Séparation des protéines par chromatographie préparative

par B. Mirabel *(Société Rhône-Poulenc Industrie, Centre de Recherches de la Croix-de-Berny, 182, Av. A. Briand, 92160 Antony)*

I. Introduction

La mise au point de méthodes préparatives performantes, pour la préparation de protéines purifiées, est devenue une nécessité compte tenu de l'intérêt croissant manifesté, tant par les pouvoirs publics que par les industriels, pour le développement des biotechnologies (fermentation, transformations enzymatiques, génie génétique).

Dès à présent la purification de protéines à l'échelle industrielle connaît un intérêt certain dans :
- le domaine alimentaire, avec la production d'isolats de soja, de protéines de lactosérum, de sang... qui ouvrent des horizons intéressants en diététique, ainsi que dans le domaine des additifs alimentaires naturels par suite de leurs propriétés fonctionnelles remarquables (pouvoir moussant, émulsifiant, gélifiant...),
- le domaine thérapeutique, avec notamment la production de protéines sériques purifiées (albumine, immunoglobulines spécifiques...),
- le domaine industriel, avec l'utilisation des catalyseurs biologiques spécifiques que sont les enzymes purifiées. Citons notamment l'utilisation de L aminocylase, pour la préparation de L aminoacide et plus particulièrement de L méthionine et de pénicilline amidase pour la production d'acide 6-amino penicillanique, matière première de base pour la préparation des penicillines semi-synthétiques.

Un grand nombre de techniques différentes sont utilisées pour la purification des protéines (1); il s'agit notamment des techniques suivantes :
- précipitation ;
- électrophorèse, isoélectrofocalisation ;
- ultracentrifugation ;
- ultrafiltration ;
- chromatographie (exclusion, échange d'ions, affinité...).

Toutefois seules les techniques de précipitation, d'ultrafiltration et de chromatographie semblent utilisables pour des productions industrielles de grandes quantités.

Le choix de la méthode de purification d'une protéine donnée dépendra des propriétés spécifiques de cette protéine (pH isoélectrique, masse moléculaire, affinité pour certains substrats ou inhibiteurs...) et de la nature des impuretés à séparer.

On retiendra que :
- la précipitation, qui correspond à la méthode la plus ancienne, présente l'inconvénient d'être peu spécifique et de conduire, dans la plupart des cas, à des protéines partiellement dénaturées ;
- l'ultrafiltration, qui permet de concentrer l'ensemble des macromolécules et de les séparer des petites molécules, ne permet pas de séparer les protéines entre elles ;
- la chromatographie, qui correspond à la technique préparative la plus spécifique, est la mieux adaptée pour la production de protéines de pureté élevée.

Dans certains cas, toutefois, la combinaison de ces différentes techniques peut être avantageuse.

Principales méthodes chromatographiques appliquées à la purification des protéines

Les principales méthodes de séparation chromatographiques des protéines sont directement basées sur les différentes propriétés caractéristiques des protéines en solution :

a. Séparations basées sur leur taille moléculaire
Les protéines sont caractérisées par une taille moléculaire élevée et peuvent, de ce fait, être purifiées par chromatographie d'exclusion (2).
Du point de vue de la préparation industrielle, cette technique sera d'autant plus performante que la taille des molécules à séparer sera différente. Elle s'appliquera donc préférentiellement aux séparations extrêmes du type :
- « dessalage » : séparation des protéines (grosses molécules) de petites molécules du type chlorure de sodium, sulfate d'ammonium, éthanol, lactose...
- déprotéination : séparation des microorganismes, des virus ou des micelles (grosses molécules) des protéines (comparativement assimilés à des petites molécules). Citons par exemple le cas de la séparation entre le virus de la grippe et l'ovalbumine.

b. Séparations basées sur leurs propriétés hydrophobes (3-7)
Les protéines renferment des zones hydrophobes (chaînes latérales des aminoacides non polaires) en nombre, taille et accessibilité variables ; elles peuvent, de ce fait, être purifiées par chromatographie hydrophobe en mettant à profit leurs interactions avec un adsorbant hydrophobe.

c. Séparations basées sur leurs charges électriques
La charge électrique des protéines dépend de leurs propriétés acido-basiques et est directement reliée au nombre et à la nature des chaînes latérales ionisables de leur chaîne polypeptidique.
Chaque protéine peut être caractérisée par son pH isoélectrique (pHi), pH auquel elle ne possède plus de charge électrique.
Leur séparation par chromatographie d'échange d'ions met à profit le fait :
- qu'aux pH inférieurs à leur pHi, les protéines ont une charge nette positive et peuvent être retenues sur les échangeurs de cations ;
- qu'aux pH supérieurs à leur pHi, elles ont une charge nette négative et peuvent être retenues sur les échangeurs d'anions.

d. Séparations basées sur leurs affinités biologiques spécifiques (6,9-13)
Certaines protéines possèdent la propriété d'interagir et de se lier de façon spécifique et réversible avec une autre molécule appelée ligand. Parmi les principales affinités biologiques, on peut citer notamment les interactions du type :
- enzyme : substrat ; enzyme : inhibiteur ; enzyme : coenzyme ;
- protéine réceptrice : hormone ;
- antigènes : anticorps...

La purification de ces protéines est obtenue par chromatographie d'affinité en mettant à profit leurs interactions avec un ligand spécifique immobilisé sur un support.

II. Choix des adsorbants

Les principales méthodes chromatographiques, ci-dessus définies, et notamment les chromatographies hydrophobe, d'échange d'ions et d'affinité, nécessitent que la protéine puisse accéder à la surface active du support.

Compte tenu de la taille moléculaire élevée des protéines, il faudra donc pouvoir disposer de support présentant une porosité élevée, permettant aux protéines d'accéder à la surface poreuse interne.

Les principaux supports utilisés, compatibles avec ces spécifications de porosité élevée, sont représentés par les gels d'agarose ou de polyacrylamide, de la cellulose, du dextrane ou des billes de silice poreuses.

Pour pouvoir envisager des productions importantes de protéines par chromatographie préparative industrielle, il convient, par ailleurs, de pouvoir disposer de supports poreux, de porosité contrôlée, présentant une rigidité mécanique et une stabilité chimique et biologique élevées.

C'est pour ces raisons que nous avons choisi d'utiliser les billes de silice poreuse développées par Rhône-Poulenc Chimie fine sous le nom de marque « Sphérosil ® ». La matrice minérale rigide ainsi que la forme sphérique des grains confèrent en effet aux Sphérosil des propriétés mécaniques (rigidité, incompressibilité, faible perte de charge lors de l'utilisation en colonne) permettant d'envisager des utilisations industrielles.

Caractéristiques des Sphérosil ®

Les Sphérosil ® présentent l'avantage d'avoir des caractéristiques bien définies et indépendantes des conditions d'utilisation (pH, force ionique) tant du point de vue coupe granulométrique que volume poreux, surface spécifique et diamètre poreux moyen (14).

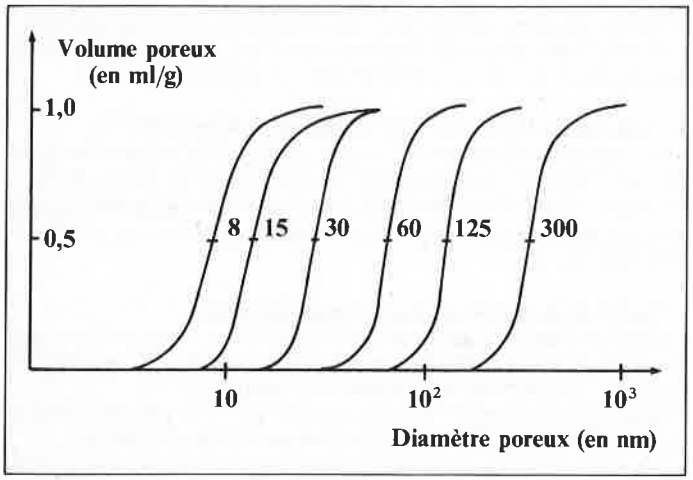
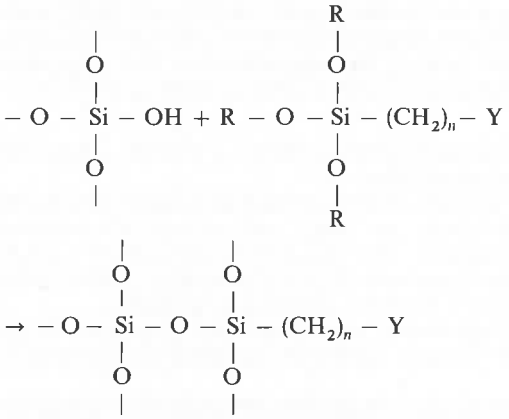


Figure 1. Répartition des diamètres poreux des Sphérosil.

Ces caractéristiques sont reportées dans le tableau 1. Les courbes de répartition des diamètres poreux sont, par ailleurs, présentées sur la figure 1.

• Pour les applications en chromatographie d'affinité ou en chromatographie hydrophobe, les Sphérosil peuvent être modifiés par greffage des groupements fonctionnels ou des ligands sélectionnés. Plusieurs modes de greffage ont été développés, le plus classique reste toutefois le greffage par silane selon la réaction :



avec Y = groupement fonctionnel à greffer.

• Pour les applications en chromatographie d'échange d'ions, les quatre types de Sphérosil échangeur d'ions suivants sont proposés par Rhône-Poulenc Chimie fine :

Sphérosil DEA	Échangeur d'ions basique faible	$-N\langle^{Et}_{Et}$
Sphérosil QMA	Échangeur d'ions basique fort	$-N(CH_3)_3^+Cl^-$
Sphérosil C	Échangeur d'ions acide faible	$-COOH$
Sphérosil S	Échangeur d'ions acide fort	$-SO_3H$

Ces échangeurs d'ions sont préparés à partir du Sphérosil XOB015 qui, par son diamètre poreux élevé (125 nm), permet une libre diffusion des protéines à l'intérieur des pores et permet donc d'obtenir, avec une cinétique rapide, des capacités en protéines élevées. La surface interne de l'échangeur est en effet largement accessible.

Tableau 1. Caractéristiques physiques des Sphérosil

Type de Sphérosil	XOA 400	XOA 200	XOB 075	XOB 030	XOB 015	XOC 005
Surface spécifique (m^2/g)	400	185	100	50	25	10
Diamètre poreux (nm)	8	15	30	60	125	300
Granulométrie	40-100μ et 100-200μ (150-350 mesh et 70-150 mesh)					
Volume poreux	1 cm^3/g					

III. Exemples d'applications préparatives : purification des protéines du lactosérum

III.1 Caractéristiques du lactosérum

Le lactosérum, ou petit lait, qui est obtenu comme sous-produit de la fabrication des fromages et de la caséine, se présente sous la forme d'un liquide jaune vert pouvant être globalement assimilé à une solution diluée de sels minéraux, de lactose et de protéines.

Selon son mode d'obtention, on distingue deux grands types de lactosérum : les lactosérums doux caractérisés par un pH voisin de 6,3 et les lactosérums acides caractérisés par un pH voisin de 4,5. La composition moyenne de ces lactosérums est reportée dans le tableau 2.

Dans les deux cas, les protéines du lactosérum forment une fraction complexe ; elles peuvent être classées en quatre groupes hétérogènes selon leur migration électrophorétique (15) : sérum albumine, β-lactoglobulines, α-lactalbumines et immunoglobulines.

Tableau 2. Composition moyenne des lactosérums (en g/100 g)

	Eau	Matières azotées	Lactose	Cendres	Matières grasses
Lactosérum doux	93,5	0,9	4,5	0,6	0,02
Lactosérum acide (lactique)	93,5	1	4,0	0,8	0,02

Les proportions relatives et les principales caractéristiques de ces différentes protéines sont rassemblées dans le tableau 3.

Tableau 3. Caractéristiques des protéines du lactosérum

Type de protéines	Masse moléculaire	Point isoélectrique	Proportion dans le lactosérum de bovins
• **Albumines :**			
β-lactoglobulines	18 200	5,2	53
α-lactalbumines	14 000	5,1	25
sérum albumine	69 000	4,9	6
• **Immunoglobulines**	160 000	5,8-7,3	16

III.2. Purification des lactoprotéines par chromatographie d'exclusion

Cette méthode a été préconisée par différents auteurs (16-20). La préparation de lactoprotéines purifiées par gel filtration, au Danemark, a été indiquée par Steiner (17); les applications potentielles de cette méthode dans le traitement des lactosérums ont été décrites par Lindquist et Williams (18) et Delaney et coll. (19-20). Elle n'a toutefois connu qu'un développement commercial très limité (voisin de 0) par suite :

- d'une part de la pureté moyenne des protéines obtenues en pratique (tableau 4);
- d'autre part de leur prix de revient élevé, lié en parties, à la dilution créée par le procédé.

Tableau 4. Composition moyenne des lactoprotéines obtenues par gel filtration (16)

Protéines (en %)	Lactose (en %)	Cendres (en %)	Matières grasses (en %)
41,9	24,9	11,5	0,8

Tableau 5. Caractéristiques des protéines obtenues après ultrafiltration et gel filtration sur Sphérosil XOA 400 (en % de la matière sèche).

	Protéines	Lactose	Cendres	Matières grasses
Après ultrafiltration	60	28,6	0,4	5
Après U.F. puis gel filtration	90	2,1	3,3	4,6

Dans le but d'améliorer la pureté des protéines obtenues, nous avons étudié la combinaison de la chromatographie d'exclusion avec l'ultrafiltration en tant que traitement de préconcentration et de prépurification.

Cette étude a été menée au stade pilote à partir d'une colonne de Sphérosil XOA 400. La pureté des protéines obtenues est très satisfaisante (cf. tableau 5); leur prix de revient reste toutefois trop élevé et n'est pas compatible avec leur prix de marché.

III.3 Purification des lactoprotéines par chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie d'échange d'ions est décrite dans la littérature pour la séparation analytique des lactoprotéines. Cette séparation analytique est essentiellement obtenue par déplacement chromatographique sur DEAE Sephadex (21) et DEAE cellulose (22).

Par mise en œuvre des Sphérosil échangeurs d'ions, nous avons récemment proposé un nouveau procédé pour la préparation de lactoprotéines purifiées tant à partir de lactosérum doux ou acide que de lait écrémé (8,23 à 26).

Les travaux menés au laboratoire, puis au stade pilote (cf. photo), vont se concrétiser en 1980 par le démarrage d'une première unité industrielle (production de 150 t/an de protéines purifiées).

III.3.1 Principe de mise en œuvre des Sphérosil échangeurs d'ions

Les Sphérosil échangeurs d'ions sont utilisés en colonne, le principe du procédé de séparation, représenté par la figure 2, se décompose en quatre étapes :

- adsorption des protéines

La solution de protéines à traiter est percolée sur la colonne de Sphérosil échangeurs d'ions. Les protéines restent adsorbées sur la colonne.

- lavage

La colonne est lavée à l'eau de façon à éliminer la solution déprotéinée restant dans son volume liquide.

- élution des protéines

Les colonnes de Sphérosil échangeurs d'anions sont préférentiellement éluées par des solutions acides et les colonnes de Sphérosil échangeurs de cations par des solutions basiques.

- lavage

Après élution la colonne est à nouveau lavée à l'eau de façon à éliminer la solution restant dans son volume liquide ; elle peut être ensuite directement réutilisée.

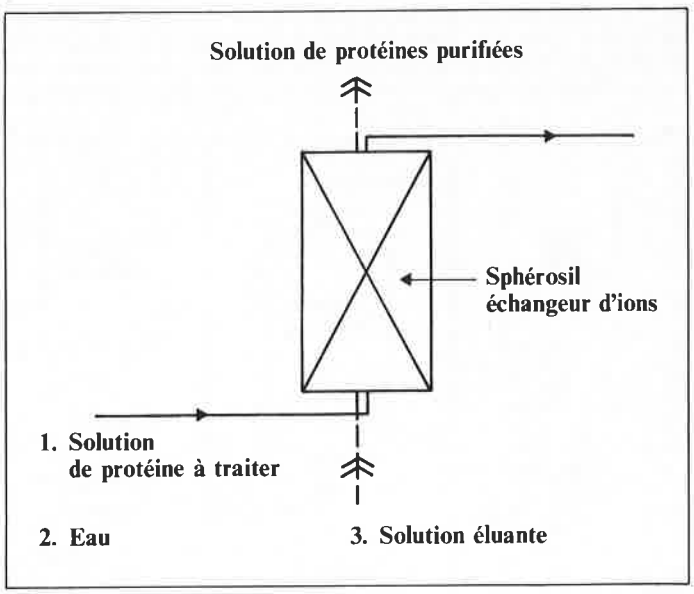


Figure 2. Schéma de principe

(*Document R.P.*)

Remarque

Dans le cas du traitement de solutions complexes contenant différentes protéines, il peut être avantageux d'utiliser deux colonnes en série ; une colonne de Sphérosil échangeurs d'anions et une colonne de Sphérosil échangeurs de cations dans le but notamment de fractionner les protéines entre elles.

III.3.2. Cas des lactosérums acides

Le procédé retenu (schéma de principe, figure 3) consiste à mettre en œuvre une colonne de Sphérosil échangeurs de cations (Sphérosil S). En effet, au pH du lactosérum acide (pH 4,6) l'ensemble des protéines est sous forme cationique et s'adsorbe sur échangeurs de cations.

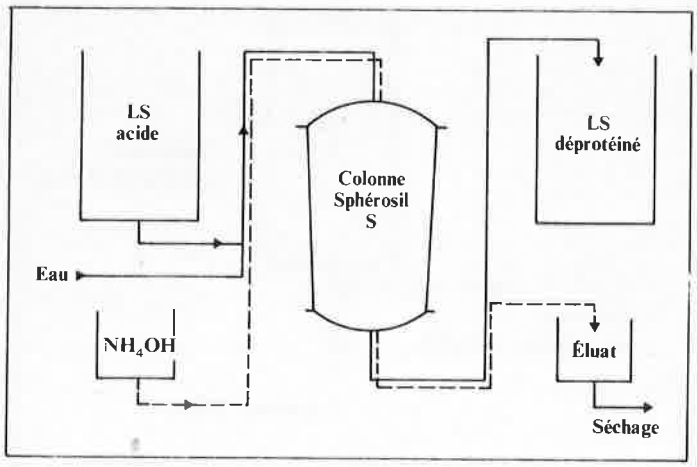


Figure 3. Procédé lactosérum acide. Schéma de principe.

Le bilan matière type d'un cycle de purification pour une unité de 450 kg de Sphérosil S, qui traiterait 10 000 litres/cycle de lactosérum acide à 6 g/l en protéines, est reporté dans le tableau 6. Il est possible d'effectuer sur cette base environ 10 à 12 cycles par jour.

Tableau 6. Lactosérum acide. Bilans d'un cycle

	Lactosérum traité	Lactosérum déprotéiné	Éluat
Volume l	10 000	10 900	1 200
Protéines g/l	6	voisin de 0	45

Tableau 7. Protéines de lactosérum acide. Analyse chimique

	Protéines Sphérosil S
Divers	
Azote protéique (%)	13,8
Cendres (%)	2,2
Lactose (%)	< 0,5
Matières grasses (%)	< 0,5
au (%)	6
Minéraux	
Ca (%)	0,8
P (%)	0,6
Na (%)	0,04
K (%)	0,03
Mg (%)	0,03

Les fractions protéiques éluées sont obtenues en solution à une concentration d'environ 4,5 %, c'est-à-dire environ 8 fois plus concentrées que dans le lactosérum initial, elles peuvent être ensuite séchées selon les technologies classiques (concentration, atomisation).

Les protéines purifiées obtenues sont solubles et ne sont pas dénaturées ; elles présentent une pureté élevée et ne contiennent notamment plus que des traces de lactose et de matières grasses : leur teneur en cendres reste par ailleurs très faible (tableau 7).

III.3.3 Cas des lactosérums doux

Le procédé retenu (schéma de principe, figure 4) consiste à mettre en œuvre une colonne de Sphérosil échangeurs d'anions (Sphérosil Q-MA) et une colonne de Sphérosil échangeurs de cations (Sphérosil-XOB 015). En effet, au pH du lactosérum doux (pH = 6,6) la plupart des protéines sont sous forme anionique et s'adsorbent sur échangeurs d'anions et une faible proportion (7 à 10 %), essentiellement constituée d'immunoglobulines, est sous forme cationique et s'adsorbe sur échangeurs de cations.

Le bilan matière type d'un cycle de purification pour une unité de 600 kg de Sphérosil QMA, qui traiterait 10 000 litres/cycle de lactosérum à 6 g/l en protéines, est reporté dans le tableau 8.

Tableau 8. Lactosérum doux. Bilan matière d'un cycle

	Lactosérum traité	Lactosérum déprotéiné	Eluat Sphérosil QMA	Eluat Sphérosil XOB 015
Volume (l)	10 000	115 000	750	95
Protéines (g/l)	6	-	60	40

De même que précédemment, avec le lactosérum acide, les protéines obtenues ici sont solubles et non dénaturées, et présentent une pureté élevée (tableau 9).

Tableau 9. Protéines de lactosérum doux. Analyse chimique

	Fraction Sphérosil QMA	Fraction Sphérosil XOB 015
Divers (%)		
Azote protéique	13	12,7
Cendres	2,5	3,7
Lactose	0,5	0,5
Matières grasses	0,5	0,5
Eau	9	9
Lactose	0,1	0,1
Minéraux (%)		
Ca	0,7	1,1
P	0,5	0,8
Na	0,08	0,02
K	0,06	0,07
Mg	0,04	0,5

Aspect économique (estimation juillet 1979).

L'estimation du coût de purification, par le procédé Sphérosil, a été plus particulièrement approfondie dans le cas du traitement de lactosérum doux, sur la base d'une étude pilote effectuée sur une période de deux ans avec un fonctionnement continu d'environ 18 mois.

Nous avons montré qu'il était possible, sur la base du schéma de principe de la figure 4, d'effectuer 10 à 12 cycles de purification par jour. Le coût du traitement (à l'exclusion de l'amortissement et des frais de séchage, estimé sur la base d'une durée de vie de deux ans des Sphérosil échangeurs d'ions (aucune baisse de capacité du Sphérosil QMA n'a été observée sur la durée des essais pilote), est d'environ 3 F/kg.

L'investissement pour une unité produisant 150 t/an de protéines étant d'environ 1 000 kF, le prix de revient de la protéine finie (amortissement et séchage compris) serait de l'ordre de 6 à 6,5 F/kg en accordant une valeur nulle au lactosérum.

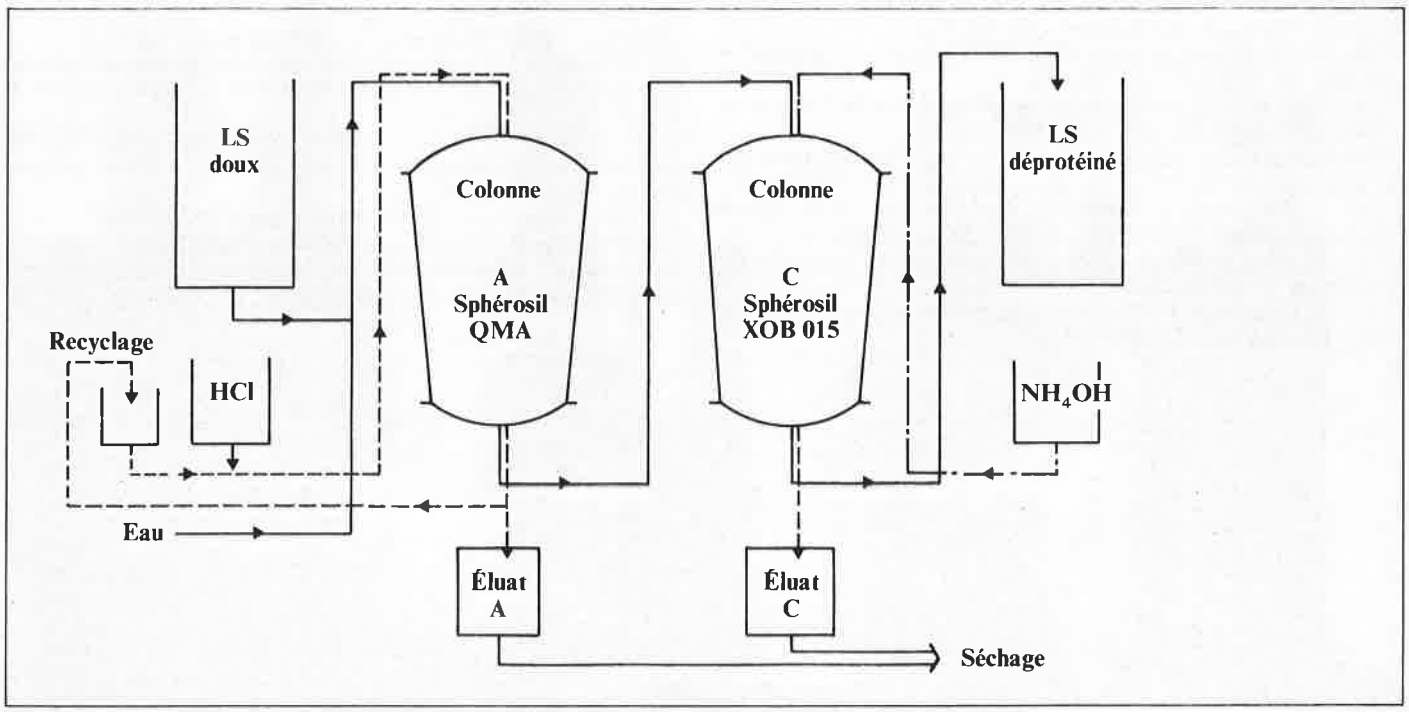


Figure 4. Procédé lactosérum doux. Schéma de principe.

Remarque

Les résultats, présentés ci-dessus, concernent le traitement des lactosérums doux et acides directement issus de fromageries ou de caséineries.

Il est, par ailleurs, possible de travailler à partir de lactosérum ayant préalablement subi différents traitements technologiques (déminéralisation totale ou partielle, déminéralisation et concentration, acidification, etc.).

Nous avons notamment constaté que les traitements de déminéralisation permettaient d'accroître la capacité effective en protéines des Sphérosils échangeurs d'ions en réduisant la compétition protéines force ionique au niveau des sites échangeurs d'ions.

III.3.4 Cas du lait écrèmé (25)

Le contenu protéique de lait écrèmé est constitué, pour une part, d'environ 6 g/l de protéines solubles que nous appellerons les séroprotéines (il s'agit de la fraction qui se retrouve dans les lactosérums), et, d'autre part, d'environ 30 g/l de caséine qui se présente à plus de 95 % sous forme d'un complexe salin à l'état micellaire. Dans le lait de vache, les micelles se trouvent sous forme de particules sphériques de diamètre moyen voisin de 100 nm.

Le procédé retenu pour la purification des protéines solubles du lait écrèmé est identique au procédé précédent de traitement du lactosérum doux. En effet, la caséine du fait de la taille de ses micelles, se trouve exclue du volume poreux des billes de Sphérosil et n'est donc pas retenue.

Ce procédé met donc en jeu à la fois un phénomène de chromatographie d'exclusion et un phénomène de chromatographie d'échange d'ions.

Après passage du lait écrémé sur les colonnes de Sphérosil, on obtient en sortie une solution contenant essentiellement la caséine, le lactose et les sels minéraux, à partir de laquelle il peut être possible de purifier la caséine native, soit par chromatographie d'exclusion, soit par ultrafiltration.

Les protéines solubles éluées des colonnes présentent des puretés comparables à celles des protéines issues du lactosérum doux.

IV. Conclusion

La chromatographie préparative est une méthode particulièrement intéressante pour la production de protéines à haut niveau de pureté et l'apparition récente, sur le marché, de supports minéraux poreux greffés échangeurs d'ions (Sphérosil échangeurs d'ions) devrait permettre un développement important de cette technique dans les années à venir.

Les travaux actuellement menés dans notre laboratoire laissent envisager des développements industriels à moyen terme dans des secteurs aussi variés que les protéines végétales (luzerne, colza, soja...), les protéines du sang (albumine, immunoglobuline) et les enzymes.

Bibliographie

(1) A. Atkinson, The purification of microbial enzymes, *Process Biochemistry*, 1973, **9,** 12.

(2) K. H. Altgelt et L. Segal, Gel permeation chromatography, Marcel Dekker, Inc. New York, 1971.

(3) S. Hjerten, Some general aspects of hydrophobic interaction chromatography, *J. Chromatogr.*, 1973, **87,** 325.

(4) B. H. J. Hofstee, Hydrophobic affinity chromatography of proteins, *An. Biochem*, 1973, **52,** 430.

(5) C. Chothia, Hydrophobic bonding and accessible surface area in proteins, *Nature*, 1974, **248,** 5446, 338.

(6) B. Bizzini, Quelques développements récents dans les techniques de séparation et d'étude des protéines, *Spectra 2000*, 1976, **31,** 12.

(7) A. L. Lehninger, Biochemistry, the molecular basis of cell structure and function. Worth Publisher, Inc. 1970, 1975.

(8) B. Mirabel, Nouveau procédé d'extraction des protéines du lactosérum, *Ann. Nutr. Alim.*, 1978, **32,** 243.

(9) C. R. Lowe et P. D. G. Dean, Affinity chromatography, John Wiley and sons Ltd, Londres, 1974.

(10) P. Cuatrecasas, Proteins purification by affinity chromatography, *J. Biol. Chem.*, 1970, **245,** 12, 3059.

(11) R. B. Dunlap, Immobilized biochemicals and affinity chromatography, Plenum Pres, New York, 1974.

(12) INSERM, 1979, vol 86. Les colloques de l'INSERM. Affinity chromatography.

(13) M. Dautrevaux, Applications de la chromatographie en phase liquide au domaine protidique, E.N.S.C. Montpellier 1972, 25.

(14) B. Mirabel, Enzymes immobilisées sur supports poreux, *Rivista Italiana*, 1977, **3,** 8, 143-148.

(15) Ch. Alais, Science du lait, principes des techniques laitières, 3e édition, Éd. Sep. 1975.

(16) G. Smith, Whey protein, *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 1976, **24,** 88.

(17) U. Steiner, Gel filtration, a new method of recovering whey proteins, *Dairy Sci.*, 1968, **30,** 3020.

(18) L. O. Lindquist et K. W. Williams, Aspects of whey processing by gel filtration, *Dairy Inds.*, 1973, **38,** 459.

(19) R. A. M. Delaney, Whey processing by reverse osmosis, ultrafiltration and gel filtration, Dairy Research Centre, Moorepark, Co. Cork (An Foras Taluntais 1971).

(20) R. A. M. Delaney, J. K. Donnelly et R. D. Kearney, Industrial applications of gel filtration, *Process Biochem*, 1973, **8,** 113.

(21) J. Hladik et J. Kas, Fractionation of whey proteins and casein of cow's milk on sephadex DEAE A 50 and A 25, *J. Chromatogr.*, 1973, **75,** 117.

(22) F. Cervone, J. D. Brito and al., Simple procedures for the separation and identification of bovine milk whey proteins, *Biochim Biophys Acta*, 1973, **295,** 555.

(23) Brevet français n° 75-26530 (publication n° 2.321.932).

(24) Demande de brevet français publiée n° 2.359.634.

(25) Demande de brevet français publiée n° 2.390.906.

(26) Demande de brevet français publiée n° 2.399.214.