

N° d'ordre
50 376
1965
120

50376
1965
120

Université de Lille — Faculté des Sciences

THÈSES

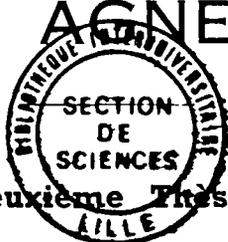
présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille

pour obtenir le grade de Docteur ès-Sciences Physiques

par

JEAN AGNERAY



Deuxième Thèse

Proposition donnée par la Faculté

Étude Théorique de la Chromatographie de Filtration sur Gels

Soutenue le 25 Novembre 1965, devant la Commission d'Examen

JURY : MM. les Professeurs J. MONTREUIL, Président
J. GERMAIN
G. BISERTE
J. E. COURTOIS

1965

P r é s e n t a t i o n .

Tout le long de cet exposé, nous avons utilisé un système unique de symboles que nous définissons une fois pour toute au chapitre II, pages 3 et 4 (feuilles roses).

Les équations sont numérotées dans l'ordre de leur apparition dans le texte. Il en est de même des références bibliographiques que nous avons regroupées dans un index alphabétique des auteurs (pages 67 à 70, feuilles jaunes).

Pour faciliter la lecture, nous avons rédigé au Chapitre IX. une "Récapitulation générale des raisonnements".

*

*

*

I N T R O D U C T I O N

La chromatographie de filtration sur gel, encore connue sous le nom de chromatographie par tamisage moléculaire (HJERREIN et KOSBACH 1), permet de fractionner un mélange en fonction du poids moléculaire de ses constituants. A la suite de considérations théoriques cherchant à expliquer le phénomène, divers auteurs ont proposé d'autres dénominations : STERNE et ACKERS (2) : chromatographie de restriction à la diffusion et PEDERSEN (3) : chromatographie d'exclusion moléculaire.

Fondamentalement nous sommes en présence d'un nouveau type de chromatographie pour laquelle le coefficient de distribution d'une substance entre la phase mobile et la phase stationnaire, est une fonction inverse de la taille de la molécule. Toutes les lois de la chromatographie de partage s'appliquent à ce nouveau type de fractionnement, le coefficient de partage (α) est remplacé par le coefficient de distribution (K_D). Dans l'état actuel des travaux, les auteurs discutent encore sur la signification physique du facteur (K_D) défini expérimentalement.

La controverse peut se résumer en deux ^{hypo-}thèses différentes mais pouvant coexister à des degrés variables.

1. - THEORIE DE RESTRICTION A LA DIFFUSION.

Les molécules de substance étudiée diffusent de la phase mobile à la phase stationnaire et inversement. Selon leur taille, ces molécules subiront une restriction plus ou moins importante à leur libre diffusion. Les petites molécules diffusent dans un volume plus grand de la phase stationnaire et seront plus difficilement éluées que les grosses molécules.

2. - THEORIE D'EXCLUSION MOLECULAIRE.

Le volume accessible à une substance dans un gel est fonction inverse des dimensions de ses molécules. Ce volume accessible pour une substance est le lieu géométrique du milieu d'une de ses molécules.

On trouve déjà des précurseurs de ce type de chromatographie dans certaines utilisations des polymères échangeurs d'ions (HELLFERRICH : 4), LATHE et RUTHVEN (5) suggèrent qu'une molécule ne peut pénétrer dans un gel d'amidon que dans la mesure où l'espace entre deux chaînes polysaccharidiques est plus grand que le diamètre de cette molécule. Le gel d'agar (ou son constituant principal : l'agarose) possède les mêmes propriétés (POLSON : 6 et HJERTEN : 7).

Le dextrane polymérisé par condensation avec l'épichlorhydrine, fournit des gels bien standardisés : les SEPHADEX (PORATH et FLODIN : 8). Le copolymère de l'acrylamide et du NN' bis méthylène-acrylamide, plus récemment commercialisé sous le nom de BIO-GEL P, nous offre une nouvelle série de supports pour chromatographie de filtration sur gel.

Dans un premier temps nous définirons les symboles et les unités qui nous sont nécessaires pour l'étude théorique de la chromatographie de filtration sur gel, et nous établirons les équations fondamentales qui dérivent de ces définitions. Nous passerons ensuite en revue les hypothèses et les travaux des principaux auteurs en cherchant à traduire leurs conclusions par des équations utilisant un système commun de variables. Enfin nous chercherons à pousser les raisonnements aussi loin que les données physiques actuellement disponibles nous le permettront, de façon à expliquer les résultats obtenus expérimentalement.

II. DEFINITION DES TERMES ET DES SYMBOLES QUE NOUS UTILISERONS TOUT LE
LONG DE CET EXPOSE.

- V_x = Volume occupé par le gel. En chromatographie c'est le volume de toute la phase stationnaire (support + liquide immobile).
- V_i = Volume de liquide de la phase stationnaire.
- V_g = Volume de la matrice solide du gel = volume occupé par les molécules du polymère constituant cette réticulation.
- V_t = Volume total d'une colonne pour chromatographie.
- V_m = Volume mort = volume de la phase mobile = $V_t - V_x$
- V_e = Volume d'éluion = volume de rétention (en chromatographie).
- V_s = Volume de séparation pour deux substances différentes sur une même colonne = $V_e - V_{e'}$
- V_d = Volume d'un dépôt sur une colonne.

En chromatographie nous pouvons définir ;

$$V_e = V_m + K_D V_i \quad (\text{Equ. 1})$$

ou encore

$$V_e = V_m + K_A V_x \quad (\text{Equ. 2})$$

$$K_D V_i = V_p \quad (\text{Equ. 3})$$

$$K_A V_x = V_p \quad (\text{Equ. 4})$$

Ces quatre définitions sont posées sans préjuger au départ de la signification réelle de K_D , K_A et V_p .

$$V_n = \text{Volume non pénétrable} = V_i - V_p$$

Nous pouvons également définir en termes algébriques les propriétés physiques d'un gel. Soit :

$$P = \text{Le poids sec de polymère correspondant à } V_x \text{ de gel.}$$

d_s = La densité du gel à l'état sec.

d_g = La densité du gel gonflé.

G = Le gonflement du gel dans l'eau ("water regain") exprimé en grammes d'eau absorbée par gramme de poids sec.

Enfin, nous appellerons :

C_p = La concentration d'un composant dans la phase stationnaire.

C_m = La concentration de ce composant dans la phase mobile.

Q_p = La quantité de composant dans la phase stationnaire.

Q_m = La quantité de composant dans la phase mobile.

$Q_T = Q_p + Q_m$

S_o : surface réelle de la section d'un pore ou surface de la section moyenne des pores d'un gel.

S : Surface effective de passage pour une molécule (ou pour une particule sphérique) de rayon = a , dans un pore de surface réelle S_o .

S_u et V_u sont utilisés pour définir respectivement une surface ou un volume unitaire dans un gel.

n^3 : nombre de petits cubes élémentaires dans une particule de gel.

n ainsi défini est utilisé pour traduire le nombre de pores, de barreaux etc... dans un gel théorique de structure cubique.

n' = nombre de pores traversé par une particule sphérique de rayon = a au bout d'un temps t .

C_p = concentration (p/v) du gel en polymère.

C_v = concentration (v/v) du gel en polymère.

l = Longueur totale des barreaux constituant la matrice de V_x de gel.

$2r$ = largeur (ou diamètre) d'un pore.

$2b$ = largeur (ou diamètre) d'un barreau.

a = rayon de STOCKE d'une molécule ou rayon d'une particule sphérique

M = poids moléculaire.

Tableau I. - Equivalence entre nos symboles et ceux utilisés par différents auteurs.

Symboles utilisés dans cet exposé.	SYMBOLES UTILISES PAR :						
	FLODIN (9)	PORATH (10)	ACKERS (11)	SQUIRE (12)	LAURENT et coll.(13)	WHITAKER (14)	ANDREWS (15)
V_x					V_x		
V_i	V_i		V_i	V_i			
V_t	V_t				V_t		
V_m	V_o	V_o	V_o	V_o	V_o	V_o	
V_e	V_e	V_e	V_e		V_e	V	V_e
K_D	K_d	K_d	K_D				
K_A					K_{av}		
V_p			V_p	V_p			
P	a						
d_s	d						
G	W						
a		R	a	r	r_s		
$2b$					$2r$		
2^r		$2A$	$2r$	$2R$			

A, A_1, A_2 etc... B, B_1, B_2 etc... sont utilisés pour représenter des constantes, des nombres ou des facteurs de proportionnalité.

Lorsque dans une équation K_D traduit une hypothèse d'interprétation on écrit :

K_{DE} = raisonnement d'exclusion moléculaire

K_{DR} = raisonnement de restriction à la diffusion.

III. - DONNEES PRATIQUES SUR LES GELS COMMERCIALEMENT DISPONIBLES.

Conventionnellement on définit un SEPHADEX par le poids d'eau utilisé pour obtenir le gonflement maximum de 10 g. de poudre sèche. On obtient donc le gonflement (G) en divisant ce nombre conventionnel par 10. Le gonflement dans l'eau est fonction inverse du nombre de ponts glycéryls. Une réticulation très importante s'oppose à la dilatation dans l'eau des grains de SEPHADEX. C'est ainsi que le SEPHADEX G. 10 est très finement réticulé alors que les mailles du SEPHADEX G. 200 seront beaucoup plus lâches. La taille des grains de ces produits est généralement comprise entre 40 et $120 \cdot 10^{-4}$ cm.

SEPHADEX commercialément disponibles.	limite d'exclusion ex- primée en poids molé- culaire.
- G. 10	700
- G. 15	1 500
- G. 25	3 000
- G. 50	9 000
- G. 75	45 000
- G. 100	100 000
- G. 200	200 000

Tableau II. - SEPHADEX COMMERCIALEMENT DISPONIBLE
(PHARMACIA -UPPSALA- Suède).

Cet exposé était en cours d'impression lorsque nous avons appris que la firme PHARMACIA ajoutait à son catalogue le SEPHADEX G. 150, dont la limite d'exclusion est de 150 000.

Un BIO-GEL est défini par un nombre conventionnel qui est approximativement le millième du poids moléculaire de la plus petite molécule exclue par ce gel.

BIO-GEL	Limite d'exclusion exprimée en poids moléculaire	Gonflement g. eau/g. sec
- P. 2	1 600	1,3 à 1,6
- P. 4	3 600	2,6
- P. 6	4 600	3,2
- P. 10	10 000	5,1
- P. 20	20 000	5,4
- P. 30	30 000	6,2
- P. 60	60 000	6,8
- P. 100	100 000	7,5
- P. 150	150 000	9,0
- P. 200	200 000	13,5
- P. 300	300 000	22,0

Tableau III : BIO-GELS COMMERCIALEMENT DISPONIBLES
(BIO-RAD ; RICHMOND -CAL. E-U.)

Le BIO-GEL P. 2 est disponible sous plusieurs formes (50 à 100 mesh., 100 à 200 mesh. et 200 à 400 mesh.) (tamis mouillé). Les autres sont livrés sous la forme 50 à 150 mesh.

IV. - EQUATIONS FONDAMENTALES POUVANT ETRE ETABLIES EN TENANT COMPTE
DES PROPRIETES DU GEL ET DE LA DEFINITION DES CONSTANTES.

A- SIGNIFICATION DE K_D ET DE K_A .

En combinant les équations 1, 2, 3 et 4 on peut écrire :

$$K_D = \frac{V_e - V_m}{V_i} = \frac{V_p}{V_i} \quad (\text{Equ. 5}).$$

$$K_A = \frac{V_e - V_m}{V_x} = \frac{V_p}{V_x} \quad (\text{Equ. 6}).$$

K_D et K_A expriment donc les rapports entre deux volumes : V_p d'une part et V_i ou V_x d'autre part. Ils sont établis pour un composé chimique dont le comportement est étudié en chromatographie.

De par sa définition V_p est un volume obtenu expérimentalement. Le fait de lui donner une signification implique le choix d'une hypothèse d'interprétation du phénomène :

1- V_p peut représenter la fraction de V_i ou V_x accessible à une molécule donnée (hypothèse d'exclusion moléculaire).

2- V_p peut représenter un volume virtuel qui traduit une relation algébrique entre K_D et V_i d'une part et K_A et V_x d'autre part. (hypothèse de restriction à la diffusion).

$$\text{-d'après l'équ. 5 : } V_p = K_D V_i \quad (\text{Equ. 7}).$$

$$\text{-d'après l'équ. 6 : } V_p = K_A V_x \quad (\text{Equ. 8}).$$

Avec les deux hypothèses que nous avons retenues V_p ne peut-être qu'une fraction de V_i . Le coefficient de distribution K_D est donc compris entre zéro et 1. L'eau tritiée, dont le K_D est forcément identique à celui de l'eau (= 1), permet la mesure expérimentale de V_i . Le chlorure de potassium dont le K_D est très élevé ($K_D = 0,98$ sur SEPHADEX G. 25) est d'utilisation plus économique et donne une précision suffisante pour la plupart des cas.

Les très grosses molécules ne pénétreraient absolument pas dans la phase stationnaire, et leur $K_D = 0$. L'encre de Chine, le "bleu dextran" ou la thyroglobuline permettent de mesurer le volume mort (V_m) d'une colonne.

Dans quelques rares cas on peut trouver un K_D supérieur à 1. Il faut alors admettre l'intervention de phénomènes d'adsorption sur la trame polysaccharidique du gel. Les dérivés aromatiques ou hétérocycliques fournissent de nombreux exemples de ce phénomène.

B- EQUATIONS FONDAMENTALES EXPRIMANT LES DIFFERENTS VOLUMES EN FONCTION DES CONSTANTES PHYSIQUES DU GEL.

Le volume de liquide de la phase stationnaire peut-être calculé en connaissant le poids sec et le gonflement du gel.

$$V_i = G.P \quad (\text{Equ. 9.})$$

Nous supposons que la densité de l'eau est égale à l'unité.

Une partie de ^{ce} volume de phase stationnaire est constituée par de l'eau d'hydratation fortement liée aux chaînes du polymère et donc inactive comme solvant. Dans le cas de chaîne polysaccharidique le volume de l'eau liée peut atteindre environ 20 p. 100 de celui de la phase stationnaire (LATURAZE -16-). Lorsque ce volume d'eau liée est connu, on doit le retrancher de V_i et l'ajouter à V_g : volume occupé par les molécules du polymère constituant la réticulation du gel. Avec cette restriction on peut aussi écrire :

$$V_g = \frac{P}{d_s} \quad (\text{Equ. 10}).$$

$$\begin{aligned} V_x &= V_g + V_i \\ &= P \left(G + \frac{1}{d_s} \right) = \frac{P}{d_s} (G \cdot d_s + 1) \quad (\text{Equ. 11}). \end{aligned}$$

C- EQUATIONS FONDAMENTALES EXPRIMANT LA CONCENTRATION DU GEL EN POLYMERE EN FONCTION DES CONSTANTES PHYSIQUES.

$$C_v = \frac{V_g}{V_x}$$

d'après les équations 10 et 11 on peut écrire :

$$C_v = \frac{1}{G \cdot d_s + 1} \quad (\text{Equ. 12}).$$

et

$$C_p = C_v \cdot d_s = \frac{d_s}{G \cdot d_s + 1} \quad (\text{Equ. 13}).$$

D- RELATION ENTRE LA DENSITE DU POLYMERE A L'ETAT SEC ET SA DENSITE APRES GONFLEMENT DANS L'EAU.

Par définition : $d_s = \frac{P}{V_g}$ (Equ. 14).

et $d_g = \frac{\text{poids de } V_x}{V_x} = \frac{\text{poids de } (V_i + V_g)}{V_x}$ (Equ. 15)

D'après l'équation 11 :

$$d_g = \frac{(G \cdot P + P)}{P (G \cdot d_s + 1)} = \frac{d_s (G + 1)}{(G \cdot d_s + 1)} \quad (\text{Equ. 16}).$$

En introduisant C_p d'après sa valeur de l'équ. 13 :

$$d_g = C_p (G + 1) \quad (\text{Equ. 17}).$$

E- SIGNIFICATION DE $G \cdot d_s$:

Des équations 9 et 10 on peut tirer des valeurs de G et de d_s et écrire :

$$G \cdot d_s = \frac{V_i}{P} \cdot \frac{P}{V_g} = \frac{V_i}{V_g} \quad (\text{Equ. 18}).$$

$G \cdot d_s$ est donc le rapport entre le volume de liquide de la phase stationnaire et le volume de la matrice solide du gel.

F- RELATION ALGEBRIQUE ENTRE K_D ET K_A .

Ces coefficients ont une signification analogue. Selon les raisonnements à élaborer on peut passer de l'un à l'autre par une relation algébrique simple.

D'après les équations 5 et 6 on peut écrire :

$$\frac{K_A}{K_D} = \frac{V_i}{V_i + V_g}$$

en remplaçant V_i et V_g par leur valeur des équations 9, 10 et 11.

$$\frac{K_A}{K_D} = \frac{G.P \cdot d_s}{P (G.d_s + 1)}$$

en introduisant C_p d'après sa valeur de l'équation 13 :

$$K_A = K_D \cdot C_p \cdot G \quad (\text{Equ. 19}).$$

ou

$$K_A = K_D \cdot C_v \cdot G \cdot d_s \quad (\text{Equ. 20}).$$

V.- EXPERIENCES TENDANT A ETABLIR UNE RELATION ENTRE LE COEFFICIENT DE DISTRIBUTION (K_D) ET LE POIDS MOLECULAIRE.

=====

Sur une période de quelques années un nombre considérable de travaux prouvent que la chromatographie sur gel séparent les constituants d'un mélange en fonction de leur dimension moléculaire. La plupart de ces utilisations de la chromatographie sur gel se limitent volontairement à une utilisation pratique dans un but d'isolement ou d'identification.

Un nombre plus restreint d'auteurs cherche à préciser le paramètre moléculaire qui doit traduire le K_D d'un composé.

Sur SEPHADEX, GARNATH et FLODIN (17) trouvent pour une série de molécules de dextrane un rapport linéaire entre $\log M$ et $\frac{V_e}{V_t}$.

Ce que nous pouvons écrire :

$$\frac{V_e}{V_t} = A + B \log M \quad (\text{Equ. 21}).$$

WILTAKER (18) trace expérimentalement la courbe représentant les variations de $\frac{V_e}{V_m}$ en fonction de $\log M$, avec le SEPHADEX G. 75 et G. 100. Les droites qu'il obtient peuvent se traduire par l'équation :

$$\frac{V_e}{V_m} = A_1 + B_1 \log M \quad (\text{Equ. 22}) \quad (\text{Figure N° 1}).$$

Enfin ANDREWS (19 - 20 - 21) obtient avec le SEPHADEX G. 75 et G. 100, une relation linéaire entre V_e et le $\log M$, que l'on peut écrire :

$$V_e = A_2 + B_2 \log M \quad (\text{Equ. 23}) \quad (\text{Figure N° 2}).$$

Les trois équations 21, 22 et 23 sont en fait équivalentes, car pour une colonne donnée et dans des conditions expérimentales constantes V_t et V_m sont constants. Nous retiendrons donc l'équation 22 qui nous paraît mieux présenter les résultats.

$$\frac{V_e}{V_m} = A + B \cdot \log (M) \quad (\text{Equ. 22}).$$

mais d'après l'équation 1 : $V_e = V_m + K_D \cdot V_i$

donc :
$$\frac{V_e}{V_m} = 1 + K_D \frac{V_i}{V_m} \quad (\text{Equ. 24}).$$

En combinant les équations 22 et 24, on obtient :

$$1 + K_D \frac{V_i}{V_m} = A + B \cdot \log (M)$$

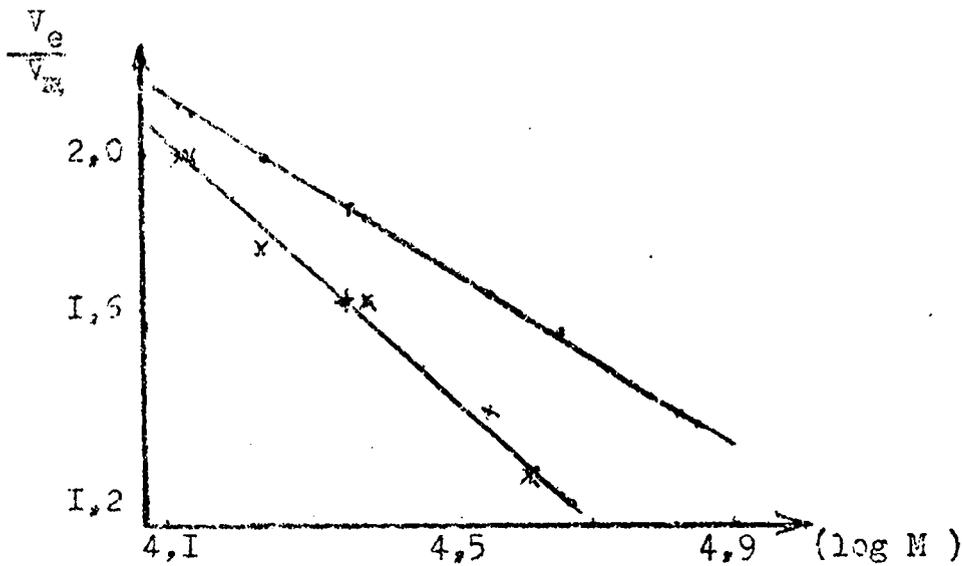


Figure n°1 : Variations de $\frac{v_e}{v_m}$ en fonction de $\log M$.

••• : sur une colonne de SEPHADEX G.100 (1,1 x 192 cm.)

x x x : sur une colonne de SEPHADEX G.75 (1,2 x 184 cm.)

(WHITAKER, 22)

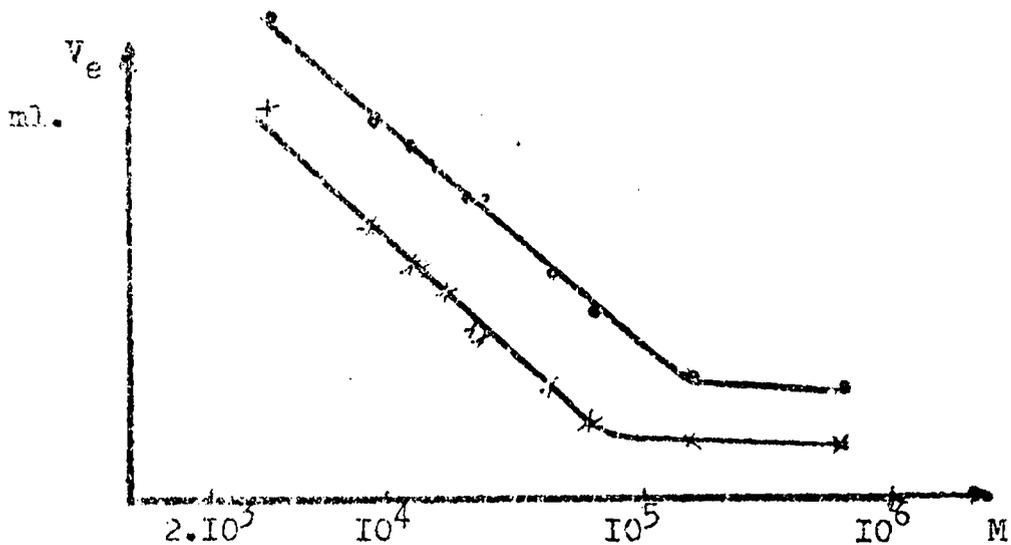


Figure n°2 : Variations de V_e en fonction de M (coordonnées semi-logarithmiques)

••• : sur une colonne de SEPHADEX G.100 (2,4 x 50 cm.)

x x x : sur une colonne de SEPHADEX G.75 (2,4 x 50 cm.)

(ANDREWS ,23)

Pour une expérience donnée $\frac{V_1}{V_m}$ est constant (= A_1)

$$A_1 \cdot K_D = (A - 1) + B \cdot \log (M)$$

$$K_D = A_2 + B_2 \log (M)$$

(Equ. 25).

Donc les travaux de ces auteurs aboutissent à la conclusion commune que le coefficient de distribution (K_D) d'une substance est une fonction linéaire de son poids moléculaire.

Malheureusement lorsque l'on cherche à établir expérimentalement une relation entre le K_D et le poids moléculaire, les résultats semblent beaucoup moins homogènes. Pour PORATH (24) on peut écrire :

$$K_D^{1/3} = A_3 + B_3 \cdot M^{1/2} \quad (\text{Equ. 26}).$$

Pour ALBERTSON (25) et pour HJERTEN et MOSBACH (26) les résultats expérimentaux peuvent se traduire par :

$$M = A_4 + B_4 \log (K_D) \quad (\text{Equ. 27}).$$

DISCUSSION.

Il faut tout de suite remarquer que la plupart des courbes que nous trouvons dans la bibliographie présentent en abscisse les poids moléculaires exprimés entre $2 \cdot 10^3$ et 10^6 , ce qui oblige à utiliser une échelle extrêmement grande ou alors à prendre des coordonnées semi-logarithmiques. Il est évident que de toute façon l'on n'obtient jamais une bien grande sensibilité. Par ailleurs, lorsque l'on travaille sur des protéines connues pour contrôler une hypothèse ou l'expression algébrique d'une théorie, les constantes physiques de ces composés de référence ne sont établies qu'avec une certaine approximation : parfois ± 10 p. 100. La combinaison d'une échelle très large et de constantes de références assez imprécises peut expliquer que toutes les expériences cherchant à contrôler la valeur de diverses théories aboutissent toujours à d'assez bonnes corrélations.

VI. - RAISONNEMENT EN FONCTION D'ELEMENTS JUSTIFIANT UNE RESTRICTION
A LA LIBRE DIFFUSION D'UNE MOLECULE DANS LA PHASE STATIONNAIRE.

Travaux de ACKERS (27).

On détermine expérimentalement le K_D de toute une série de molécules de protéines selon deux méthodes différentes mais dans des conditions aussi comparables que possible (pH, force ionique, concentration en protéine, etc...)

- 1ère méthode : par chromatographie sur colonne en appliquant l'équation fondamentale (Equ. 1).

$$V_e = V_m + K_D V_i$$

et en posant $K_D = \frac{V_p}{V_i}$ (Equ. 3) sans préjuger de la signification de V_p .

- 2ème méthode : on réalise l'équilibre complet entre les deux phases (intérieure et extérieure aux particules de gel). Un poids de gel (p) est mis à gonfler dans une solution de protéines (contenant Q_t g. de la substance à étudier) on complète à V_t ml. et on laisse reposer jusqu'au lendemain. On mesure la concentration en protéine dans le liquide surnageant ($= C_m$).

Dans cette seconde méthode, l'équilibre de concentration entre les phases est certainement réalisé ce qui, à priori, ne peut être admis dans l'expérience chromatographique. Ceci permet d'établir de nouvelles équations pour cette expérience.

$$V_p = \frac{\text{quantité de protéine dans la phase stationnaire}}{\text{concentration de protéine dans cette phase}} = \frac{Q_p}{C_p}$$

$$V_p = \frac{Q_t - Q_m}{C_p} = \frac{Q_t - C_m \cdot V_m}{C_p} \quad (\text{Equ. 28}).$$

Ce qui permet de calculer V_p car $C_p = C_m$.

$$\text{or } K_D = \frac{V_p}{V_i} = \frac{Q_t - C_m \cdot V_m}{V_i \cdot C_p}$$

$$\text{d'où } K_D \cdot V_i = \frac{Q_t}{C_m} - V_m \quad (\text{Equ. 29}).$$

Ce qui permet de calculer $K_D \cdot V_i$

Par ailleurs la quantité totale de protéine se retrouve dans les deux phases. D'où :

$$Q_t = V_m \cdot C_m + V_p \cdot C_p$$

D'où l'on tire une valeur de $\frac{Q_t}{C_m}$ que l'on reporte dans l'équation 29 pour obtenir :

$$K_D = \frac{V_p \cdot C_p}{V_i \cdot C_m} \quad (\text{Equ. 30}).$$

cette équation n'est valable que pour $C_p = C_m$. Elle permet lors de la deuxième expérience de calculer K_D à partir des résultats des équations 28 et 29.

Si le coefficient de distribution (K_D) est uniquement fonction du volume relatif accessible à une protéine, sa valeur obtenue à l'équilibre dans la deuxième expérience devrait être identique à celle établie par chromatographie et on doit pouvoir écrire en combinant l'équation fondamentale 1 et l'équation 30 :

$$\boxed{K_D = \frac{V_e - V_m}{V_i} = \frac{V_p \cdot C_p}{V_i \cdot C_m}} \quad (\text{Equ. 31}).$$

ACKERS (28) effectue ces calculs de K_D avec des échantillons de SEPHADEX G. 75, G. 100 et G. 200. Il obtient les courbes que nous reproduisons figures N° 3, 4 et 5. Il est évident que pour un SEPHADEX G. 75 l'hypothèse de l'équation 31 est vérifiée. Pour le SEPHADEX G. 200 l'hypothèse n'est pas confirmée et il faut remplacer l'équation 31 par l'inégalité :

$$\frac{V_e - V_m}{V_i} < \frac{V_p \cdot C_p}{V_i \cdot C_m} \quad (\text{Equ. 32}).$$

D'après la figure N° 5 il apparaît que cette inégalité est fonction de la taille de la molécule étudiée.

Pour expliquer ce phénomène ACKERS (30) propose d'assimiler la région pénétrable du gel à un ensemble de cylindres. La limitation à la libre diffusion d'une molécule dans une telle structure, peut se décomposer en deux facteurs :

- 1- Limitation au passage par l'entrée circulaire du pore.
- 2- Une fois pénétrée dans le cylindre, la molécule subit des frottements sur les parois, ce qui limite ainsi la libre diffusion.

ACKERS spécifie bien que ce schéma est probablement plus simple que la réalité. Nous reviendrons sur ce point lors de la discussion.

Les équations, permettant le calcul de ces deux coefficients, ont été établies par RENKIN (32) lors d'une étude de la filtration, de la diffusion et du tamisage moléculaire au travers de diverses membranes de nature cellulosique.

I. - Limitation au passage par l'entrée circulaire d'un pore :

soit a : le rayon de STOCKE de la molécule.

r : le rayon du pore.

La surface de l'entrée du pore ($= S_0$).

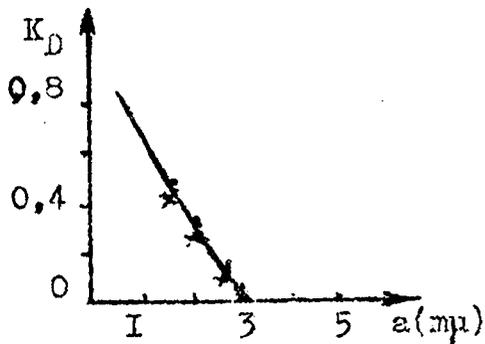


Figure n°3

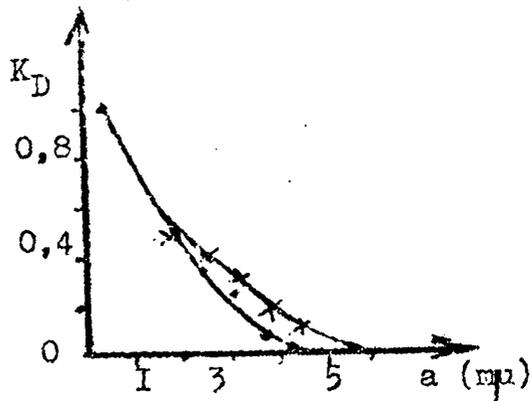


Figure n°4

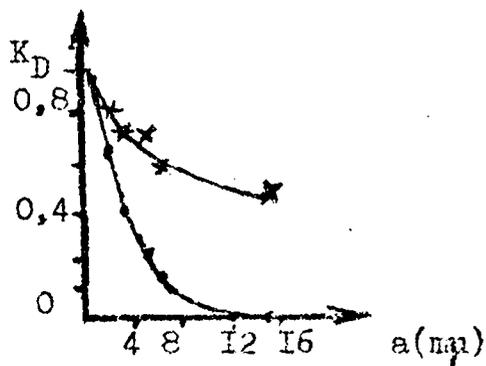


Figure n°5

Mesure du coefficient de distribution par chromatographie(...)
et par mesure à l'équilibre(x x x) : ACKERS (29)

Figure n°3 : expérience avec le SEPHADEX G.75.

Figure n°4 : expérience avec le SEPHADEX G.100.

Figure n°5 : expérience avec le SEPHADEX G.200.

$$S_0 = \pi r^2$$

Soit S la surface effective de passage d'une molécule de rayon = a dans le pore de rayon = r, elle peut être représentée par le lieu géométrique du milieu de cette molécule, donc du centre de sa section circulaire dans le plan de S_0 . Ce lieu est le cercle de rayon=(r - a).

$$S = \pi (r - a)^2$$

$$\frac{S}{S_0} = \frac{(r - a)^2}{r^2} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \quad (\text{Equ. 33}).$$

2. - Frottement limitant la diffusion d'une particule sphérique dans un cylindre.

Ce phénomène a été étudié expérimentalement par LADENBURG (33) et TAKEN (34) en a fait l'étude théorique que LANE (35) a appliqué à la diffusion au travers d'une membrane selon l'équation :

$$\frac{S}{S_0} = 1 - 2,104 \left(\frac{a}{r}\right) + 2,09 \left(\frac{a}{r}\right)^3 - 0,95 \left(\frac{a}{r}\right)^5 \quad (\text{Equ. 34}).$$

Cette équation est valable pour des valeurs de $\frac{a}{r}$ pouvant descendre plus bas que 0,08 (RENKIN -36-). Malheureusement les auteurs ne précisent pas les limites supérieures de la validité de cette expression. Cette limite doit exister car pour $a = r$, le rapport S/S_0 ne tend pas vers zéro.

Pour obtenir la limitation totale à la libre diffusion RENKIN (37) multiplie les deux facteurs et obtient :

$$\frac{S}{S_0} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \left\{ 1 - 2,104 \left(\frac{a}{r}\right) + 2,09 \left(\frac{a}{r}\right)^3 - 0,95 \left(\frac{a}{r}\right)^5 \right\} \quad (\text{Equ. 35})$$

Au cours d'une expérience sur gel d'agar à diverses concentrations ACKERS et STIBBE (38) montrent que :

$$\frac{S}{S_0} = \frac{D}{D_0} \quad (\text{Equ. 36}).$$

D représente le coefficient de diffusion de la molécule de rayon a dans le milieu poreux et D_0 son coefficient de libre diffusion.

ACKERS (39) propose donc l'équation :

$$K_D = \frac{V_e - V_m}{V_i} = \frac{S}{S_0} \quad (\text{Equ. 37})$$

S/S_0 pouvant se traduire par sa valeur de l'équation 35.

La comparaison entre les coefficients de distribution (K_D) obtenus expérimentalement par chromatographie et ceux obtenus par le calcul au moyen de l'équation 37 présentent une assez bonne corrélation, si la courbe traduisant les variations de K_D est tracée en fonction de a/r . Si les mêmes données expérimentales sont utilisées pour exprimer K_D en fonction du logarithme du poids moléculaire les résultats sont beaucoup moins satisfaisants.

- DISCUSSION -

Ce travail constitue un apport fondamental pour l'étude théorique du phénomène. Pour un rayon de pore (r) faible (SEPHADEX G. 75) on ne peut étudier que des molécules de faible rayon et dans ce cas le fractionnement s'effectue selon la théorie de l'exclusion moléculaire.

Pour des pores de rayon (r) plus important (SEPHADEX G. 200) le phénomène d'exclusion moléculaire semble jouer un rôle mineur et il faut faire intervenir des facteurs traduisant les limitations à la libre diffusion des molécules.

Nous avons tracé figure N° 6 les courbes correspondant aux équations 33, 34 et 37. Notons dès maintenant que la courbe $y_4 = (1 - \frac{a}{r})^4$ est extrêmement voisine de la courbe $y_2 = K_D$ de l'équation 37 et que expérimentalement il serait difficile de les séparer d'autant plus que r (= rayon d'une molécule tout juste exclue du gel) n'est pas connu avec précision.

Si sur les abscisses de cette figure nous faisons figurer a au lieu de a/r , les courbes ne changent pas si nous multiplions l'échelle des abscisses par r . On peut tout d'abord constater que la mesure expérimentale de r est pratiquement impossible car pour $a = 0,7 r$ les courbes y_2 et y_4 sont pratiquement confondues avec l'axe des abscisses.

Tout le raisonnement d'ACKERS repose sur la courbe de la figure N° 5 qui met en évidence un K_D beaucoup plus grand dans le cas des mesures à l'équilibre (deuxième expérience), que dans celui des mesures par chromatographie. Or, en examinant minutieusement cette courbe, on peut observer que seule point correspondant à $a = 150 \text{ \AA}$ détermine la forme de la courbe entre $a = 60 \text{ \AA}$ et $a = 160 \text{ \AA}$. Ce point extrême est obtenu lors d'une expérience avec un virus. Toute dépolymérisation ou adsorption se produisant pendant le temps nécessaire pour obtenir l'équilibre entraîne une augmentation artificielle du K_D .

Cette restriction mise à part, il faut justifier par des considérations théoriques, ces courbes établies expérimentalement et expliquer les différences de comportement des gels en chromatographie et à l'équilibre. Nous reprendrons cette discussion lorsque nous aurons passé en revue les autres travaux théoriques.

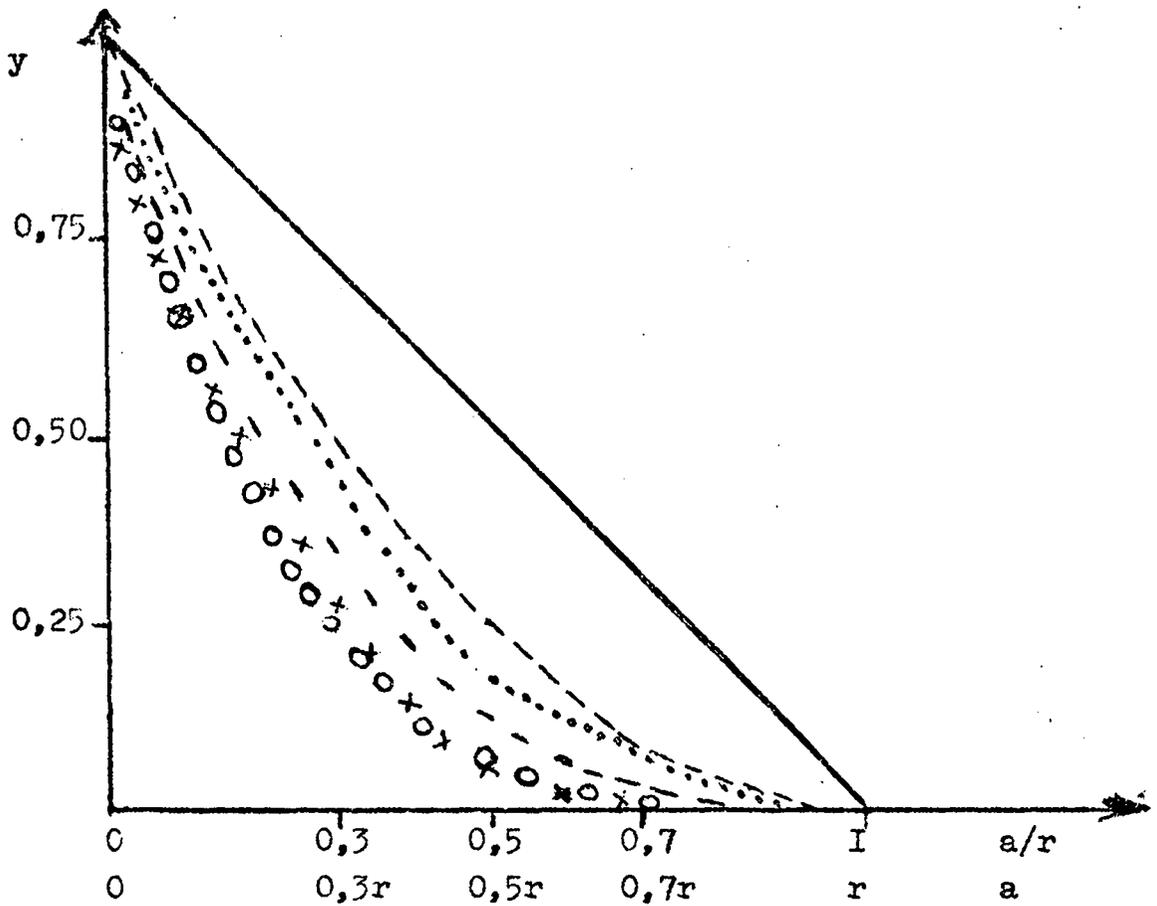


Figure n°6 :

(- - - -) $y = (1 - \frac{a}{r})^2$ (équ.33)

(.....) $y_I = (1 - 2,104(\frac{a}{r}) + 2,09(\frac{a}{r})^3 - 0,95(\frac{a}{r})^5$ (équ.34)

(xxxxxxx) $y_2 = (1 - \frac{a}{r})^2 (1 - 2,104\frac{a}{r} + 2,09(\frac{a}{r})^3 - 0,95(\frac{a}{r})^5$ (équ.37)

(- - -) $y_3 = (1 - \frac{a}{r})^3$

(o o o o) $y_4 = (1 - \frac{a}{r})^4$

(———) $y_5 = 1 - \frac{a}{r}$

VII. - RAISONNEMENT EN FONCTION DU CALCUL DU VOLUME ACCESSIBLE A UNE
MOLECULE.

Il est universellement admis que la vitesse d'écoulement d'une chromatographie ne modifie en rien le rapport V_e/V_m donc le K_D des dérivés soumis à l'expérience. C'est en tenant compte de cette constatation fondamentale que de nombreux auteurs éliminent au départ toute intervention possible de phénomènes de diffusion.

PORATH (41 et 42) propose d'assimiler le gel à une structure géométrique simple, ce qui permet de calculer le volume accessible à une molécule de rayon connu. SQUIRE (43) généralise ce raisonnement et cherche à calculer le volume accessible dans un système complexe comprenant des pores de forme conique, cylindrique et parallélépipédique.

A- Raisonnement selon PORATH (44).

On suppose que certaines molécules ne peuvent pénétrer à l'intérieur du gel que dans la mesure où elles ne se heurtent pas aux chaînes de polymère constituant la réticulation solide de ce gel. Les ouvertures à la surface du gel sont probablement de forme irrégulière. Il en est de même de la forme et du revêtement des pores. Supposons que ces pores soient de forme conique et de dimension moyenne :

$$\begin{aligned} \text{rayon de base} &= r \\ \text{profondeur totale} &= H \end{aligned}$$

$$\text{Le volume moyen d'un pore} = V = \frac{\pi}{3} r^2 \cdot H \quad (\text{Equ. 38.})$$

Une molécule de rayon = a (a plus petit que r) pourra diffuser à l'intérieur d'un pore jusqu'à une profondeur h. Le lieu géométrique de ses

déplacements à l'intérieur de ce pore est représenté par un cône homothétique à celui du pore et de volume $= v = \frac{\pi}{3} h (r - a)^2$ (equ. 39)

Le coefficient de distribution (K_D) est proportionnel au rapport des deux volumes V et v .

$$\begin{aligned} K_D &= A \frac{v}{V} \\ &= A \frac{h \cdot (r - a)^2}{H \cdot r^2} = A \frac{h}{H} \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \quad (\text{Equ. 40}). \end{aligned}$$

A est une constante de proportionnalité. Par ailleurs h et H sont eux-mêmes fonction de a et r .

$$\frac{h}{H} = \frac{r - a}{r} = 1 - \frac{a}{r}$$

donc, l'équation 40 devient :

$$K_D = A \left(1 - \frac{a}{r}\right)^3 \quad (\text{Equ. 41}).$$

Par ailleurs le volume r^3 est certainement proportionnel au volume de solvant dans la phase stationnaire, donc de l'eau utilisée pour le gonflement du gel.

$$r^3 = B \cdot V_i = B (G - x) \quad (\text{Equ. 42}).$$

B est une constante de proportionnalité - x représente la fraction de l'eau à l'intérieur du gel qui est fortement liée à la matrice et qui ne possède aucun pouvoir solvant.

Pour des molécules d'une même série chimique, on admet que " a " représente le rayon de rotation ("gyration radius"). Celui-ci est proportionnel

à la racine carrée du poids moléculaire (M) (ZIMM et STOCKMEYER -45-).

$$a = B_1 M^{1/2} \quad (\text{Equ. 43}).$$

Reportons les valeurs de a et de r des équations 42 et 43 dans l'équation 41 :

$$K_{DE} = A \left\{ 1 - \frac{B_1 \cdot M^{1/2}}{B \cdot (G - x)^{1/3}} \right\}$$

$$K_{DE} = A \left\{ 1 - A_1 \frac{M^{1/2}}{(G - x)^{1/3}} \right\} \quad (\text{Equ. 44}).$$

A et A_1 sont des constantes de proportionnalité.

En faisant intervenir les valeurs des équations 1 et 9 :

$$V_e = V_m + K_D \cdot V_i \quad (\text{Equ. 1}).$$

$$V_i = G \cdot P \quad (\text{Equ. 9}).$$

L'équation 44 devient :

$$K_{DE} = \frac{V_e - V_m}{G \cdot P} = A \left\{ 1 - \frac{A_1 \cdot M^{1/2}}{(G - x)^{1/3}} \right\}^3 \quad (\text{Equ. 45}).$$

Cette équation permettrait d'une part de mesurer le K_{DE} chromatographique d'une substance et d'autre part de comparer ce K_{DE} avec le poids moléculaire en fonction de la théorie d'exclusion moléculaire. Les auteurs obtiennent ainsi une assez bonne corrélation entre les K_{DE} chromatographiques et les K_{DE} calculés (dernier membre de l'équation 45).

B- Raisonnement selon SQUIRE (46).

$$\text{Le volume d'un pore c\^onique} = \frac{\pi r^3}{3 \tan \alpha}$$

α est l'angle d'ouverture du c\^one et r le rayon de la base.

R\^eduisant implicitement le syst\^eme \`a un seul pore, l'auteur pose :

$$V_i = \frac{\pi r^3}{3 \tan \alpha} = B \cdot V_m \quad (\text{Equ. 46}).$$

$$\text{avec } \frac{V_i}{V_m} = B \quad (\text{Equ. 47}).$$

Le volume accessible pour une particule sph\^erique de rayon a est un c\^one homoth\^etique de celui du pore dont la base poss\^ede un rayon de $(r - a)$.

$$V_p = \frac{\pi (r - a)^3}{3 \tan \alpha} \quad (\text{Equ. 48}).$$

En combinant les \^equations 46, 47 et 48, on obtient :

$$\frac{V_p}{V_i} = \frac{(r - a)^3}{r^3} = \frac{V_p}{B \cdot V_m}$$

$$V_p = B \cdot V_m \left(1 - \frac{a}{r}\right)^3 \quad (\text{Equ. 49}).$$

Les \^equations fondamentales 1 et 3 peuvent s'\^ecrire :

$$V_e = V_m + K_D \cdot V_i = V_m + V_p$$

En rempla\^cant V_p par sa valeur de l'\^equation 49, on obtient :

$$V_e = V_m + B \cdot V_m \left(1 - \frac{a}{r}\right)^3 \quad (\text{Equ. 50}).$$

Notons au passage que cette façon de mener les c. culs aboutit à faire disparaître l'angle d'ouverture du cône, qui combiné à r en détermine la profondeur.

On peut appliquer un calcul analogue pour un cylindre de paramètres h et r .

$$V_i = h \cdot r^2 = B \cdot V_m \quad (\text{Voir Equ. 47}).$$

$$V_p = h (r - a)^2$$

$$\frac{V_p}{V_i} = \frac{(r - a)^2}{r^2} = \frac{V_p}{B \cdot V_m}$$

$$V_p = B \cdot V_m \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2$$

$$V_e = V_m + V_p = V_m + B \cdot V_m \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \quad (\text{Equ. 51}).$$

Dans le cas d'un parallélépipède de paramètres : h , l et $2r$.

$$V_i = 2 r \cdot l \cdot h = B \cdot V_m \quad (\text{Voir Equ. 47}).$$

$$V_p = 2 (r - a) l \cdot h$$

$$\frac{V_p}{V_i} = \frac{2 (r - a) l \cdot h}{2 r \cdot l \cdot h} = \left(1 - \frac{a}{r}\right) = \frac{V_p}{B \cdot V_m}$$

$$V_p = B \cdot V_m \left(1 - \frac{a}{r}\right)$$

$$V_e = V_m + V_p = V_m + B \cdot V_m \left(1 - \frac{a}{r}\right) \quad (\text{Equ. 52}).$$

Nous insistons sur le fait que dans les équations 50, 51 et 52, B est identique et correspond à la définition de l'équation 47. Notons aussi que cette façon de mener les calculs conduit à éliminer la hauteur du cylindre ainsi que la largeur et la hauteur du parallélépipède, ce qui aboutit à un résultat mathématiquement très curieux : dans le cas d'un cône le volume d'é-
lution est fonction de $\left(1 - \frac{a}{r}\right)^3$, dans le cas d'un cylindre il est fonction de $\left(1 - \frac{a}{r}\right)^2$, et dans le cas d'un parallélépipède il est fonction de $\left(1 - \frac{a}{r}\right)^3$.

Pour poursuivre le raisonnement, il faut attribuer à chacune des formes géométriques un coefficient représentant sa participation au volume intérieur total du gel (V_1). Pour ce faire, SQUIRE "spécifie" que :

- dans l'équation 50 (cas d'un cône) $B = 3g^3$
- dans l'équation 51 (cas d'un cylindre) $B = 9g^2$
- dans l'équation 52 (cas d'un parallélépipède) $B = 9g$

"car cela permet d'obtenir une équation relativement simple et cadrant assez bien avec les résultats expérimentaux" !!!.

$$\frac{V_p}{V_m} = \left\{ 1 + g \left(1 - \frac{a}{r}\right) \right\}^3 \quad (\text{Equ. 53}).$$

Ceci correspond à admettre que le nombre de cônes dans une particule de gel est beaucoup plus important que le nombre de cylindres et considérablement plus important que celui des parallélépipèdes.

L'auteur admet par ailleurs que le rayon (a) d'une molécule est proportionnel à la racine cubique de son poids moléculaire et peut écrire :

$$\frac{V_p}{V_m} = \left\{ 1 + g \left(1 - \frac{M^{1/3}}{C^{1/3}} \right) \right\}^3 \quad (\text{Equ. 54}).$$

C étant le poids moléculaire d'une protéine totalement exclue du gel, la signification de la constante : g est assez complexe mais SQUIRE l'établit expérimentalement lors de l'étalonnage d'une colonne.

L'auteur applique cette équation à un grand nombre de molécules et trouve dans l'ensemble une assez bonne corrélation entre les résultats expérimentaux de plusieurs auteurs et les poids moléculaires admis pour ces protéines.

- DISCUSSION -

Admettons avec SQUIRE (44) que d'une part le volume intérieur du gel puisse être représenté par un assemblage géométrique simple et que d'autre part, seul le principe d'exclusion moléculaire intervient dans la définition de l'équation fondamentale 1. Il est possible d'effectuer le calcul de V_p de façon plus orthodoxe.

Un volume peut toujours s'exprimer sous la forme de :

$$V = \Lambda \cdot r^3 \quad (\text{Equ. 55}).$$

Dans le cas d'un cube ou d'une sphère r représente le seul paramètre. Dans des cas plus compliqués, r représente la moyenne des paramètres. Pour les formes géométriques très complexes r représente un paramètre algébrique défini par l'équation 55.

$$\text{Donc : } V_i = A \cdot r^3$$

$$V_p = A_1 (r - a)^3$$

On peut admettre que $A \neq A_1$ car les deux volumes ont certainement des formes assez voisines, seuls les angles vifs de V_i ne se retrouveront pas dans V_p . On peut donc écrire avec une approximation acceptable :

$$K_{DE} = \frac{V_p}{V_i} = \frac{(r - a)^3}{r^3}$$

$$K_{DE} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^3 \quad (\text{Equ. 56}).$$

Cette équation est à comparer avec l'équation 41 de PARATH (47). Elle ne diffère que par un coefficient de proportionnalité dont la signification est difficile à expliquer.

L'équation 56 doit aussi être comparée avec les équations 35 et 37 d'ACKERS (48). La signification de r en est la même car si le pore est supposé cylindrique il pourrait tout aussi bien avoir une autre forme car à aucun moment on ne fait intervenir la hauteur de ce cylindre.

On peut voir figure N° 6 que la courbe $K_D = y_2$ correspondant à l'équation 37 est assez voisine de la courbe $K_D = y_3$ de l'équation 56. Vu le manque de précision de notre connaissance des rayons moléculaires, il semble peu probable que des expériences, mêmes minutieuses, puissent trancher le débat en faveur de l'un ou l'autre des hypothèses.

Toutefois, tous les raisonnements que nous venons de passer en revue sont en défaut sur le même point : ils supposent que les parois des pores du gel sont assimilables à des surfaces. Or il est évident que ces parois sont constituées par des chaînes de polymères et il serait plus vraisemblable de les comparer à un assemblage de barreaux disposés de façon plus ou moins régulière.

Cette considération nous amène à prévoir un coefficient de correction ayant pour effet de diminuer le deuxième facteur de l'équation 37, celui qui traduit le frottement sur les parois lisses d'un cylindre. Donc, on peut prévoir un K_{DR} plus faible que celui prévu par ACKERS (49).

De même, les espaces entre les barreaux constituant les parois d'un pore sont accessibles à certaines molécules, ce qui a pour effet de corriger en hausse la valeur du volume accessible. On peut donc prévoir un K_{DE} plus grand que celui obtenu par l'équation 56.

Nous allons voir dans quelle mesure un tel raisonnement peut nous faire progresser dans cette étude théorique de la chromatographie de filtration sur gel.

D- Calcul du volume accessible à une molécule dans un gel théorique de structure cubique.

Imaginons une particule cubique de gel, dont chaque face est divisée en n^2 carrés par des barreaux représentant les chaînes de polymères constituant la matrice de ce gel. Il en est de même à l'intérieur de la particule, si bien que le cube de gel se trouve divisé en n^3 petits cubes creux délimités par les barreaux qui matérialisent les arêtes (Voir figure N° 7).

- Soit $2b$ la largeur de chaque barreau (supposé parallélépipédique)
- Soit $2r$ la largeur du pore creux qui correspond à une face d'un petit cube

$$\begin{aligned} \text{La longueur d'une arête d'un grand cube} &= 2n.r + 2(n+1)b \\ &= 2n(r+b) + 2b \end{aligned} \quad (\text{Equ. 57}).$$

avec b plus petit que r et n très grand.

$2b$ est négligeable à côté de $2n(r+b)$ et on peut écrire :

$$\text{- Longueur d'une arête} \neq 2n(r+b) \quad (\text{Equ. 58}).$$

$$\text{- Volume d'un cube} \neq 8n^3(r+b)^3 = V_x \quad (\text{Equ. 59}).$$

1- Calcul du nombre de petites facettes dans cette structure.

Sur la figure N° 7, on peut compter ces facettes :

- Dans un plan horizontal on trouve n^2 facettes, comme il y a $(n+1)$ plans horizontaux, on obtient $n^2(n+1)$ facettes horizontales.

- Dans un plan vertical on compte également n^2 facettes. Il y a $(n+1)$ plans verticaux parallèles au plan de la feuille et $(n+1)$ perpendiculaires à ce plan. Donc, on trouve $2(n+1)$ plans verticaux et $2n^2(n+1)$ facettes verticales.

Au total la structure comporte $3n^2(n+1)$ facettes.

Pour n très grand on peut admettre que ce nombre est peu différent de $3n^3$ (Equ. 60).

2- Calcul du volume interstitiel.

Ce volume interstitiel (V_i) peut se décomposer en deux volumes élémentaires (voir figure N° 8).

Le volume (V_{i1}) correspondant à n^3 cubes de volume $(2r)^3$ et le volume (V_{i2}) correspondant au volume des $3n^2(n+1)$ facettes creuses de $2r \cdot 2b$, soit $24n^2(n+1)b \cdot r^2$.

$$V_i = 8n^3 \cdot r^3 + 24n^2(n+1)b \cdot r^2$$

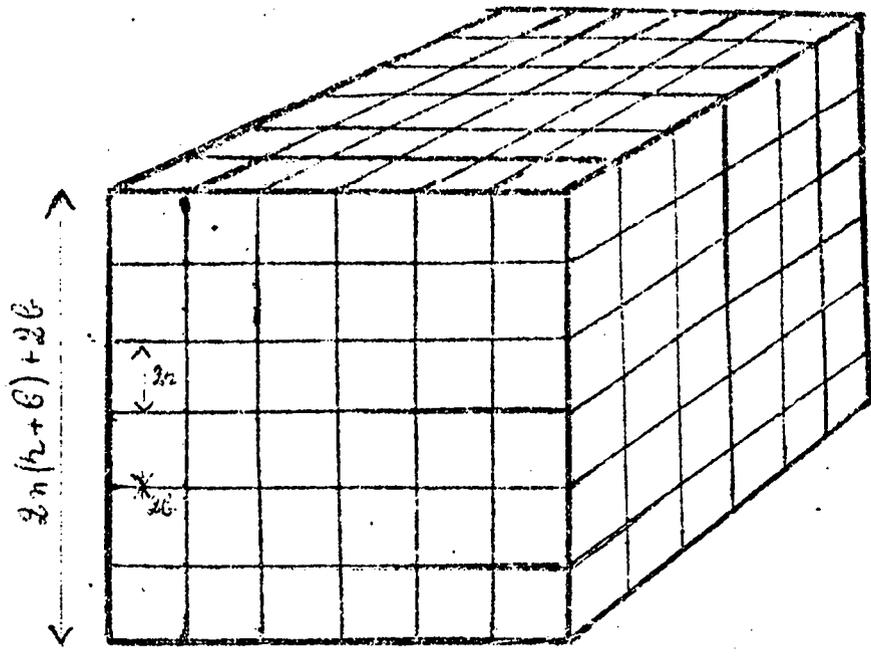


Figure nº7 :

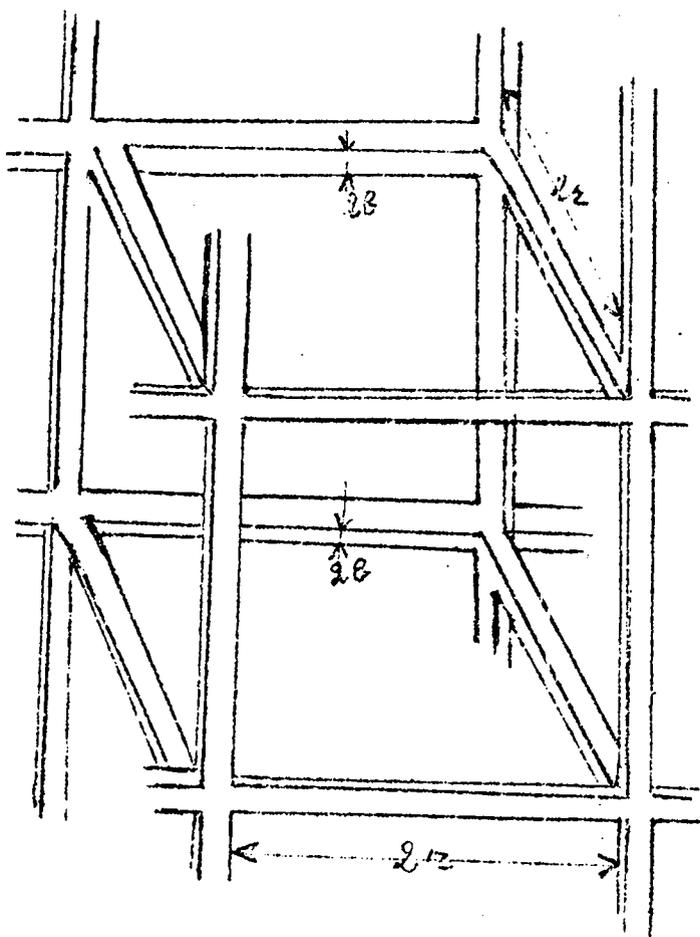


Figure nº8 .

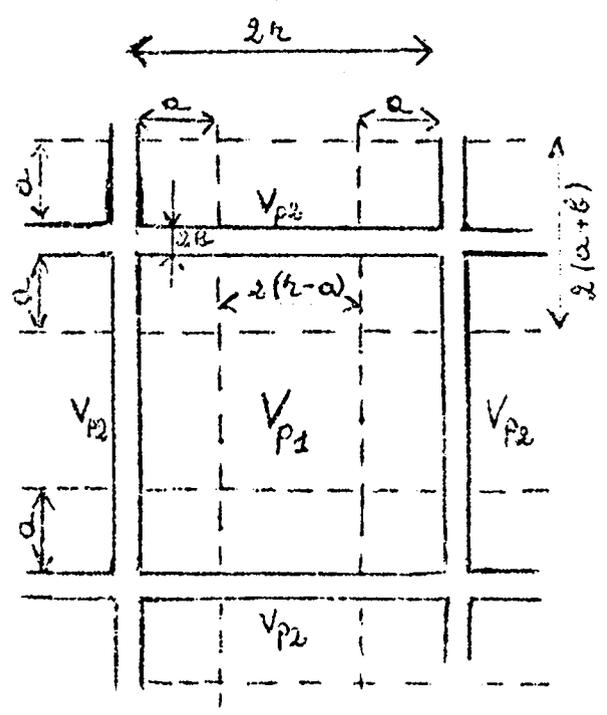


Figure nº9.

Pour n très grand on peut écrire :

$$V_i \approx 8 n^3 \cdot r^2 (r + 3b) \quad (\text{Equ. 61}).$$

3- Calcul du volume accessible (V_p) à une particule sphérique de rayon (a).

Ce volume (V_p) peut se décomposer en deux volumes élémentaires (voir figure N° 9).

$$V_{p1} = \text{Volume de } n^3 \text{ cubes de côté } 2(r - a) = 8 n^3 (r - a)^3$$

$$\begin{aligned} V_{p2} &= \text{Volume accessible dans les } 3 n^3 \text{ facettes creuses} \\ &= 3 n^3 \cdot 2(r - a) \cdot 2(r - a) \cdot 2(a + b) \\ &= 24 n^3 (r - a)^2 (a + b) \end{aligned}$$

$$V_p = V_{p1} + V_{p2} = 8 n^3 (r - a)^2 (r + 2a + 3b) \quad (\text{Equ. 62}).$$

4- Calcul de K_{DE} .

En introduisant les valeurs de V_i et de V_p des équations 61 et 62 dans l'équation 3 on peut écrire :

$$K_{DE} = \frac{V_p}{V_i} = \frac{(r - a)^2 (r + 2a + 3b)}{r^2 (r + 3b)}$$

$$K_{DE} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \left(1 + \frac{2a}{r + 3b}\right)$$

-(Equ. 63).

5- Calcul de K_{AE} .

En introduisant dans l'équation 4 les valeurs V_p et V_x des équations 62 et 59; on peut écrire :

$$K_{AE} = \frac{V_p}{V_x} = \frac{(r - a)^2 (r + 2a + 3b)}{(r + b)^3} \quad (\text{Equ. 64}).$$

$$K_{AE} = \frac{(r - a)^2}{(r + b)^2} \left\{ 1 + \frac{2(a + b)}{(r + b)} \right\} \quad (\text{Equ. 65}).$$

6- Calcul de la concentration du gel en polymère.

Reportons dans l'équation 20 les valeurs de K_{DE} et de K_{AE} des équations 63 et 64.

$$C_v = \frac{K_{AE}}{K_{DE} \cdot G \cdot d_s} = \frac{r^2 (r + 3b)}{G \cdot d_s (r + b)^3} \quad (\text{Equ. 66}).$$

Mais $G \cdot d_s$ est fonction de r et b . Nous allons donc chercher à le remplacer par sa valeur. Pour cela il faut calculer C_v par une autre méthode :

$$C_v = \frac{V_g}{V_x} = \frac{4 l \cdot b^2}{V_x} \quad (\text{Equ. 67}).$$

où l est la longueur totale de barreaux dans V_x de gel.

7- Calcul de la longueur totale de barreaux dans un volume V_x de gel.

ORSTEIN (50) propose de calculer cette longueur par une technique arithmétique, mais il est amené à négliger les intersections entre barreaux. Les volumes correspondants sont ainsi comptés deux ou trois fois. Ceci peut entraîner une erreur négligeable dans le cas où b est très petit par rapport à r . Il est toutefois préférable d'éviter cette imperfection par le calcul algébrique suivant.

$$- \text{ Nous savons que la longueur d'une arête} = 2 n (r + b) \quad (\text{Equ. 60})$$

Sur la figure N° 10 on peut voir que :

- Dans un plan horizontal, il y a $(n + 1)$ barreaux de longueur égale à celle d'une arête et $(n + 1)$ fois n petits barreaux de longueur $= 2 r$.

$$\text{soit } (n + 1) 2 n (r + b) + 2 r \cdot n (n + 1) = 2 n (n + 1) (2r + b)$$

Comme on trouve $(n + 1)$ plans horizontaux : la longueur totale des barreaux horizontaux $= 2 n (n + 1)^2 (2 r + b)$.

- Ces plans horizontaux sont reliés par des barreaux verticaux de longueur $= 2 r$.

Or, on en compte $n (n + 1)$ sur une face et il y a $(n + 1)$ plans verticaux parallèles à cette face.

$$\text{Donc la longueur totale de barreaux verticaux} = 2 r \cdot n (n + 1)^2$$

$$\text{Longueur totale de barreaux dans un cube de } V_x \text{ de gel} = 1$$

$$= 2 n(n + 1)^2 (3 r + b)$$

$$\text{Pour } n \text{ très grand : } 1 \neq 2 n^3 (3 r + b) \quad (\text{Equ. 68}).$$

8- Autre calcul de la concentration du gel en polymère.

Reportons dans l'équation 67 les valeurs de l et de V_x des équations 68 et 59 :

$$C_v = \frac{V_g}{V_x} = \frac{4l \cdot b^2}{V_x} = \frac{(3r + b) b^2}{(r + b)^3} \quad (\text{Equ. 69.})$$

9- Calcul de $G \cdot d_s$.

En comparant les valeurs de C_v des équations 67 et 69, on peut écrire :

$$G \cdot d_s = \frac{r^2 (r + 3b)}{b^2 (3r + b)} \quad (\text{Equ. 70.})$$

D'ailleurs, on retrouve ce résultat si dans l'équation 18 on remplace V_i et V_g par leur valeur des équations 61 et 69.

10- Expression de r en fonction des constantes physiques du gel :

L'équation 70 peut être développée et réarrangée en fonction de r .

$$G \cdot d_s \cdot b^2 (3r + b) = r^2 (r + 3b)$$

$$r^3 + 3b \cdot r^2 - 3b^2 \cdot G \cdot d_s \cdot r - G \cdot d_s \cdot b^3 = 0 \quad (\text{Equ. 71.})$$

où r ; b ; G et d_s sont positifs.

L'étude de la dérivée permet de tracer la courbe :

$$y = r^3 + 3b \cdot r^2 - 3b^2 \cdot G \cdot d_s \cdot r - G \cdot d_s \cdot b^3 \quad (\text{Eqn. 72}).$$

qui peut avoir une ou trois solutions. Vu les racines de cette dérivée, on peut prévoir une seule solution. Nous reproduisons cette courbe figure N° 11.

La résolution de l'équation 72 doit se faire par le calcul en donnant à r différentes valeurs successives de façon à encadrer progressivement la solution : $y = 0$.

11- Calcul de r pour des gels bien définis.

Pour un SERNIADEX G. 200 on sait que le gonflement G est voisin de 20 g/g. et pour un sephadex G. 100 il est voisin de 10 g/g. (grammes d'eau par gramme de produit sec). La densité du dextrane polymérisé ($d_s = 1,64$) (FLODIN 51). Il est beaucoup plus difficile de fixer une valeur pour b : Le rayon d'une chaîne polysaccharidique est de l'ordre de $3 \cdot 10^{-8}$ cm. Toutefois les déformations provoquées par les liaisons entre chaînes obligent la plupart des auteurs à utiliser dans leurs calculs des valeurs sensiblement plus élevées : $7 \cdot 10^{-8}$ cm. (LAURENT et KILLANDER -52-). De plus nous avons vu au chapitre IV B. qu'une partie souvent appréciable de l'eau interstitielle était liée à la chaîne polysaccharidique. Comme cette eau liée ne possède aucun pouvoir solvant, on doit, dans les calculs, l'ajouter au volume de la matrice solide (V_g), ce qui contribue à augmenter sensiblement la valeur de b .

Nous avons résolu l'équation 72 en prenant successivement :

$$b = 3 \cdot 10^{-8} \text{ cm.}$$

$$\text{et } b = 7 \cdot 10^{-8} \text{ cm.}$$

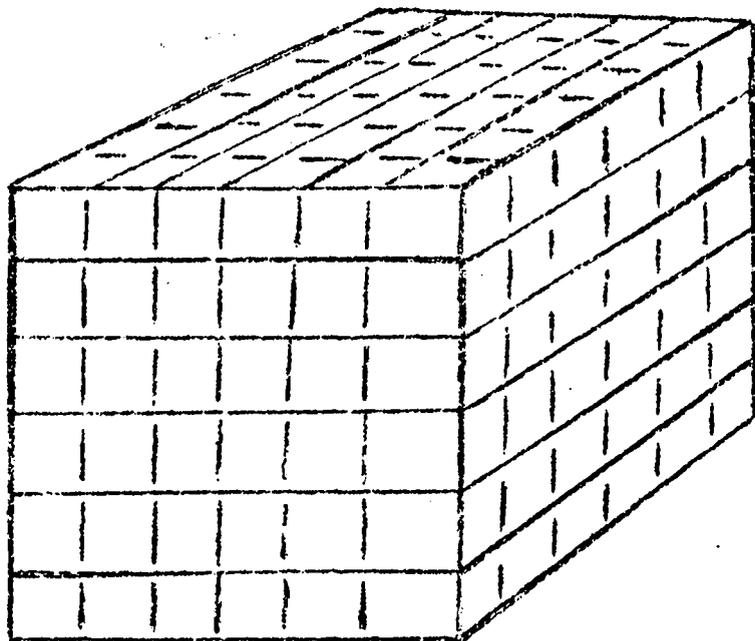


Figure nº 10.

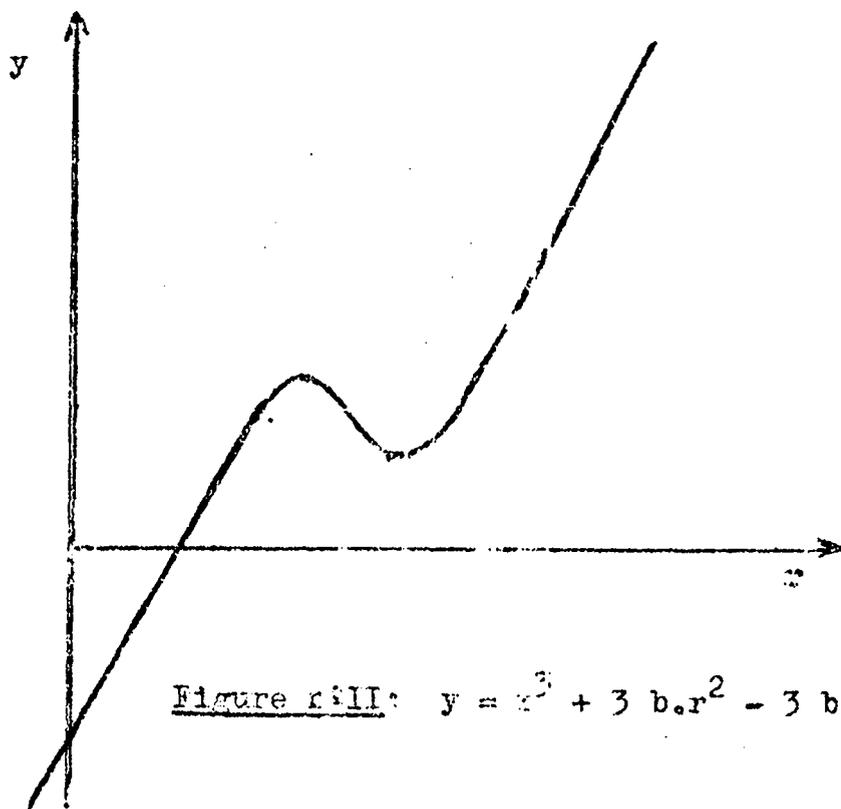


Figure nº 11: $y = x^3 + 3 b \cdot r^2 - 3 b^2 \cdot G \cdot d_s \cdot r - G \cdot d_s \cdot b^3$

Nous trouvons pour le SEPHADEX G. 100 :

$$\text{pour } b = 3 \text{ \AA} \qquad r = 18 \text{ \AA}$$

$$\text{pour } b = 7 \text{ \AA} \qquad r = 41 \text{ \AA}$$

Pour un SEPHADEX G. 200 :

$$\text{Pour } b = 3 \text{ \AA} \qquad r = 26 \text{ \AA}$$

$$\text{Pour } b = 7 \text{ \AA} \qquad r = 61 \text{ \AA}$$

Les valeurs de r obtenues en posant $b = 3 \text{ \AA}$ sont effectivement trop faibles. Celles obtenues pour $b = 7 \text{ \AA}$ sont plus en rapport avec la taille des molécules fractionnées par ces gels.

12- Calcul d'une valeur approchée pour n :

n est naturellement fonction de la taille de chaque particule de gel. Le tamisage d'une poudre sèche de SEPHADEX G. 200 fixe cette taille des grains. Elle est généralement comprise entre 4 et 12. 10^{-3} cm. Nous retiendrons donc une taille moyenne $D = 8. 10^{-3}$.

$$D^3 = V_g = 8^3 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^3 \qquad (\text{Equ. 72}).$$

Prenons comme nous l'avons vu au paragraphe 11 :

$$b = 7. 10^{-8} \text{ cm}$$

$$r = 61. 10^{-8} \text{ cm}$$

On peut écrire avec les restrictions que nous avons signalé pour l'équation 10 :

$$C_v = \frac{V_g}{V_x} = \frac{D^3}{8 n^3 (r + b)^3} \qquad (\text{Equ. 73}).$$

d'où :

$$n^3 = \frac{D^3}{8 (r + b)^3 C_v} \qquad (\text{Equ. 74}).$$

En remplaçant C_v par sa valeur de l'équation 12 :

$$n^3 = \frac{D^3 (G \cdot d_s + 1)}{8 (r + b)} \quad (\text{Equ. 75}).$$

Pour un SEPHEDEX G. 200 en prenant $G = 20$

$$d_s = 1,64$$

$$r = 61 \text{ \AA}$$

$$b = 7\text{\AA}$$

On trouve $n^3 = 7 \cdot 10^{12}$. Ce qui nous donne pour n une valeur approchée de $1,91 \cdot 10^4$.

Un calcul identique pour le SEPHEDEX G. 100 donne pour n un ordre de grandeur de $2,15 \cdot 10^4$. Il faut noter que la différence de n pour ces deux gels n'est pas considérable.

Enfin, il faut insister sur le fait que n a été calculé pour un modèle théorique qui n'est certainement pas identique à la structure réelle d'un SEPHEDEX. De plus, nous rappelons encore une fois l'imprécision inévitable pour la valeur fixée pour b . Il faut tenir compte de ces restrictions chaque fois que nous utilisons ces valeurs de n .

13- Discussion de l'équation 63.

$$K_{DE} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \left\{ 1 + \frac{2a}{(r + 3b)} \right\} \quad (\text{Equ. 63}).$$

$$a- \text{Etude du terme} = \frac{1}{(r + 3b)}$$

D'après l'équation 61 : $V_1 = 8 n^3 \cdot r^2 (r + 3b)$

$$\frac{1}{(r + 3b)} = \frac{8n^3 \cdot r^2}{V_i} \quad (\text{Equ. 76}).$$

On peut tirer de l'équation 59 une valeur de n^3 .

$$n^3 = \frac{V_x}{8(r+b)^3} \quad (\text{Equ. 77}).$$

Reportons cette valeur de n^3 dans l'équation 76.

$$\frac{1}{(r + 3b)} = \frac{r^2}{(r + b)^3} \cdot \frac{V_x}{V_i}$$

$$\frac{1}{(r + 3b)} = \frac{r^2}{(r + b)^3} \cdot \frac{V_x}{V_x - V_g}$$

$$\text{Mais } V_g/V_x = C_v$$

$$\frac{1}{(r + 3b)} = \frac{r^2}{(r + b)^3 (1 - C_v)} \quad (\text{Equ. 78}).$$

b- Etude du facteur : $\frac{r^2}{(r + b)^3}$

r^2 traduit une surface. En effet la surface d'un pore = $4r^2$.

$(r + b)^3$ traduit un volume. Dans la structure cubique que nous avons défini au début de ce chapitre le volume d'un cube de gel de n^3 petits cubes = $8n^3 (r + b)^3$

Le volume d'un de ces petits cubes = $8(r + b)^3$

Le facteur $\frac{r^2}{(r + b)^3}$ représente donc à un coefficient numérique

près le rapport entre la surface unitaire d'un pore (S_u) et le volume unitaire de gel (V_u).

$$\frac{r^2}{(r+b)^3} = A \frac{S_u}{V_u} \quad (\text{Equ. 79}).$$

S_u / V_u caractérise parfaitement un gel. Même si sa définition expérimentale présente des difficultés, ce facteur est très intéressant sur le plan théorique.

c- Nouvelle expression de K_{DE}

Reportons dans l'équation 63 les valeurs des différents facteurs selon les équations 78 et 79.

$$K_{DE} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \left\{ 1 + A \frac{S_u \cdot 2a}{V_u (1 - C_v)} \right\} \quad (\text{Equ. 80}).$$

Mais pour un gel donné $\frac{2A \cdot S_u}{V_u (1 - C_v)} = B$ est une constante. L'équation 80 peut

donc s'écrire :

$$K_{DE} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 (1 + B \cdot a) \quad (\text{Equ. 81}).$$

La courbe $y = K_{DE}$ de l'équation 81 sera légèrement au-dessus de la courbe $y_1 = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2$ et y tend vers y_1 quand a tend vers zéro et a tend vers r , c'est-à-dire quand K_{DE} tend vers zéro et vers 1 (Figure N°6).

Le K_{DE} calculé selon l'équation 81 est effectivement plus élevé que le K_{DE} plus approximatif obtenu avec l'équation 56 :

$$K_{DE} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^3$$

Si nous comparons maintenant le K_{DR} calculé selon l'équation 37 d'ACKERS (53) avec le K_{DE} de l'équation 81, les différences sont suffisantes pour être mises en évidence expérimentalement quand a est assez grand.

Par contre quand a est petit (cas d'une expérience sur SEPHADEX G. 75) les coefficients de distribution calculés par ces deux équations sont assez voisins, ce qui expliquerait les courbes expérimentales d'ACKERS (voir figure N° 3). Toutefois nous ne pouvons pas justifier les courbes de la figure N° 5.

VIII. - RAISONNEMENT D'EXCLUSION MOLECULAIRE FAISANT INTERVENIR LA CONCENTRATION DU GEL EN POLYMERE.

=====

Cette notion de concentration du gel en polymère de constitution présente un grand intérêt, car c'est le paramètre fondamental dans la préparation d'un gel d'agar, d'un gel d'amidon et même d'un gel de polyacrylamide. Avec le SEPHADEX ce paramètre est moins évident car le polymère est livré tout préparé, mais le gonflement, qui est à la base de la classification de ces matières premières, traduit en fait la concentration en polymère comme le montre les équations 12 et 13.

ALLISON et HUMPHREY (54) étudient la diffusion de certaines protéines dans des gels d'agar et de gélatine de concentrations variables, ce qui permet de classer ces protéines dans l'ordre de leur poids moléculaire et même de faire un parallèle entre la concentration en gélatine empêchant toute diffusion et le poids moléculaire de la protéine étudiée.

SMITHIES (55), par électrophorèse sur gel d'amidon, établit que la migration d'une protéine est fonction inverse de la concentration du gel en amidon. Le coefficient de retardement relatif est fonction de la taille d'une molécule et non de sa charge électrique.

POLSON (56), après une étude de la diffusion de divers virus au travers des gels d'agar, établit que la concentration en agar capable d'exclure une molécule est une fonction inverse de son diamètre moléculaire, ce que nous pouvons écrire avec nos symboles :

$$C_{pE} = \frac{A}{a} \quad (\text{Equ. 82})$$

D'autres expériences amènent POLSON (57) à faire intervenir les différences de coefficients de diffusion plutôt que les différences de poids moléculaires.

ANDREWS (58) mesure le volume d'élution pour diverses protéines au cours de chromatographies sur gels d'agar, la phase stationnaire étant constituée par un granulé de gel de concentration variable en agar (2,5 à 12 p. 100). Les courbes obtenues mettent en évidence une relation entre le poids moléculaire et le volume d'élution, il trouve que cette technique est plus précise pour l'étude du poids moléculaire que pour celle des coefficients de diffusion.

STEELE et ACKERS (59) dans une expérience analogue montrent qu'il existe une relation entre le diamètre ^{moléculaire} et le volume d'élution.

ORNSTEIN (60) au cours d'une étude théorique sur le gel de polyacrylamide, établit que le diamètre moyen des pores est fonction inverse de la rac. carrée de la concentration du gel en polyacrylamide, ce que nous pouvons écrire avec nos symboles :

$$2 r = \frac{A}{C_p^{1/2}} \quad (\text{Equ. 83}).$$

Enfin LAURENT et KILLANDER (61) proposent une équation liant le coefficient de distribution (K_A) à la concentration du gel en polymère. Nous allons étudier ce travail plus en détail.

A- RAISONNEMENT SELON LAURENT et KILLANDER (62)

Il s'agit de calculer le volume accessible pour une molécule de rayon a dans un gel hypothétique, constitué par des barreaux cylindriques, très longs par rapport à leur diamètre et répartis au hasard dans une particule sphérique de gel.

Ce calcul a été effectué par OGSTON (63) en exprimant la concentration du gel en polymère en centimètres de barreaux par millilitres de gel ($= L$).

a = rayon de la molécule sphérique

b = le rayon d'un barreau.

En appliquant l'équation d'OGSTON à leur modèle théorique, LAURENT et KILLANDER obtiennent :

$$K_A = e^{(-\pi \cdot L (a + b)^2)} \quad (\text{Equ. 84}).$$

L'application de cette formule présente quelques difficultés. Pour un gel bien standardisé comme le SEPHADEX, on peut attribuer à la chaîne droite de polysaccharide un rayon de $2 \text{ à } 3 \cdot 10^{-8}$ cm. Mais comme le dextrane constituant le gel est flexible et présente un certain nombre d'embranchements, on doit lui attribuer un rayon plus important. Comme nous l'avons déjà signalé, LAURENT et KILLANDER (64) proposent pour b la valeur de $7 \cdot 10^{-8}$.

La valeur de L (concentration en dextrane exprimée en cm de chaîne par ml. de gel) est encore plus délicate à fixer. Finalement les auteurs doivent établir cette concentration à partir des résultats d'expériences chromatographiques.

Une fois ces deux valeurs déterminées, il est possible de calculer le rayon de STOCKE d'une molécule à partir du coefficient de distribution (K_A) Les auteurs donnent de nombreux exemples concluant à la vérification de l'hypothèse.

B- DISCUSSION.

Pour faciliter la discussion il nous faut exprimer L (cm/ml.) en fonction de C_v (ml/ml.)

L = nombre de cm. de barreaux dans 1 ml de gel.

$L.V_x$ = nombre de cm. de barreaux dans V_x ml. de gel.

$\pi b^2.L.V_x$ = volume occupé par les barreaux de V_x ml. de gel.

$$C_v = \frac{\pi b^2.L.V_x}{V_x}$$

d'où l'on tire

$$L = \frac{C_v}{\pi.b} \quad (\text{Equ. 85}).$$

Reportons cette valeur de L dans l'équation 84.

$$\begin{aligned} K_A &= e^{-C_v.b^{-2} (a+b)^2} \\ &= e^{-C_v \left(1 + \frac{a}{b}\right)^2} \end{aligned} \quad (\text{Equ. 86}).$$

On peut remplacer C_v par sa valeur de l'équation 12 :

$$K_A = \exp. \left\{ -\left(\frac{1}{G.d_s + 1}\right) \left(1 + \frac{a}{b}\right)^2 \right\}$$

G et d_s sont des constantes pour un SEPHADEX. Il n'est donc plus nécessaire d'établir arbitrairement des valeurs pour L. Toutefois nous devons rappeler que nous avons négligé le volume de l'eau liée à la chaîne polysaccharidique. Il faut en tenir compte lorsque l'on choisit une valeur pour b.

C- APPLICATION D'UN CALCUL DE VOLUME ACCESSIBLE A UN GEL DE STRUCTURE
DEFINIE PAR LAURENT ET KILLANDER (65).

=====

Soit l la longueur totale de barreaux supposés cylindriques.
le milieu d'une molécule sphérique de rayon a ne peut pénétrer à l'intérieur
d'un volume cylindrique concentrique de celui du barreau et de rayon $(a + b)$.

Le volume non pénétrable total pour cette molécule est donc :

$$1. \quad \overline{\pi} \cdot (a + b)^2 = V_n + V_g \quad (\text{Equ. 88}).$$

Ce raisonnement est en fait trop simple, car on ne peut assimiler
le gel à un cylindre unique. L'équation 88 n'est en fait valable que pour f :
(distance minimale entre deux barreaux) plus grand que $2a$.

$$V_x = V_i + V_g = V_p + V_n + V_g$$

$$V_x = V_p + \overline{\pi} \cdot l (a + b)^2$$

Comme d'après l'équation 4 : $V_p = K_A \cdot V_x$

$$V_x = K_{AE} \cdot V_x + \overline{\pi} \cdot l (a + b)^2$$

$$K_{AE} = 1 - \frac{\overline{\pi} \cdot l \cdot b^2}{V_x} \quad (\text{Equ. 89}).$$

Mais d'après l'équation 11 : $V_x = \frac{P (G \cdot d_s + 1)}{d_s}$

or, $V_g = \frac{P}{d_s} = \overline{\pi} \cdot l \cdot b^2 \quad (\text{Equ. 90}).$

En combinant les équations 89, 11 et 90 on écrit :

$$K_{AE} = 1 - \frac{(a+b)^2}{b^2 (G. d_s + 1)} \quad (\text{Equ. 91}).$$

En introduisant C_v avec sa valeur de l'équation 12 :

$$K_{AE} = 1 - \left(1 + \frac{a}{b}\right)^2 C_v \quad (\text{Equ. 92}).$$

Avec la restriction f plus grand que $2a$ (voir restriction pour l'équation 88)

Il nous faut comparer les K_A obtenus par l'équation 87 (raisonnement statistique et différentiel d'OGSTON (66) et par l'équation 92 (raisonnement d'exclusion moléculaire dans le cas simplifié où f est plus grand que $2a$).

L'équation 87 peut se développer :

$$K_A = 1 - \frac{\left(C_v \left(1 + \frac{a}{b}\right)\right)^2}{1!} + \frac{\left(C_v \left(1 + \frac{a}{b}\right)\right)^2}{2!} + \frac{\left(C_v \left(1 + \frac{a}{b}\right)\right)^2}{3!} \text{ etc.}$$

L'équation 92 est donc le développement de l'équation 87 limité au premier ordre ce qui est tout à fait compatible avec la restriction : f plus grand que $2a$.

D- CONCLUSION :

Ce mode de raisonnement permet de comparer la théorie d'exclusion moléculaire aux résultats obtenus en étudiant le partage des protéines entre les deux phases liquides contenant des polymères solubles (ALBERTSON 67, 68). Le coefficient de partage (K) d'une protéine entre ces deux phases est une fonction exponentielle de son poids moléculaire, ce qui peut s'écrire :

$$\frac{C_1}{C_2} = K = e^{A.M} \quad (\text{Equ. 93}).$$

Tout ceci tend à confirmer que, dans la mesure où l'équilibre est réalisé le phénomène se réduit à une exclusion moléculaire. Par contre nous ne pouvons toujours pas expliquer le phénomène dans le cas d'une chromatographie sur SEPHADEX G. 200 (Voir figure N° 5).

IX. - APPLICATION D'UN RAISONNEMENT DE RESTRICTION A LA DIFFUSION A
UNE STRUCTURE CUBIQUE (définie au chapitre VII D).

=====

A- RESTRICTION A LA DIFFUSION SELON UN AXE PERPENDICULAIRE A LA SURFACE D'UN PORE.

La diffusion d'une molécule dans un liquide homogène peut se traduire par un déplacement selon trois axes perpendiculaires l'un à l'autre (Ox, Oy et Oz). En un point O le gradient de concentration imposera le déplacement selon un de ces axes (Ox par exemple) et dans une direction (O vers x par exemple). Les concentrations en O, y et z étant égales, la diffusion selon les axes Oy et Oz se fait dans les deux sens et n'intervient pas dans la répartition statistique des molécules étudiées. (Voir figure N° 13).

Nous savons que la restriction à la diffusion au travers d'un pore $= (1 - \frac{a}{r})^2$ (voir équation 33). Une molécule ayant traversé n' pores a subi une restriction à la diffusion $= R$.

$$R = (1 - \frac{a}{r})^2 n' \quad (\text{Equ. 94}).$$

B- ETUDE DU PHENOMENE A L'ECHELLE D'UNE PARTICULE DE GEL.

Une particule de gel de n^3 petits cubes schématise la phase stationnaire (V_x) et baigne dans une phase mobile qui se déplace.

Supposons ces déplacements de la phase mobile suffisamment rapides pour que au temps t_0 , la concentration en produit étudié soit identique sur toutes les faces externes du cube de gel.

La diffusion d'une molécule, qui au temps t_0 se trouve dans la phase mobile, se fait vers le centre du cube de gel, selon les six axes perpendiculaires à chacune des faces. Lorsqu'une molécule a traversé un pore, elle diffuse ensuite librement dans le volume interstitiel du petit cube correspondant.

On suppose que les concentrations sont assez faibles, si bien qu'au niveau du front de diffusion le passage de la concentration C_0 à la concentration nulle se fait sur une distance dx négligeable. Au temps t les molécules du front de diffusion auront traversé n' pores sur l'axe Ox et effectué un déplacement de $2 n' (r + b)$ sur cet axe. Si au temps $t : 2 n' < n$, les molécules se répartissent dans le volume périphérique du cube de gel. Un certain volume au centre de ce cube ne contient pas de substance étudiée, mais fait toujours partie du volume interstitiel (voir figure N° 14).

1- Calcul du coefficient de distribution (K_{DR}).

Dans la zone où la substance a diffusé, elle occupe un volume correspondant au volume accessible selon la règle de l'exclusion moléculaire. Nous pouvons donc calculer le coefficient de distribution (K_{DR}) selon la théorie de restriction à la diffusion, valable pour un temps t et pour un gel théorique de structure cubique.

Dans un grand cube de gel de n^3 petits cubes, au temps t , il y a $(n - 2n')$ ³ cubes ne contenant pas de substance étudiée. Cette substance se trouve dans le volume périphérique, correspondant à $n^3 - (n - 2n')$ ³ petits cubes soit :

$$2 n' (3 n^2 - 6n. n' + 4 n'^2)$$

Or d'après l'équation 62 on sait que le volume accessible pour une molécule sphérique de rayon a dans un cube de n^3 petits cubes élémentaires = V_p

$$V_p = 8 n^3 (r - a)^2 (r + 2a + 3b) \quad (\text{Equ. 62})$$

Donc le volume accessible à la molécule sphérique de rayon a dans la zone périphérique où elle se trouve = V_{pR}

$$V_{pR} = 2 n' (3n^2 - 6 n. n' + 4 n'^2) \left\{ 8 (r - a)^2 (r + 2a + 3b) \right\} \quad (\text{Equ. 95}).$$

En appliquant l'équation fondamentale 3 : $K_D V_i = V_p$ avec les valeurs de V_i et de V_p des équations 61 et 95, on obtient :

$$K_{DR} = \frac{V_{pR}}{V_1} = \frac{2n' (3 n^2 - 6n. n' + 4 n'^2) 8 (r - a)^2 (r + 2a + 3 b)}{8 n^3 r^2 (r + 3b)}$$

$$K_{DR} = 2 \left\{ 3 \left(\frac{n'}{n} \right) - 6 \left(\frac{n'}{n} \right)^2 + 4 \left(\frac{n'}{n} \right)^3 \right\} \left(1 - \frac{a}{r} \right)^2 \left(1 + \frac{2 a}{r + 3b} \right) \quad (\text{Equ. 96}).$$

En introduisant dans cette équation 96 la valeur de K_{DE} de l'équation 63, on peut écrire :

$$K_{DR} = 2 \left\{ 3 \left(\frac{n'}{n} \right) - 6 \left(\frac{n'}{n} \right)^2 + 4 \left(\frac{n'}{n} \right)^3 \right\} K_{DE} \quad (\text{Equ. 97}).$$

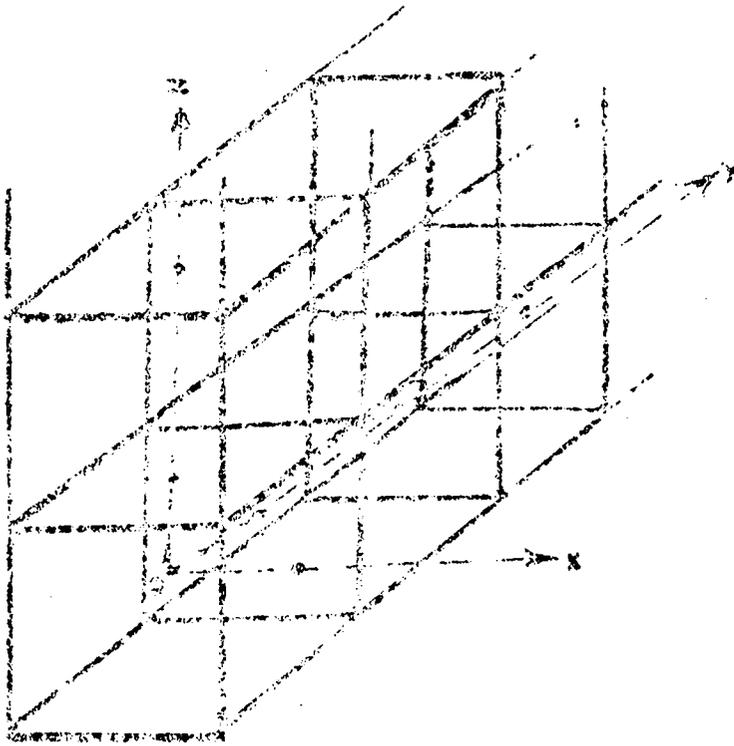


Figure n° 13 :

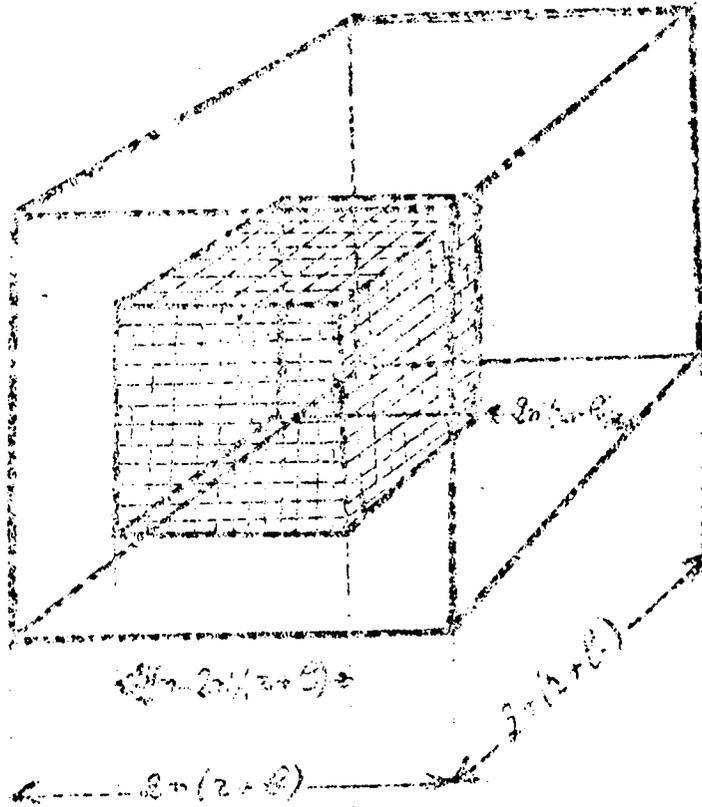


Figure n° 14 :

Avec $2 n' < n$

$$\text{Donc } 0 < 2 \left\{ 3 \left(\frac{n'}{n} \right) - 6 \left(\frac{n'}{n} \right)^2 + 4 \left(\frac{n'}{n} \right)^3 \right\} < 1$$

2- Cas où $2 n' = n$

Si le temps de diffusion t est suffisant $2 n' = n$ et dans l'équation 97 $K_{DR} = K_{DE}$

Ceci peut correspondre à une expérience dans laquelle on réalise un équilibre entre les deux phases. C'est dans le cas de la mesure du K_D à l'équilibre selon la première expérience d'ACKERS (69) (voir chapitre VI).

Ceci peut également être obtenu quand la diffusion s'effectue rapidement et que dans une chromatographie le temps t_x pour lequel $2 n' = n$ est compatible avec la vitesse de déplacement de la phase mobile.

3- Discussion de l'équation III :

Cette équation qui traduit un raisonnement de restriction à la diffusion prouve que le coefficient de distribution K_{DR} est une fonction de K_{DE} , obtenu par un raisonnement d'exclusion moléculaire. Le facteur de multiplication de K_{DE} est lui-même une fonction de $n' / n = f(t)$.

Ceci nous conduit à une conclusion fondamentale :

{ si l'on adopte un raisonnement de restriction à la diffusion, cela correspond à affecter le coefficient de distribution (K_{DE}) d'un facteur fonction du temps et de toute façon inférieur ou égal à un. }

Si le temps t , pendant lequel la diffusion peut opérer, est court K_{DR} est beaucoup plus petit que K_{DE} . Si au contraire le temps accordé est plus prolongé, K_{DR} tend vers K_{DE} et l'expérience traduit uniquement un phénomène d'exclusion moléculaire.

4- Cas particulier où la restriction à la diffusion joue un rôle plus important.

Soit t' le temps nécessaire pour qu'une molécule de la substance étudiée diffuse librement dans la phase liquide sur une distance de $n(r+b)$. Ceci revient à choisir pour le temps t' de l'équation 97, le temps qui est nécessaire à une molécule de substance à étudier, pour occuper un volume de phase liquide égale à celui d'une particule de gel ($= 8 n^3 (r+b)^3$).

Vu les restrictions à la libre diffusion dans le gel, la molécule ne parcourt pas $n(r+b)$ en un temps t' mais traverse n' pores sur une distance de $2 n' (r+b)$.

Le rapport distance effectivement parcourue / distance parcourue en diffusion libre est une façon d'exprimer une restriction à la libre diffusion. Donc d'après l'équation 94 :

$$R = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^{2n'} = \frac{2 n' (r+b)}{n(r+b)^3} = \frac{2 n'}{n} \quad (\text{Equ. 98}).$$

$$\text{Pour } a = r \quad R = 0$$

$$\text{Pour } a = 0 \quad R = 1$$

Donc R est compris entre 0 et 1. La forme de la courbe $R = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^{2n'}$ est analogue à celle de y_3 et $y_4 = f\left(\frac{a}{r}\right)$ de la figure N° 6 avec une dérivée nulle pour $a/r = 1$ et une dérivée $= -2 n'$ pour $a/r = 0$.

L'équation 98 est mathématiquement valable car :

$$0 < \left(1 - \frac{a}{r}\right)^{2n'} < 1$$

$$0 < \left(\frac{2 n'}{n}\right) < 1$$

On peut donc espérer trouver une valeur de n' à un temps t' pour que

$$\left(1 - \frac{a}{r}\right)^{2n'} = \frac{2n'}{n}$$

$$\frac{n}{2n'} \left(1 - \frac{a}{r}\right)^{2n'} - 1 = 0 = y \quad (\text{Equ. 99}).$$

Pour chaque valeur de a/r on peut résoudre l'équation 99 par calcul et encadrement de plus en plus serré de la solution $y = 0$.

En appliquant ce travail à un SEPHADEX G. 200 : valeur approchée de $n = 191 \cdot 10^2$ (voir paragraphe VII - D - 12), nous trouvons :

pour $\frac{a}{r} = 0,1$	$27 < n' < 28$
pour $\frac{a}{r} = 0,2$	$10 < n' < 11$
pour $\frac{a}{r} = 0,5$	$5 < n' < 6$
pour $\frac{a}{r} = 0,7$	$3 < n' < 4$

5- Discussion :

a- Nous avons montré que la restriction à la diffusion joue un rôle important au bout d'un temps t' tel que :

$$\frac{2 n'}{r} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^{2 n'} \quad (\text{Equ. 98}).$$

Dans le cas d'un gel du type SEPHADEX G. 200 ceci est réalisé pour n' très petit, même dans le cas de petites molécules.

$\frac{2n'}{n}$ traduit le rapport du nombre de pores utilisé au temps t' au nombre total de pores sur l'axe de diffusion. Dans les meilleures conditions (pour $\frac{a}{r} = 0,1$) :

$$\frac{2 n'}{n} \neq \frac{28 \cdot 2}{191 \cdot 10^2} \neq 28 \cdot 10^{-4}$$

Donc même dans le cas de petites molécules seul 3 p. 1000 des pores (orientés sur un axe perpendiculaire à la surface du gel) sont utilisés pour obtenir une restriction optimale à la diffusion. Au-delà les phénomènes d'exclusion moléculaire prennent plus d'importance.

Il faut toutefois nuancer ces conclusions, car aucune molécule ne subit une restriction nulle. Il faudrait établir l'équation 98 pour un temps t' : le temps nécessaire à la plus petite molécule d'un mélange pour parcourir dans le gel la distance $n(r + b)$ et pour traverser $\frac{n}{2}$ pores sur l'axe Ox.

b- La sélection entre les particules est très sévère pour les petites molécules ($\frac{a}{r} = 0,2$). Elle devient pratiquement nulle pour $a = 0,5 r$.

c- Les distances parcourues au temps t' sont extrêmement faibles. A titre d'exemple, pour $a = 0,5 r$ elles sont de l'ordre de :

$$2 n' (r + b) = 2.6 (61 + 7) 10^{-8} \text{ cm.} = 816 \text{ \AA.}$$

Il n'est donc pas étonnant que les équilibres se réalisent très rapidement et que la vitesse d'éluion ne joue aucun rôle dans la détermination du K_{DR} .

d- Enfin, au-delà du temps t' la molécule continue à diffuser dans le gel et il reste un volume accessible à la diffusion directement proportionnel à a^3 . En effet, plus a est grand, plus n' est petit au temps t' , donc plus le volume non occupé à cet instant : $f(n - 2 n')^3$ est grand. Dans ces mêmes conditions le facteur $2 \left\{ 3 \left(\frac{n'}{n} \right) - 6 \left(\frac{n'}{n} \right)^2 + 4 \left(\frac{n'}{n} \right)^3 \right\}$ est faible, au temps t' , et donc K_{DR} beaucoup plus petit que K_{DE} .

Nous pouvons calculer les valeurs approchées de K_{DE} et K_{DR} dans certains cas particuliers : prenons par exemple le cas d'un SEPHADEX G. 200 ($r = 61 \text{ \AA}$, et $n = 191 \cdot 10^2$) et pour une molécule de $a = 0,5 r$ ($n' = 6$ au temps t'). Avec les restrictions que nous avons faites au paragraphe VII. D 11- et 12- on peut introduire ces valeurs dans les équations 63 et 97 pour obtenir :

$$K_{DE} \neq 0,44$$

$$K_{DR} \neq 0,0008$$

Dans ce cas le coefficient de distribution obtenu par chromatographie est plus proche de K_{DR} , alors que celui mesuré à l'équilibre correspond au K_{DE} calculé, ce qui justifie bien les résultats expérimentaux d'ACKERS (voir figure N° 5).

Si maintenant nous calculons K_{DE} et K_{DR} pour une molécule de $a = 0,1$ r sur un même gel nous obtenons :

$$K_{DE} \neq 0,94$$

$$\text{au temps } t' : n' = 27$$

$$K_{DR} \neq 0,0075$$

Dans ce cas le coefficient de distribution (K_D) obtenu par chromatographie correspond à K_{DE} .

Donc dans le cas d'une petite molécule chromatographiée sur SEPHADEX G. 200 (première expérience d'ACKERS : figure N° 5), le coefficient de distribution (K_D) correspond au K_{DE} (phénomène d'exclusion moléculaire) car à chaque plateau théorique de la chromatographie le temps t est beaucoup plus grand que t' (temps nécessaire pour obtenir une restriction optimale à la diffusion). Dans le cas des plus grosses molécules le coefficient de distribution (K_D) mesuré par chromatographie est plus proche de K_{DR} (phénomène de restriction à la diffusion) car à chaque plateau théorique le temps t est plus voisin de t' . Ces conclusions justifient bien les résultats expérimentaux d'ACKERS (70).

X. - RECAPITULATION GENERALE DES RAISONNEMENTS.

=====

Nous avons vu que la chromatographie de filtration sur gel fractionne un mélange en fonction de la taille des molécules étudiées. Les premiers auteurs ont cherché à établir une relation entre le coefficient de distribution (K_D) d'une substance et son poids moléculaire. En fait, il semble maintenant que les résultats soient plus satisfaisants lorsque l'on compare le K_D avec un paramètre

traduisant le volume moléculaire (rayon de rotation, rayon de STOCKE, rayon d'une sphère de volume équivalent etc...). Malheureusement tous ces paramètres moléculaires ne sont connus que très approximativement et leur utilisation dans les raisonnements ne fait qu'accroître les imprécisions provenant des mesures expérimentales. Il serait certainement plus raisonnable, dans l'état actuel de nos connaissances, d'utiliser comme point de comparaison les constantes physiques (constante de diffusion, constante de sédimentation etc...) plutôt que les paramètres théoriques que l'on peut déduire de ces dernières.

Les auteurs cherchent à trancher entre les deux théories possibles :

1- THEORIE D'EXCLUSION MOLECULAIRE :

Les molécules ne peuvent se répartir que dans une fraction du volume intérieur du gel, qui est représentée par le lieu géométrique du milieu d'une d'entre elles.

2- THEORIE DE RESTRICTION A LA DIFFUSION :

Si l'expérience ne se poursuit que pendant un temps très limité, les molécules les plus petites pénètrent plus profondément à l'intérieur du gel que les grosses molécules, car elles subissent une limitation moindre au passage au travers des pores ainsi que des frottements plus faibles sur les parois.

Il est évident que si nous laissons l'expérience se poursuivre pendant un temps suffisamment long, la diffusion va s'effectuer jusqu'à l'obtention d'un équilibre entre la phase extérieure et le liquide à l'intérieur du gel. A ce moment le coefficient de distribution doit traduire uniquement des phénomènes d'exclusion moléculaire.

ACKERS (71) compare les coefficients de distribution (K_{DE}) obtenus à l'équilibre avec les K_D obtenus par chromatographie (voir chapitre VI et les figures n° 3, 4 et 5). Les théories doivent être confrontées avec les résultats

de cette expérience fondamentale. Voyons tout d'abord les conclusions que l'on peut tirer de ces trois courbes.

ACKERS admet que dans le cas des SEPHADEX G. 75 et G. 100 les K_D obtenus par chromatographie traduisent essentiellement l'exclusion moléculaire, car ils sont très voisins de ceux obtenus à l'équilibre. Il faut toutefois ajouter que ces courbes pourraient également traduire la restriction à la diffusion si on se trouvait dans une zone où $K_{DE} \neq K_{DR}$.

Pour les expériences sur SEPHADEX G. 200, les courbes pourraient traduire un artéfact de chromatographie, mais il est prouvé que les variations de la vitesse d'écoulement n'influence que très peu la mesure du K_D . Il faut donc admettre que le K_D obtenu par chromatographie est plus faible que le K_{DE} obtenu à l'équilibre, la différence s'accroissant quand le rayon de la molécule augmente. Les K_D calculés d'après les volumes d'éluion doivent donc correspondre à la théorie de restriction à la diffusion. De plus, nous devons prouver que dans cette zone le K_{DE} est très différent du K_{DR} .

ACKERS propose pour traduire la restriction à la diffusion :

$$K_{DR} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \left\{ 1 - 2,104 \left(\frac{a}{r}\right) + 2,09 \left(\frac{a}{r}\right)^3 - 0,95 \left(\frac{a}{r}\right)^5 \right\} \quad (\text{Equ. 37}).$$

Nous avons montré (figure N° 6) que la courbe traduisant cette équation serait difficile à séparer expérimentalement de la courbe :

$$y = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^4.$$

Par un raisonnement d'exclusion moléculaire PORATH (72) et SQUIRE (73) aboutissent à des équations du type :

$$K_{DE} = A \left(1 - \frac{a}{r}\right)^3 \quad (\text{Equ. 41, 50 et 56}).$$

Ces courbes sont assez voisines de celle de l'équation 37 et des mesures expérimentales ne peuvent pas trancher entre les deux hypothèses. De plus elles ne peuvent en aucun cas justifier les résultats expérimentaux d'ACKERS.

Il faut néanmoins remarquer que toutes ces équations sont obtenues en admettant que le gel était constitué par des parois pleines. Or la structure d'un gel doit être assimilée à un assemblage complexe de barreaux. L'introduction de ce fait dans les raisonnements doit avoir pour effet de faire diminuer le K_{DR} et augmenter le K_{DE} et donc de justifier les différences obtenues expérimentalement par ACKERS.

Sur une structure cubique, constituée par un assemblage de barreaux nous avons obtenu avec un raisonnement d'exclusion moléculaire :

$$K_{DE} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \left(1 + \frac{2a}{r + \frac{2}{3}b}\right) \quad (\text{Equ. 63}).$$

ou

$$K_{DE} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 (1 + B.a) \quad (\text{Equ. 81}).$$

B est une constante qui caractérise le gel.

Sur une même structure, un raisonnement de restriction à la diffusion nous donne au temps t :

$$K_{DR} = 2 \left\{ 3\left(\frac{n'}{n}\right) - 6\left(\frac{n'}{n}\right)^2 + 4\left(\frac{n'}{n}\right)^3 \right\} K_{DE} \quad (\text{Equ. 97}).$$

$$\text{avec } 0 < 2 \left\{ 3\left(\frac{n'}{n}\right) - 6\left(\frac{n'}{n}\right)^2 + 4\left(\frac{n'}{n}\right)^3 \right\} < 1$$

$$\text{et } 0 < 2 \frac{n'}{n} < n$$

$\frac{2 n'}{n}$ est une fonction du temps.

K_{DR} est fonction de K_{DE} et de toute façon K_{DR} est toujours inférieur ou égal à K_{DE} . Pour un temps t suffisant $2 n'$ tend vers n et K_{DR} tend vers K_{DE} .

n : (nombre de pores dans une particule de gel) est une constante qui caractérise le gel.

n' : (nombre de pores traversés en un temps t) par une molécule sphérique de rayon a , se déplaçant sur l'axe de diffusion Ox) est une fonction du rayon a de cette molécule.

Il nous a été possible d'établir un ordre de grandeur pour n (voir paragraphe VII, D. 12-), ce qui nous a permis d'étudier les variations de $\frac{2 n'}{n}$ en fonction de $\frac{a}{r}$.

Au moins, théoriquement, les phénomènes de restriction à la diffusion sont plus sensibles après un temps t' , tel que :

$$\left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 n' = \frac{2 n'}{n} \quad (\text{Equ. 98}).$$

La résolution de cette équation pour différentes valeurs de a , permet de prouver que seule une petite fraction à la périphérie des particules de gel intervient dans les phénomènes de restriction à la diffusion. Le reste du gel ne joue un rôle que pour un temps t_1 plus grand que t' et dans ce cas les phénomènes d'exclusion moléculaire prennent plus d'importance.

Dans une très large mesure, les équations 63 et 81 ($K_{DE} = f(a)$) et 97 ($K_{DR} = f(n', K_{DE})$), permettent d'expliquer les courbes expérimentales obtenues par ACKERS (voir figures N° 3, 4 et 5 et paragraphe IX B. 5-).

C O N C L U S I O N S

G E N E R A L E S

Après une revue bibliographique des travaux théoriques, cherchant à expliquer les résultats de la chromatographie de filtration sur gel, nous avons constaté que les équations proposées ne pouvaient pas justifier la totalité des résultats expérimentaux.

En appliquant les mêmes raisonnements à une structure cubique composée de barreaux, nous avons établi des équations pour exprimer les coefficients de distribution en fonction des deux théories actuellement admises. Dans l'ensemble ces équations expliquent assez bien les courbes des expériences fondamentales.

Toutefois la structure théorique sur laquelle nous avons effectué nos raisonnements, ne saurait être assimilée trop étroitement avec la structure réelle d'un gel. Celle-ci est d'ailleurs variable selon le polymère utilisé. Les résultats de ce type de raisonnement ne pourront pas être exploités tant que nous ne connaissons pas exactement le rayon des barreaux qui schématisent les chaînes de polymère et la disposition relative de ceux-ci dans l'espace intérieur du gel.

En attendant ces données précises, nous pouvons quand même accepter un certain nombre d'hypothèses.

- Les phénomènes de restriction à la diffusion se manifestent surtout au bout d'un temps relatif, très court, et de toute façon dans la zone périphérique des particules de gel.

- Lorsque le temps pendant lequel les molécules se déplacent dans le gel est plus long que le temps nécessaire pour obtenir une restriction optimale à la diffusion, le phénomène tend vers celui de l'exclusion moléculaire.

Ce temps pour la restriction optimum à la diffusion est fonction du rayon de la molécule étudiée. Dans le cas d'une petite molécule ce temps est extrêmement bref et le coefficient de partage obtenu par chromatographie traduit un phénomène d'exclusion moléculaire, ceci quel que soit le gel utilisé.

- Dans le cas des molécules plus volumineuses, on ne peut utiliser que des gels de gonflement plus importants. Le temps pour une restriction optimale à la diffusion est relativement plus élevé et compatible avec le temps correspondant au passage par un plateau théorique de chromatographie. Dans ce cas, le coefficient de distribution se rapproche de celui que l'on peut prévoir selon les raisonnements de restriction à la diffusion.

Tout ceci correspond bien à la réalité expérimentale.

Toutefois, il ne faut pas oublier, que les études théoriques de la filtration sur gel ne sont qu'à leurs tous débuts : et de nombreuses possibilités de raisonnements n'ont pas encore été envisagées.

Par exemple un raisonnement en terme de viscosité du milieu analogue à ceux utilisés pour l'étude de l'électrophorèse de zone, devrait nous fournir des conclusions intéressantes.

Par ailleurs, toutes nos théories sont obtenues en prenant une dimension moyenne pour les pores. Or cette constatation implique une répartition statistique de la taille des pores de chaque côté de cette moyenne. Lorsque nous disposerons des données de structure nécessaires, il sera possible d'effectuer un nouveau type de raisonnement d'exclusion moléculaire : les grosses molécules

n'ayant accès qu'aux pores les plus gros et statistiquement les moins nombreux.

Enfin, la thermodynamique devrait fournir un apport décisif à cette étude. Malheureusement dans le domaine de la diffusion et du mouvement BROWNIEN les connaissances théoriques ne permettent pas d'aborder un problème aussi complexe. La mise en équation du choc des molécules contre les barreaux constituant le gel, de la concentration du milieu qui est une fonction du temps et de la présence d'autres molécules dépasse très largement les possibilités actuelles de la thermodynamique appliquée.

En attendant la résolution de ces problèmes, la chromatographie de filtration sur gel nous fournit une excellente méthode de fractionnement et permet une mesure pratique et satisfaisante du volume moléculaire.

*

* *

B I B L I O G R A P H I E

(Les numéros entre parenthèses qui suivent les références correspondent à l'ordre d'apparition des citations dans le texte).

- ACKERS G.K.
 Biochemistry. 1964, 3, 723. (11, 27, 28, 29, 30, 39, 48, 49, 53, 69, 70, 71)
- ACKERS G.K. et SIMMER R. L.
 Biochim. Biophys. Acta. 1962, 59, 137. (38)
- ALBERTSSON P.A.
 Nature, 1958, 182, 709. (67)
- ALBERTSSON P.A.
 Biochim. Biophys. Acta. 1958, 27, 378. (25, 68)
- ALLISON A.C. et HUMPHREY J.H.
 Nature 1959, 183, 1590. (54)
- ANDREWS P.
 Nature 1962, 196, 36. (20, 58)
- ANDREWS P.
 Biochem. J. 1964, 91, 222 (15, 19, 23)
- ANDREWS P. et FOLLEY S.J.
 Biochem. J. 1963, 87, 3P. (21)

- GARNATH K.A. et FLODIN P.
Makrol. Chem. 1961, 48, 160. (17)
- FAXEN H.
Archiv. Mat. Astron. Fysih. 1922, N° 27. (34)
- FLODIN P.
Dextran gels and their applications in gel filtration.
PHARMACIA - Uppsala - Suède (1962). (9, 17, 51)
- HELFFERICH F.
Iononaustauscher. Vol 1, 122. Verlag Chemie edit.
(1959) Weinheim. (4)
- HJERTEN S.
Biochem. Biophys. Acta. 1961, 53, 514. (7)
- HJERTEN S. et MOSBACH R.
Anal. Biochem. 1962, 3, 109. (1, 26)
- LADENBURG R.
Ann. Physik. Leipzig. 1907, 22, 287. (33)
- LANE J.A.
Chemical Engineer's Handbook Mc Graw-Hill Pub.Cy. New-York
(1950) section II, 753. (35)
- LATHE G.H. et RUTHVEN C.R.Y.
Biochem. J. 1956, 62, 665. (5)
- LATURAZE J.
Lyon Pharmaceutique 1963, 14, 101. (16)
- LAURENT T.C. et KILLANDER J.
J. Chromatog. 1964, 14, 317. (13, 52, 61, 62, 64, 65).

- OGSTON A.G.
Trans Faraday Soc. 1958, 54, 1754. (63, 66)
- ORSTEIN L.
Annals New-York Academy Sciences 1964, 121 art. 2, 321. (50,60)
- PEDERSEN K.O.
Arch. Bioch. . Biophys. 1962, suppl. 1, 157. (3)
- POLSON A.
Biochim. Biophys. Acta. 1956, 19, 53. (56)
- POLSON A.
Biochim. Biophys. Acta. 1961, 50, 565. (6, 57)
- PORATH J.
Proc. Int. Symp. Pharmaceutical Chemistry. Florence
Butterworth et Co. Ltd. Londres - in ANDREWS 15. (24, 42)
- PORATH J.
Chimie pure et appliquée. 1963, 6, 233 (10, 41, 44, 47,
72)
- PORATH J. et FLODIN P.
Nature 1959, 183, 1657. (8)
- RENKIN E.M.
J. Gen. Physiol. 1955, 38, 225. (32, 36, 37)
- SQUIRE P.G.
Arch. Biochem. Biophys. 1964, 107, 471. (12, 43, 46, 73)

- SMITHIES O.
Arch. Biochem. Biophys. 1962, suppl. 1, 125. (55)
- STEERE R.L. et ACKERS G.K.
Nature 1962, 196, 475. (2, 59)
- WHITAKER J.R.
Anal. Chem. 1963, 35, 1950. (14, 18, 22)
- ZIEM B.H. et STOCKMEYER W.H.
J. Chem. Phys. 1949, 17, 1301. (45)

*

*

*

T A B L E d e s M A T I E R E S

I. - INTRODUCTION 1
II. - Définition des termes et des symboles que nous utiliserons tout le long de cet exposé 3
III. - Données pratiques sur les gels commercialement disponibles.....	6
IV. - Equations fondamentales pouvant être établies en tenant compte des propriétés du gel et de la définition des constantes.	
A- Signification de K_D et de K_A 8
B- Equations fondamentales exprimant les différents volumes en fonction des constantes physiques du gel 9
C- Equations fondamentales exprimant la concentration du gel en polymère en fonction des constantes physiques 10
D- Relation entre la densité du polymère à l'état sec et sa densité après gonflement dans l'eau 10
E- Signification de $G.d_s$ 10
F- Relation algébrique entre K_D et K_A 11
V.- Expériences tendant à établir une relation entre le coef- ficient de distribution (K_D) et le poids moléculaire 11

VI. - Raisonnement en fonction d'éléments justifiant une restriction à la libre diffusion d'une molécule dans la phase stationnaire.	
- Expériences d'ACKERS 15
VII. - Raisonnement en fonction du calcul du volume accessible à une molécule.	
A- Raisonnement selon PORATH 23
B- Raisonnement selon SQUIRE 26
C- Discussion 29
D- Calcul du volume accessible à une molécule dans un gel théorique de structure cubique 31
1. Calcul du nombre de petites facettes dans cette structure 32
2. Calcul du volume interstitiel 32
3. Calcul du volume accessible 33
4. Calcul de K_{DE} 34
5. Calcul de K_{AE} 35
6. Calcul de la concentration du gel en polymère 35
7. Calcul de la longueur totale de barreaux dans un volume V_x de gel. 36
8. Autre calcul de la concentration du gel en polymère 37
9. Calcul de $G \cdot d_g$ 37
10. Expression de r en fonction des constantes physiques du gel....	37
11. Calcul de r pour des gels bien définis 38
12. Calcul d'une valeur approchée de n 40
13. Discussion de l'équation 63 41

a- Etude du terme $\frac{1}{(r + 3 b)}$	42
b - Etude du facteur $\frac{r^2}{(r + b)^2}$	42
c- Nouvelle expression pour K_{DE}	43
VIII. - Raisonnement d'exclusion moléculaire faisant intervenir la concentration du gel en polymère		
	44
A- Raisonnement selon LAURENT et KILLANDER	46
B- Discussion	47
C- Application d'un calcul de volume accessible à un gel de structure définie par LAURENT et KILLANDER	48
D- Conclusion	49
IX. - Application d'un raisonnement de restriction à la diffusion à une structure cubique.		
A- Restriction à la diffusion selon un axe perpendiculaire à la surface d'un pore.	50
B- Etude du phénomène à l'échelle d'une particule de gel		
1. Calcul du coefficient de distribution (K_{DR})	51
2. Cas où $2 n' = n$	54
3. Discussion de l'équation 111	54
4. Cas particulier où la restriction à la diffusion joue un rôle plus important.	55
5. Discussion	56
X. - Récapitulation générale des raisonnements	58
CONCLUSIONS GÉNÉRALES		
	63
- Bibliographie	67
- Table des matières	71

