Purification à l'échelle industrielle du virus grippal

Comparaison de l'ultracentrifugation de zone et de la chromatographie d'exclusion sur billes de silice

par C. Dulout *, A. Peyrouset *, P. Adamowicz ** et A. Poinsard **

(ELF Aquitaine, Centre de recherches de Lacq, 64170 Artix et ** Institut Pasteur Production, 92230 Garches)*

Introduction

La chromatographie d'exclusion a connu un développement important (1) avec la mise au point de gels de séparation à base de dérivés d'agar, de dextrans ou d'acrylamide. Les applications de cette technique de séparation selon la taille, de molécules biologiques ou non, sont innombrables dans les laboratoires. En revanche, son application industrielle est restée relativement peu répandue : les gels, non rigides, ne permettent pas de travailler avec des débits élevés et sont difficilement stérilisables.

La mise au point de billes de verre (2) ou de silice à porosité contrôlée (3), a donné un nouvel essor à la chromatographie d'exclusion : de tels supports ont une résistance mécanique et une résistance aux températures élevées qui autorisent précisément de forts débits et une stérilisation à l'autoclave. Les phénomènes d'adsorption non spécifique ont été éliminés par blocage des sites actifs de la silice au moyen d'agents polyoxyéthylénés (4, 5) rendant cette technique applicable industriellement.

Les nombreuses applications de cette méthode à la purification de virus de plantes ou de virus animaux (4, 6, 7, 8 et 9) ont démontré son efficacité à l'échelle du laboratoire.

Il nous est apparu intéressant de mettre au point les conditions de purification industrielle du virus grippal. C'est, en effet, l'antigène viral le plus important par le volume et le nombre des lots à purifier dans l'industrie biologique. Cette nouvelle méthode a été comparée à la technique de purification par ultracentrifugation zonale isopycnique sur gradient de saccharose. Cette dernière technique (10) est, en effet, celle qui est la plus largement utilisée par les producteurs de vaccin grippal depuis la mise au point des ultracentrifugeuses à rotor zonal alimenté à débit continu en échantillon (11).

Matériel et méthodes

Multiplication du virus

Cette étude a porté sur les souches du virus grippal correspondant à la situation épidémiologique en Europe de la période 1977-1978 : A/URSS/H_1N_1, A/Victoria/H_3N_2, A/Texas/H_3N_2 et B/Hong Kong.

Des aliquotes (0,2 ml) de suspension virale sont inoculées dans la cavité allantoïdienne d'œufs embryonnés de 10 jours ; après incubation à + 35 °C, pendant 2 à 3 jours, et après refroidissement des œufs à + 4 °C, les liquides allantoïdiens sont collectés et leur mélange clarifié par centrifugation. Des lots de 500 litres de liquide virulent sont ainsi préparés.

Concentration du virus

Les virions du liquide virulent clarifié sont adsorbés sur hématies de poule puis relargués pour obtenir une suspension virale de 60 litres. Cette suspension est partagée en deux fractions égales de 30 litres, dont l'une est directement soumise à l'étape de purification par ultracentrifugation zonale isopycnique, et dont l'autre est concentrée à nouveau par ultrafiltration jusqu'à un volume de 3 litres ; le concentrat virulent est soumis à l'étape de purification par chromatographie d'exclusion.

Purification par ultracentrifugation zonale isopycnique

La séparation par ultracentrifugation zonale isopycnique est réalisée dans un rotor K III (Electronucleonics) alimenté à débit continu en échantillon (12-15 l/h) sur un gradient de saccharose (2 à 60 %) autoformé dynamiquement et accéléré à 90 000 g. Après passage de l'échantillon, le rotor est décéléré jusqu'à l'arrêt dans les conditions qui permettent une réorientation convenable du gradient, et son contenu est récolté par le bas en 32 fractions de 100 ml. Les fractions les plus riches en activité hémagglutinante sont rassemblées et leur mélange constitue la préparation antigénique purifiée.

Purification par chromatographie d'exclusion

Une colonne d'un diamètre de 10 cm et d'une longueur de 120 cm est remplie de billes de silice (Sphérosil XOB 030, Rhône-Poulenc) de diamètre poreux moyen 60 nm et de granulométrie 100 à 200 µm. Le nombre de plateaux théorique de la colonne est de 3 000. Les sites adsorbants de la silice sont bloqués par passage d'une solution aqueuse de PEG 20 000 à 1 % pendant 24 heures. L'appareil (figures 1 et 2) est pourvu de dispositifs automatiques permettant un fonctionnement continu : la préparation d'antigènes à fractionner est injectée à intervalles de temps réguliers et les phases exclues et retardées sont respectivement distribuées en sortie de colonne, dans des récipients distincts, par des électrovannes commandées par un programmateur (12). La colonne est alimentée en solution tamponnée physiologique de pH 7,4 à un débit de 150 ml/mn et l'échantillon viral injecté par fractions de 500 ml. Les effluents en

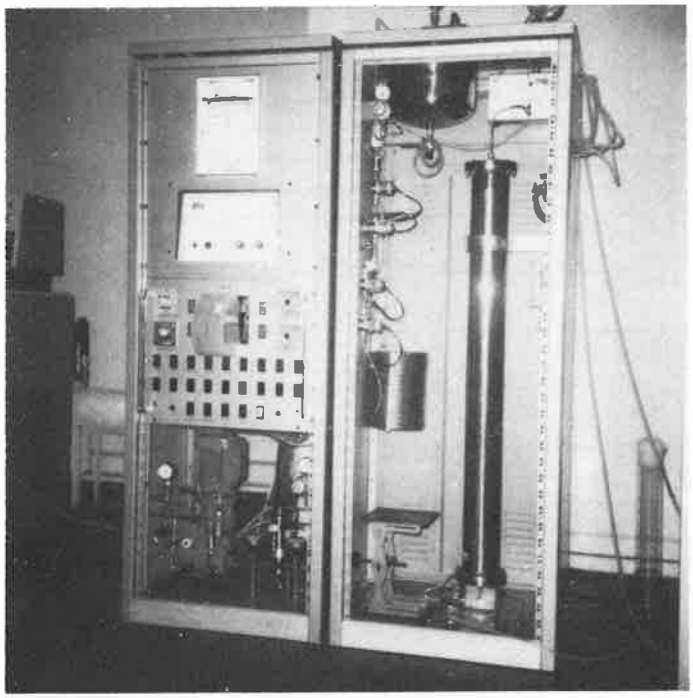

Figure 1. Chromatographe industriel.

sortie de colonne passent dans une cellule UV accouplée à un enregistreur qui inscrit le profil continu de la densité optique à 280 nm. La durée d'un cycle entre deux injections d'échantillon est de 1 heure

Activité hémagglutinante

Le titre en antigène viral est déterminé par l'hémagglutination d'hématies de coq, à 0,5 %, en microplaques ; il est exprimé en unités internationales (UI), rapporté à un étalon.

Taux de protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry (13), l'albumine bovine sérique servant d'étalon.

Densité apparente des antigènes purifiés

50 microlitres d'antigène purifié sont déposés sur un gradient préformé de saccharose (15-55 %) et centrifugés à 50 000 t/mn pendant 60 mn (rotor MSE SW 65 6 × 4,2 ml). Après centrifugation, les tubes sont percés et des fractions de 100 µl sont collectées et analysées pour déterminer, d'une part le taux de saccharose par réfractométrie, et d'autre part le titre hémagglutinant. La densité du pic d'activité hémagglutinante est déduite du taux de saccharose correspondant.

Microscopie électronique

Les antigènes purifiés sont examinés au microscope électronique (Philips EM 300) après coloration négative au phosphotungstate de sodium à 2 % (pH 7,4).

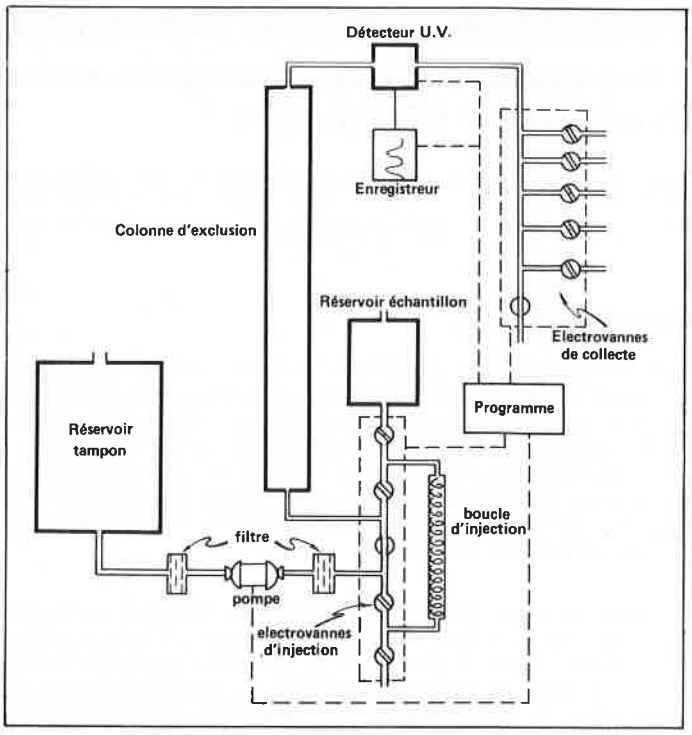

Figure 2. Schéma du chromatographe industriel.

Résultats

Séparation des antigènes viraux

Un profil de séparation par chromatographie est présenté dans la figure 3. Il a été contrôlé que l'activité hémagglutinante est retrouvée dans la phase exclue et se superpose au pic de densité optique à 280 nm, tandis que la phase retardée contient du matériel non viral. On doit remarquer l'identité des profils de densité optique après chaque injection d'échantillon, indiquant que la colonne conserve, dans le temps, un pouvoir de séparation non altéré par les passages répétés d'échantillon.

Le pic d'activité hémagglutinante obtenu par ultracentrifugation zonale (figure 4) est retrouvé dans les fractions denses du gradient (d = 1,14 à 1,22) ; on observe que l'importance de ce pic est beaucoup plus élevée que celle de la phase exclue obtenue par chromatographie, du fait qu'il correspond à l'injection sur le gradient de la totalité de l'échantillon à purifier, tandis que la phase exclue en chromatographie ne correspond à l'injection que d'une partie aliquote de l'échantillon.

Rendements

Les rendements des deux techniques de purification ont été calculés à partir des titres hémagglutinants des antigènes purifiés, rapportés aux titres des antigènes avant purification. On constate que les rendements obtenus par chromatographie sont légèrement plus

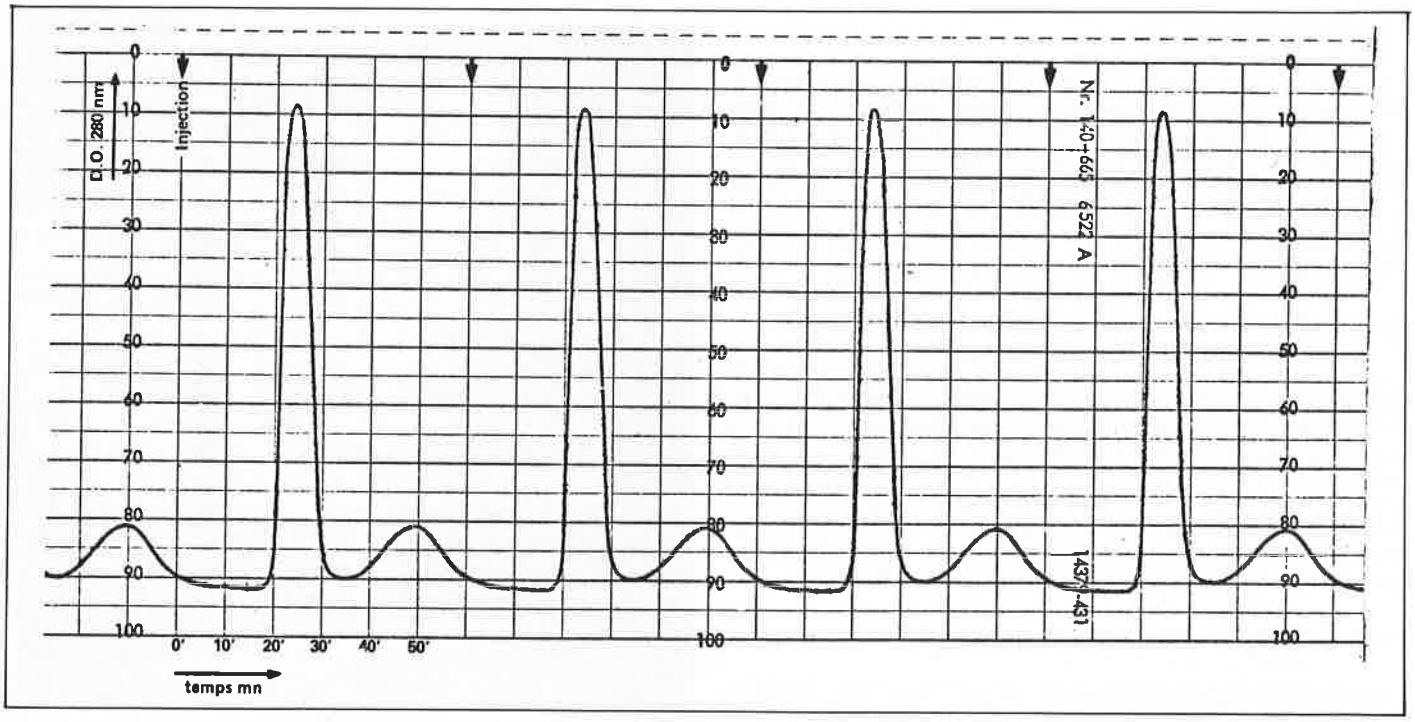

Figure 3. Chromatogrammes du virus grippal A/URSS/H_1N_1

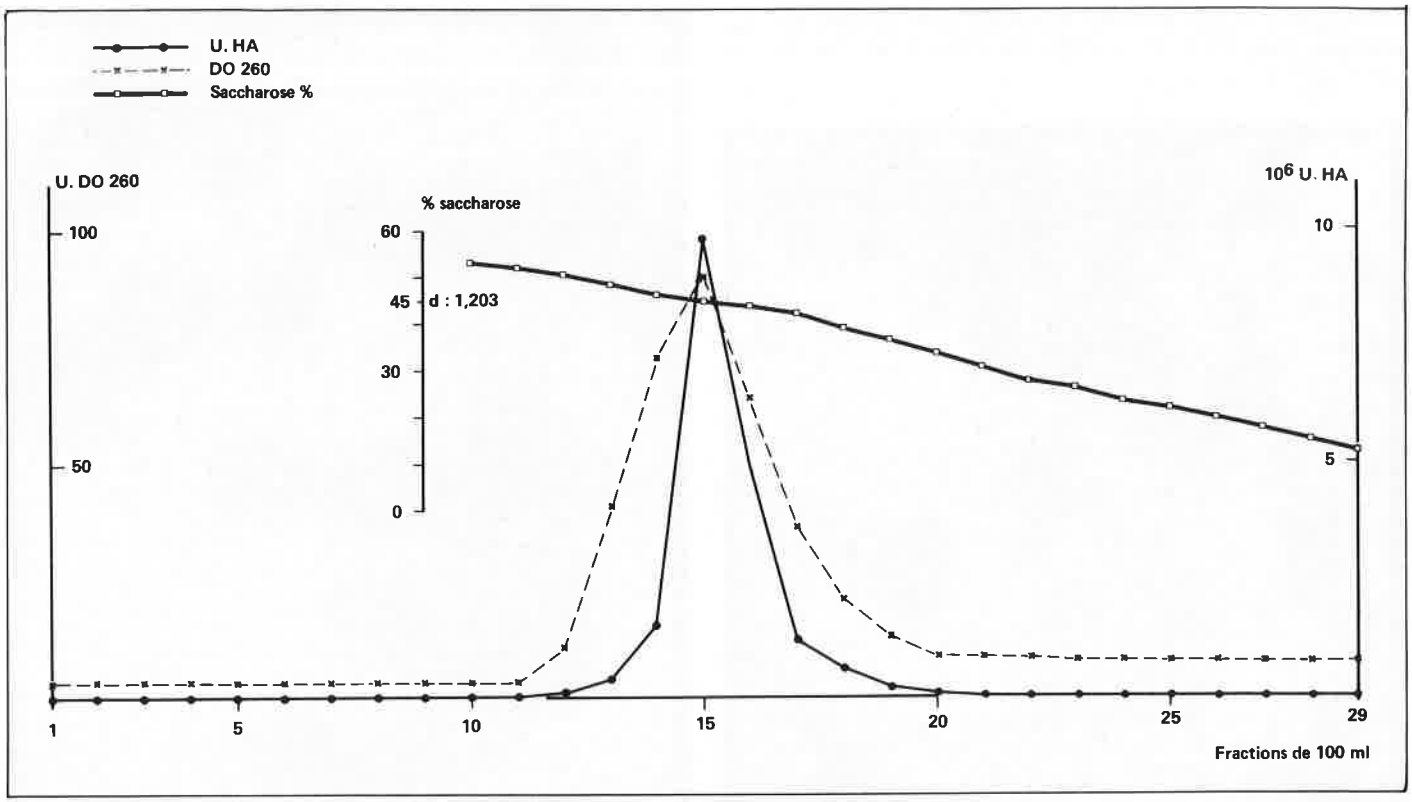

Figure 4. Ultracentrifugation en gradient de saccharose du virus grippal A/URSS/H_1N_1.

élevés, pour la souche A, que ceux obtenus par centrifugation zonale. Concernant le virus de la souche B, ils sont très nettement en faveur de la chromatographie.

Tableau I. Rendements en activité hémagglutinante obtenus par ultracentrifugation (U.C) et chromatographie (G.F.C.)

Souche	Lot	Rendements (%)	
		U.C.	C.F.C.
A/Victoria	1	71	83
	2	72	71
A/Texas	3	50	72
A/URSS	4	72	78
	5	68	80
B/Hong Kong	6	58	82
	7	66	82

Analyse des antigènes purifiés

Les activités spécifiques, définies comme l'activité hémagglutinante rapportée à 1 mg de protéine ont été déterminées pour les antigènes purifiés (tableau II); on constate qu'elles varient peu avec la technique de purification pour les souches A/Victoria et A/Texas tandis qu'elles sont sensiblement supérieures pour les antigènes types A/URSS et type B/Hong Kong purifiés par chromatographie.

L'intégralité des particules virales purifiées par chromatographie a été contrôlée par observation au microscope électronique (figure 5 et 6). On constate le même polymorphisme que pour toute autre préparation du virus grippal purifiée par centrifugation zonale. Les particules sont non aggrégées présentant une couronne de spicules caractéristiques des myxovirus.
De même, la densité des antigènes purifiés a été contrôlée

Tableau II. Activités spécifiques des antigènes purifiés par ultracentrifugation (U.C.) et chromatographie (G.F.C.)

Souche	Lot	Activité (U.I/mg)	
		U.C.	G.F.C.
A/Victoria	1	15 000	14 500
	2	17 000	16 200
A/Texas	3	13 600	12 100
A/URSS	4	12 900	16 600
B/Hong Kong	5	14 800	17 000
	6	15 800	21 400
	7	14 600	17 800

Tableau III. Densité des antigènes purifiés par ultracentrifugation (U.C.) et chromatographie (G.F.C.)

Souche	Lot	Densité	
		U.C.	G.F.C.
A/Victoria	1	1,205	1,197
	2	1,195	1,189
A/Texas	3	non déterminée	non déterminée
A/URSS	4	1,203	1,184
B/Hong Kong	5	1,182	1,183
	6	1,192	1,190
	7	1,196	1,190

(tableau III) : aucune différence significative n'est décelée entre les antigènes d'un même lot, purifiés par chromatographie ou par centrifugation zonale.

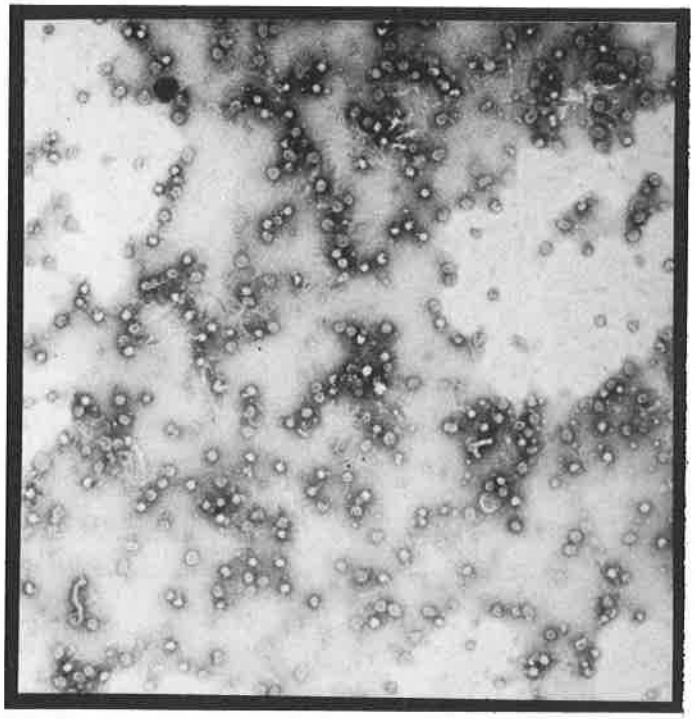

Figure 5. Microscopie électronique du virus grippal (A/URSS/H_1N_1) purifié par chromatographie.
Coloration négative au PTA 2 % (grossissement × 12 000)

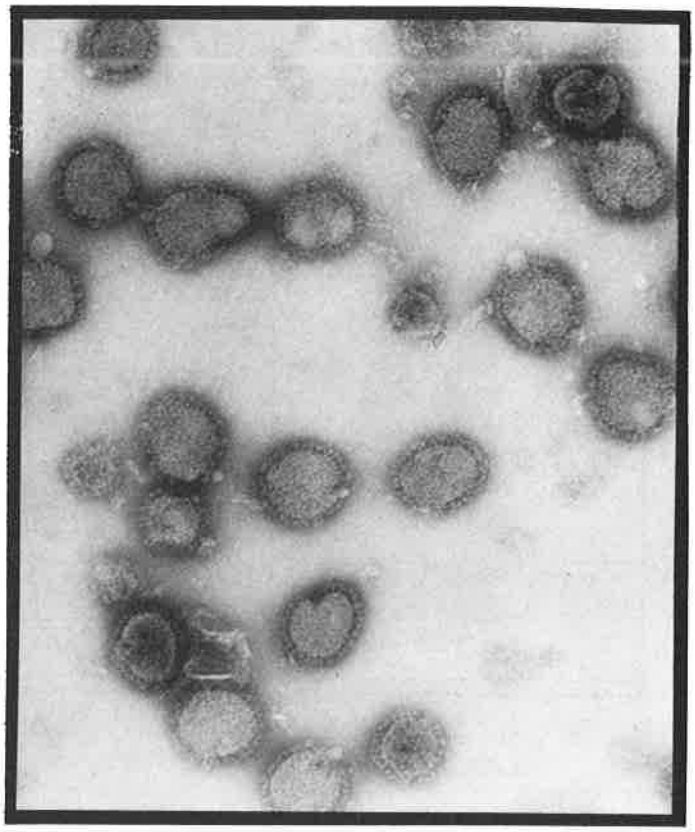

Figure 6. Microscopie électronique du virus grippal (A/URSS/H_1N_1) purifié par chromatographie.
Coloration négative au PTA 2 % (grossissement × 120 000)

Discussion

Dans cette étude, nous avons comparé deux méthodes appliquées industriellement pour la purification du virus grippal : l'ultracentrifugation zonale et la chromatographie d'exclusion sur billes de silice. La chromatographie s'est révélée au moins égale et souvent supérieure à l'ultracentrifugation, tant en ce qui concerne les rendements que la pureté, tout en conservant la structure du virion. Les autres avantages liés à cette méthode de purification sont :

- la simplicité d'utilisation liée à l'automatisation ;
- un coût d'exploitation faible ;
- la reproductibilité de la séparation : les conditions de la séparation sont retrouvées intactes à chaque injection d'échantillon. Ceci n'est pas le cas dans l'ultracentrifugation zonale en continu car le gradient de densité accumule les impuretés dans les fractions légères ; or, les virions doivent traverser ces couches pour atteindre leur zone d'équilibre dans les couches denses du gradient.

En revanche, le système de purification par chromatographie nécessite une concentration élevée de l'échantillon à purifier car, par exemple, la capacité de traitement d'une colonne de 10 cm de diamètre est de 12 litres par 24 heures. On peut envisager d'utiliser des colonnes de plus fort diamètre ; mais il est préférable de travailler avec des échantillons les plus concentrés possibles, le passage de l'échantillon à travers la colonne s'accompagnant d'une dilution d'un facteur 3. Ceci impose une concentration ultérieure de l'antigène purifié ; cette opération est facilement réalisée sur cassette Millipore car on se trouve en présence d'une suspension de virus pur dans du tampon d'élution.

Enfin, l'échantillon doit être stérile car, s'il est contaminé par des germes bactériens, ceux-ci sont exclus dans la même fraction que les antigènes ; l'ultracentrifugation permet, en revanche, d'éliminer un grand nombre de ces contaminants.

Nous pensons que ces inconvénients sont largement compensés par les avantages décrits à savoir : les rendements, la pureté et la simplicité d'utilisation. Cette technique, qui remplace avantageusement l'ultracentrifugation pour la purification du virus grippal, est appelée à connaître d'importants développements pour la séparation industrielle des antigènes de haut poids moléculaire, tant viraux que bactériens.

Bibliographie

(1) J. Porath et P. Flodin, *Nature*, London, 1959, **183**, 1657.
(2) W. Haller, *Nature*, London, 1965, **206**, 693.
(3) M. Lepage, R. Beau et A. J. De Vries, *Anal. Chemistry*, 1967, **39**, 935.
(4) C. W. Hiatt, A. Shelokov, E. J. Rosenthal et J. M. Galimore, *Journal of Chromatography*, 1971, **56**, 363.
(5) G. L. Hawk, J. A. Cameron et L. B. Dufault, *Preparative Biochemistry*, 1972, **2**, 193.
(6) W. Haller, *Virology*, 1967, **33**, 740.
(7) K. Marcinka, *Acta Virol.*, 1972, **16**, 53
(8) R. J. Barton, *J. gen. Virol.*, 1977, **35**, 77.
(9) J. T. Heyward, R. A. Klimas M. D. Stapp et J. F. Obijeski, *Archives of Virology*, 1977, **55**, 107.
(10) C. B. Reimer, R. S. Baker, R. M. van Frank, T. E. Newlin, G. B. Cline et N. G. Anderson, *J. Virol.*, 1967, **1**, 1207.
(11) N. G. Anderson, *Nature*, 1963, **199**, 1166.
(12) A. Peyrouset et R. Panaris, *J. of Applied Polym. Science*, 1972, **16**, 315.
(13) D. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Rendall, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.