

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Essai de mise au point d'une purification du polysaccharide C de Neisseria meningitidis en vue de la préparation d'un vaccin

RUSCART, Patricia

Award date:
1990

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

**Essai de mise au point d'une purification du polysaccharide C de
Neisseria meningitidis en vue de la préparation d'un vaccin**

RUSCART Patricia

Résumé

Nous avons tenté de mettre au point une nouvelle méthode de purification du polysaccharide capsulaire du sérogroupe C de *Neisseria meningitidis*, une bactérie gram-négative responsable d'une forme de méningite chez l'être humain. Ces polysaccharides sont utilisés comme vaccins. Après détermination du pK du polysaccharide par titrages conductimétriques et potentiométriques, nous avons essayé de séparer le polysaccharide immunogène des endotoxines contaminantes par chromatographie d'échange d'anions. Les résultats obtenus montrent la nécessité d'une étape préalable de purification du jus complet de fermentation.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1990

promoteur : P. Van Cutsem

Remerciements

Je remercie Monsieur le Professeur Van Custem pour l'accueil dans son laboratoire et pour les conseils judicieux qu'il m' a donné durant ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur Mignolet et Pascale Demile de Smith Kline Biologicals pour leur accueil et leur aide précieuse.

Je remercie plus particulièrement tous les membres du laboratoire de Biotechnologie Théorique et toutes les personnes qui m'ont aidé à SKB et aux facultés.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 1 INTRODUCTION: Méningites bactériennes et vaccination.

1)La maladie	1
2) Historique des méthodes de lutte préventive	1
3)Composition des polysaccharides meningococcique	3
4)Le MENCEVAX	4
- Présentations commerciales	4
- Structure des PS constitutifs (A,C,W,Y)	4
5)Methode actuelle de production du MENCEVAX	
- Résumé du principe	5
- Schéma simplifié de la production des quatre polysaccharides	8

CHAPITRE 2: Caractérisation du polysaccharide C

1)Rappel de sa structure	9
2)Autres Informations	
- Observation de 2 pics	10
- Difficulté d'analyse par HPLC	10
- Infos SKRit sur PSA	11

CHAPITRE 3:Audit de la méthode classique

1)Buts	12
2)METHODE	
- Schéma de production détaillé	12
- Echantillonnage	13
- Méthode d'analyse et difficultés	14
- Spécificité QC du PSC	14
-Bilan:contribution des différentes étapes	15
-Problèmes	16

CHAPITRE 4: Objectif du travail

- JUSTIFICATION	17
- METHODOLOGIE	17

CHAPITRE 5: Matériel et méthodes

1) Développement MENCEVAX : analyse des échantillons	
1) Traitement	18
2) Dosage de l'acide sialique	18
3) Dosage des acides nucléiques	19
4) Dosage des endotoxines	21
5) Dosage des protéines	21
2) Titrages acidimétrique et conductimétrique	24

CHAPITRE 6: Essais de purification par échangeur d'ions

1) Recherche du pK du PSC	
-Titrage du PSC acidifié	26
-Titrage du PSC non acidifié	28
-conclusion	29
2) Choix du gel	29
3) Mise au point de la chromatographie à partir d'un polysaccharide C purifié par voie classique	
1) Méthode d'analyse quantitative du PSC	29
2) Condition d'adsorption du PSC sur le gel	
A) Essais avec le tampon tris	30
-essais par lots pour sélectionner le pH d'adsorption.	30
-essais par lots pour déterminer les conditions ioniques d'adsorption.	31
-conclusion des essais de fixation sur le gel par lots, réalisés avec le tampon tris	33
B) Essais avec le tampon PO ₄	33
-essais par lots pour sélectionner le pH d'adsorption.	33
-essais par lots pour déterminer les conditions ioniques d'adsorption.	33

-essais par lots pour vérifier l'effet du pH sur l'adsorption du PSC en présence de tampon PO4 0,01N contenant du NaCl 0,15M.	34
3)Condition de décrochage	34
4)Essais sur colonne	
1)Colonnes de 7ml de gel DEAE TSK	36
2)Colonnes de 23ml de gel DEAE TSK	37
4)Essais de purification du PSC natif	
1)Essai sur colonne DEAE TSK 7ml avec du tampon PO4 0,01N et un gradient de NaCl de 0,15 à 1M	38
2)Essai sur colonne DEAE TSK 23ml avec dutampon PO4 0,01N et un gradient de NaCl de 0,15 à 0,4 M	38
5)Conclusion	39
6)Essais réalisé sur EGTA	40
a)Essai réalisé par lots pour déterminer la concentration en EGTA à utiliser pour la chromatographie	40
b)Essai sur colonne DEAE TSK 7ml	42
<u>CHAPITRE 7: CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	43

CHAPITRE I CONTEXTE : MENINGITES BACTERIENNES ET VACCINATION

1) LA MALADIE

La méningite est le nom générique donné à toute espèce d'inflammation des espaces méningés. Elle peut-être aiguë ou chronique, et peut-être d'origine virale, bactérienne, chimique (intoxication par la vitamine A, saturnisme) ou physique (insolation).

La plupart des cas de méningites sont néanmoins d'origine bactérienne et sont principalement dues à trois microorganismes différents dont le plus courant est *Neisseria meningitidis* ou meningocoques. Il faut également citer *Hemophilus influenzae* et *Diplococcus pneumoniae*.

Il existe plusieurs sérogroupes de ce meningocoque : A, B, C, D, E, γ , Y, W (anonyme 1975) (remarque : les meningocoques ne sont responsables que de 32% des cas de méningite bactérienne)

La méningite qui nous intéresse est celle provoquée par le séro groupe C de *Neisseria meningitidis*.

C'est une maladie endémique pouvant dégénérer en épidémie dans certains pays africains particulièrement touchés. Les trois sérogroupes principaux A, B, et C de *N.meningitidis* se rencontrent dans des régions différentes du globe : Le séro groupe A est particulièrement présent en Afrique et tend à s'étendre en Europe par le sud; le séro groupe B est très étendu en Europe; le C aux états-unis.

Une des classes principales de population atteinte par cette maladie est celle des enfants de 3 à 5 ans, qui constituent 50% des cas, l'autre groupe est constitué de jeunes gens de 17 à 24 ans. Par contre, la méningite n'atteint qu'exceptionnellement les enfants avant leur troisième mois, immunisés par le passage transplacentaire d'AC anti-meningococciques du type IgG.

2) L'historique (des vaccins antimeningocoques et Chimiothérapie)

(SK. recherche et développement 1975)

- 1) Découverte du meningocoque par Weihselboum en 1887
- 2) Apparition des sérums antimeningococciques début XXème siècle (diminution du taux de mortalité de 80 à \pm 20%)
- 3) Les vaccins anciens

Des vaccins tués ont été essayés en Afrique depuis 1915, et ce avec des succès (ou échecs) divers. Ces résultats peuvent s'expliquer par le mode de fabrication du vaccin et par une dépolymérisation possible de l'Ag avec perte de son pouvoir immunogène.

4) La chimiothérapie

Comme pour le cas de la pneumonie, devant les médiocres succès de la vaccinothérapie et la toxicité des vaccins atténués les cliniciens se sont tournés vers la chimiothérapie. Dès 1943, les sulfamidés furent employés avec succès, et ce pendant une vingtaine d'années. Les sulfamidés réduisent la mortalité à $\pm 10\%$ et détruisent également les germes chez les porteurs. Mais dès 1963, les souches de meningocoques deviennent de plus en plus résistantes aux sulfamidés.

En 1964, on essaie de juguler les phénomènes de résistance par l'emploi de pénicilline G, V, de tétracycline, d'érythromycine d'ampicilline mais sans succès ...

Il est à remarquer que la méningite, à ses débuts est guérissable par des antibiotiques, mais, ses premiers symptômes ressemblant à ceux de la grippe(*) , il est souvent trop tard quand on la détecte. Cette situation critique allait relancer la recherche d'un vaccin efficace contre la méningite.

5) Vaccin

Les Ag intéressants au point de vue "vaccin" se retrouvent dans la capsule et dans la paroi cellulaire des meningocoques. En 1969, Gotschlich, Lui et Artenstein publièrent une méthode permettant d'isoler les polysaccharides capsulaires des sérogroupes A et C de *Neisseria meningitidis*, utilisant un détergent cationique, le CETAVLON, pour complexer l'Ag et obtenir des ps de haut poids moléculaire (>100.000 Daltons). Bien que n'étant pas immunogène pour l'animal, il fut prouvé qu'il induit une forte réponse immunitaire chez l'homme. (les essais ont donc dû se faire directement sur l'homme). En 1930, l'efficacité du PSA, correspondant à *N meningitidis* groupe A, fut démontrée par une campagne de vaccination de l'O.M.S. Une expérience semblable à été réalisée au Brésil où, en moins de six mois, 90 millions de personnes furent vaccinées parmi lesquelles 90% environ furent protégées. La protection contre la méningite est constatée par l'accroissement dans le sérum du patient vacciné du nombre des AC dirigés contre le meningocoque incriminé. Le PSC quant à lui a été utilisé aux Etats-Unis où le groupe C est prépondérant. Les recrues militaires des trois armées sont vaccinées systématiquement depuis 1971, avec un taux de protection voisin de 90%. Par ailleurs, le PSB ne provoque pas l'apparition D'AC chez l'homme et ne peut donc être utilisés tel quel comme vaccin.

(*) A savoir : céphalée, rachialgies, fièvre à 40°C
raideur de la nuque, douleurs articulaires.....

Traitement : Sulfamidés
Antibiotiques (Chloramphénicol, ampicilline.)

3) COMPOSITION CHIMIQUE DU PS

Les meningocoques peuvent être classés en divers serogroupes au moyen de réactions d'agglutination. Les PS capsulaires sont les Ag responsables de cette spécificité; leur composition chimique est reprise au tableau 1 (GOLD 1979)

Tableau 1

Monomères constitutifs des PS capsulaires des méningococciques

: Serogroupe:	Unité répétitive du PS	:
: A	: N-acétyl, O-acétyl mannosamine 6-phosphate (α -1-6)	:
: B	: Acide N-acétyl neuraminique (α -2-8)	:
: C	: Acide N-acétyl, O-acétyl neuraminique (α -2-9)	:
: C"variant"	: Acide N-acétyl, neuraminique (α -2-9)	:
: D	: Inconnu	:
: H	: (2-glycérol-3)-->(phosphate-3)-->	:
:	: 4 -D glucopyrannose-1 avec O-acétylation partielle,	:
:	: sur le galactose:	:
: X	: N-acétyl glucosamine-4-phosphate (α -1,4)	:
: Y	: Acide N-acétyl, O-acétyl neuraminique : glucose	:
:	: (α -2-6)	:
: Z	: Inconnu	:
: W135	: Acide N-acétyl neuraminique : glucose (α -2-6)	:
: 29E	: Acide 3-désoxy octulosonique : 2-désoxy-galacto-	:
:	: samine	:

4) LE MENCEVAX

- Présentation actuelle

Le vaccin anti-méningococcique fut un des premiers vaccins constitué par une molécule isolée de bactérie pathogène. Il s'agit de polysaccharides capsulaires extraits des différents sérogroupes de *Neisseria meningitidis*. Le vaccin MENCEVAX produit par la société SMITH KLINE BIOLOGICALS contient les polysaccharides des principaux sérogroupes pour lesquels ce type d'antigène confère une protection chez l'homme.

Il peut avoir 3 présentations commerciales :

- vaccin pour le séro groupe A
- vaccin pour le séro groupe A et C
- vaccin pour les sérogroupes A,C,W et Y

Il se compose des polysaccharides correspondants lyophilisés (50µg/dose) et de lactose comme stabilisant.

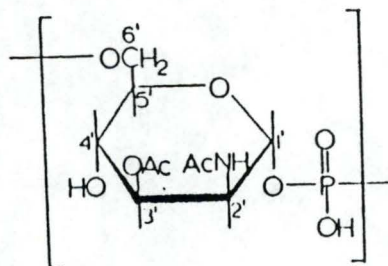
Sous forme lyophilisée , il se conserve 3 ans à +2.C/+8.c
 9 mois à +22.C
 2 semaines à +45.

Sous forme diluée 2 semaines à +25.C
 (ANHOURY 1980) 2 mois à +4.C

- STRUCTURE DES POLYSACCHARIDES CONSTITUTIFS

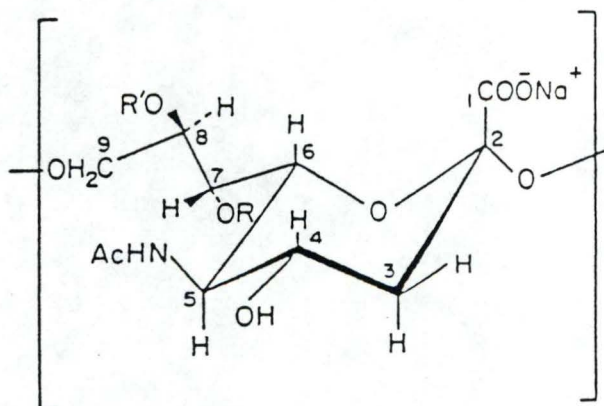
Monomère constitutif du PSA

N-acétyl, O-acétyl mannosamine- 6 - phosphate (α -1-6)



Monomère constitutif du PSC

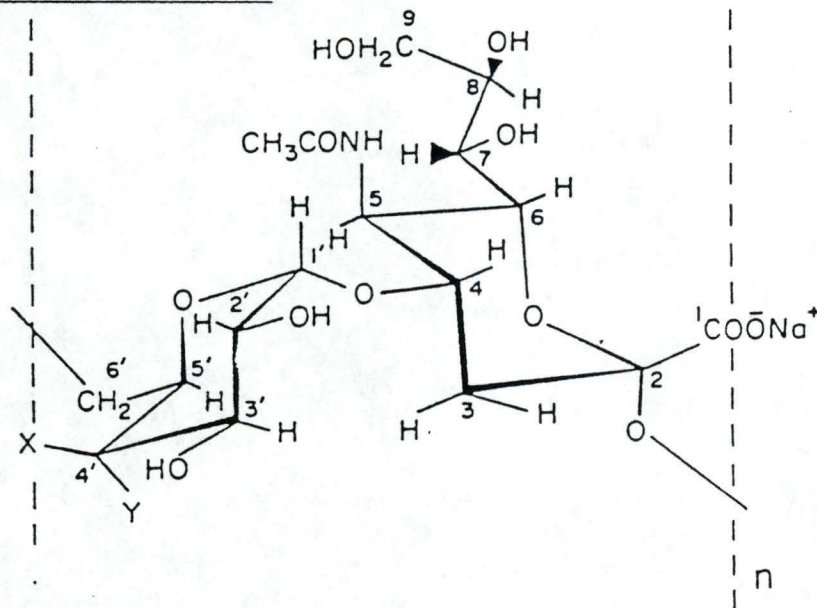
- 4 possibilités a : R=R'=H
 b : R=R'=COCH3
 c : R=H, R'=COCH3
 d : R=COCH3, R'=H



Acide N-acétyl, O-acétyl neuraminique (α -2-9)

Monomères constitutifs du PSY et du PSW

Pour le PSY : X = H
 Y = OH
 Pour le PSW 135 : X = OH
 Y = H



(BHATTARSEE ET ALL (1975))
 (JENNINGS Et AL (1977))

Acide N-acétyl, O-acétyl neuraminique glucose (α -2-6)

5) METHODE ACTUELLE DE PRODUCTION MENCEVAX

REMARQUES PRELIMINAIRES (Dumont de Chassart (1987))

1- Les méthodes d'extraction de polysaccharides bactériens en vue d'une utilisation comme vaccin doivent préserver au maximum les caractéristiques de la molécule native, afin d'éviter les pertes d'immunogénicité.

Des études menées lors des campagnes de vaccination ont montré l'importance du poids moléculaire du polysaccharide injecté sur la réponse immunitaire des volontaires vaccinés. Il faut aussi noter que la perte de certains groupements tel que le groupe O-acétyl, peut réduire l'efficacité du produit.

2- Un autre point important est la pureté du produit. Il doit être parfaitement stérile et maintenu tel jusqu'à l'utilisation et ne doit être la cause d'aucune autre réaction adverse : Fièvre, allergie, ... Les normes concernant la teneur en protéines acides nucléiques et substances pyrogènes sont publiées par l'O.M.S. (WHO) et les producteurs de vaccins doivent s'y conformer.

Les vaccins anti-méningococciques par exemple sont subordonnés aux "technical report series" N.594 & 610 (W.H.O. 1976-1978). Les méthodes de purification y sont également décrites.

3- Toute innovation visant à améliorer une méthode de production doit faire l'objet d'un dossier à soumettre aux autorités responsables de l'enregistrement des vaccins, qui peuvent imposer au producteur, en préalable à la mise en oeuvre de cette innovation de démontrer (par un coûteux essai clinique), qu'elle n'affecte pas l'inocuité et l'immunogénicité du produit.

c- METHODE

(Méthode de production Mencevax : 29-11-85)

o SOUCHES

Les souches utilisées pour la préparation des polysaccharides ont été obtenues sous forme lyophilisée du Dr E.C. Gotschlich qui a jeté les bases de la mise en oeuvre des vaccins antiméningites bactériennes (réf : Gotschlich 1976)

Des cultures sur boîtes de Pétri sont suspendues dans un milieu de conservation et congelées par petites portions à -70°C pour constituer le "seed"

Les caractéristiques de ce seed doivent être vérifiées régulièrement. Cet examen comprend les point suivants :

- 1) Une coloration Gram d'une culture doit faire apparaître des coques Gram négatifs caractéristiques de *N.meningitidis*.
- 2) La souche doit pousser à 37°C et non pas à 25°C.
- 3) Elle doit être capable d'utiliser le glucose et le maltose et non le saccharose, le lévulose, le manitol, le lactose....
- 4) Les colonies sur agar doivent être oxydase positives
- 5) Une suspension de la culture doit s'agglutiner en présence d'un antisérum spécifique du groupe.

o FERMENTATION

Les souches ensemencent des milieux solides et liquides pour produire la préculture destinée à ensemencer le fermenteur de production préalablement stérilisé.

Le milieu de culture est stérilisé par filtration. Le pH et la pression de la culture en fermenteur sont surveillés par des sondes et régulés. La culture est arrêtée en fin de la phase logarithmique de croissance (correspondant à l'élévation rapide du pH et de l'O₂ dissous) puis inactivée à 56.C. On transvase la culture inactivée dans une cuve de stockage.

Célite: terre de diatomée, Kieselguhr, frustules et fragments silique d'espèces variées de diatomées. Elle est utilisée comme agent clarifiant.

Cétavlon: Cetrimonium Bromide, N,N,N-triméthyl-1-hexadécylaminium bromide... $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Br}$. Il est utilisé comme détergent cationique et comme antiseptique.

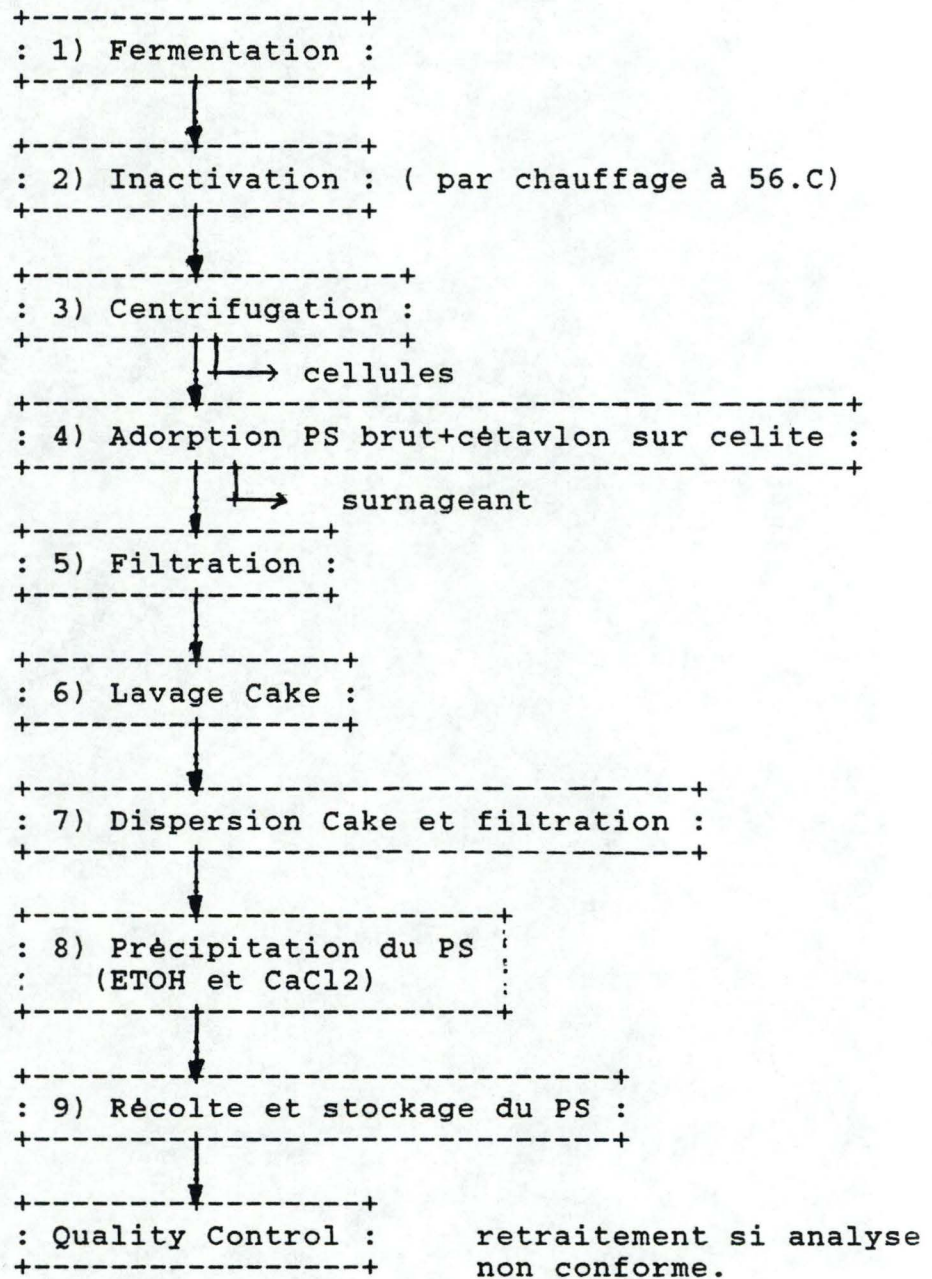
o EXTRACTION

Après contrôle d'inactivation, on effectue la centrifugation, les cellules tuées sont éliminées et le surnageant est recueilli, celui-ci contient le PS et trois principaux contaminants : Les acides nucléiques, les protéines et les endotoxines ou lipopolysaccharides. On y ajoute de la célite et une solution de Cétavlon, le tout est mélangé par agitation mécanique. A ce stade, on a formation de complexes entre des dérivés polyionique (les PS, 90% des endotoxines, 25% des protéines et 99% des acides nucléiques) du milieu et un sel d'ammoniac quaternaire (le bromure de cétrimonium ou cétavlon). Ces complexes précipitent sur un support poreux inerte, la célite ou terre de diatomées. On filtre le tout sur un filtre avec préfiltre en papier et on rince avec de l'eau contenant une faible concentration en Cétavlon. Le filtrat est éliminé, il contient tout ce qui ne s'est pas complexé c'est à dire principalement les protéines. On verse alors sur le cake une solution saline mélangée à de l'éthanol pur éluer le polysaccharide.

Comme il reste de l'eau de lavage dans la Célite, un gradient se forme; or chaque complexe formé se décompose à une concentration particulière en sel. Le complexe formé entre les contaminants (endotoxines) et le Cétavlon se décompose à une concentration plus faible en sel. On a donc, dans la première fraction de l'éluat, les endotoxines qui s'éluent en quantités importantes (de l'ordre de 20g/l), les protéines et acides nucléiques résiduels, qui forment la "phase trouble", écartée par le producteur. Le PS reste complexé à cette concentration saline. Il se décroche par la suite. On le récolte et on le verse dans un bac contenant de l'éthanol en forte concentration et du CaCl_2 pour le précipiter.

On élimine le maximum de surnageant, on filtre, on lave à l'alcool puis à l'acétone. Comme celui-ci est très volatile, il permet de sécher sous vide à température ambiante. Le stockage se fait dans des flacons apyrogènes à -20°C (un échantillon est prélevé et analysé pour vérifier que la pureté du produit répond aux normes.).

- SCHEMA SIMPLIFIE DU PROCEDE DE PRODUCTION DES 4 PS. DE MENCEVAX

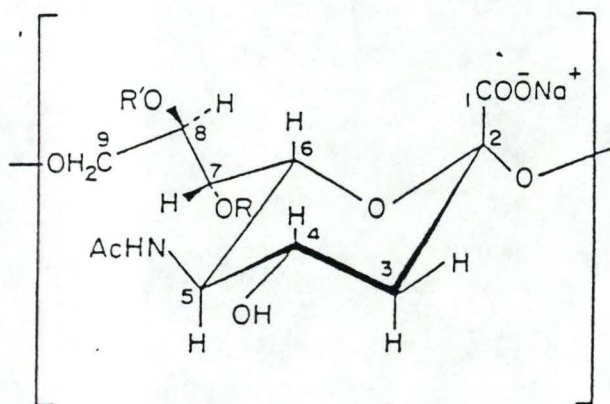


CHAPITRE II CARACTERISATION DU PSC POLYSACCHARIDE C.

a) QU'EN SAIT-ON ?

- rappel de sa structure

monomère constitutif du PSC



- a R = R' = H
- b R = R' = COCH₃
- c R = H, R' = COCH₃
- d R = COCH₃, R' = H

$$\begin{aligned} \text{PMmonomère } 311 + (2\text{H}) &= 313 \\ \text{ou } 311 + (1\text{C}_2\text{H}_3\text{O}) &= 397 \end{aligned}$$

Polymère pM = 10E5 à 3 X 10E5 (W.H.O.1976)

o % d'O-acétyl

Maximun d'O-acétyl si diacétylation : 22%

Maximun d'O-acétyl si monoacétytation = 12%

Norme OMS ≥ 1,5 mM/g polysaccharide

≥ 6,4% d'O-acétyl

o % d'acide sialique (=acide neuraminique)

PM267,24 norme >80%

o Les polysaccharides C sont sous forme de sels de Ca. Par dosage au spectrophotomètre d'absorption atomique, nous avons mesuré une teneur en Ca de 4% du polysaccharide. Les ions Ca²⁺ sont ajoutés après élution pour amorcer la précipitation.

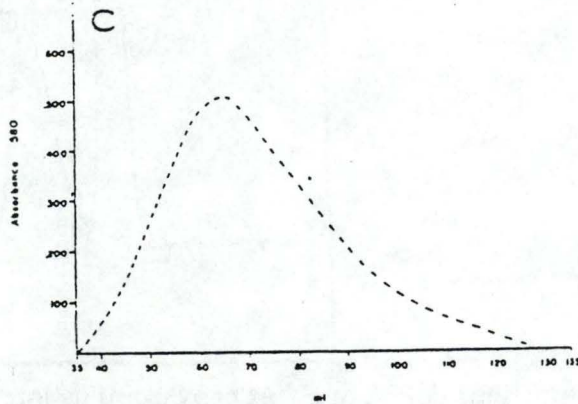
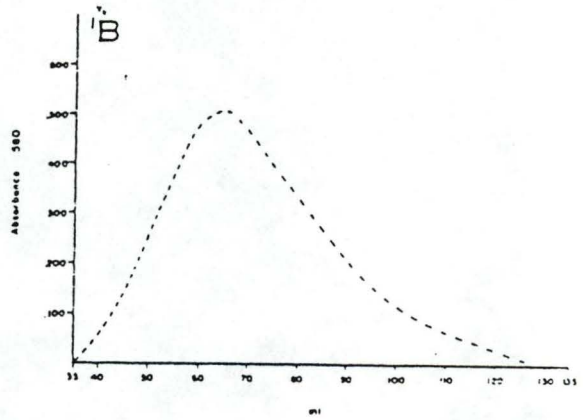
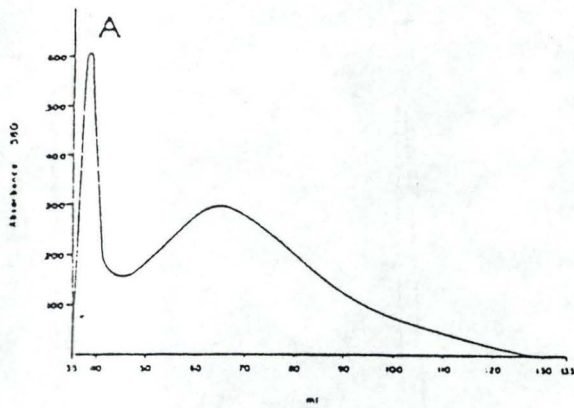


FIG. 1 : Filtration surgel de 2 Mg de polysaccharide meningococcique sur une colonne de Cepharse 4b (1,5 X 85 cm) équilibrée avec de l'acétate d'ammonium, pH 7,0. On dose l'acide sialique dans l'éluat. Le volume mort et le volume total de la colonne sont respectivement 37,5 et 127,5 ml. A, le profil d'éluat du PSC; B, le profil d'éluat du PSC avec 0,1% de SDS ajouté au tampon d'éluat. C, le profil d'éluat du PSC traité avec du venin de serpent à sonnettes.

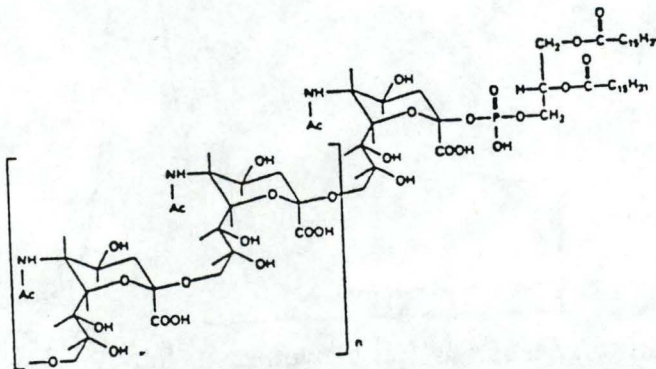


FIG 2: Structure probable du groupement lipidique du polysaccharide de *Neisseria meningitidis* du sérotype C. (Gotschlich et al. 1981)

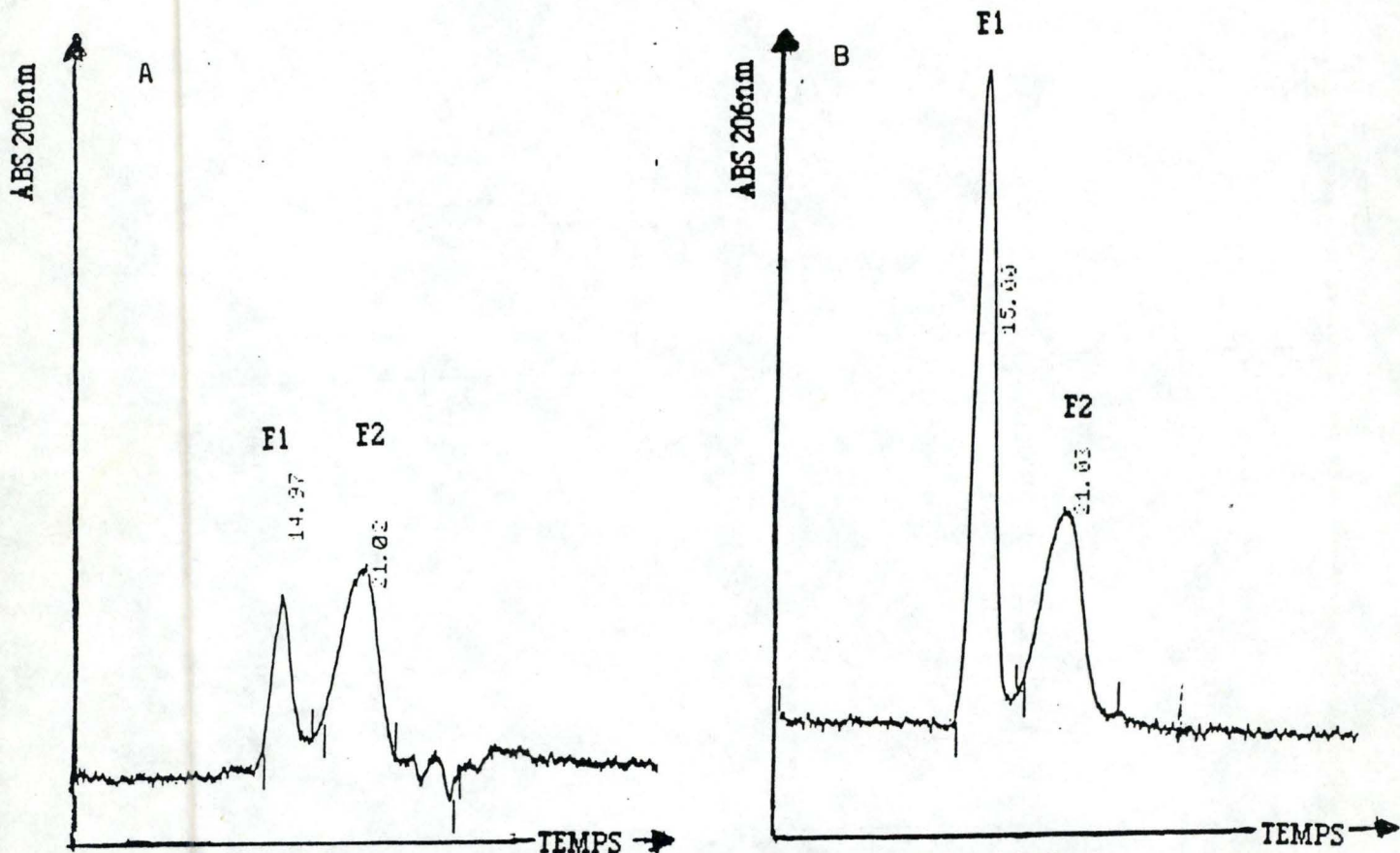


FIG 3: Perméation de gel de deux échantillons de PSA purifiés provenant de lots différents (A et B) sur une colonne de TSK G 6000 PWXL (porosité: 2000) équilibrée avec un tampon tris 10mM pH 7- NaCl 0,4N à un débit de 0,5ml/min. Le PS est détecté à sa sortie par lecture de l'absorbance à 206nm. Le polysaccharide A s'élué sous deux formes : F1 et F2.

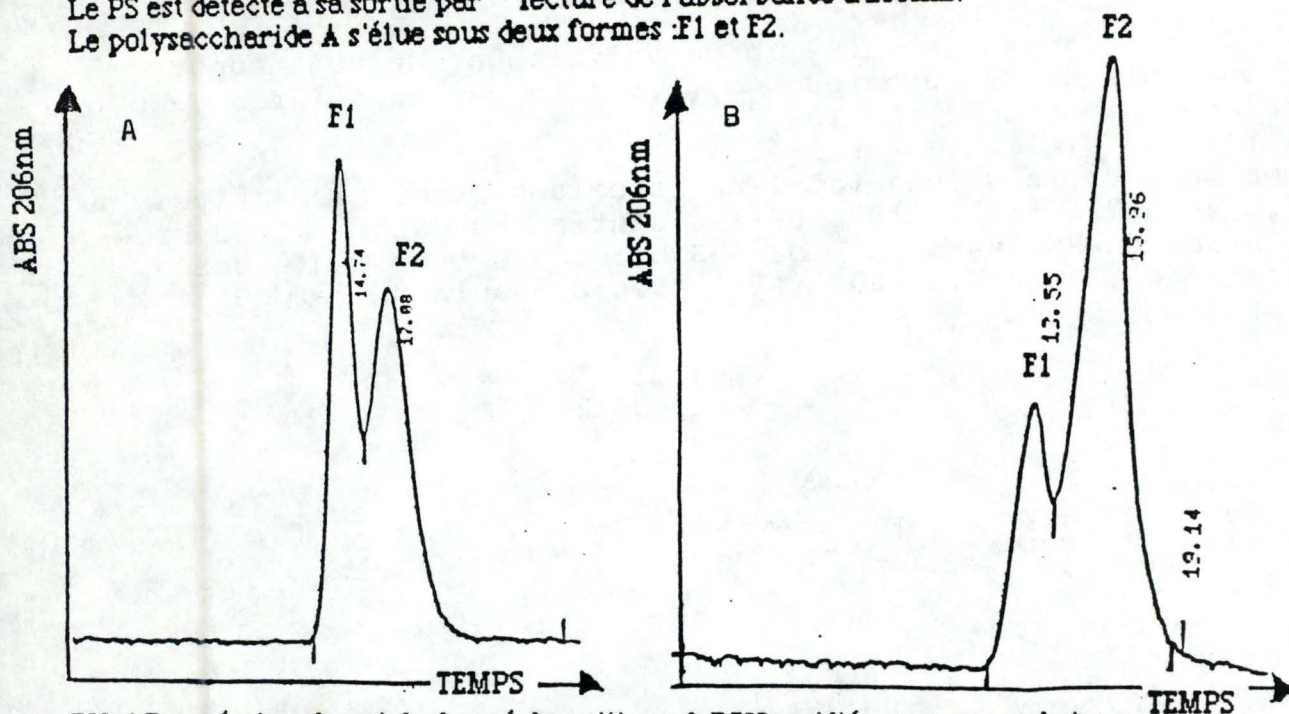


FIG 4: Perméation de gel de deux échantillons de PSC purifiés provenant de lots différents (A et B) sur une colonne de 14 mL d'ULTRAHYDROGEL LINEAR (limite d'exclusion $7 \cdot 10^6$) équilibrée avec un tampon PO4 10mM pH 7,6 NaCl 1M à un débit de 0,5ml/min. Le PS est détecté à sa sortie par un spectrophotomètre UV (lecture à 206nm) relié à un intégrateur. Le polysaccharide C s'élué sous deux formes : F1 et F2. A) Le rapport F1/F2=60/40 B) le rapport F1/F2=20/80

b) AUTRES INFORMATIONS

Littérature

Les résultats des nombreuses études menées sur la composition chimique des PS meningococciques suggèrent que ceux-ci se trouvent sous une forme hautement agrégée. Gotschlich et al (1981) suggèrent qu'une cause probable de cette agrégation est la capacité qu'a ce polymère de se lier à des substances lipidiques qui leur confèrent un comportement micellaire. Ils ont montré la présence de petites quantités de lipides liés par covalence à l'extrémité réductrice de ces hydrates de carbones. La présence d'extrémités hydrophobes permettrait l'agrégation des PS, entre eux ou avec d'autres macromolécules, en micelles qui pourraient être réversiblement rompues par les détergents anioniques ou cationiques (ex Cétavlon). Cela a été montré par filtration du PSC, traité ou non par du détergent, sur un gel de Sepharose 4B (Figure 1). On voit 2 pics. Les PS agrégés s'éluent dans le volume mort, les autres après.

Une étude approfondie de la structure du PSC a permis à ces chercheurs de proposer une structure probable de l'extrémité non réductrice de cet antigène (Figure 2)

DIFFICULTE D'ANALYSE PAR HPLC DU PSA ET DU PSC

On avait pensé doser le Mencevax (PSC et PSA) par HPLC mais on s'est trouvé devant un problème :

Le polyccharide A aussi bien que le polysaccharide C s'éluent sous deux formes F1 et F2 de poids moléculaires différents.

Le PSC est déposé sur de l'Ultrahydrogel linear dont la limite d'exclusion est de 7×10^6 .

F1 s'élué à 14.74

F2 s'élué à 17,08. Le schéma d'elution est repris figure 4

Le PSA est déposé sur gel TSK G 6000 PWXL de porosité égale à 2000

F1 s'élué à 15'30

F2 s'élué à 21'3. Le schéma d'élution est repris figure 3

De plus, pour différents lots, le rapport F1/F2 varie. Après plusieurs manipulations et tests, on a pu conclure que le PS de forme 2 s'adsorbait sur la colonne, on ne peut donc utiliser l'HPLC pour doser le PSC ou le PSA.

Remarque : L'utilisation de Cétavlon (comme décrit dans l'article de GOTSCHLICH et al 1981) n'a rien apporté, le pic 1 ne varie pas et le pic 2 diminue par adsorption partielle du PS sur la colonne.

INFO SKRIT SUR PSA (DEMIL 1989)

Remarque : Le polysaccharide A et le polysaccharide C, ayant le mêmes comportement dans le procédé classique de production et présentant les mêmes schémas de séparation en HPLC, il nous paraît utile d'aborder l'étude du PSC par une observation réalisée par SKB sur le PSA et qui concerne la désacétylation partielle du produit durant le lavage. Des expériences ont été mises au point pour mieux comprendre cette désacétylation.

o influence du temps, de la température et du pH.

On a dosé les groupements O-acétyl après incubation dans différentes conditions et élimination du surnageant. On observe que l'augmentation du pH, de la température et du temps d'incubation favorise la désacétylation.

o influence de la concentration en Cétavlon sur la désacétylation.

Après purification d'un même lot de polysaccharide A complexé à la Célite au moyen de 0,2 - 0,3 et 0,4 % en Cétavlon, on a mesuré la concentration en o-acétyl du produit fini.

On voit qu'en présence de 0,4 % de Cétavlon, la désacétylation est moindre. L'étape de complexation à la Célite et la décantation sont rapides et évitent une exposition longue du polysaccharide à des pH=9 (pH de complexation après ajout de la Célite).

Ces expériences ont permis de choisir des conditions limitant la désacétylation : pH=7, diminution de la durée de l'expérience, diminution de la température, augmentation de la concentration en Cétavlon.

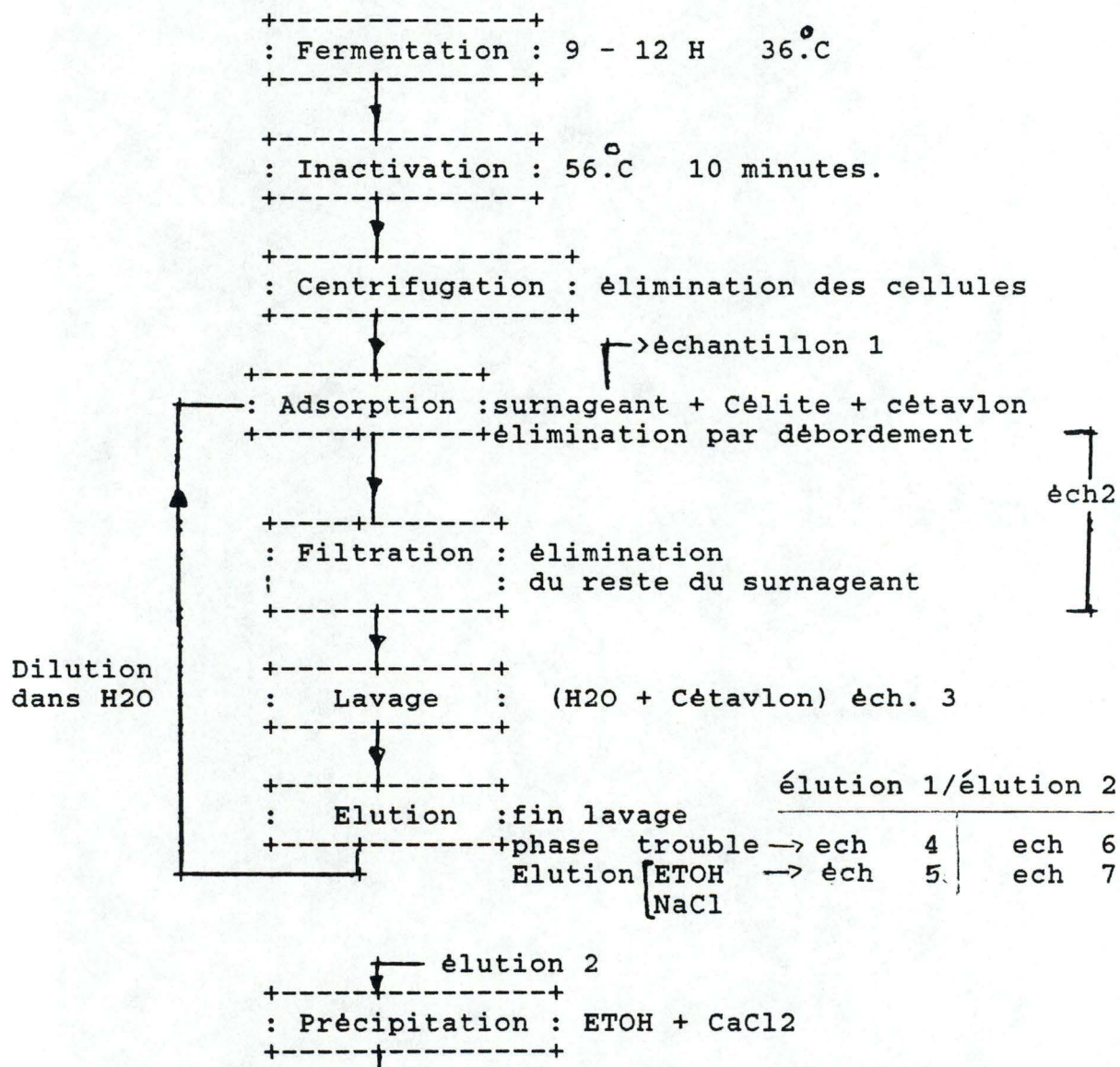
CHAPITRE III AUDIT DE LA METHODE CLASSIQUE

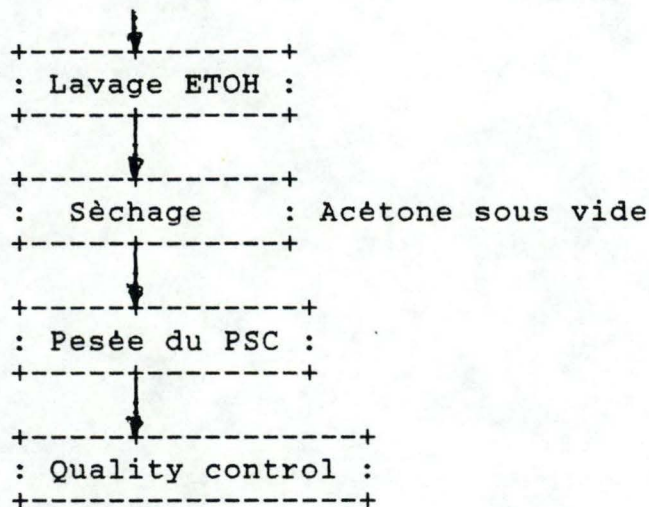
BUTS

Au cours d'une production classique du PSC, nous avons effectué un certain nombre de mesures, afin d'une part de caractériser le produit à purifier (Le PSC dans le milieu de culture après élimination des cellules par centrifugation), d'autre part d'obtenir une meilleure compréhension du comportement du produit et des contaminants dans un schéma de purification. Ces mesures nous ont permis de porter un jugement global sur la méthode de production.

METHODE

- Schéma détaillé du procédé de production du PSC





EXPLICATION DU FLOW SHEET

Lors de la centrifugation, on se débarrasse des cellules qui forment une boue et on retrouve dans le surnageant les PS accompagnés des protéines, AC, nucléiques et endotoxines.

Une bonne partie des contaminants est déjà éliminée lors de l'adsorption non spécifique sur la célite

On ajoute du Cétavlon qui joue le rôle de ligand entre d'une part la célite et d'autre part les PSC et endotoxines.

Le lavage permet ensuite de ne conserver que ce qui est fixé, on ajoute du Cétavlon à l'eau de lavage pour assurer l'adsorption. Vient ensuite une étape d'éluat avec un mélange d'alcool et de NaCl. Les premières fractions de l'éluat très riches en endotoxines, sont éliminées. On récolte enfin la dernière fraction qui contient les PSC.

- ECHANTILLONNAGE

Nous avons prélevé 7 échantillons (numérotés de 1 à 7 sur le Flow sheet) sur un lot de production :

- 1: surnageant après centrifugation.
- 2: mélange 50-50 du surnageant après adsorption et après filtration
- 3: eau de lavage
- 4: Phase trouble c'est à dire dernière fraction avant sortie de PS
- 5: éluat
- 6 et 7: correspondent respectivement au 4 et 5 mais après dilution et réadsorption du premier éluat.

- METHODE D'ANALYSES

TABLEAU DES METHODES CHOISIES

ANALYSE	METHODE CHOISIES
Acides nucléiques	Bromure d'éthidium
Protéines	Méthode de Lowry
Endotoxines	Méthode LAL
PS	Dosage de l'ac sialique

Ces méthodes sont décrites dans le chapitre matériel et méthodes. Un prétraitement des échantillons par passage sur colonne PDIO a été nécessaire pour éliminer l'éthanol et le NaCl qui interfèrent lors des dosages.

- Spécification du QC (Quality Control) (W.H.O. 1976)

L'O.M.S. lors du dépôt du brevet a posé des normes auxquelles le produit doit répondre. Ces normes sont les suivantes:

- Protéine résiduelles < 1%
- AC. nucléiques résiduels < 1%
- O-acétyl $\geq 1,5$ m M/g
- Acides sialiques $\geq 80\%$
- Endotoxines < à 2,5 μ g (norme interne)
- Poids moléculaire Kd 0,5 \geq 65% (*)

spécificité Identité OK.

(*) : Kd : constante de distribution

Lors de chromatographie sur gel de filtration Sepharose 4b, au moins 65 % du produit doit s'éluer avec une valeur de Kd ≤ 0.50

BILAN

Résultats du dosage des contaminants lors du process d'extraction et purification du PSC

Echantillons:	Volumes (L)	Endotoxines		AC Nucléique		Protéines	
	:	: g	: %	: mg	: %	: Mg	: %
1) Surnageant:	150	: 265,2	: 100	: 5109,87	: 100	: 48550	: 100
centrifuge:		:	:	:	:	:	:
2) Surnageant:	170	: 30,26	: 11,41	: 479,2	: 9,37	: 41650	: 85,79
adsorption							
+filtrat							
3) Lavage	: 35	: 61,46X	: 0,2X	: 130,8	: 2,56	: 5290	: 10,89
(célite)	:	: 10E-3	: 10E-1	:	:	:	:
5) Eluat	: 18	: 3,6 X	: 0,1 X	: 80,5	: 1,57	: 460,6	: 0,95
extraction:		: 10E-6	: 10E-3	:	:	:	:
6) Troubles	: 1,2	: 2,136X	: 8 X	: 3,6	: 7,05 X	: ND	: ----
purification:		: 10E-6	: 10E-7	:	: 10E-2	:	:
7) Eluat	: 15	: ≤1,76 X	: 7 X	: 57,9	: 1,13	: 255,6	: 0,52
purification:		: 10E-10	: 10E-11	:	:	:	:

ND : non détectable

Rem: Les résultats des dosages de l'échantillon 4 étant quantitativement non significatifs ont été omis.

ANALYSE DES RESULTATS

a) protéines

85 % des protéines sont éliminées avec le surnageant de la fixation, et 10 % lors du lavage. Le surplus reste adsorbé sur la célite (nous ne le retrouvons plus dans la phase trouble en purification).

b) acides nucléiques

Les acides nucléiques sont adsorbés en grande partie sur la célite. Nous ne retrouvons que ± 9 % dans le surnageant après complexation. Ils ne sont que très peu désorbés lors des lavages et ± 1 % se retrouve dans l'éluat.

c) Endotoxines

Les endotoxines se fixent fortement sur la célite (± 89 %) et y restent complexées même lors de l'éluat finale.

Problèmes

- La célite est un adsorbant non spécifique : Les étapes de lavages sont donc nécessaires. Par ailleurs, la célite est utilisée en fin de culture dans un milieu très hétérogène dont la composition peut varier d'une culture à l'autre. La qualité de la complexation par le cétavlon change. Les contaminants pourront alors s'éluer en concentration plus importante avec le PS qui ne répondra alors plus aux spécifications.

Le côté fort empirique de cette méthode, nous a conduits à chercher une méthode plus fiable. Nous nous sommes tournés vers l'adsorption spécifique du PS sur le gel, ce qui allégerait par ailleurs les manipulations.

CHAPITRE IV OBJECTIF DU TRAVAIL

Nous avons étudié l'effet d'une chromatographie d'échange d'ion sur la purification du polysaccharide C "natif" c'est-à-dire en solution dans le milieu de culture débarrassé des cellules de *Neisseria meningitidis*.

Nous avons choisi de travailler sur le polysaccharide C spécifiquement, parce que c'est pour sa purification qu'on rencontrait le plus de problèmes au moment où le sujet de mémoire a été défini.

La méthode actuelle est en effet longue et assez empirique, et ne permet pas de prévoir le rendement final. La main d'oeuvre représentant un élément important du prix de revient d'un vaccin, toute réduction de la durée de production influence donc favorablement son coût.

Après avoir caractérisé le PSC pur et le PSC natif, nous avons essayé de sélectionner un gel et de déterminer les conditions de fixation et d'élution du polysaccharide.

CHAPITRE V MATERIEL ET METHODES

1) Développement Mencevax : Analyses des échantillons in process

(1) Traitement des échantillons

En vue de leur dosage en protéines acides nucléiques et endotoxines, les échantillons sont traités sur colonnes de perméation PD-10 de PHARMACIA.

Matériel :

une colonne PD10 par échantillon
NaCl 0,5 M filtré sur filtre 0,2 μ m NALGENE

Utilisation des colonnes PD-10

ATTENTION : se munir de gants stériles .

- a) équilibrer la colonne avec une solution de NaCl 0,5 M filtrée sur NALGENE et recueillir au moins 25 ml de cette solution à la sortie de la colonne.
- b) Laisser la colonner se vider, déposer précisément 2,5 ml d'échantillon sur la colonne et laisser celle-ci se vider à nouveau.
- c) Rincer la colonne avec la solution de NaCl 0,5 M déjà utilisée ci-dessus et récolter immédiatement jusqu'à obtenir 4,4g d'éluat
- d) Analyser l'échantillon et appliquer un coefficient de dilution de 1,76.

2) DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE

1. Principe

La teneur en acide sialique est mesurée par la méthode de Svennerholm (1957). L'interaction de l'acide sialique avec le résorcinol et du cuivre provoque la formation d'un complexe cuivrique qui absorbe à 580 nm.

La relation entre l'absorbance et la quantité d'acide sialique est linéaire.

$$y = 0,0023 + 0,0055x \quad R = 1,00$$

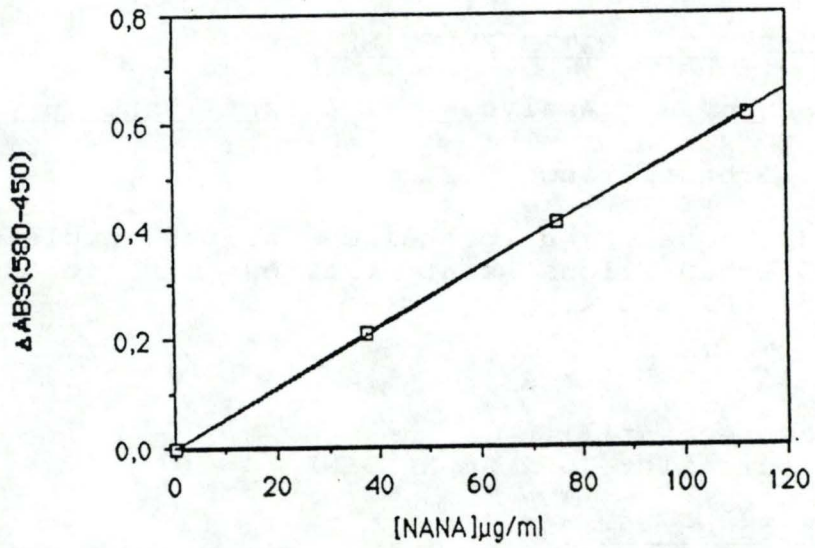


FIG 1': Droite d'étalonnage du dosage en acide sialique: la différence entre l'absorbance à 580nm et l'absorbance à 450nm en fonction de la concentration en NANA

2. Réactif

- Solution :
- Alcool isoamylique P.A.
 - solution de sulfate de cuivre : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,1M
24,97g/L
 - HCl conc P.A.
 - Solution stock de résorcinol : 2g/100ml
 - Réactif au résorcinol : 1 ml de sol. stock ajouté à
80 ml d'HCL concentré contenant 0,25 ml de CuSO_4 0,1
M et amener à 100 ml (Préparer au moins 4 h avant
l'emploi, stable une semaine à 4.C.
 - Standard(NANA) : 7,5 mg Ac N-Acétyl neuraminique /50ml

3. Procédure

- x ajouter dans les tubes 5 ml de réactif au résorcinol et
chauffer 15' à 105.C.
- x refroidir rapidement et mettre dans 1 bain de glace.
- x ajouter 5 ml d'alcool isoamylique (agiter vigoureusement pour
obtenir une émulsion).
- x refroidir en bain de glace, centrifuger.
- x lire à 580 nm et 450 nm (zéro alcool isoamylique).

4. Etalonnage

Courbe standard : ml NANA	:	ml H ₂ O	:	µg NANA
0	:	2	:	0
0,5	:	1,5	:	37,5
1	:	1	:	75
1,5	:	0,5	:	112,5

Placer en abscisse la concentration en NANA et en ordonnée la
différence d'absorbance entre 580 nm et 450 nm (Figure 1')

3) DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

1) Principe : Le bromure d'éthidium voit sa fluorescence augmenter
en présence d'acides nucléiques.

2) Réactifs :

1) Mélange RNA - DNA

- . solution DNA 0,1 mg/ml
-NaCl 0,5 M
- . solution RNA 0,1 mg/ml
NaCl 0,5 M
- . Mélange 3 ml RNA à 0,1 mg /ml
avec 2,267 ml DNA à 0,1 mg/ml (0,057 mg/ml RNA
0,043 µg/ml DNA)

2) Bromure d'éthidium 10 mg/L dans NaCl 0,5 M

3) Matériel :

Une spectrofluorimètre PERKIN ELMER.

4) Courbes de référence

- Courbe standard . prélever 0, 100, 200, 300, 400 et 500 µl du mélange RNA-DNA . Ajouter 1000, 900, 800, 700, 600 et 500 µl de NaCl 0,5 M suivant l'étape à laquelle l'échantillon est prélevé faire également courbe cétavlon 0,19 %
courbe cétavlon 0,25 %

5) Procédure :prélever 1 ml de chaque échantillon et standard et y ajouter 9 ml de solution de Bromure d'éthidium avant de lire au spectrofluorimètre :

Longueur d'onde d'excitation de la fluorescence = 365 nm

Longueur d'onde d'émission de la fluorescence = 590 nm

Utiliser une cuvette en quartz et prendre la solution de Bromure d'éthidium comme blanc

Le bromure d'éthidium voit sa fluorescence augmenter avec la présence d'acides nucléiques. On obtient une relation linéaire entre la concentration en acides nucléiques et la fluorescence. Les interférences causées par les sels sont éliminées par simple dialyse des échantillons (sur colonne PD 10). Pour une même concentration en acides nucléiques, le Cétavlon augmente la fluorescence. Aussi, pour les échantillons contenant du Cétavlon, une courbe d'étalonnage en présence de cétavlon à la concentration de 0,05 % (celle rencontrée dans les échantillons) est réalisée.

L'éthanol et le NaCl contenus dans les éluats viennent également fausser le dosage des acides nucléiques. Une dialyse est faite à température ambiante et est suivie d'une redissolution du précipité apparu dans du tampon. Il est généralement admis qu'en présence de protéines, le dosage des acides nucléiques est surévalué.

4) DOSAGE DES ENDOTOXINES

Nous avons utilisé la procédure fournie en même temps que le PYROTELL par la firme Associates of Cape cod ,incorporated (1982)

Le dosage des endotoxines utilise le lisat d'amoebocyte de limule (LAL). Il s'agit plutôt d'un test ou d'un dosage semi-quantitatif.

1) PRINCIPE

Le lisat de "Limulus amebocyte" est un extrait aqueux des cellules sanguines (amoebocytes) de la limule *Limulus polyphemus*. le Pyrotell forme une masse solide par coagulation quand il est incubé avec des endotoxines à 37.C pendant 1 heure. Le test LAL est spécifique, facile à réaliser et peu détecter des quantités d'endotoxine de l'ordre du picogramme.

2) Réactifs

a) Le Pyrotell lyophilisé et congelé auquel il faut ajouter 5 ml d'eau apyrogène par flacon juste avant l'utilisation

b) Standard d'endotoxine

Remarque : Le matériel doit être apyrogène.

3) Procédure : après passage sur colonne PD10, chaque échantillon est dilué de 10 fois en 10 fois un dixième de ml de chaque dilution est incubé à 37.C pendant 1h avec 1ml de LAL. Après incubation, on note la formation ou non d'un gel. on repère la dernière dilution positive. On dilue ensuite de 2 fois en 2 fois pour cerner le point de gélification. On réalise en parallèle une série de dilutions contenant une concentration connue d'une endotoxine de référence. Ces dilutions contenant une concentration de la dernière dilution positive de l'endotoxine de référence étant déterminée par comparaison, on calcule les teneurs de l'échantillon.

remarque : Résultat - dernière dilution positive
- 100 µg/ml d'endotoxine
- 10 E-10 g/ml d'endotoxine

5) DOSAGE DES PROTEINES : METHODE LOWRY

1) PRINCIPE

La détermination de la concentration en protéines est basée sur la mesure spectrophotométrique d'une coloration bleue développée par un complexe cuivrique formé en présence de protéin

2) MATERIEL

- Spectrophotomètre (lecture de l' absorbance à 750 nm)
- Filtre 0,2 µm

3) REACTIFS

Toutes les solutions sont préparées avec H₂O milli Q.

n. 1 : Solution 2% Na₂CO₃* dans 0.1 N NaOH

* (stabilité réaction)

100 ml NaOH/2 0.1N : 0.4g NaOH/100 ml H₂O

Na₂cO₃ : 2g Na₂CO₃/100 ml NAOH 0.1 N

n. 2 : CuSO₄. 5 H₂O . 0.5 % dans tartrate NA*. K) 1%

* évite que Cu(OH)₂ précipite

Cu SO₄ 5 H₂O 5 % : 5g/100ml H₂O

Tartrate Na, K 1% : 1g/100ml H₂O

10ml (Cu SO₄)* 5H₂O 5% / 100ml tartrate Na, K 1%

* sensibilité de la réaction

n. 3 : Solution alcaline de Cu : Solution Folin

Solution à préparer fraîchement tous les jours pour 50 ml : 1 ml de la solution n.2 et amener à 50 ml avec la solution n. 1.

n. 4 : Réactif de Folin

Diluer le Folin onc. en 50/50 suivant la quantité voulue

n. 5 : Solution SDS 10 % (Janssen Chemica ref. : 2304253)

Pour 100 ml : peser 10 g SDS

dissoudre dans ± 80 ml H₂O

ajuster à 100 ml avec H₂O dans un matra.

n. 6 : Solution NaCl 0.5 M

n. 7 : Solution BSA 10 mg/50 ml (Bovine Serun Albumin)

Pour 100 ml de solution : peser 20 mg de BSA dissoudre dans NaCl 0,5 M. Ajuster à 100 ml dans un matra avec une solution NaCl 0.5M

4) METHODE

Préparation de la courbe étalon :

Solutions BSA 10 mg/50 ml NaCl 0.5 M

	Standar: BSA 10 mg/50 ml Solution Stock	NaCl 0,5 M
Blanc		200 µl
10 µg BSA	50 µl	150 µl
20 µg BSA	100 µl	100 µl
30 BSA	150 µl	50 µl
40 BSA	200 µl	/
		100 µl BSA + 2.4 ml NaCl 0.5 M

PRISE DES ECHANTILLONS

Pour chaque échantillon, faire des dilutions adéquates dans du NaCl 0.5 M, dans des tubes à essai en verre.

Pour chacune de ces dilutions, prélever des prises de 50 µl, 100 µl, 150 µl et 200 µl et amener à 200 µl avec du NaCl 0.5 M dans des tubes à essai en verre.

A tous les tubes ajouter :

- 200 µl de SDS 10 %
- 1 ml de la solution n.3.
Mélanger repos 10 minutes.
- 100 µl de la solution n.4 et mélanger immédiatement (Réactif Folin). Repos 30 Minutes et lecture au spectrophomètre à 750 nm.

Remarque :

Les standards et les échantillons sont traités en même temps !

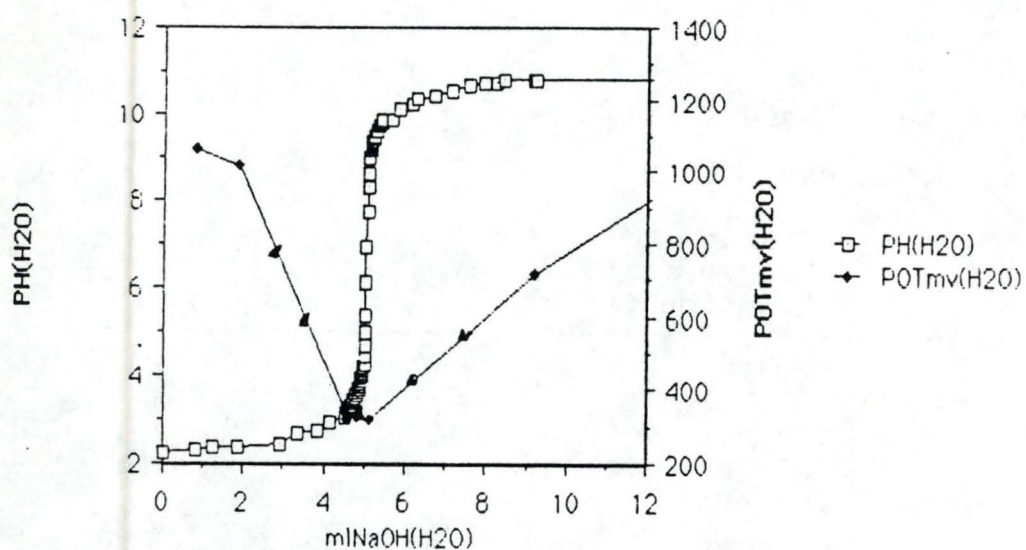


FIG 2: Courbes des titrages acidimétrique et conductimétrique de 5ml HCl 20mN, dilué dans 25mL H₂O saturée en azote par du NaOH 20mN.

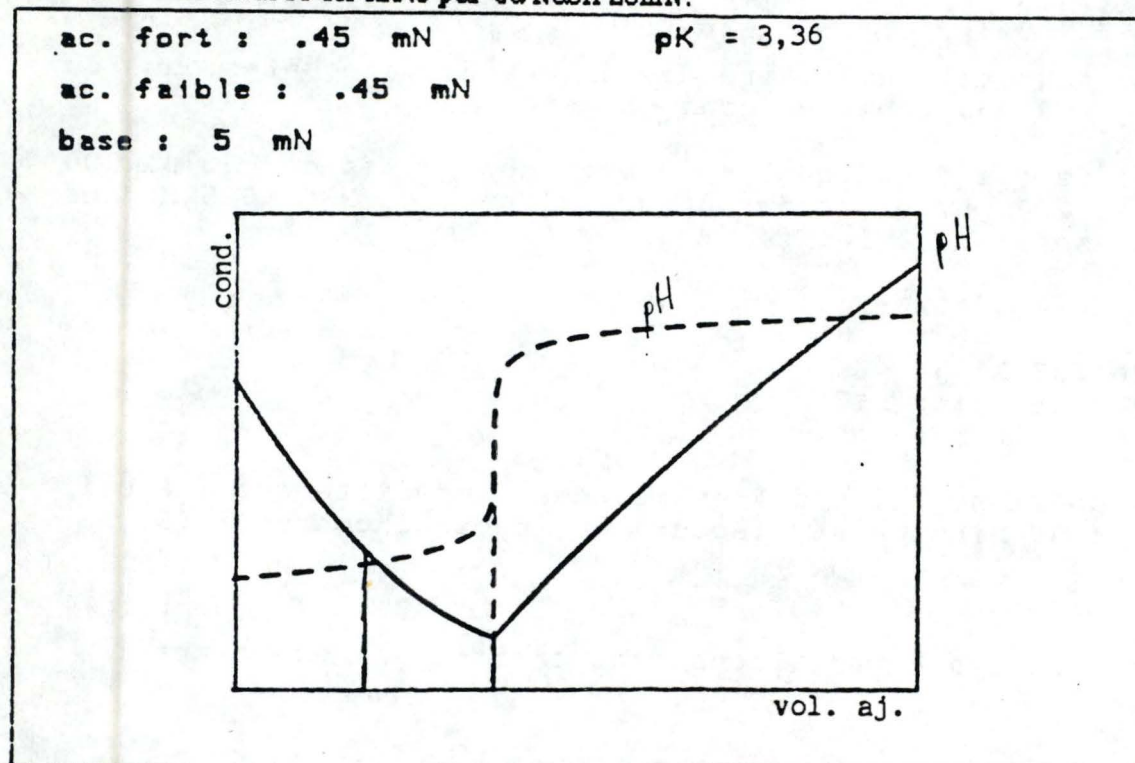


FIG 2: Courbes des titrages acidimétrique et conductimétrique simulés d'un mélange d'HCl et d'acide galacturonique par du NaOH.

Lecture

La lecture se fait au spectrophomètre à une longueur d'onde de 750 nm.

On porte la DO obtenue pour chaque échantillon, sur la courbe étalon et l'on obtient ainsi la concentration en $\mu\text{g/ml}$ de l'échantillon dilué.

2) Titrages acidimétrique et conductrimétrique.

Lorsqu'au cours d'un titrage on ajoute, à une solution d'électrolyte, la solution d'un autre électrolyte donnant lieu à une réaction de double décomposition, la conductivité de la solution est progressivement modifiée sous l'influence du remplacement d'un électrolyte par un autre pour autant que sa conductivité soit différente.

A) Variation de la conductivité au cours du titrage

On admettra que les électrolytes forts sont complètement dissociés et on négligera la dissociation des électrolytes faibles ou insolubles. En cas de mélange, on somme les conductivités des constituants.

Sur un diagramme ayant comme abscisse le nombre de ml de HCl ajouté, et comme ordonnée les conductivités, ces dernières varient en ligne droite; il en va de même de leur somme: La conductivité du NaCl formé demeure constante. Si on continue à ajouter du réactif titrant, sa concentration augmente et donne à la solution un supplément de conductivité qui croît en ligne droite, de sorte que l'ensemble du diagramme de conductivité a une allure très caractéristique: deux droites qui se coupent au point d'équivalence (figure 2'), indiquant ainsi sa position.

En présence d'acide faible (figure 3') on observe normalement trois zones linéaires. La première correspond à la neutralisation de l'acide fort et est fortement décroissante. La deuxième correspond à la neutralisation de l'acide faible: seuls l'anion de l'acide faible et le cation de la base augmentent en concentration, et la conductivité croît faiblement.

Nous avons donc, pour le PSC, combiné des titrages potentiométriques, qui permettent une détection aisée du saut de pH entre pH 5 et pH 9, et des titrages conductimétriques qui permettent en principe de déterminer également le point d'équivalence séparant les zones de l'acide fort et de l'acide faible.

B) Matériel et Méthodes.

Les solutions NaOH et HCl ont été préparées par dilution d'un standard titrisol Merck.

La conductivité a été mesurée grâce à un impédancemètre Hewlett Packard 4800 H muni d'une électrode de conductivité Schott Gerate (constante de cellule : $K : 1,03 \text{ cm}^{-1}$ et relié à un enregistreur Kipand zonen BD12. Le pH était suivi par un pH-mètre consort n.p 614 muni d'une électrode radiometer n.EK2321C relié également à l'enregistreur.

3) Méthode des tests par lot pour sélectionner le pH de départ pour une chromatographie d'échange d'ions (page 30 Pharmacia 87)

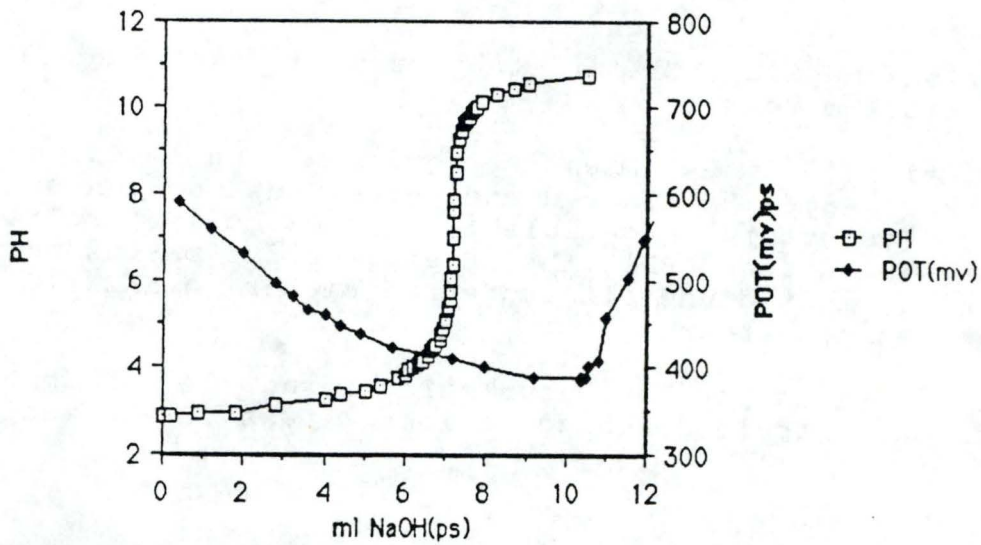


FIG 6: Courbes des titrages acidimétrique et conductimétrique de 50mg de PSC dissous dans 25mL d'eau déionisée et saturée en azote. Après acidification par 5mL de HCl 20mN, le PSC est titré par du NaOH 20mN.

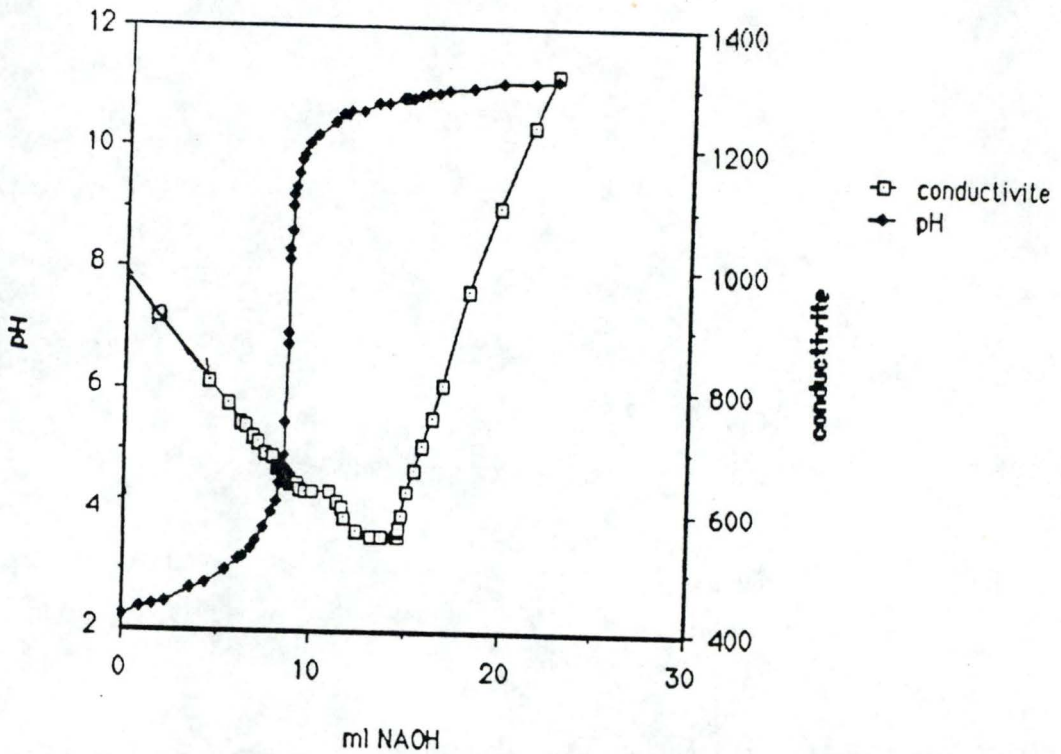


FIG 7: Courbes des titrages acidimétrique et conductimétrique de 50mg de PSC dialysé, lyophilisé et redissous dans 25mL d'eau déionisée et saturée en azote. Après acidification par 8,63mL de HCl 20mN, le PSC est titré par du NaOH 20mN.

CHAPITRE 6 Essai de purification par échangeur d'ions.

1) Recherche du pK du Polysaccharide C

Pour purifier le PSC par Chromatographie d'échange d'ion, il était nécessaire d'en connaître le pK.

Etant donné qu'il s'agit d'un polysaccharide acide carboxylique, on s'attendait à ce qu'il ait un pK < 6.

pK mesuré

o Pour titrer le PSC dissous dans de l'eau dont le pH d'équilibre était de ± 6 , nous avons d'abord dû l'acidifier à l'aide d'acide chlorhydrique. La technique de titrage est reprise dans le chapitre matériel et méthodes.

Nous faisons simultanément deux titrages : acidimétrique et conductrimétrique.

Titrage du PSC acidifié

o acidification du PSC

50 mg de PSC

25 ml H₂O sous azote (pour éliminer le CO₂ dissous afin qu'elle se trouve à un pH d'équilibre de 7)

5 ml HCl 20 mN

le pH du PSC dissous acidifié est de 2,8

o Nous avons titré le polysaccharide acidifié avec du NaOH 20 mM. La courbe de titration obtenue est présentée à la figure 6.

o Problème : Il est apparu un décalage entre les points d'équivalence des titrages acidimétrique et conductimétrique, ce qui nous a fait penser à 2 fonctions acides différentes, comme on en rencontre par exemple en titrant des aa (groupements COOH et NH₃⁺)

Or, la structure du polysaccharide C publiée dans la littérature ne fait état que de fonctions acide carboxylique.

o Nous avons dialysé puis lyophilisé le PS pour vérifier la présence d'impuretés. Le produit utilisé rencontre en effet les spécifications mais n'est pas pur à 100 %. Nous avons obtenu la même courbe pour le titrage dans les mêmes conditions (les titrages ont été refaits 3 fois, figure 7).

Comprehension du problème:

Le PS peut perdre des groupements O-acétyl (dans la littérature :Demil 1989 et SK 1975, on parle surtout de ce phénomène en milieu basique). Nous supposons que le polysaccharide aurait perdu lors de l'acidification le groupement acétyl se trouvant

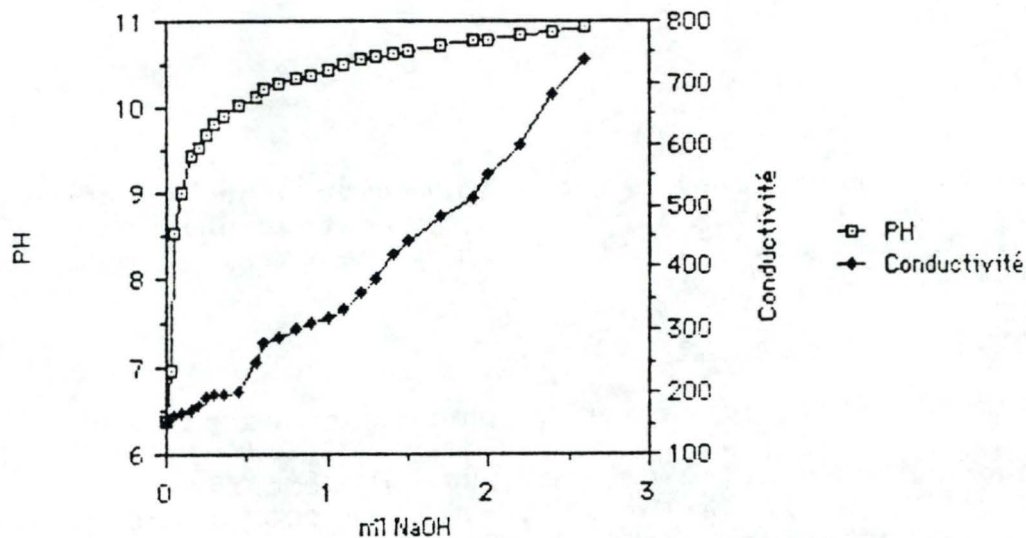


FIG 8: Courbes des titrages acidimétrique et conductimétrique de 50 mg de PSC non acidifié, dissous dans 25 mL H₂O saturée en azote par du NaOH 20 mM.

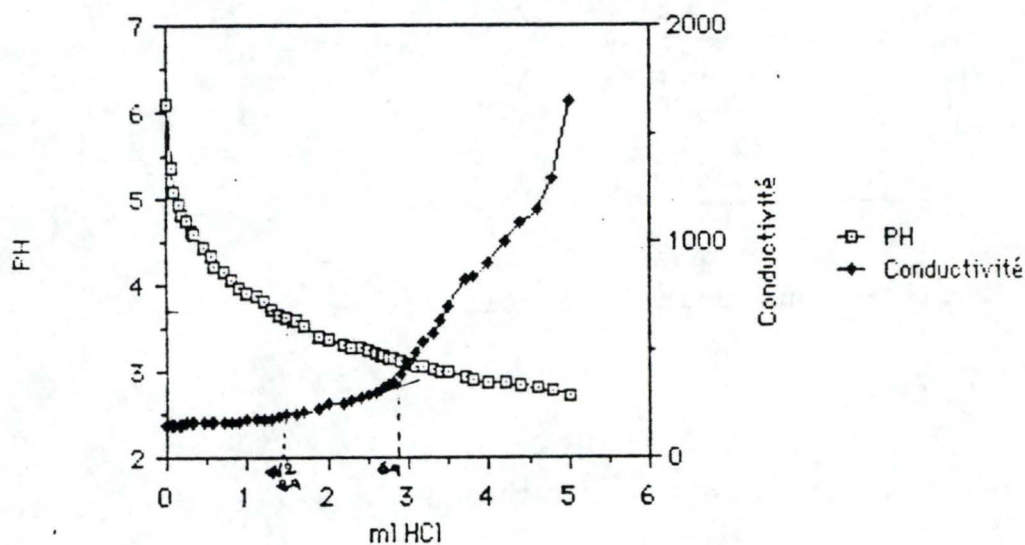


FIG 9: Courbes des titrages acidimétrique et conductimétrique de 50 mg de PSC, dissous dans 25 mL H₂O saturée en azote par du HCl 20 mN.

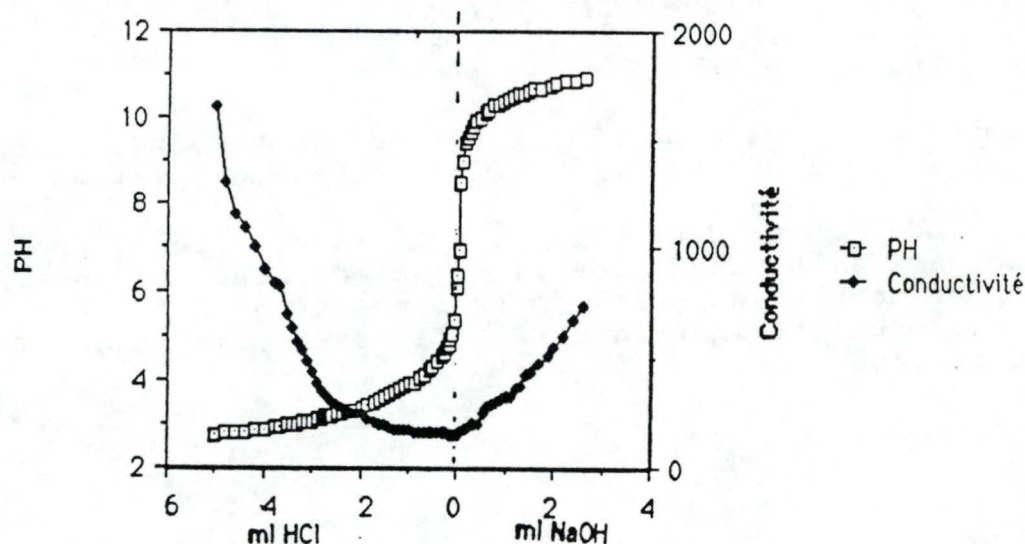


FIG 10: Juxtaposition des courbes de titrage acidimétrique et conductimétrique de 50 mg de PSC, dissous dans 25 mL H₂O saturée en azote par du HCl 20 mN et NaOH 20 mN.

A PH7, il reste encore les H⁺ de NH₃⁺ que l'hydroxyde ajouté continue à neutraliser. Il faut ajouter 0,20 m \bar{e} q (10.416 ml X 20 mN) de NaOH pour que tous les H⁺ soient neutralisés. A ce moment là, les OH⁻ très mobiles, apparaissent en excès dans la solution dont la conductivité augmente rapidement.

A PH7, il ne reste plus sous forme acide que la fonction NH₃⁺, qui est titrée par 3,40 ml de NaOH 20 mN. On a donc neutralisé 0,068 m \bar{e} q de NH₃⁺. Comme nous avons utilisé 50 mg de PSC dont le PM moyen d'un monomère est de 379, on aurait théoriquement $\frac{50}{379 \times 1000} = 0,131$ m \bar{e} q de monomères.

Nous pouvons conclure que 52 % des monomères sont désacétylés (puisqu'on a formé 0,068 m \bar{e} q de NH₃⁺).

Nous avons refait le titrage du polysaccharide mais sans l'acidifier pour voir si le décalage entre les points d'équivalences, des deux titrages conductimétriques et acidimétrique disparaît.

Titration du PSC non acidifié.

titrage par NaOH

50 mg PSC

25 ml d'eau distillée saturée en azote.

titré avec du NaOH 20 mN (2,5 ml)

Résultats

Les courbes de titrage sont reprises en figure 8.

Le point d'inflexion de la courbe du titrage acidimétrique étant dépassé avant l'ajout de NaOH et la conductivité augmentant régulièrement avec celui-ci, tous les PSC sont déjà sous forme ionisé (COO⁻). Le pK est donc déjà dépassé avant le titrage.

Titration HCl

50 mg PSC

25 ml d'eau distillée saturée en azote

titré avec du HCl 20 mN (5ml)

Résultats

Sur la figure 9, nous pouvons observer que la conductivité augmente lentement jusqu'à pH 3,3 puis proportionnellement à l'ajout de HCl.

En admettant que tous les PSC sont sous forme ionisée COO⁻ au pH de départ, nous trouvons, en mesurant le pH à la demi-équivalence, un pK de 3,7. Cette valeur est tout à fait plausible, les acides uroniques ayant fréquemment un pK d'à peu près 3,5.

Il a fallu 2,8 ml de HCl 20 mN pour titrer la fonction COO-, nous trouvons le nombre d'équivalence par masse de PSC : $2,8 \times 20 \text{ mN} \times 1/1000 = 0,056 \text{ m\acute{e}q}$ pour 50 mg.

Le PM d'un monomère étant de 379 et que chaque monomère possède une seule charge. Nous devrions titrer $\frac{50}{379 \times 100} = 0,131 \text{ m\acute{e}q}$

Il n'y a donc que $\frac{0,056}{0,131} = 43 \%$ des monomères qui seraient chargés

La figure 10 rassemble les figures 8 et 9 juxtaposées pour pouvoir les comparer aux figures 6 et 7.

Nous constatons que les points d'équivalence des 2 courbes coïncident. L'écart rencontré dans les 2 titrages précédents est donc probablement dû à la désacétylation occasionnée par l'acidification préalable du PS.

Les courbes la figure 10 ressemblent fortement à celles du titrage d'un acide carboxylique (un titrage de pectine est montré à titre d'exemple dans le chapitre matériel et méthodes).

CONCLUSION

Le pK du polysaccharide C est de 3,7. A pH 6,4 qui est celui du surnageant de culture après centrifugation, le polysaccharide se trouve donc sous forme ionisée COO-. Nous avons tenté d'utiliser cette propriété de charge pour séparer le polysaccharide des contaminants.

2) Choix du gel.

Après avoir mesuré un pK de 3,7 pour le polysaccharide, nous avons sélectionné un échangeur d'anions.

Les techniciens de SKB connaissant particulièrement bien l'emploi du Fractogel TSK DEAE de Merck utilisé pour la production du vaccin Engerix, nous avons décidé a priori de tester ce type d'échangeur d'ions.

3) Mise au point de la chromatographie à partir d'un PSC purifié par voie classique.

1) Méthodes d'analyse quantitative du PSC

- L'absorbance à 206 nm n'est pas spécifique ni quantifiable. Mais on peut l'utiliser quand on travaille avec du PSC pur
- Nous avons utilisé le dosage de l'acide sialique décrit dans matériel et méthodes quand nous voulions quantifier le PSC.

2) Condition d'adsorption du PS sur le gel Fractogel TSK DEAE (MERCK).

Au départ, nous avons choisi d'utiliser le tampon tris d'usage fréquent avec échangeurs d'anions, son pouvoir tampon maximum se trouvant à PH 8,3.

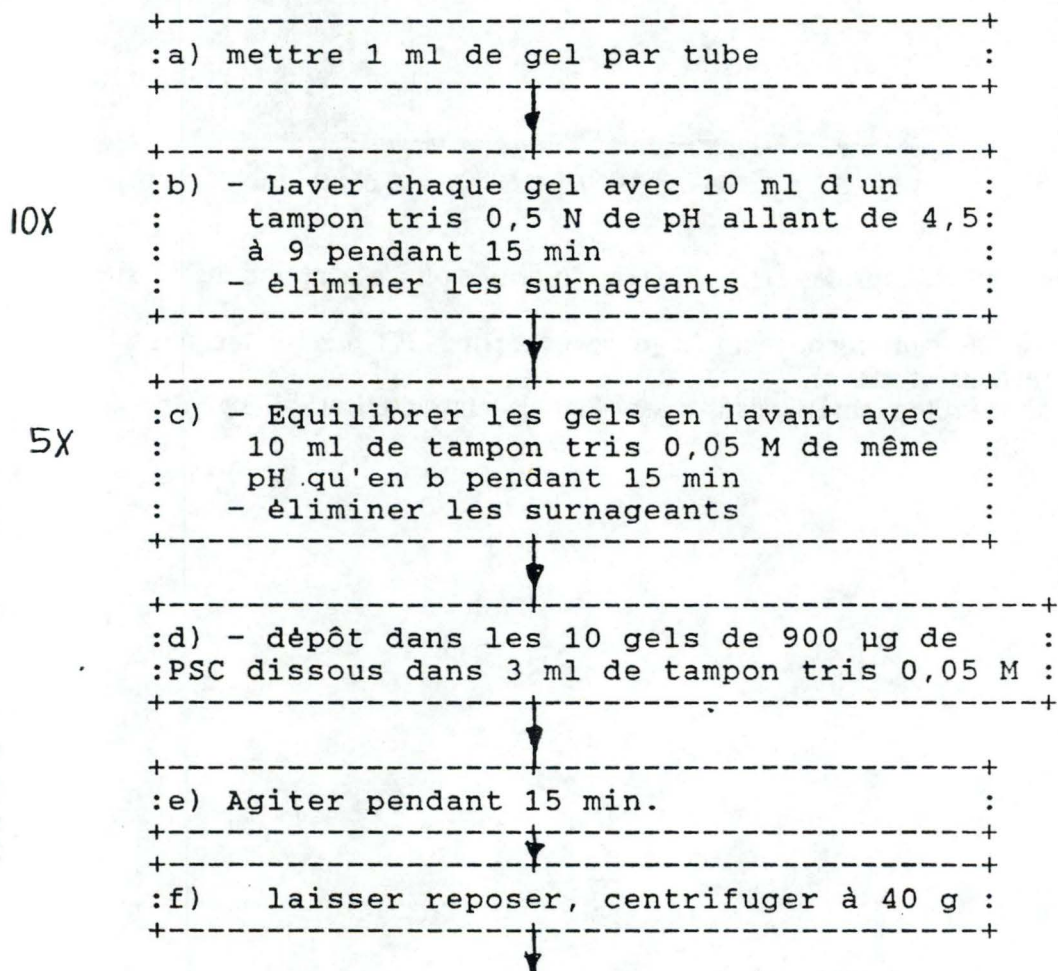
A) Essais en tampon tris.

o essais par lots pour sélectionner le pH de départ

1) matériel

tampon tris 0,5 N +aux pH de 4,5 à 9 par tranche de 0,5
et 0,05 N + unité
stock de PSC : 12 mg dans 2 ml

2) Mode opératoire



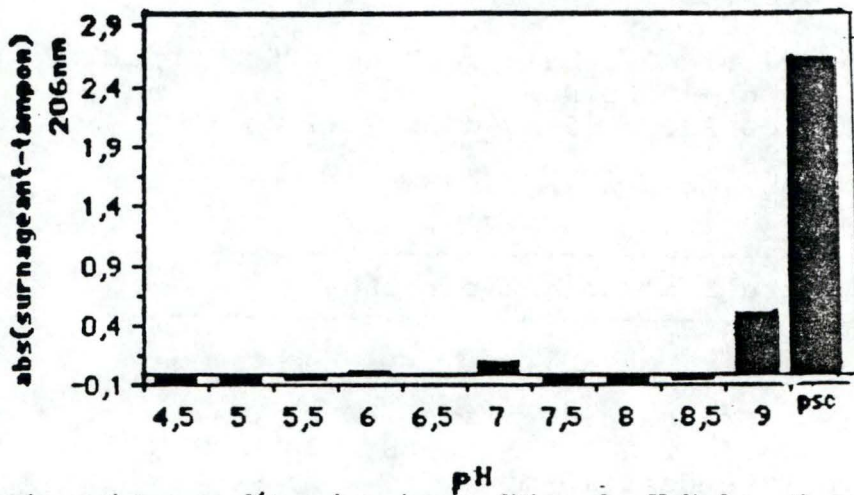
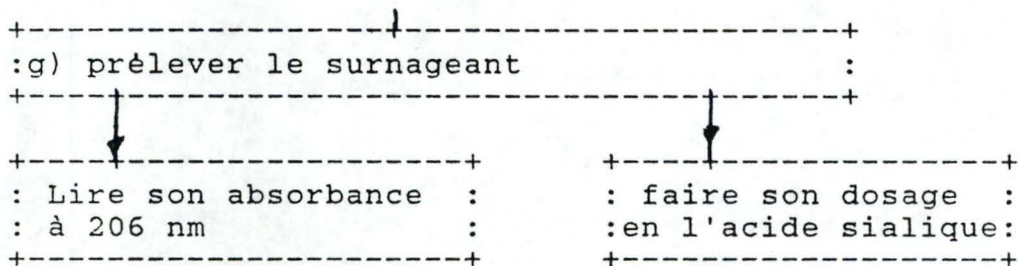


FIG 11:Essais par lots pour déterminer les conditions de pH d'adsorption du PSC sur du gel DEAE.

Absorbance à 206nm du surnageant du gel après dépôt du PSC dans du tampon tris 0,05N sans sel à différents pH.

PSC:absorbance à206nm du PSC dissous dans 3mL de tampon tris 0,05N à pH 6,5



Le gel est lavé et équilibré aux différents pH avec le tampon tris. Le PS est ajouté au gel et mis à incuber. Le surnageant est ensuite récupéré et dosé pour en déterminer le contenu résiduel en PS.

Résultats

Nous pouvons observer (fig 11) qu'entre PH 4,5 et 8,5, le polysaccharide ne se retrouve pas dans le surnageant. Il est donc adsorbé.

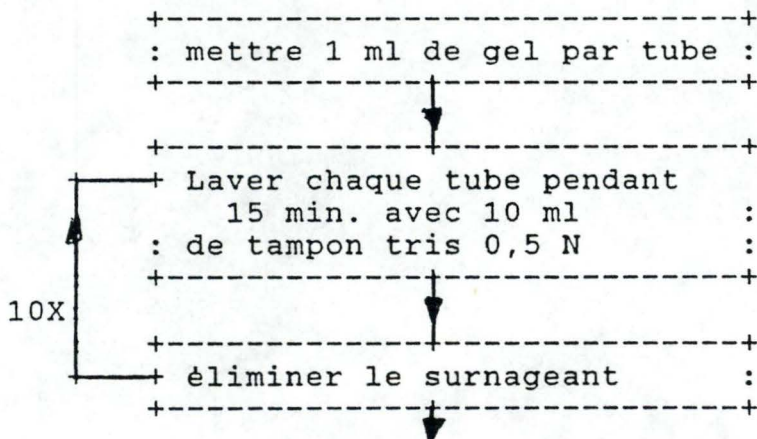
o essais par lots pour déterminer les conditions ioniques d'adsorption

Le pH n'influençant pas l'adsorption, nous avons choisis de travailler à pH 6,4, le pH du milieu de culture dont on devra extraire le PSC.

1) Matériel

- Tampon tris 0,5 N pH 6,4
- Tampon tris 0,05 N pH 6,4 et NaCl de 0 à 0,5 par tranches de 0,05
- Stock PSC : 2 mlH2 contenat 12 mg PSC

2) Mode opératoire



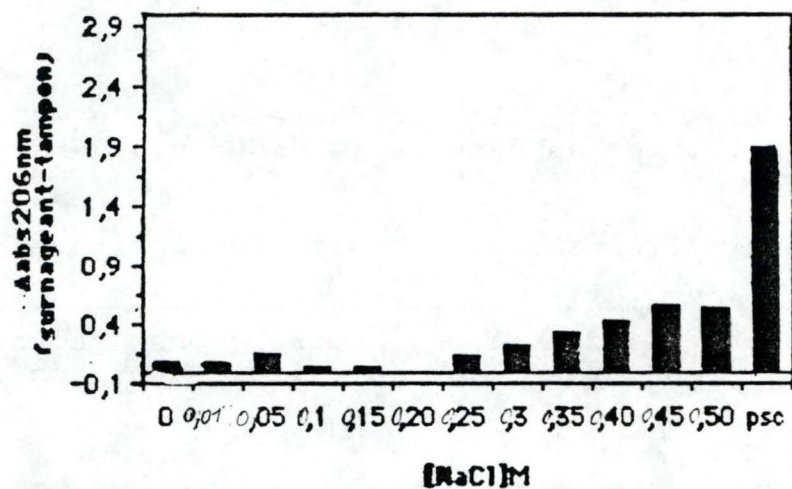
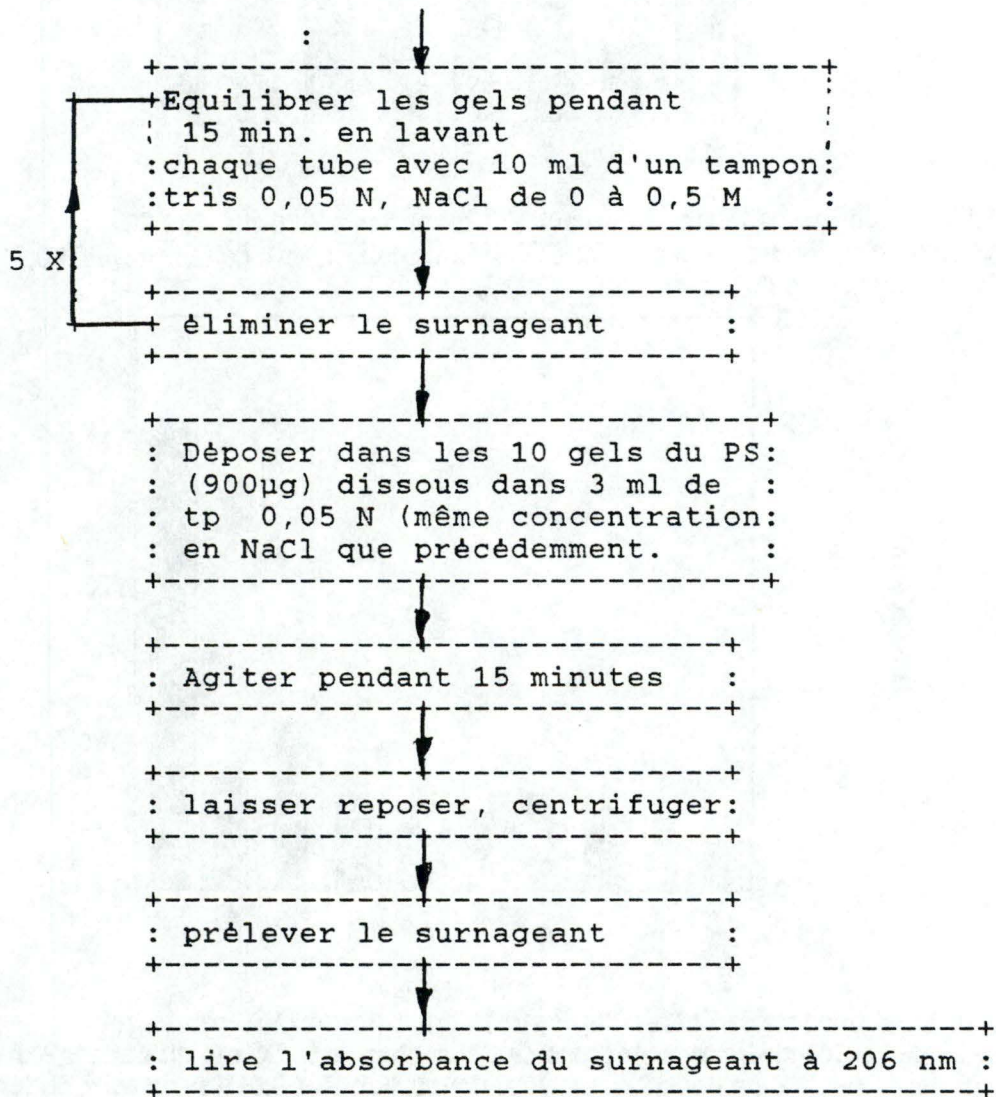


FIG 12:Essai par lots pour déterminer les conditions ioniques d'adsorption du PSC par du gel DEAE .

Absorbance à 206nm du surnageant du gel après dépôt de 900 μ g PSC dans du tampon tris 0,05mN pH6,4 à différentes concentrations en NaCl.

PSC:absorbance à 206 nm de 900 μ g de PSC dissous dans 3mL de tampon Tris 0,05N pH 6,4 NaCl 0,25N.



Le gel est lavé et équilibré avec le tampon à pH 6,4 aux différentes concentrations ioniques. Le polysaccharide est ajouté au gel et mélangé à celui-ci. Le surnageant est ensuite récupéré et son absorbance est lue à 206 nm pour en déterminer le contenu en polysaccharides. (L'absorbance à 206 nm du tampon correspondant est soustraite de la lecture).

3) Les résultats sont repris en figure 12.

Quand la [NaCl] est supérieure à 0,2 M, le PSC s'adsorbe moins. Les ions Cl⁻ entrent vraisemblablement en compétition avec les charges COO⁻ du polysaccharide pour se fixer sur les charges positives du gel.

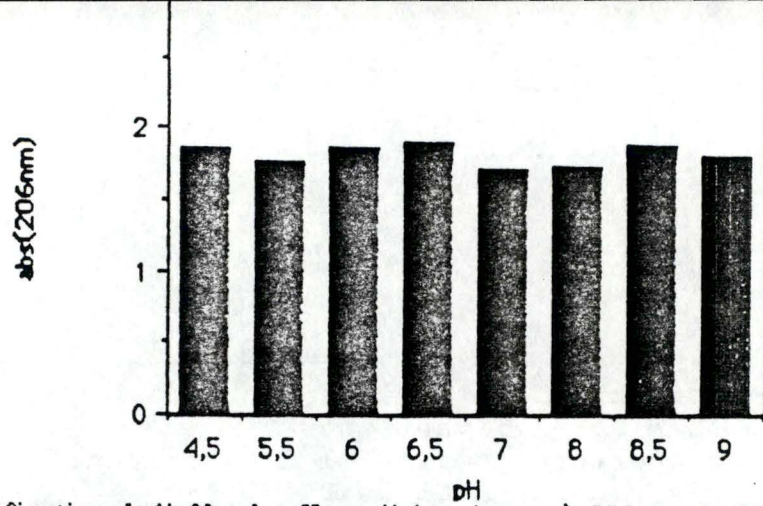


FIG 13: Vérification de l'effet du pH sur l'absorbance à 206 nm du PSC
L'absorbance à 206 nm de 900 µg de PSC dissous dans 1,5 mL de tampon P04 0,01N NaCl 0,15M est mesurée à différents pH.

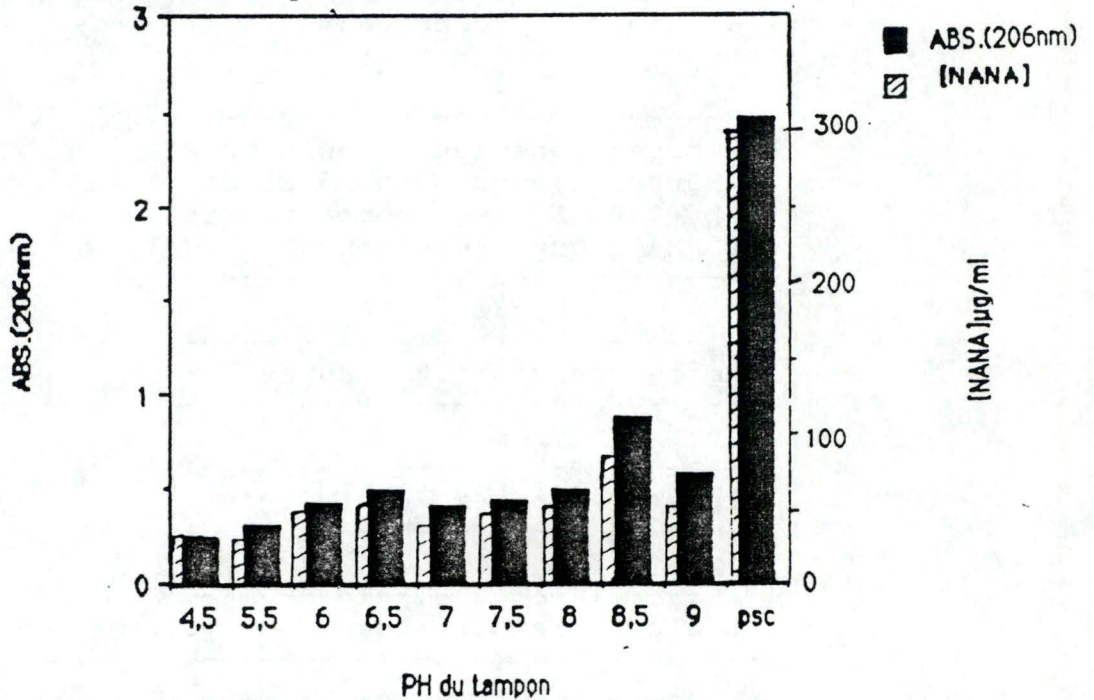


FIG 14: Essai par lots de l'effet du pH sur l'adsorption du PSC par le gel.
Dosage de l'acide sialique et lecture de l'absorbance à 206 nm du surnageant du gel après dépôt de 900 µg de PSC dans 3 mL de tampon P04 0,01N sans sel à différents pH.
PSC: absorbance à 206 nm de 900 µg de PSC dissous dans 3 mL de tampon P04 0,01N pH 6,4.

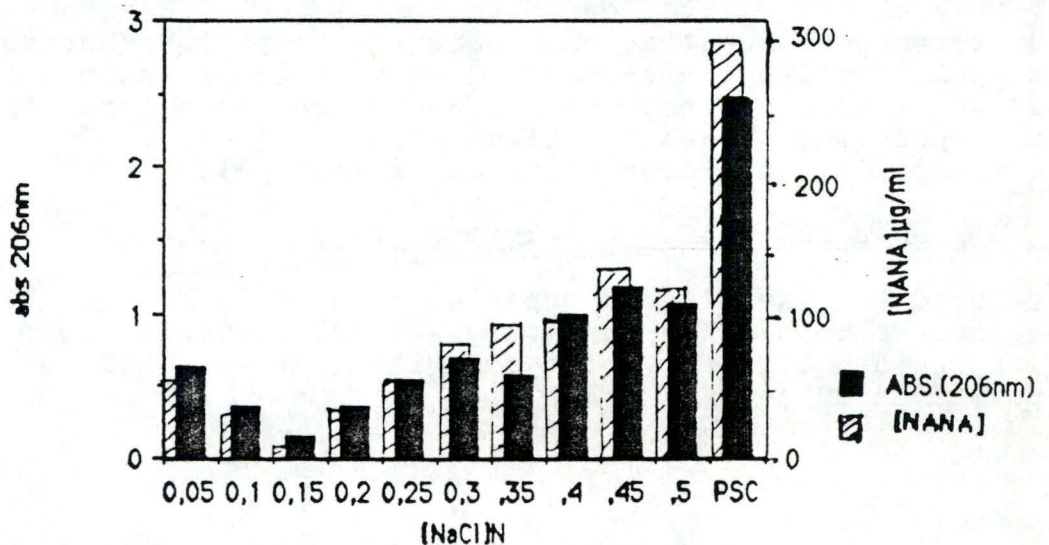


FIG 15: Essai par lots de l'effet des conditions ioniques sur l'adsorption du PSC par le gel.
Dosage de l'acide sialique et lecture de l'absorbance à 206 nm du surnageant du gel après dépôt de 900 µg de PSC dans 3 mL de tampon P04 0,01N à pH 6,4 à différentes concentrations en NaCl.
PSC: absorbance à 206 nm de 900 µg de PSC dissous dans 3 mL de tampon P04 0,01N pH 6,4 NaCl 0,25M.

o Conclusion des essais par lots de fixation sur le gel avec le tampon tris

Quoique le pH ne semble pas influencer l'adsorption du polysaccharide C sur le gel, nous avons utilisé un tampon phosphate. En effet, le pH de la chromatographie peut influencer l'adsorption ou la désorption des contaminants lors de l'utilisation du jus complet de fermentation. Celui-ci étant à pH $\pm 6,4$, nous avons pris un tampon phosphate au même pH une concentration PO_4 0,01 suffit car le pH varie peu (juste légèrement avec NaCl).

B) Essais en tampon phosphate

o essais par lots pour sélectionner le pH de départ

Matériel et mode opératoire

Le protocole est identique à celui utilisé en A) mais avec du tampon PO_4 0,5 N puis 0,01 N au lieu du tampon tris de pH 4,5 à pH 9.

Nous avons recherché la présence du PSC dans le surnageant du gel par dosage de l'acide sialique et lecture de l'absorbance à 206 nm.

Nous avons vérifiés à la figure 13 que le pH n'a pas d'influence sur l'absorbance du PSC à 206 nm. La variation de l'absorbance en fonction du pH est au maximum de 5 %. Elle n'est pas significative.

Résultats: figure 14

Le dosage du PSC et la lecture de l'absorbance à 206 nm concordent. Ils confirment les résultats obtenus en A) : le polysaccharide C s'adsorbe à tous les pH entre 4,5 et 9. On observe néanmoins une légère tendance à mieux s'absorber en dessous de pH 8,5.

o essais par lots pour sélectionner les conditions ioniques de départ

Matériel et mode opératoire

Les techniques sont identiques à celles utilisées en A) mais avec du tampon PO_4 0,5 N puis 0,01 N pH 6,4 de concentration ionique en NaCl de 0 à 0,5 M au lieu du tampon tris.

Résultats : figure 15

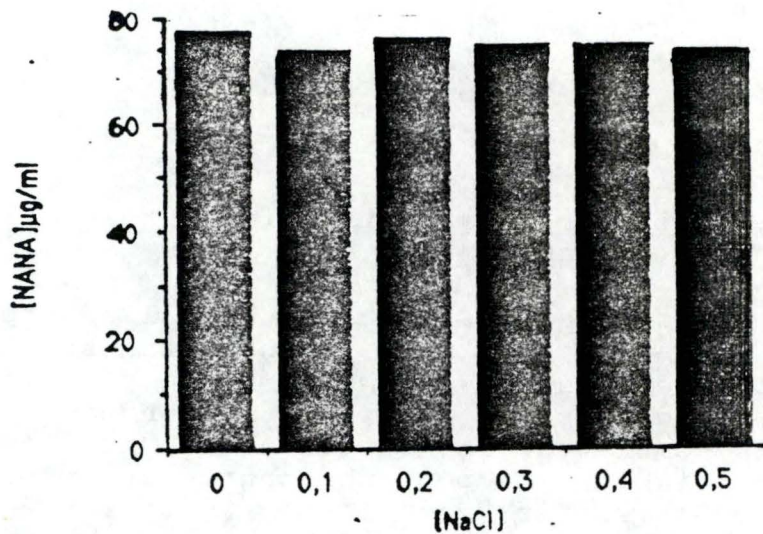


FIG 16: Vérification de l'effet de la concentration en NaCl sur le dosage du PSC. Dosage de 80 µg de PSC dissous dans 1 mL de tampon PO4 0,01N pH 6,4 à différentes concentrations en NaCl.

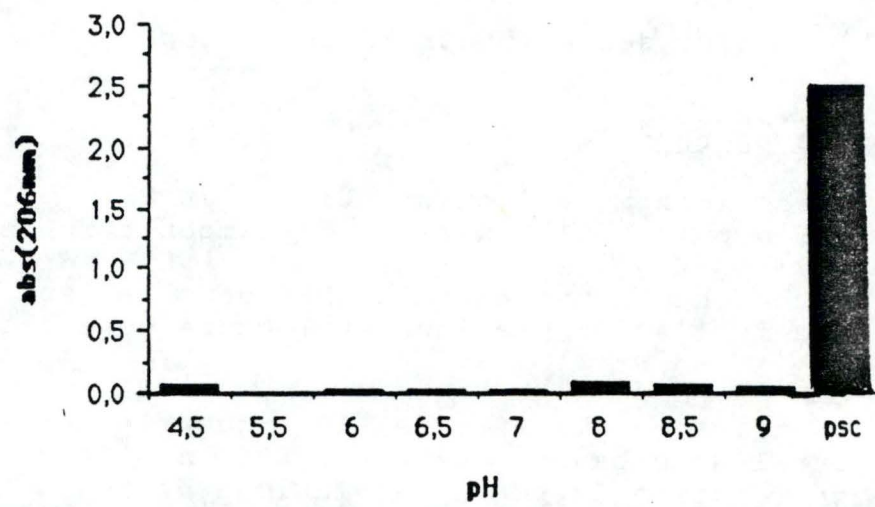


FIG 17: Essai par lots pour vérifier l'effet du pH sur l'adsorption du PSC par le gel en présence de tampon PO4 0,01N NaCl 0,15M. lecture de l'absorbance à 206 nm du surnageant du gel après dépôt de 900 µg de PSC dans 3mL de tampon PO4 0,01N contenant du NaCl 0,15M à différents pH. PSC: absorbance à 206 nm de 900 µg de PSC dissous dans 3mL de tampon PO4 0,01N NaCl 0,15M à pH 6.

On voit que le polysaccharide C s'adsorbe le mieux à une concentration en NaCl de 0,15 M puisque sur le 927 µg déposés, on n'en retrouve que 49,8 µg dans le surnageant soit ±5 %. Les 871 µg restants étant adsorbés par le gel.

Pour pouvoir nous fier à notre dosage, nous avons vérifié que la concentration ionique ne l'influencait pas. Les résultats sont montrés à la figure 16.

o essais par lots pour vérifier l'effet du pH sur l'adsorption du PSC en présence de tampon PO4 0,01 N NaCl 0,15 M-----

Matériel et mode opératoire

Le protocole est identique à celui utilisé lors des essais pour sélectionner le pH d'adsorption sans NaCl mais avec tampon PO4

0,5 N+ NaCl 0,15 M

0,01 N+

pH de 4,5 à 9 par tranche de 0,5

Résultats : figure 17

Comme dans le cas du tampon tris, le pH n'influence pas l'adsorption. Nous ne retrouvons pas de PSC dans le surnageant: cela tendrait à confirmer qu'une concentration en NaCl de 0,15 M permet de mieux adsorber le PSC (dans les conditions expérimentales étudiées).

3) Conditions de décrochage

Nous avons recherché la concentration en NaCl nécessaire pour le décrochage du PSC. Pour cela, nous avons procédé par lots : dépôt PSC dans du NaCl 0,15 M, décrochage avec du tampon PO4 0,01 N; à PH 6,4 et à différentes concentrations ioniques.

Matériel

Tampon PO4 0,5 N NaCl 0,15 M PH 6,4

Tampon PO4 0,01 N NaCl 0,15 M PH 6,4

Tampon PO4 0,01 N PH 6,4 en concentrations en NaCl suivantes :

0,2 M ; 0,22 M ; 0,25 M ; 0,3 M ; 0,35 M

0,4 M ; 0,45 M ; 0,50 M ; 0,55 M

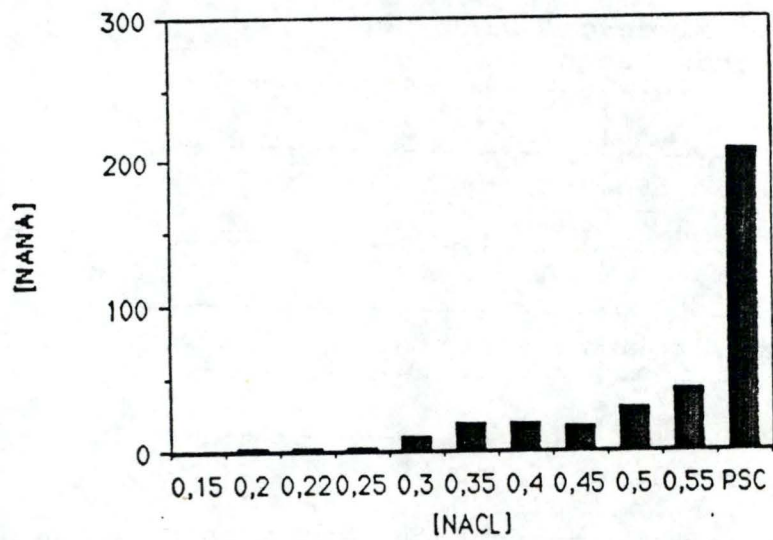
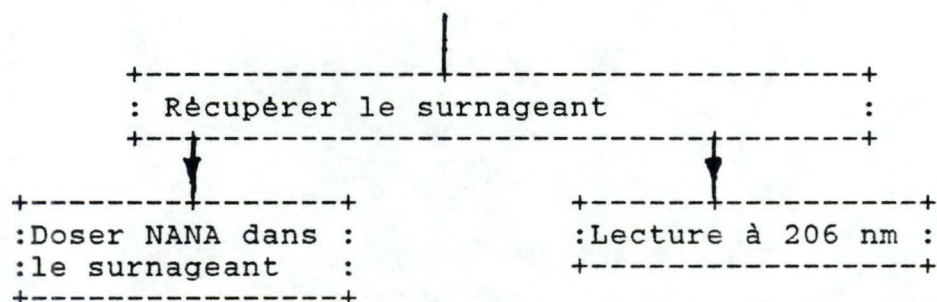


FIG 18:Essai par lots pour déterminer les conditions de désorption du PSC adsorbé par le gel dans du tampon P04 0,01N NaCl 0,15M pH 6,4.
 lecture de l'absorbance à 206 nm du surnageant du gel après rinçage du gel avec du tampon P04 0,01N pH 6,4 à différentes concentrations en NaCl.
 PSC:absorbance à 206 nm de 900 µg de PSC dissous dans 3mL de tampon P04 0,01N NaCl 0,15 M à pH 6,4.



Le gel est lavé et équilibré avec du tampon PO4 NaCl 0,15 M pH 6,4 (conditions dans lesquelles le PSC s'adsorbe le mieux). Le polysaccharide est déposé, nous avons vérifié qu'il était bien adsorbé en dosant les polysaccharides résiduels dans le surnageant. Nous avons rincé dans les mêmes conditions pour que tous les PSC non adsorbés soient bien éliminés. Le nouveau surnageant a été analysé. Les conditions ioniques de désorption ont été étudiées en lavant chaque tubes avec un tampon PO4 0,01 M PH 6,4 de concentrations en NaCl croissantes. Les surnageants ont été recueillis et dosés quant à leurs contenus en acide sialique.

Résultats

Dans les surnageants 1) et 2) on ne détecte pas de PSC, ni par la lecture de l'absorbance à 206 nm, ni par dosage de l'acide sialique.

Les résultats du dosage de l'acide sialique dans le surnageant du 3ème lavage sont repris en figure 18.

On décroche le PSC à partir de 0,3 M NaCl mais peu dans les conditions du Batch (temps de décrochage, volume, ...)

Pour confirmer la concentration minimale d'élution, nous sommes passés à un système de chromatographie sur colonne.

4) Essais sur colonne :

*) Essai sur colonne de 7 ml gel DEAE TSK.

Mode opératoire

Régler la pompe sur un débit de 10 ml/h. Rincer la colonne avec 80 ml de tampon PO4 0,01 M NaCl 0,15 M, déposer 5 mg de PSC (0,7 mg/ml de gel) dans 2 ml PO4 0,01 M NaCl 0,15 M. Rincer la colonne avec 10 ml de tampon PO4 0,01 M NaCl 0,15 M. Nous effectuons un gradient de tampon PO4 0,01 M entre une concentration initiale en NaCl de 0,15 M et 1 M en fin d'élution. L'élution est suivie par lecture de l'absorbance à 206 nm

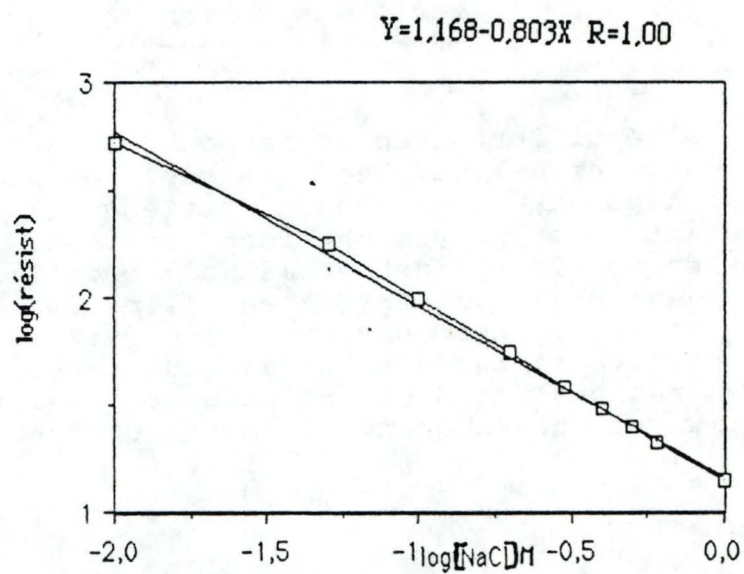


FIG 20: Droite d'étalonnage de la résistivité du tampon P04 0,01N, en fonction de sa concentration en NaCl.

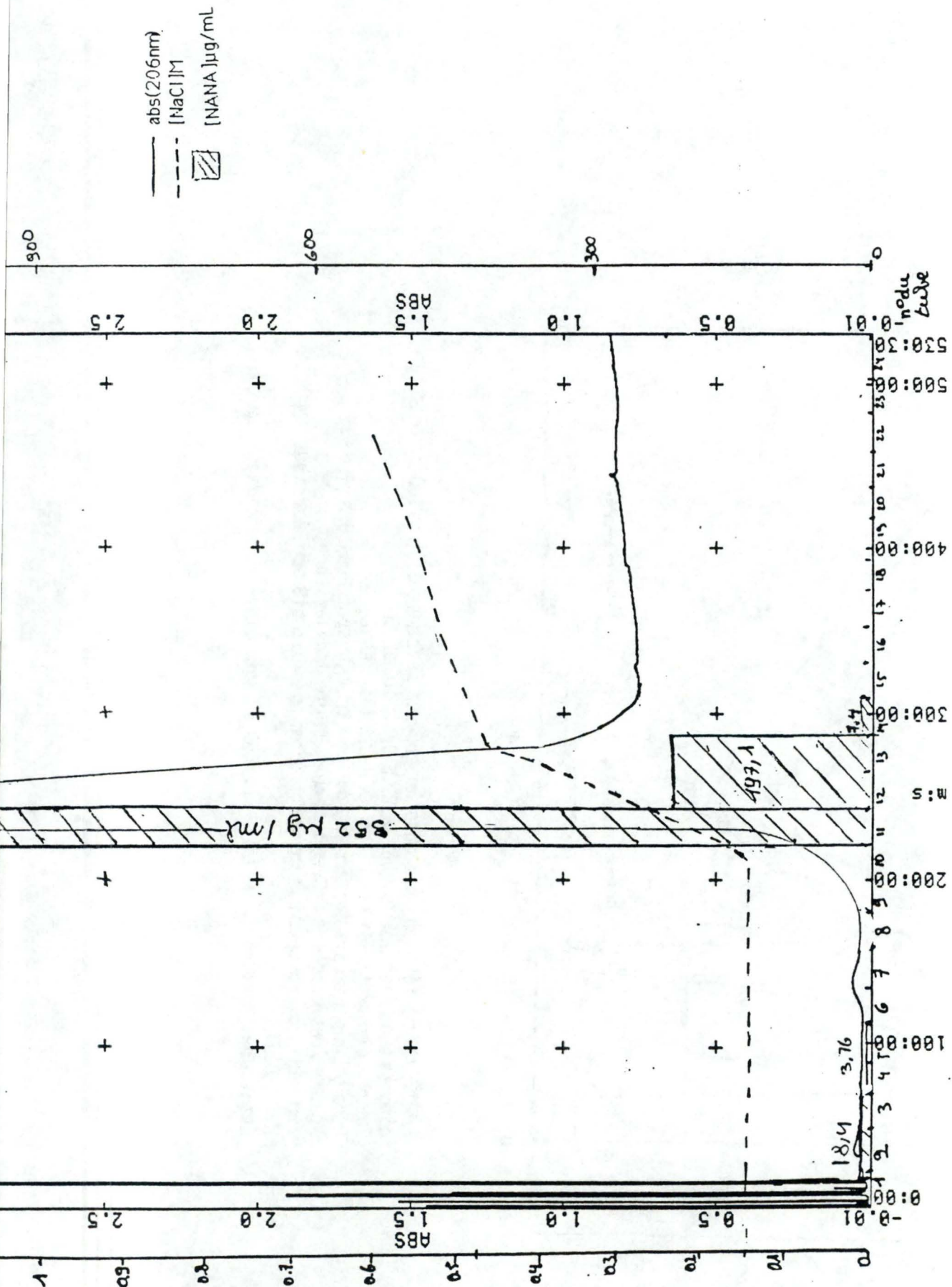


FIG 19: Schéma d'éluion d'une chromatographie d'échange d'ion de 5 mg de PSC déposé sur une colonne de 7 ml de DEAE. Débit : 10 mL/H
 Lecture de l'absorbance à 206 nm (Blanc réalisé sur P04 0,01N)
 Tampon d'adsorption: P04 0,01 N pH 6,4 NaCl 0,15M.
 Désorption par un gradient en NaCl de 0,15 à 1M. (tampon P04 0,01N pH 6,4)
 Résultats des dosages de NaCl et de l'acide sialique dans les fractions.

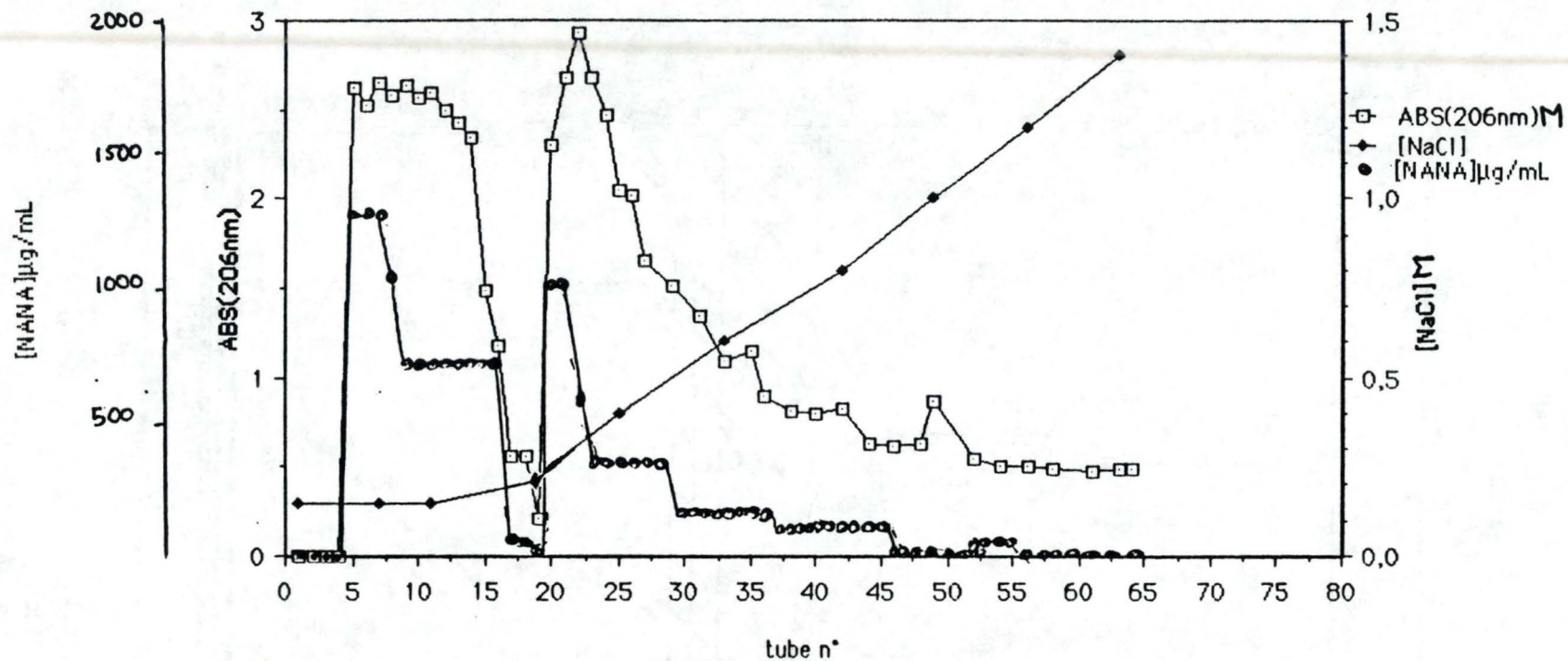


FIG 21: Schéma d'éluion d'une chromatographie d'échange d'ion de 100 mg de PSC déposé sur une colonne de 23ml de DEAE. Débit : 100mL/H
 Tampon d'adsorption: P04 0,01 N pH 6,4 NaCl 0,15M. (30mL)
 Désorption par un gradient en NaCl de 0,15 à 1,5M. (tampon P04 0,01N pH 6,4)
 Résultats des dosages de NaCl et de l'acide sialique dans les fractions.
 l'éluion est suivie par lecture de l'absorbance à 206 nm (Blanc réalisé sur P04 0,01N NaCl 0,015)
 Les résultats des dosages de NaCl et de l'acide sialique dans les fractions sont ajoutés sur le schéma.

Dosages

- La concentration NaCl est dosée en mesurant la conductivité des échantillons avec un impédancemètre Hewlett Packard 4800A en référence à une droite d'étalonnage de tampon PO₄ 0,01N à des concentration en NaCl de 0 à 1 M (cette droite est reprise à la figure 20). La fraction contenant le PSC est déterminée en dosant l'acide sialique.

Résultats

- Les 5000 µg sont presque entièrement adsorbés puisqu'on n'en récupère que 133 µg dans les tubes correspondant au lavage.

- Le graphe de la figure 19, nous montre que l'élution du PSC commence à une concentration en NaCl de 0,20 M et finit quand la concentration en NaCl est de 0,48 M.

- Bilan : sur les 5000 µg déposés, on n'en élue que ± 2400 soit 48 %

**) Essais sur colonne de 23 ml de gel DEAE TSK

On procède de la même façon que en *) mais on dépose 100 mg. (14,35 mg/ml de gel) de polysaccharide pur. Le débit de la pompe est de 100 ml/H (4volumes de colonne /H)

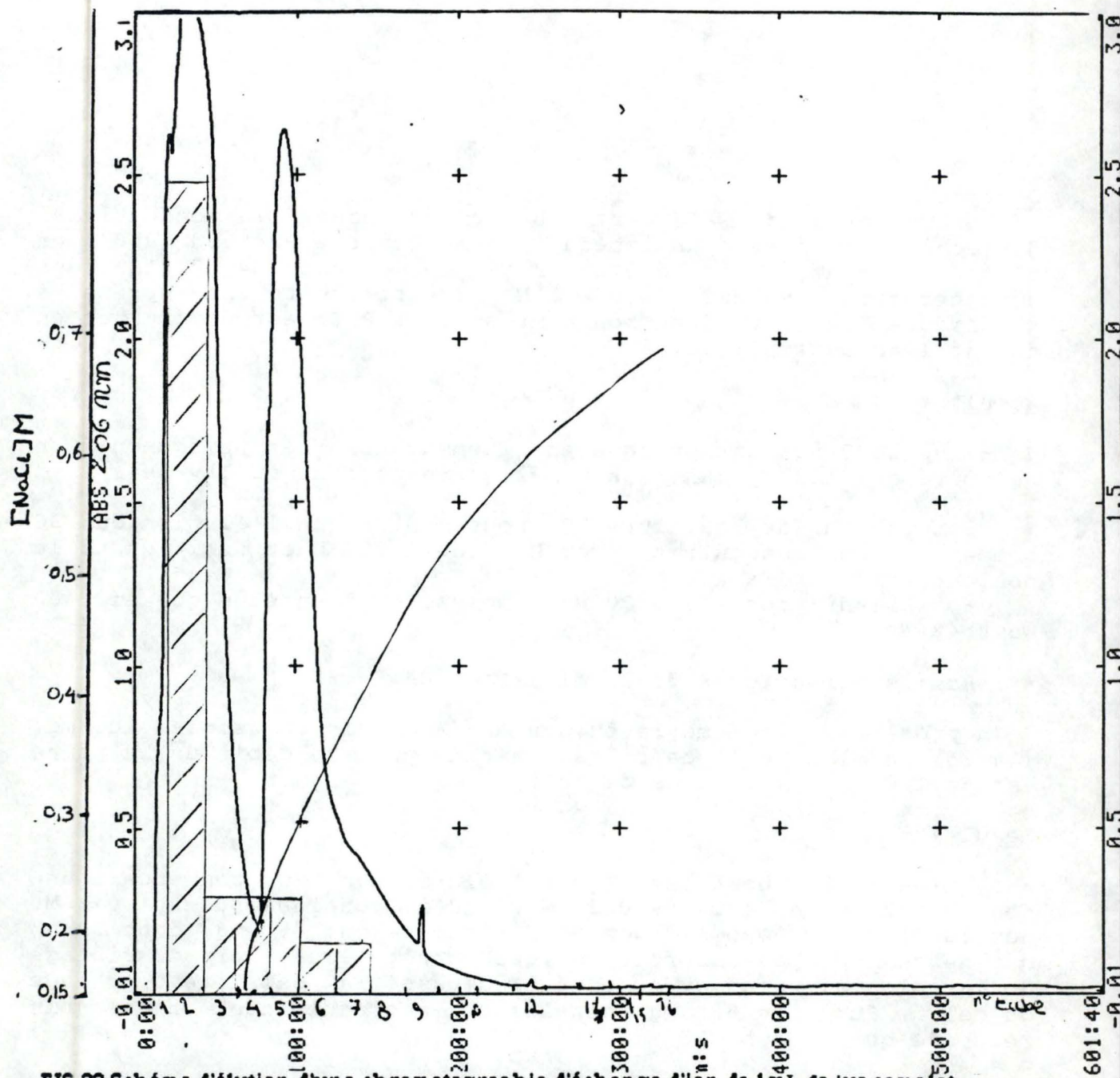
Résultats

La figure 21, nous montre que l'élution du PSC commence à une concentration en NaCl de 0,2 M et qu'il continue jusque 0,8 M. Sur les 100 mg déposés, on n'en récupère que 48 mg, dont 32 mg qui ne se sont pas adsorbés, et qui ont été élués lors du rinçage de la colonne. Nous avons en fait dépassé la capacité d'échange du gel. Sur les 68 mg déposés et accrochés nous n'en avons récupéré que 10 donc 25 %.

Conclusion

- Le PSC purifié semble se décrocher à partir d'une concentration en NaCl égale à 0,2 M. Nous devons maintenant vérifier qu'il le fait dans les mêmes conditions, quand il se trouve dans le milieu de culture.

- Le bilan est médiocre, nous récupérons au plus 50 % du polysaccharide. Il reste fixé dans la colonne ou précipité dans le gel. Si nous rinçons celui-ci avec du NaOH 0,5 M, nous pouvons, en mesurant directement l'absorbance à 206 nm, voir qu'une partie était bien fixée, mais il n'est pas possible de la doser.



4) essais de purification d'un milieu de culture.

1) Essais sur colonne DEAE TSK 7ml avec un tampon PO4 0,01 M et un gradient en NaCl 0,15M à 1M. Débit 100 ml/H

Le jus complet de fermentation après centrifugation est concentré 12 fois par ultrafiltration à l'aide d'un concentrateur Amicon par cartouche d'ultrafiltration.

Nous avons déposé 1 ml de ce concentré sur la colonne équilibrée avec du tampon PO4 0,01 M NaCl 0,15. Nous avons procédé pour la chromatographie de la même façon que pour le PSC purifié mais en dosant en plus du NaCl et de l'acide sialique, les endotoxines (principal contaminant) par le test "limulus".

Résultats

Les résultats sont mis sous forme de graphe à la figure 22.

Le dosage du NaCl ne peut se faire par la mesure de la conductivité car il y a trop d'interférences avec les électrolytes présents dans le jus complet. Pour résoudre ce problème, nous n'avons plus utilisé de gradient continu mais nous avons procédé par paliers en utilisant des tampons PO4 0,01 M, NaCl : 0,15 M, 0,20 M, 0,22 M afin de mieux maîtriser la concentration en NaCl de l'eluant.

Nous avons également rencontré des problèmes avec le dosage de l'acide sialique pour certains tubes : Probablement dûs à la présence entre autre de lactose dans le milieu de culture.

Nous y avons remédié en préparant une courbe standard contenant du lactose (en concentration égale à celle du glucose, calculée pour le dosage du PSY et PSW)

Le dosage des endotoxines a montré qu'on les retrouvait dans presque tous les échantillons. Cela peut s'expliquer par le fait que nous sommes en présences d'endotoxines de formes et de poids moléculaires variés.

2) Essai sur colonne DEAE TSK de 23 ml en tampon PO4 0,01 NaCl 0,15M-->0,4M

Nous avons procédé par paliers de [NaCl] croissant. Nous avons déposé 3 ml de jus concentré 12X.

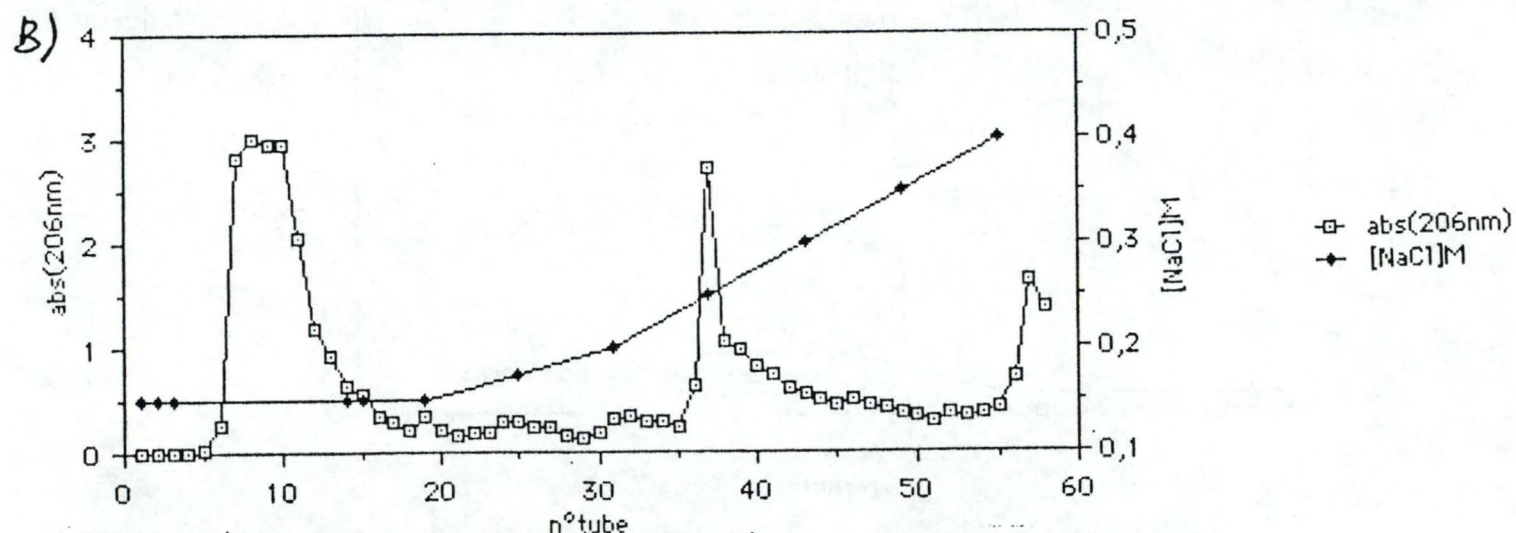
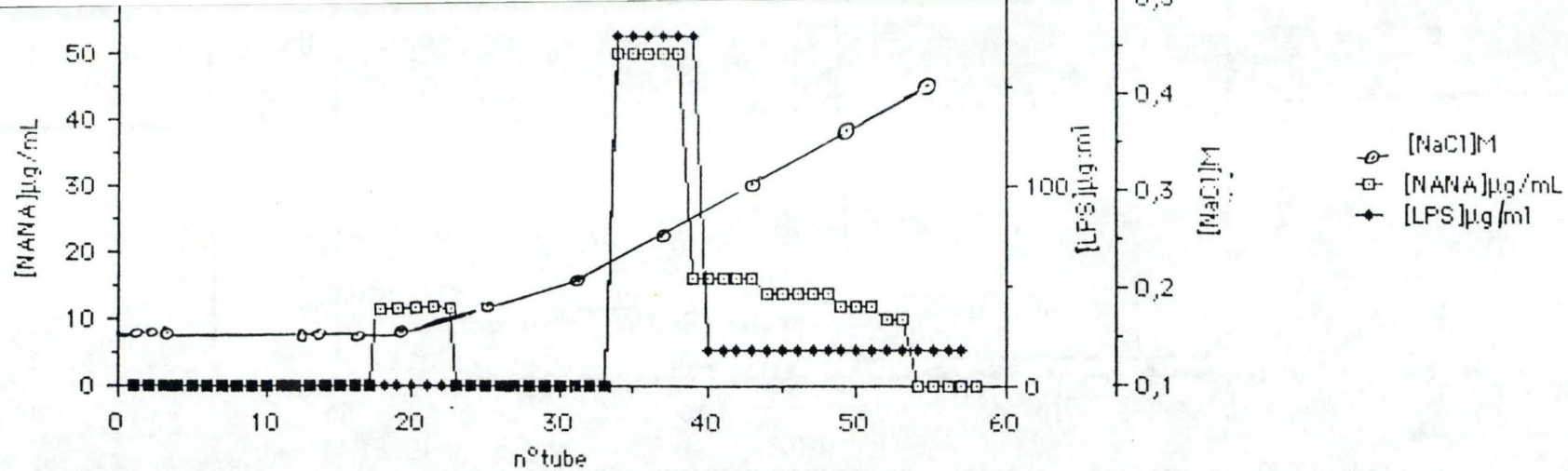


FIG 23: Schéma d'élution d'une chromatographie d'échange d'ion de 3 mL de jus complet de fermentation après centrifugation, concentré 12 fois, sur une colonne de 23 ml de DEAE. TSK: Débit : 100 mL/H
 Tampon d'adsorption: P04 0,01 N pH 6,4 NaCl 0,15 M. (50 mL)
 Désorption par des tampons P04 0,01 N de concentrations en NaCl croissantes:
 Résultats des dosages en NaCl, en acide sialique et de l'absorbance à 206 nm des fractions sont repris en A, ceux du dosage en endotoxines en B. (on a pris P04 0,01 N NaCl 0,15 M comme blanc.)

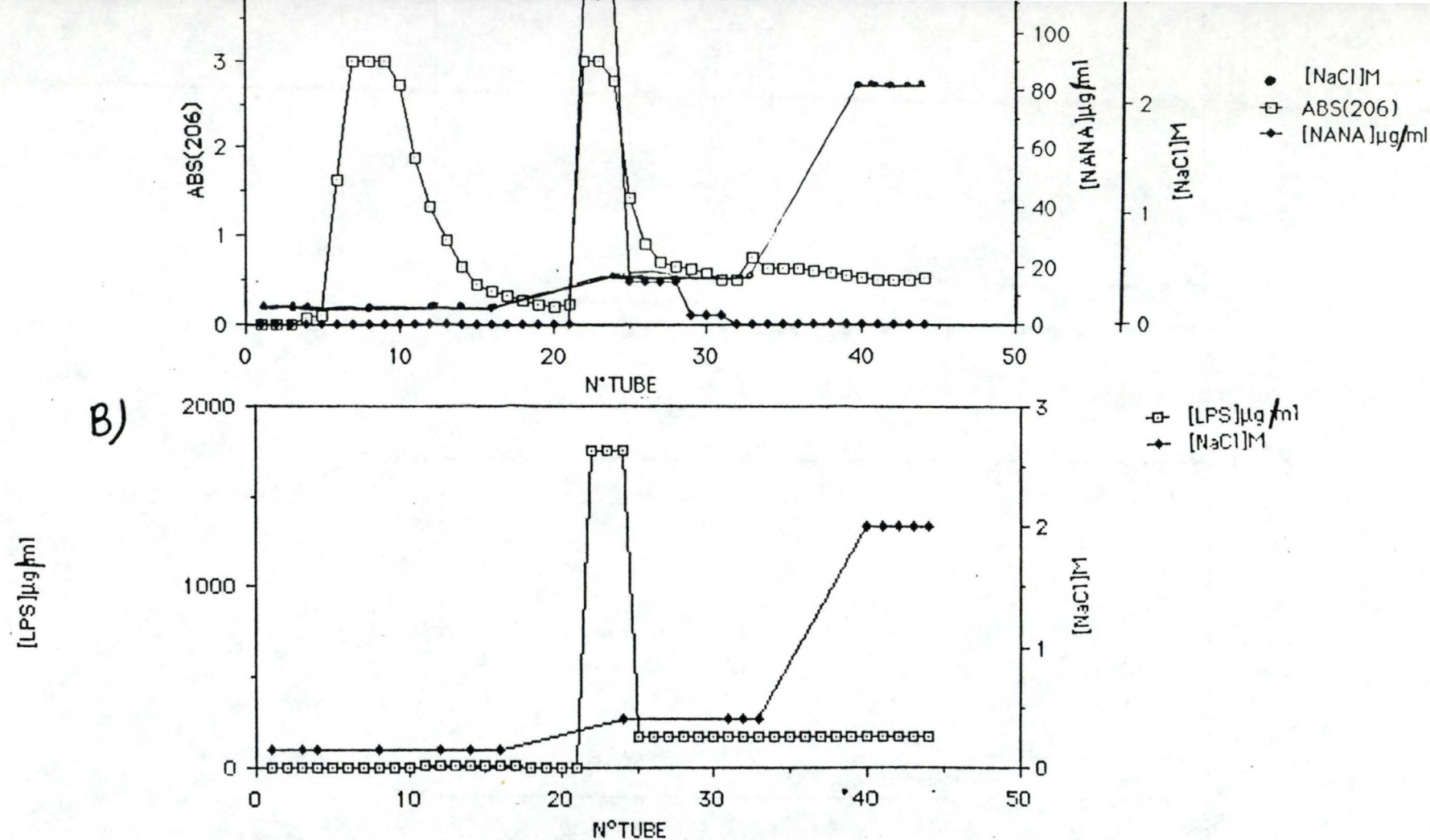


FIG 24: Schéma d'éluion d'une chromatographie d'échange d'ion de 3mL de jus complet de fermentation après centrifugation, concentré 12 fois, sur une colonne de 23 ml de DEAE. TSK: Débit : 100mL/H
 Tampon d'adsorption: P04 0,01 N pH 6,4 NaCl 0,15M. (50mL)
 Résultats des dosages en NaCl, en acide sialique et de l'absorbance à 206nm des fractions sont repris en A, ceux du dosage en endotoxines en B. (on a pris P04 0,01N NaCl 0,15M comme blanc.)
 désorption tampon P04 0,01N contenant du NaCl 0,4M (60ml), ensuite du NaCl 2M.

Résultats

Nous voyons (fig 23) que dans le lavage de la colonne, des contaminants s'éluent mais nous ne retrouvons pas de PSC ni d'endotoxines. Ce sont vraisemblablement des protéines et des acides nucléiques. Les PS et endotoxines commencent à s'éluier au même moment, à une concentration en NaCl de 0,22 M. Alors que les PSC ne sont plus décrochés par du NaCl les PSC ont fini à 0,4 M, les endotoxines sortent encore.

Les dosages des PSC donnent cependant des résultats inférieurs aux mesures réelles car il y a encore des interférences : les absorbances à 450 nm sont trop élevées par rapport à celles à 580 nm. Comme on calcule la différence pour trouver la concentration en PSC, les valeurs observées sont trop basses. Pour le jus complet concentré, nous dosons 750 µg/ml de PSC.

Conclusion :

Nous allons désorber avec du NaCl 0,4 M pour récupérer tout le PSC puis augmenter la concentration ionique pour vérifier qu'il ne s'éluie plus à des concentrations supérieures.

3) essai sur colonne DEAE TSK de 23 ml, en tampon PO4 0,01 M pH 6,4

Adsorption et le lavage se font avec du NaCl 0,15 M, l'éluion avec 2,5 volumes de colonne de tampon PO4 0,01 M en NaCl 0,4 M suivie de NaCl 0,2 M)

Résultats

fig24

Nous obtenons de nouveau les mêmes résultats. Un gradient n'est donc pas nécessaire.

5) Conclusion

Les protéines et acides nucléiques ne nous posent pas de problème. Le contaminant principal, dont nous voulions séparer le polysaccharide, l'endotoxine, était encore présent en concentration beaucoup trop importante. Il se trouve probablement lui aussi sous forme anionique retenue sur la colonne (Westphal 1975)

6) Essais réalisés avec de l'EGTA.

Le PSC étant associé intermoléculairement par des ions calcium, nous avons étudié son comportement en présence d'EGTA (complexant spécifique du Ca⁺⁺). Nous avons travaillé avec du PSC purifié et avons voulu observer le comportement du PS sans calcium lorsqu'il était en présence du gel. Une modification des propriétés d'échange et d'adsorption du PSC sur la colonne de chromatographie permettrait peut-être en effet une élution indépendante du PSC et des lipopolysaccharides.

a) Essais réalisé par lots pour déterminer la concentration en EGTA à utiliser.

Nous avons mesuré (Chap II a) que le Ca²⁺ représentait 4,0% en poids du PSC.

Comme en moyenne le PM d'un monomère est de 379 gr, si toutes les carboxylates du polysaccharide étaient complexées par du Ca²⁺, on aurait 40g de Ca²⁺ pour 758g de PSC. On en a 4% donc 30,32g.

L'EGTA étant tétravalent, il faut 1 môle d'EGTA pour 2 môles de Ca²⁺.

$$\text{PMEGTA} = 380,4$$

Si on prend des échantillons de 0,3 mg de PSC par ml (ou 0,3 g/l) il faut prendre comme quantité équivalente en EGTA

$$\left[\frac{(0,3 \times 4) / 100 \times 380,4}{(40,08 \times 2)} \right] = 57,06 \cdot 10^{-3} \text{ g/L d'EGTA}$$

Nous avons noté arbitrairement, 1/16, 1/8, 1/4 et 1/2 les solutions d'EGTA respectivement seize, huit, quatre et deux fois moins concentrées en EGTA que l'équivalence (57,06 10E-3 g/L) et 2X, 4X les tampons deux et quatre fois plus concentré en EGTA.

1) mode opératoire

+-----+
:Equilibrer 1 ml gel avec des concentrations en :
:EGTA de 0, 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, = ,2X, 4X :
:Tampon PO4 0,01 N NaCl 0,15 M :
+-----+



+-----+
:Ajouter 0,9 mg PSC dans 3 ml EGTA. Agiter pendant 15 mn :
+-----+



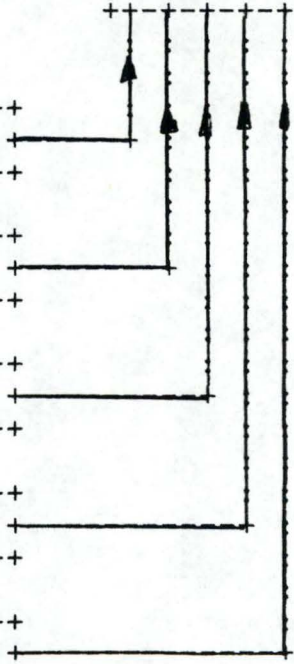
+-----+
:Laver avec 5 ml :
:NaCl 0,15 M :
+-----+



+-----+
:Récupérer le surnageant :
+-----+



+-----+
:Laver avec 5 ml NaCl 0,15 M :
+-----+



lecture à
206 nm

+-----+
: 5ml NaCl 0,2 M :
+-----+

+-----+
: 5ml NaCl 0,22 M :
+-----+

+-----+
: 5ml NaCl 0,25 M :
+-----+

+-----+
: 5ml NaCl 0,3 M :
+-----+

Pour la lecture de l'absorbance à 206 nm, prendre comme blanc pour chaque surnageant le tampon de concentration en NaCl et EGTA correspondant.

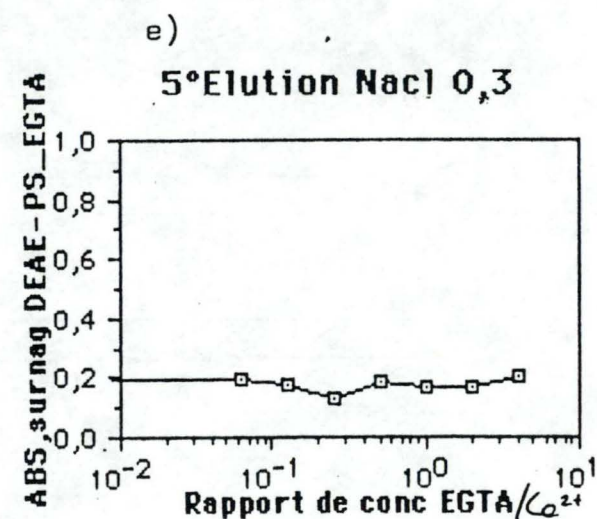
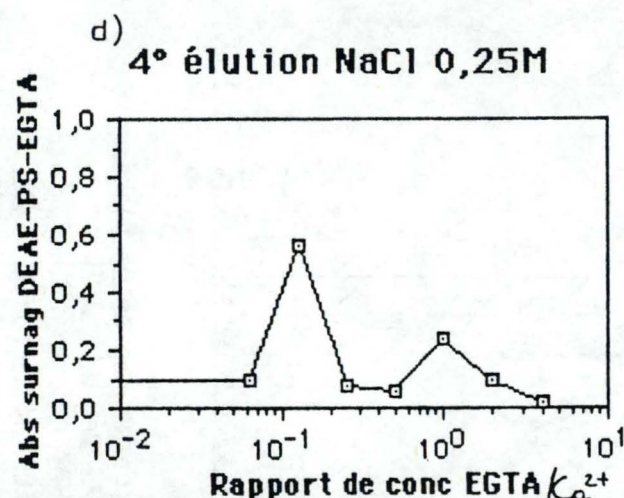
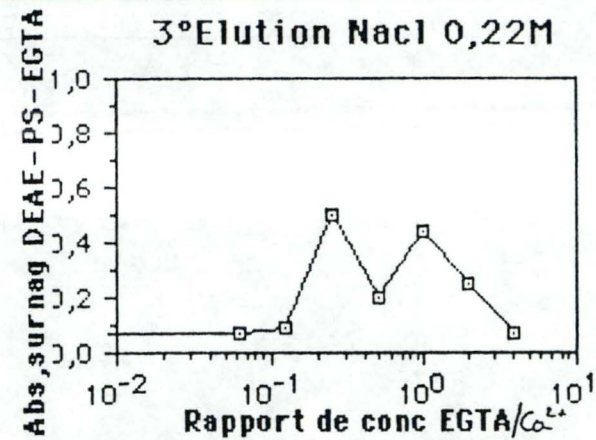
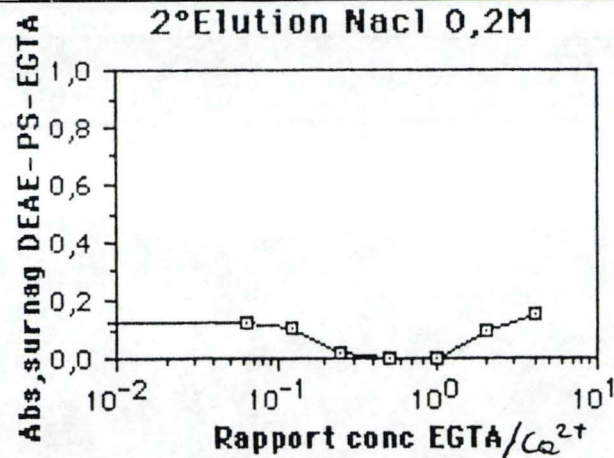
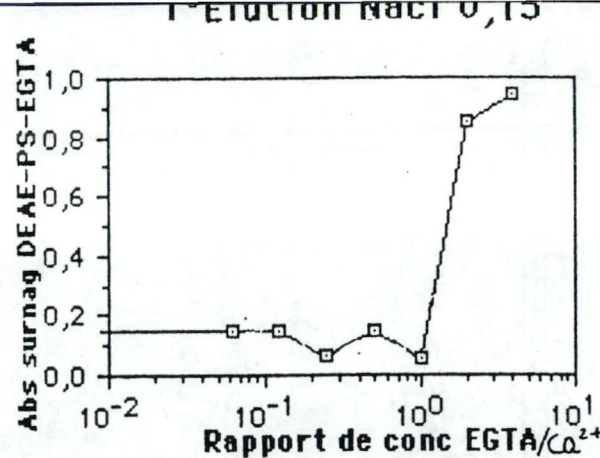


FIG 25: Essais par lots pour déterminer la concentration en NaCl nécessaire au décrochage du PSC. 900 µg de PSC sont déposés sur chaque gel, dans de l'EGTA.

Rapport $[EGTA]/[Ca^{2+}] = 1 = 57,06 \cdot 10^{-3} \text{g/L d'EGTA}$

$$1/2 = 57,06 / 2 \cdot 10^{-3} \text{g/L} \quad 2^* = 57,06 \cdot 2 \cdot 10^{-3} \text{g/L}$$

$$1/4 = 57,06 / 4 \cdot 10^{-3} \text{g/L} \quad 4^* = 57,06 \cdot 4 \cdot 10^{-3} \text{g/L}$$

$$1/8 = 57,06 / 8 \cdot 10^{-3} \text{g/L}$$

$$1/16 = 57,06 / 16 \cdot 10^{-3} \text{g/L}$$

a) Essai de décrochage avec NaCl: 0,15M

b) Essai de décrochage (de ce qui est encore adsorbé après lavage NaCl 0,15M) avec NaCl: 0,2M

c) Essai de décrochage avec NaCl: 0,22M

d) Essai de décrochage avec NaCl: 0,25M

e) Essai de décrochage avec NaCl: 0,30M

lecture de l'absorbance à 206nm du surnageant du gel après lavage avec le tampon adéquat.

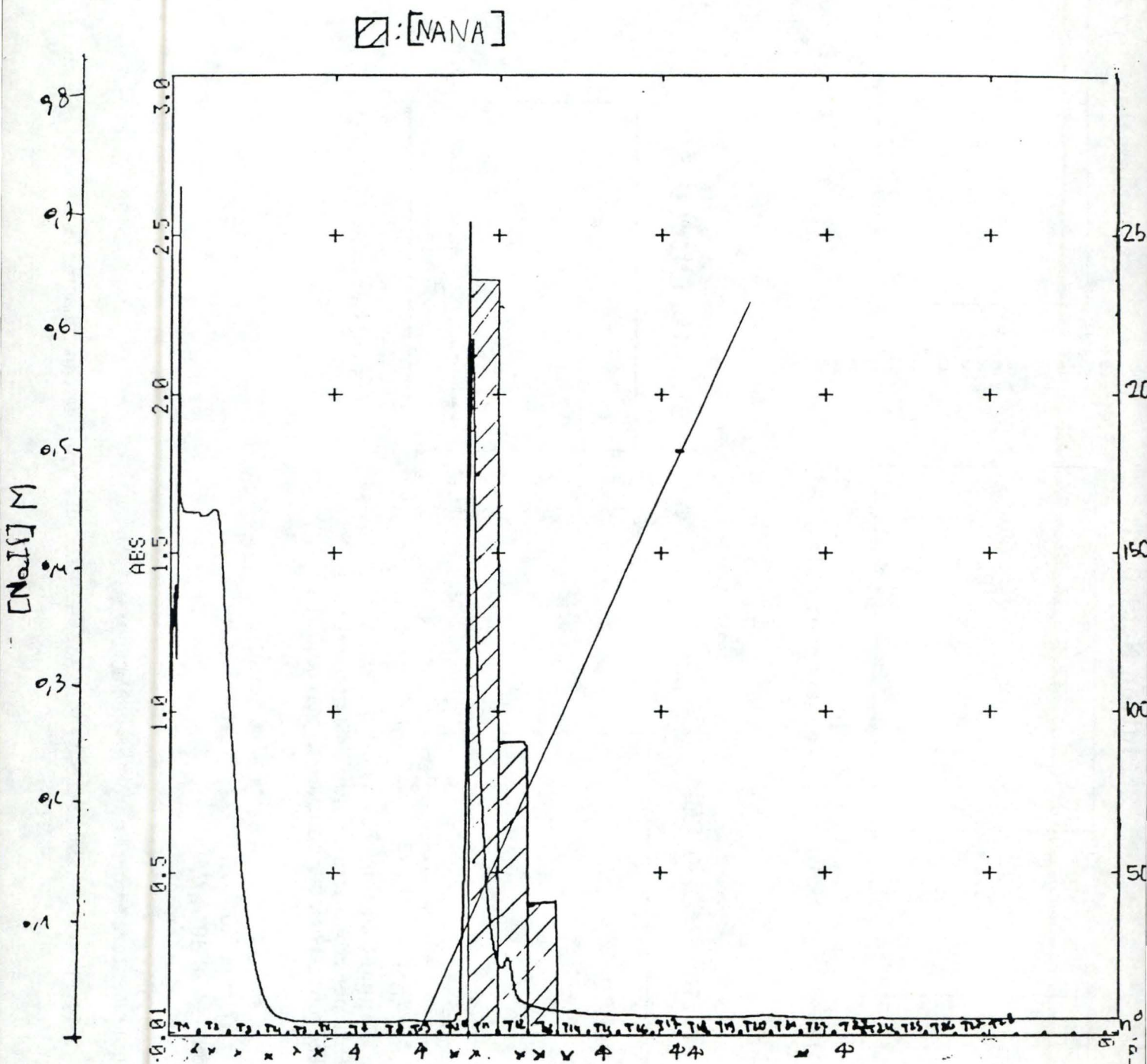


FIG 26: Schéma d'éluion d'une chromatographie d'échange d'ion de 5 mg de PSC déposé sur une colonne de 7 ml de DEAE. Débit : 10 mL/H
 Tampon de rinçage: EGTA 0,0049M
 Tampon de décrochage: EGTA 0,0049M NaCl de 0 M à 1M.
 L'éluion est suivie par mesure de l'absorbance à 206nm (Blanc réalisé sur EGTA 0,0049M NaCl de 0 M)
 Les résultats des dosages de NaCl et de l'acide sialique dans les fractions sont ajoutés sur le schéma.

Résultats

Seule une concentration en EGTA minimum 2 fois supérieure au contenu en Ca^{2+} permet de désorber le PSC du gel à une concentration en NaCl de 0,15 M. Nous avons préparé une colonne de chromatographie d'échange d'ions, équilibrée avec de l'EGTA.

L'EGTA accélère la désorption du PS. Il ne nous a malheureusement pas été possible de vérifier sur une chromatographie du jus complet si la présence d'EGTA permet une élution différentielle du PS et des endotoxines. (figure 25)

b) Essai sur colonne DEAE de 7 ml

On a déposé 5 mg de PSC dans 2 ml de tampon
on avait donc $\frac{5 \times 4}{100} = 0,2$ mg de Ca^{2+} dans 2 ml

100mg Ca^{2+} dans 1 litre
ou 0,00249 Mole/ L 0,00498 éq/L

Pour que une concentration en EGTA quatre fois plus concentrée, il faut $0,00498 \text{ éq/L} \times 4 = 0,01992 \text{ éq/L}$ ou 0,00498 Mole/L

Le PM étant de 380,4, Nous avons pris une solution contenant 1,898 g/L d'EGTA.

Mode Opératoire

```
+-----+
: Rincer la colonne avec 70 ml EGTA 0,0049 M :
+-----+
      |
+-----+
: Déposer 2 ml EGTA 0,0049 M contenant 5 mg PSC :
+-----+
      |
+-----+
: Faire passer un gradient en NaCl de 0 à 1M contenant de
: l'EGTA 0,049M
+-----+
```

Résultat

Nous avons rencontré de problèmes pour doser le NaCl suite à la présence d'EGTA dans les échantillons.

Nous avons néanmoins observé (figure 25) que l'EGTA accélère la désorption du PS. Il ne nous a malheureusement pas été possible de vérifier sur une chromatographie du jus complet si la présence d'EGTA permet une élution différentielle du PS et des endotoxines.

CHAPITRE VII CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail s'inscrit dans une recherche d'amélioration des procédés de production des polysaccharides (A,C,W,V) de *Neisseria meningitidis* constituant le vaccin MENCEVAX produit par la société SMITH KLINE BIOLOGICALS. Nous nous sommes attachés à l'étude de la purification du polysaccharide C; après avoir vérifié par mesure de son pK qu'il est bien chargé négativement en fin de fermentation (après inactivation de la bactérie et centrifugation), Nous avons évalué la contribution d'une chromatographie d'échange d'anions sur sa purification.

La composition de jus de culture débarassé des cellules mortes avait été analysée par ailleurs révélant qu'un des principaux contaminants du PSC natif est l'endotoxine (Lipo polysaccharide = LPS)

Les conditions de fixation et d'élution sur l'échangeur d'anions d'un PSC, purifié par la méthode classique ont été définies, avec difficulté étant donné l'hétérogénéité apparente du produit (une partie du PS serait associée à un phospholipide)

Nous avons tenté de séparer chromatographiquement le PSC natif de son principal contaminant (endotoxines) sans y parvenir dans le cadre de ce travail : sur colonne les 2 produits s'adsorbent et s'éluent dans les mêmes conditions. Nous n'avons pas été en mesure de tester le comportement d'endotoxines purifiées.

Une étude plus approfondie serait indispensable mais il paraît dès à présent évident qu'une prépurification (par exemple par précipitation) devrait précéder une étape de purification fine par chromatographie. Nous pouvons peut-être nous servir également des techniques citées par Wesphal (1975) pour purifier les endotoxines: procéder à une extraction des endotoxines, par un mélange phénol/eau à une température de 65-68°C. En refroidissant, ce mélange homogène se sépare en 2 phases: aqueuse et organique. Dans ces conditions le complexe d'endotoxines se trouve toujours dans la phase aqueuse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANONYME (1975) : RAPPORT I.R.S.I.A. 1975-76 Convention 2407, recherche et industrie thérapeutiques Smith-Kline R.I.T. Genval. pp. 1-101.
- ANONYME (1976) : RAPPORT I.R.S.I.A. 1976-77 Convention 2407, recherche et industrie thérapeutiques Smith-Kline R.I.T. Genval. pp. 1-72.
- ANHOURY, M.L., ARICKX, M., BOON B., CROOY, P., DE NEYS, R., DEWEZ, M., GILLES D., GOOSSENS, J., LIVEYNS, R. & ROELANTS, P., (1979) : Analysis of a bivalent meningococcal vaccine (A + C), Ann. soc. belge Med. trop., 59, pp. 259,266.
- ANHOURY, M.L., ARICKX, M., BOON B., CROOY, P., DE NEYS, R., DEWEZ, M., GILLES D., GOOSSENS, J., LIVEYNS, R. & ROELANTS, P., (1980) : Analyse d'un vaccin meningococcique bivalent (A + C), Médecine d'Afrique Noire , 27(4) 393-404.
- BHATTACHARJEE A.K., JENNINGS, H.J, KENNY, C.P., MARTIN, A., SMITH, I.C.P., (1975) : Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of Neisseria meningitidis serogroup B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance, J. Bio. Chem., 250, pp. 1926-1932.
- Colmant, P. (1963) : chimie générale et abrégé de chimie minérale
Faculté universitaire Notre Dame de la paix Namur.
Maison d'édition : A.D. Wasmal-Charlier(S.A.) pp 369-371.
- CRUSE, J.M., LEWIS, R.E.jr(eds) (1989) : Contemporary trends in conjugate Vaccine development : Conjugate Vaccines contrib Microbial Immunol Basel, Karger, Vol 10 pp 1-10.
- DEBONGNIE, P. (1986) : Caractérisation par RPE des interactions du cuivre (II). Mémoire pp II9-III1 Université catholique de Louvain Faculté des Sciences Agronomiques.
- DEMIL, P.& HOET, E. (1989) : Communication personnelle non publiée. Smith-Kline RIT. Rixensart.
- DUMONT DE CHASSART, Q. (1987) : contribution à la mise en oeuvre de techniques de purification de polysaccharides destinés à la préparation d'un Vaccin. Mémoire. Facultés des Sciences Agronomiques de l'Etat Gembloux.
- GOLD, R. (1979) : Immunogenicity of meningococcal polysaccharides in man in : IMMUNOLOGY OF BACTERIAL POLYSACCHARIDES, vol. 2, ELSEVIER/NORTH HOLLAND, Amsterdam, pp. 121-151.

- GOTSCHLICH, E.C., REY, M., ETIENNE, J., SANBORN, W.R., TRIAU, R. & CVJETANOVIC, B. (1972) : The immunological responses observed in the field studies in Africa with group A meningococcal vaccines. *Prog. Immunobiol. Stand.*, 5, pp. 485-491.
- GOTSCHLICH, E.C., FRASER, B.A., NISHIMURA, O., ROBBINS, J.B., LIU, T.Y., (1981) : Lipid on capsular polysaccharide on Gram-negative bacteria, *J. Biol. Chem.*, 256, PP. 8915-8921.
- JENNINGS, H.J. BHATTACHARJEE, A.K., BUNDLE, D.R., KENNY, C.P., MARTIN, A and SMITH I.C.P. (1977) : Structures of the capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* as determined by ¹³C-Nuclear Magnetic resonance Spectroscopy : *The journal of infectious diseases* Vol 136 Supplement August 1977.
- LIVEYNS, R., GILLES, D & ARICKX, M. (1982) : Procédé de préparation de polysaccharides capsulaires antigéniques purifiés, produits obtenus et leurs utilisations : Mémoire descriptif déposé à l'appui d'une demande de Brevet d'invention.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.*, 193, PP PP. 265-275.
- PEARSON IV, F.C. (1986) PYROGENS and depyrogenation : Theory and practice.
- PHARMACIA (1987): ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY PRINCIPLES AND METHODS PHARMACIA LKB Biotechnology.
- PORRO M., NENCIONI, L., TAGLIAFERRI, L., SALETTI, M., (1980) : The biological and physico-chemical characteristics of meningococcus polysaccharide group C prepared by two different method of purification. *J. Bio. Sand.*, 8, pp. 7-13.
- RIETSCHEL, E.TH., SCHADE, V., JENSEN, M., WOLLENWEBER, H.-W., LÖDERITZ, O. and GREISMAN S-G (1982) : Bacterial Endotoxines : Chemical structure, Biological Activity and Role in Septicoemia. *Scand. J. infect. Dis. suppl* 31 : 8-21.
- SCOPES, R.K. (1982) : Protein purification. Principles and Practice : Series Editor, Library of congress Cataloging in Publication Data pp67 - 132.
- S.K. recherche et développement (1975) : La Meningite R&D chimie.
- SVENNERHOLM, L., (1957) : Quantitative determination of sialic acid. *Biochem. Biophys. Acta*, 24, pp 604-611.

- TSAI, C.M., FRASCH, C.E., RIVERA, E., and HOCKSTEIN, H.D., (1989) : measurements of lipopolysaccharide(endotoxin) in meningococcal protein and polysaccharide preparation for vaccine usage. JOURNAL OF BIOLOGICAL STANDARDISATION 17, 249-258.
- WONG, K.H., BARRERA, O., SUTTON, A., MAY, F., HOCHSTEIN, D.H., ROBBINS, J.D., ROBBINS, J.B., PARKMAN, P.D. & SELIGMAN, E.B.Jr, (1977) : Standardization and control of meningococcal vaccine group A and group C polysaccharides J. Bio. Stand., 5, pp. 197-215.
- W.H.O., WORLD HEALTH ORGANISATION (1976) : Requierments for polysaccharides vaccines. Technical report serie n.594, pp. 50-75, Genève.
- W.H.O., WORLD HEALTH ORGANISATION (1978) : Requierments for meningococcal polysaccharides vaccines. Technical report serie n.610, pp. 94-98, Genève.
- WESTPHAL, O. (1975) : Bactèrial Endotoxines. Int. Archs. Allergy App. Immunol 49 : 1-43.

LISTES DES ABREVIATIONS

- ABS** : Absorbance,
- AC** : Anticorp
- Ag** : Antigène.
- DEAE** : Diethylamino etyl.
- EGTA** : Ethyleneglycol-bis-(β -aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid.
- EtOH** : Ethanol.
- HPLC** : High presure liquid chromatography.
- LPS** : Lipopolysaccharide.
- O.M.S** : Organisation Mondiale de la Santé
- PS** : Polysaccharide capsulaire de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe a
- PSA** : Polysaccharide capsulaire de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe A.
- PSB** : Polysaccharide capsulaire de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe B.
- PSC** : Polysaccharide capsulaire de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe C.
- PSW** : Polysaccharide capsulaire de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe W.
- PSY** : Polysaccharide capsulaire de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe Y.
- R** : Coefficient de régression.
- SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate.
- W.H.O** : World Heald Organisation.