



Original Paper

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Purification de la Protéine C-Réactive (CRP) par une procédure simplifiée en deux étapes chromatographiques

S. A. AKPONA^{1*}, M. GOMINA ASSOUMANOU², A .D. SEDOGBO⁴
et I. ABDOULAYE³

¹ Professeur de Biochimie, UERS de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Parakou, BP 123 Parakou, Email : akponasimon@yahoo.fr (République du Bénin).

² Assistant-Junior en Biochimie, UERS de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Parakou, BP 123 Parakou, Email : elboutraguero@yahoo.fr (République du Bénin).

³ Professeur agrégé de Biochimie, Faculté des Sciences de la Santé, BP 188 Cotonou, Université d'Abomey-Calavi (République du Bénin).

⁴ Attachée de recherche, UERS de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Parakou, BP 123 Parakou (République du Bénin).

*Auteur correspondant, E-mail: akponasimon@yahoo.fr

RESUME

La purification de la Protéine C-Réactive (CRP) a été faite par une procédure simplifiée de chromatographie d'échange ionique en deux phases en tampons différents suivie d'une étape finale de Blue Sepharose à partir des sérums inflammatoires. Cette procédure a permis d'obtenir la protéine pure en peu de temps et de préparer son immun sérum monospécifique pour le diagnostic et le suivi des situations pathologiques en néonatalogie, au cours de la réaction inflammatoire, ou d'autres pathologies de l'adulte pour lesquelles l'évaluation de cette protéine est d'une grande utilité.

© 2010 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: Chromatographie, immunoelectrophorèse, réaction inflammatoire.

INTRODUCTION

Décrite pour la première fois en 1930, la C-Reactive Protein (CRP) est aujourd'hui l'un des meilleurs marqueurs de la réaction inflammatoire (Mary et al., 2003 ; Okemefuna et al., 2010). Sa synthèse hépatique en réponse à un dommage tissulaire de type inflammatoire fait élever son taux plasmatique à plus de 100 fois la valeur sérique retrouvée chez l'individu normal (Bienvenu et al., 1985 ; Delmas et al., 2000). Un taux plasmatique de CRP élevé est corrélé avec une

affection bactérienne (Rasamoelisoa et al., 1999 ; Mary et al., 2003 ; Simon et al., 2004 ; Casey et al., 2008), un risque cardiovasculaire accru (Panichi et al., 2000 ; Schwedler et al., 2006), et une mortalité élevée en soins intensifs (Kuvandik et al., 2007). Cela explique le grand intérêt que l'on attache à l'isolement de cette protéine en vue de la production d'immun sérum monospécifique à des fins diagnostiques et pour le suivi pronostique (Alt et al., 1982). La purification de la CRP était réalisée par des méthodes

complexes et longues, associant de façon variable la chromatographie d'échange ionique, la chromatographie d'affinité, l'électrophorèse préparative, le comportement de la molécule en présence ou en absence du calcium (Ganrot et al., 1969 ; Johnson et Prellner, 1977 ; Kindmark et al., 1989). Dans ce travail, nous proposons une méthode simple, en deux étapes chromatographiques, pour la purification de la CRP à partir des sérums inflammatoires.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Le sérum utilisé est un pool provenant de prélèvements effectués chez des patients opérés pour appendicite aigüe et au troisième jour post opératoire, dans le Service de Chirurgie Viscérale du Centre National Hospitalier et Universitaire de Cotonou (Benin).

Le DE23, le Blue Sepharose CL-6B et le gel d'agarose sont des produits Pharmacia. Le TRIS, l'acide chlorhydrique, le chlorure de sodium, le polyéthylène glycol 1500 (carbowax), l'EDTA et le chlorure de calcium sont des produits purs pour analyse. Ils ont servi à la préparation des différents tampons A et B utilisés dans les étapes de la purification.

Méthodes

Le DE23, un échangeur d'ions cellulose, a servi à la première étape de séparation. Il a été gonflé et activé par un cycle acide-base intercalé de lavage à l'eau distillée avant d'être coulé dans une colonne de chromatographie Pharmacia (2,5 x 20 cm). Il a été équilibré en tampon (Tris-HCl 40 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4), tampon A, pendant une nuit à un débit de 20 ml/h.

Le sérum inflammatoire (25 ml) dialysé contre le tampon A a été déposé sur la colonne ainsi équilibrée et l'élution faite par le même tampon (20 ml/h) en collectant des fractions de 5 ml. Après l'élimination des fractions protéiques non fixées dans ces conditions, un

gradient continu de NaCl, 0 à 0,4 M, a permis de décrocher la fraction fixée sur la colonne. Cette fraction a été concentrée au carbowax et ramenée au volume initial de 25 ml puis dialysée contre le tampon (Tris-HCl 40 mM, EDTA 5 mM, pH 7,4), tampon B. La fraction ainsi traitée a subi alors un deuxième passage chromatographique sur le gel DE23 régénéré et équilibré dans le tampon B. Après élution de la fraction non fixée, les protéines fixées ont été décrochées en deux phases. La plupart des protéines contaminantes sont d'abord éliminées entre 0 et 0,4 M de NaCl. Ensuite, le reste des fractions fixées qui contenaient la totalité de la CRP de la prise d'essai a été élué entre 0,4 et 1 M.

A l'analyse (immunoélectrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%), cette fraction s'est révélée contenant de l'albumine qu'une étape de Blue Sepharose (deuxième étape chromatographique de séparation) en tampon (Tris-HCl 40 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4) a permis d'éliminer. La CRP a été enfin obtenue grâce à l'utilisation de 1,5 M NaCl (sur le gel Blue Sepharose) pour décrocher la presque totalité de la protéine à l'état pur.

La mise en évidence de protéines dans les fractions collectées a été faite par la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 280 nm.

Le contrôle de la pureté de la préparation a été réalisé au moyen de l'immunoélectrophorèse standard et classique selon Grabar et Williams, et l'immunoélectrophorèse en deux dimensions (Briand et Paolaggi, 1997) avec, dans le gel d'agarose à 0,8%, soit un immun sérum polyvalent, soit un anticorps monospécifique selon le cas. Enfin, un immun sérum anti-CRP a été préparé à partir de la protéine purifiée en utilisant le lapin fauve de race bourgogne comme animal de laboratoire.

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans le présent travail, la CRP a été purifiée à partir des sérums humains

inflammatoires par deux étapes chromatographiques, l'une d'échange ionique au DE23 et l'autre d'affinité au Blue Sepharose.

Le protocole que nous proposons dérive d'une analyse de plusieurs techniques en tenant compte des propriétés physico-chimiques de la molécule de CRP. Il permet de partir de 25 ml de sérum inflammatoire pour obtenir la CRP de pureté satisfaisante. La première étape de fractionnement du sérum inflammatoire sur le gel DE23 a été réalisée en deux phases chromatographiques. La première phase a permis d'obtenir le profil d'élution de la Figure 1. L'immunoélectrophorèse sur gel d'agarose réalisée sur les fractions recueillies, avec le sérum humain normal comme témoin, a permis de situer la CRP dans la fraction fixée sur le gel DE23 et décrochée par le gradient de NaCl 0-0,4 M (Figure 4).

La fraction décrochée par le gradient NaCl 0-0,4 M issue de la phase précédente a fait l'objet d'une deuxième phase chromatographique sur le gel DE23 dans un tampon différent (tampon B). En dehors de la fraction non fixée dans ces conditions, un gradient de NaCl de 0 à 0,4 M a permis d'éliminer l'ensemble des autres protéines fixées qui souillent la CRP. La protéine C-réactive qui, dans nos conditions de travail restait encore solidement fixée sur le gel a été décrochée par un gradient de NaCl de 0,4 à 1 M (Figure 2).

L'analyse de cette fraction par immunoélectrophorèse sur gel d'agarose présumée ne contenir que la CRP à l'état pure s'est révélée encore contaminée par de l'albumine (Figure 5). Cette situation nous a obligé à recourir à une dernière étape de chromatographie sur une colonne de Blue Sepharose en tampon (Tris-HCl 40 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4). Ces conditions ont modifié le comportement du gel vis-à-vis de l'albumine qui, au lieu d'être

retenu, est sortie presque en totalité. La CRP fixée sur le gel a été alors décrochée avec une molarité de 1,5 M en NaCl (Figures 3 et 6).

Les Figures 7 et 8 montrent une pureté satisfaisante de la préparation de la CRP selon notre protocole de travail.

L'immun sérum préparé à partir de cette protéine ainsi purifiée est monospécifique comme l'indique le contrôle immunoélectrophorétique sur gel d'agarose (Figure 9).

Les stratégies mises en œuvre pour la purification de la CRP dépendent des paramètres comme, entre autres, sa concentration, sa susceptibilité à être précipitée par les sels, son interaction avec certains sucres, son comportement physicochimique dans certains milieux (Fujise et al., 1992 ; Kindmark et al., 1989 ; Pruden et al., 1988 ; Sarikaputi et al., 1991 ; Takiguchi et al., 1990 ; Wu et al., 2003). Les anticorps monoclonaux n'ont pas été épargnés dans cette entreprise délicate de purification de la CRP. Comme le décrivent Yamamoto et al. (1992), les étapes de purification les plus couramment utilisées comportent une à deux phases de chromatographie d'échange ionique (Ganrot et al., 1969 ; Johnson et Prellner, 1977), une phase de chromatographie d'affinité associant, en fin de procédure, une électrophorèse préparative qui fait appel au comportement de la molécule en présence ou en absence du calcium dans le tampon de séparation (Kindmark et al., 1989 ; Parra et al., 2005). Toutes ces méthodes sont longues, lourdes et onéreuses. Le protocole que nous présentons dans ce travail part d'une faible quantité de sérum inflammatoire, 25 ml, passe par une étape d'échange ionique en deux temps avec deux systèmes tampon différents et une étape de Blue Sepharose pour obtenir la molécule de CRP à l'état pur. Il épargne des techniques d'immunoaffinité et d'électrophorèse préparative indispensables dans les différents protocoles conventionnels. Enfin, il

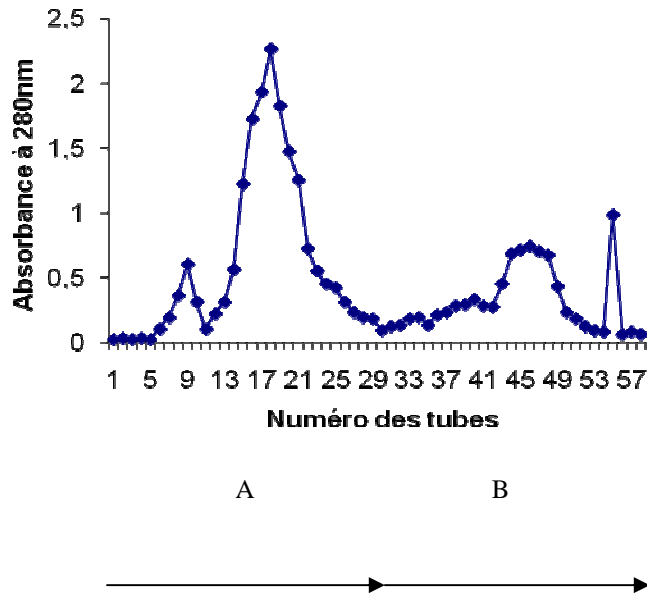


Figure 1: Profil d'éluion des protéines de la fraction inflammatoire sur le gel DE23 (1^{er} passage). A-Tampon Tris-HCl 40 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4 ; B- Gradient NaCl 0-0,4 M.

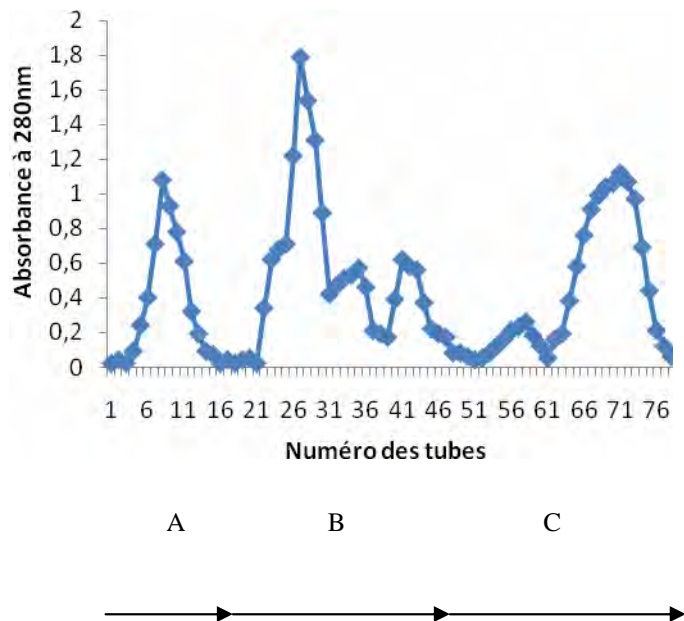


Figure 2: Profil d'éluion des protéines de la fraction inflammatoire sur le gel DE23 (2^{ème} passage). A-Tampon Tris-HCl 40 mM, EDTA 5 mM, pH 7,4 ; B- Gradient NaCl 0-0,4 M ; C- Gradient NaCl 0,4-1 M.

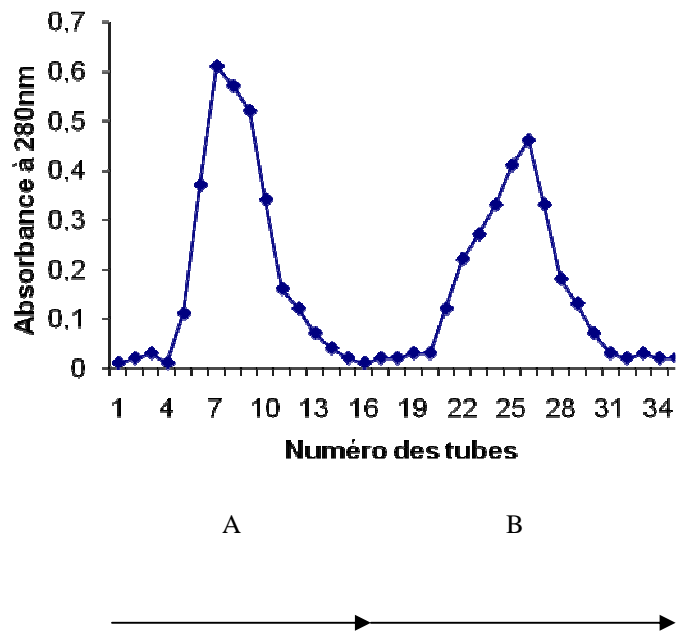


Figure 3 : Profil d'élution des protéines de la fraction inflammatoire sur le gel Blue separose. A-Tampon Tris-HCl 40 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4 ; B- Tampon Tris-HCl 40 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,4.

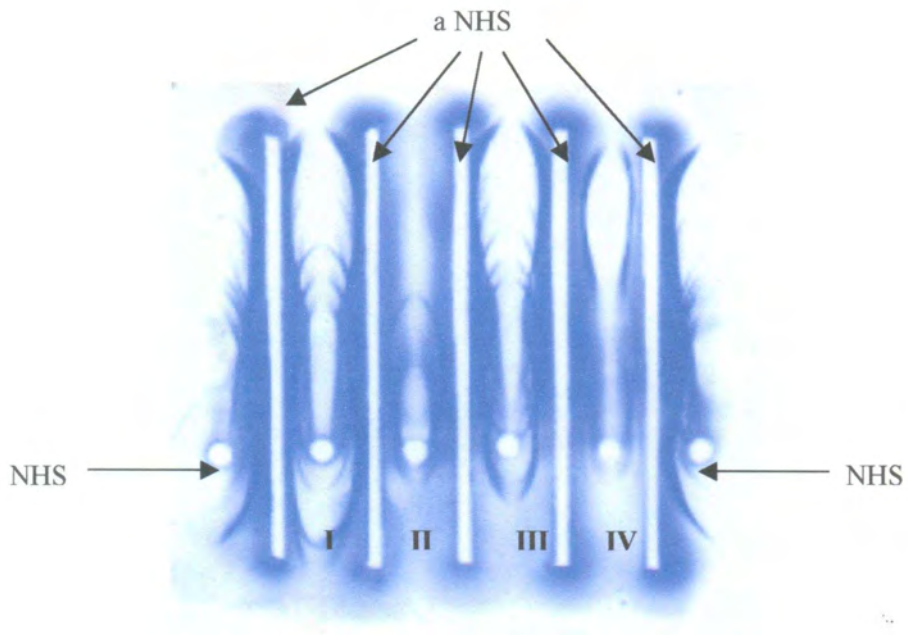


Figure 4 : Immunoélectrophorégramme sur gel d'agarose des fractions obtenues lors du 1^{er} passage sur le gel DE23. I- Fraction inflammatoire déposée sur le gel DE23 ; II- Fraction non fixée sur le gel DE23 ; III et IV- Fraction décrochée avec un gradient NaCl 0-0,4 M. NHS : Sérum humain normal ; aNHS : anticorps anti-NHS.

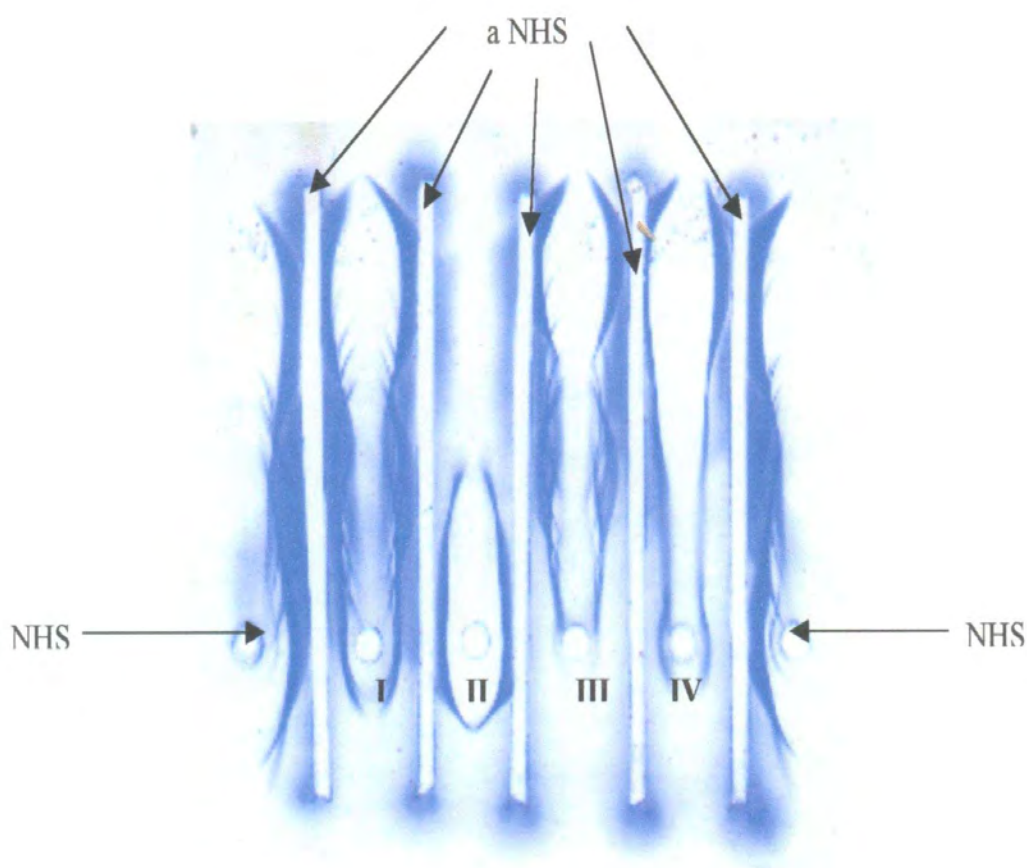


Figure 5 : Immunoélectrophorégramme sur gel d'agarose des fractions obtenues lors du 2^{ème} passage sur le gel DE23.

I- Fraction décrochée par NaCl 0-0,4 M lors du 1^{er} passage sur le gel DE23 ; II- Fraction non fixée sur le gel DE23 ; III- Fraction décrochée avec un gradient NaCl 0-0,4 M ; IV- Fraction décrochée avec un gradient NaCl 0,4-1 M.
NHS : Sérum humain normal ; aNHS : anticorps anti-NHS.

est rapide et pratique pour obtenir la CRP dont le rôle biologique très important n'est pas encore totalement exploré. La protéine C-réactive (CRP) est une protéine d'une grande importance en biologie clinique. De ce fait, purifier la CRP et disposer de son immun sérum monospécifique devient une entreprise utile en biologie clinique à des fins diagnostiques et pour le suivi. En effet, en association avec l'orosomucoïde, la CRP permet de faire le diagnostic du début de l'infection puis d'affirmer la guérison lorsque

le taux sérique des deux protéines est revenu à la normale.

Bien que nous n'ayons pas pris en compte la question du rendement au cours de la purification, la technique décrite a permis d'obtenir la CRP à l'état pur. Cette préparation injectée au lapin fauve de race bourgogne permet d'obtenir un immun sérum anti-CRP monospécifique utilisable en laboratoire pour la mise au point de diverses méthodes immunochimiques.

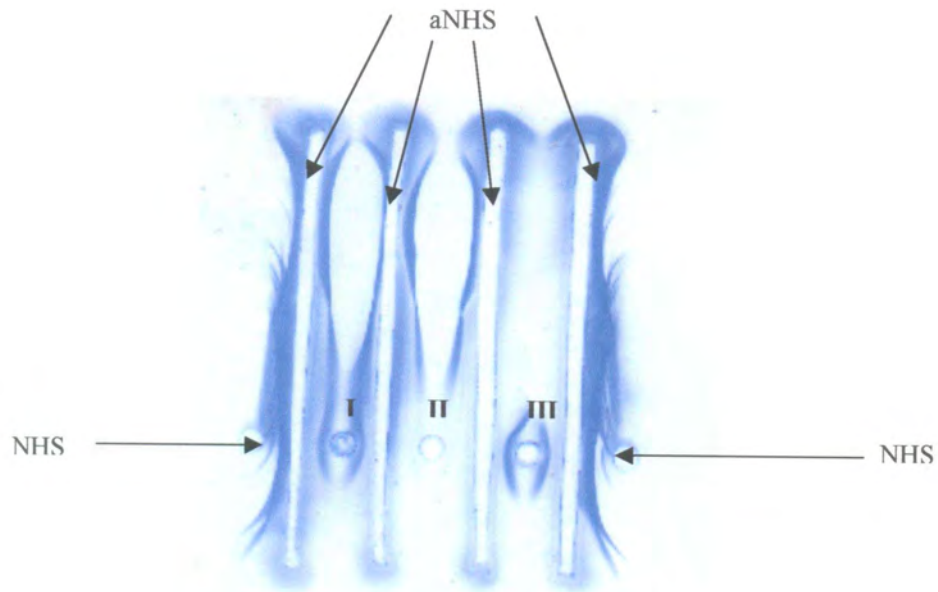


Figure 6 : Immunoélectrophorégramme sur gel d'agarose des fractions obtenues lors du passage sur le gel Blue Sepharose.

I- Fraction décrochée avec un gradient NaCl 0,4-1 M sur le gel DE23 ; II- Fraction décrochée avec NaCl 0,5 M sur le gel Blue Sepharose ; III- Fraction décrochée avec NaCl 1,5 M sur le gel Blue Sepharose.
NHS : Sérum humain normal ; aNHS : anticorps anti-NHS.

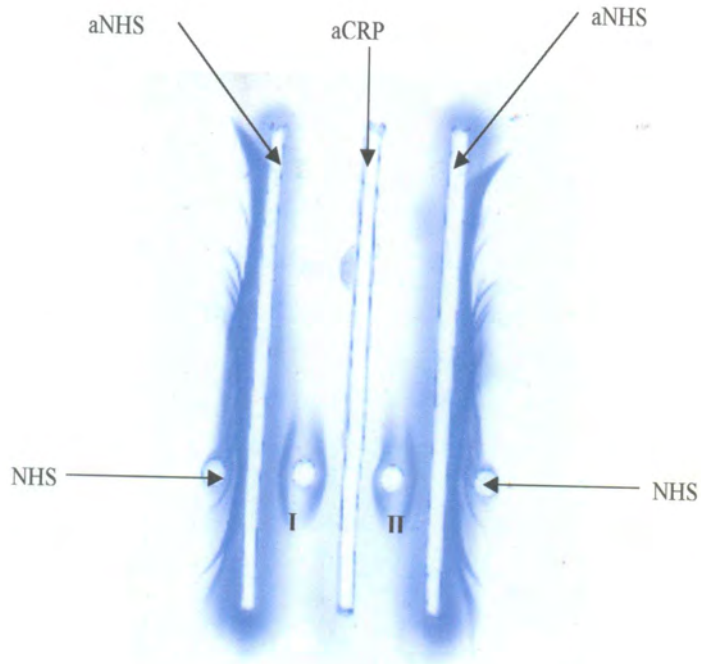


Figure 7 : Immunoélectrophorégramme sur gel d'agarose de la fraction décrochée avec NaCl 1,5 M sur le gel Blue Sepharose.

I et II- Fraction décrochée avec NaCl 1,5 M sur le gel Blue Sepharose.
NHS : Sérum humain normal ; aNHS : anticorps anti-NHS ; aCRP : anticorps anti-CRP du commerce.

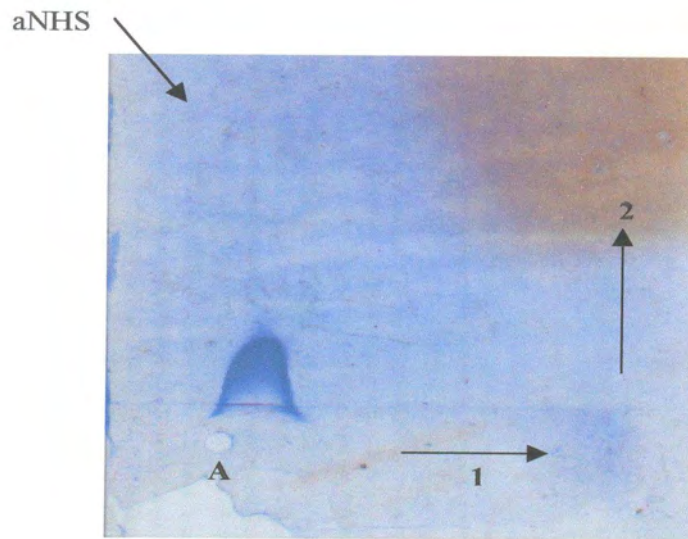


Figure 8 : Immunoélectrophorégramme double dimension sur gel d'agarose de la fraction décrochée avec NaCl 1,5 M sur le gel Blue Sepharose.
1- 1^{er} sens de migration électrophorétique ; 2- 2^{ème} sens de migration électrophorétique.
aNHS : anticorps anti-NHS.

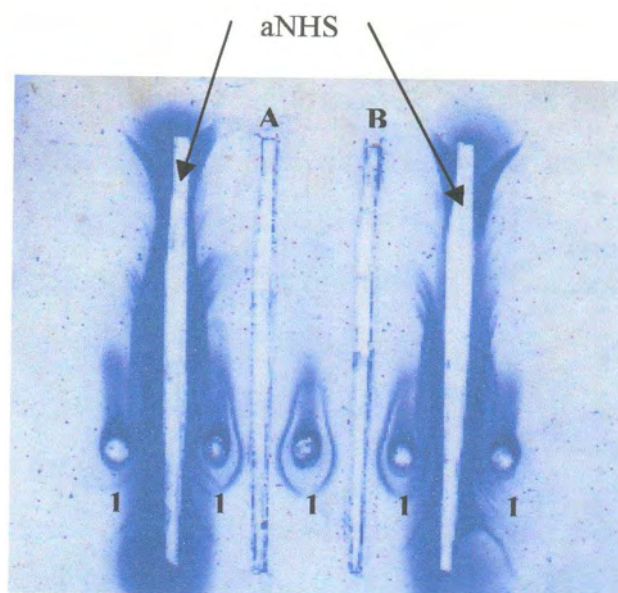


Figure 9 : Immunoélectrophorégramme de contrôle de pureté de la CRP contenue dans la fraction décrochée avec NaCl 1,5 M sur le gel Blue Sepharose.
aNHS : anticorps anti-NHS.
A- Anticorps anti-CRP de commerce.
B- Anticorps anti-CRP préparés chez le lapin à partir de la CRP purifiée.

RÉFÉRENCES

- Alt R, Willard D, Messer J, Metais P, Goester C, Mark JJ. 1982. Intérêt de la C-réactive protéine dans les infections bactériennes néonatales. *Arch. Fr. Pédiatr.*, **39**: 811-813.
- Bienvenu J, Bienvenu F, Baltassat P. 1985. Profil protéique du nouveau-né : intérêt particulier des protéines de l'inflammation. *Le Pharmacien Biologiste*, **19**(156) : 101/31-105/35.
- Briand P, Paolaggi F. 1997. Méthodes électrophorétiques et électrochimiques. In *Appareils et Méthodes en Biochimie et Biologie Moléculaire*, Kamoun P (ed). Edition Flammarion Médecine-Science : Paris ; 213-230.
- Casey R, Newcombe J, McFadden JJ, Bodman-Smith KB. 2008. The acute phase reactant C-reactive protein binds to phosphorylcholine-expressing *Neisseria meningitidis* and increases uptake by human phagocytes. *Infection and Immunity*, **76**(3): 1298-1304.
- Delmas J, Monneret G, Lapillonne A, Basson E, Isaac C, Bienvenu F, Putet G, Bienvenu J. 2000. Cinétiques de la prolactine et de la C-réactive protéine dans les infections néonatales à streptocoque du groupe B. *Annales de Biologie Clinique*, **58**(2): 208-211.
- Fujise H, Takanami H, Yamamoto M, Ohta I, Yamamoto S, Fukase T, Naiki M, Akihama S, Ogawa E, Takahashi R. 1992. Simple isolation of canine C-reactive protein (CRP) by phosphorylcholine (PC) affinity chromatography. *J. Vet. Med. Sci.*, **54**(1): 165-167.
- Ganrot PO, Kindmark CO. 1969. A simple two-step procedure for isolation of C-reactive protein. *Biochem Biophys Acta*, **194**: 443-448.
- Johnson U, Prellner K. 1977. Purification of C-reactive protein on DEAE-Cellulose by a simple two-step procedure utilizing the calcium dependency of the protein. *Biochemica and Biophysica Acta*, **495**: 349-353.
- Kindmark C-O L, Williams JC. 1989. Purification of human C-reactive protein by barium sulfate and preparative agarose electrophoresis. *PMIS*, **97**: 891-896.
- Kuvandik G, Ucar E, Borazan A, Aydemir S, Ilikhan S, Sekitmez N, Duru M, Ozer B, Kaya H. 2007. Markers of inflammation as determinants of mortality in intensive care unit patients. *Advances in Therapy*, **24**(5): 1078-1084.
- Mary R, Veinberg F, Couderc R. 2003. Les méningites aiguës, protéines inflammatoires et procalcitonine. *Annales de Biologie Clinique*, **61**(2): 127-137.
- Okemefuna AI, Stach L, Rana S, Ziai Buetas AJ, Gor J, Perkins ST. 2010. C-reactive protein exists in NaCl concentration-dependant pentamer-decamer equilibrium in physiological buffer. *J.B.C.*, **285**: 1041-1052.
- Panichi V, Migliori M, De Pietro S, Taccola D, Andreini B, Metelli MR, Giovannini L, Palla R. 2000. The link of biocompatibility to cytokine production. *Kidney International*, **58**: 96-103.
- Parra MD, Mika Tuomola DVM, Cabezas-Herrera J, Ceron JJ. 2005. Use of a time resolve immunofluorimetric assay for determination of canine C-reactive protein concentrations in whole blood. *Am. J. Vet. Res.*, **66**: 62-66.
- Pruden JD, Connolly M.K, Stecher JV. 1988. Single-step purification of rat C-reactive protein and generation of monospecific C-reactive protein antibody. *J. Chromatography*, **437**: 399-410.
- Rasamoelisoa JM, Tovone XG, Andriamandy RCL, Rasamoela NW, Rasamindrakotroka A. 1999. Intérêt de la C-réactive protéine (CRP) dans les affections fébriles de l'enfant. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, **65**(2):113-116.
- Sarikaputi M, Morimatsu M, Syuto B, Saito M, Naiki M. 1991. A new purification procedure for bovine C-reactive protein

- and serum amyloid P component. *J. Biochem.*, **23**(10): 1137-1142.
- Schwedler SB, Filep JG, Galle J, Wanner C, Potempa LA. 2006. C-reactive protein: a family of proteins to regulate cardiovascular function. *Am. J. Kidney Dis.*, **47**: 212-222.
- Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Loui P, Lacroix J. 2004. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta analysis. *Clinical Infectious Diseases*, **39**: 206-217.
- Takiguchi M, Fujinaga T, Naiki M, Mizuno S, Otomo K. 1990. Isolation, characterization and quantitative analysis of C-reactive protein from horses. *Am. J. Vet. Res.*, **51**(8): 1215-1220.
- Wu Y, Xang Hw, Ji SR, Sui S. 2003. Two dimensional crystallization of rabbit C-reactive protein monomeric subunit. *Acta Cryst.*, **59**: 922-926.
- Yamamoto S, Tagata K, Nagahata H, Ishikawa Y, Morimatsu M, Naiki M. 1992. Isolation of canine C-reactive protein and characterization of its properties. *Vet. Immunol. Immunopathology*, **30**: 329-339.