



HAL
open science

La chromatographie de partage centrifuge en mode échange d'ions : un outil novateur pour la capture de peptide d'intérêts au sein d'un hydrolysate de RuBisCO.

Leslie Boudesocque

► To cite this version:

Leslie Boudesocque. La chromatographie de partage centrifuge en mode échange d'ions : un outil novateur pour la capture de peptide d'intérêts au sein d'un hydrolysate de RuBisCO.. Colloque Adebio-tech-SFGP "Peptide issus des procédés d'hydrolyse : filières industrielles", Adebio-tech. Romainville, FRA., Oct 2012, Romainville, France. 17 diapositives. hal-02805544

HAL Id: hal-02805544

<https://hal.inrae.fr/hal-02805544>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

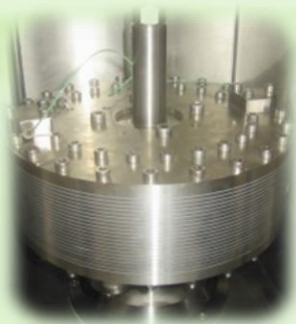
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*La Chromatographie de Partage Centrifuge en
mode Echange d'Ions :
un outil novateur pour la capture de peptides
d'intérêt au sein d'un hydrolysate de RuBisCO*

Leslie Boudesocque

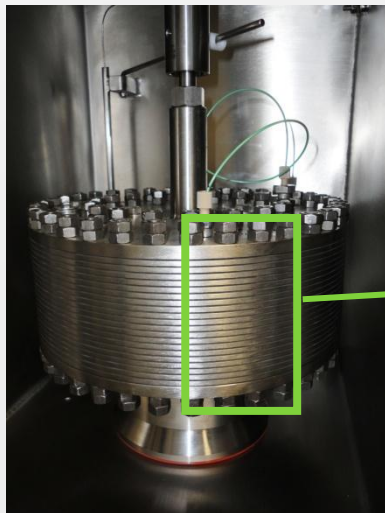
Equipe RICM, UMR INRA 1282 Infectiologie et Santé Publique

Université François-Rabelais Tours



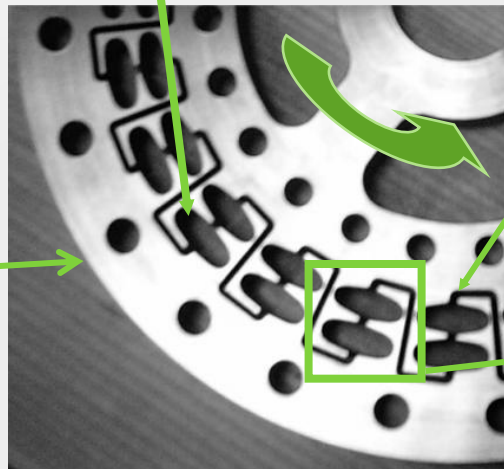
La Chromatographie de Partage Centrifuge

- La chromatographie de partage centrifuge (CPC)
 - ↪ Technique chromatographique **liquide/liquide**
 - ↪ Différence de **partage** entre 2 phases liquides **non miscibles** d'un même système biphasique de solvants



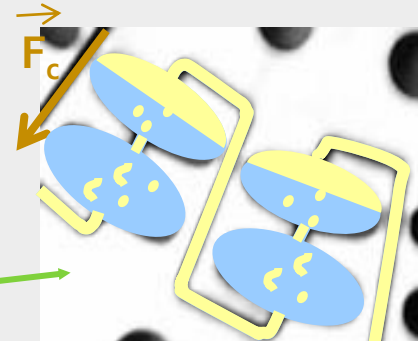
FCPC Kromaton
Colonne 200ml

Cellules de Partage



Conduits capillaires

Phase supérieure
Phase inférieure



Mode Ascendant

Modes de développement

- Le mode élution

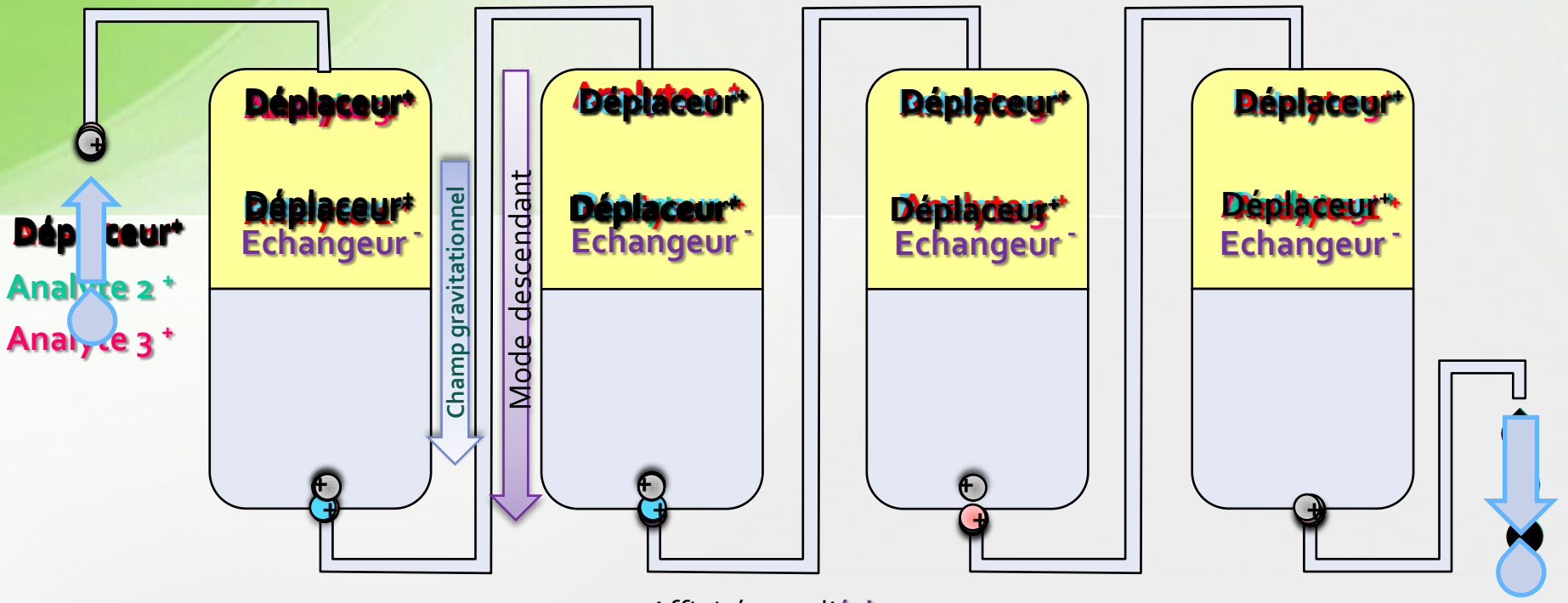
- Isocratique
- Gradient
- (Multi)DualMode(s)...

Toutes molécules :
composés de synthèse,
métabolites primaires et
secondaires...

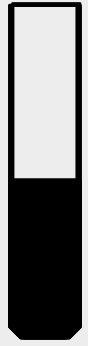
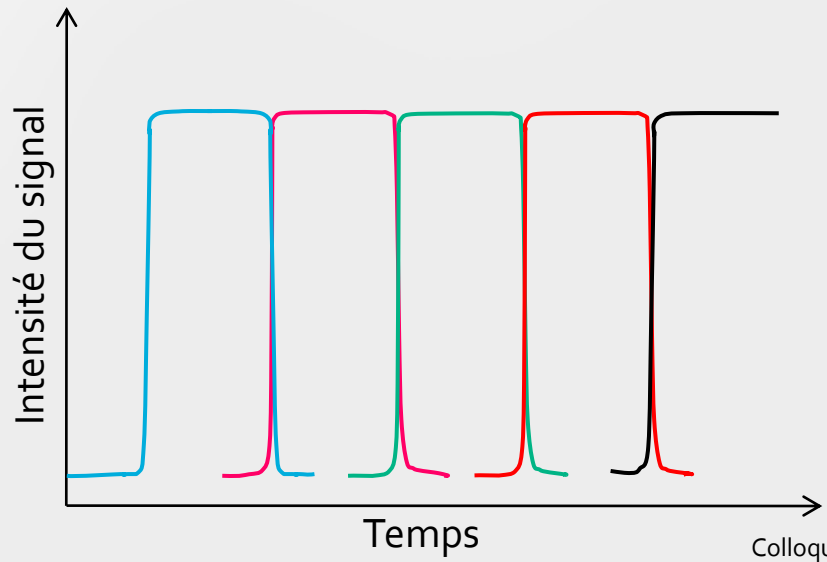
- Le mode déplacement

- pH-zone refining
- Echange d'ions

Molécules ionisables ou ionisées :
Alcaloïdes, peptides...



Affinité pour l'échangeur⁻
 Reteneur⁺ < Analyte 3⁺ < Analyte 2⁺ < Analyte 1⁺ < Déplaceur⁺

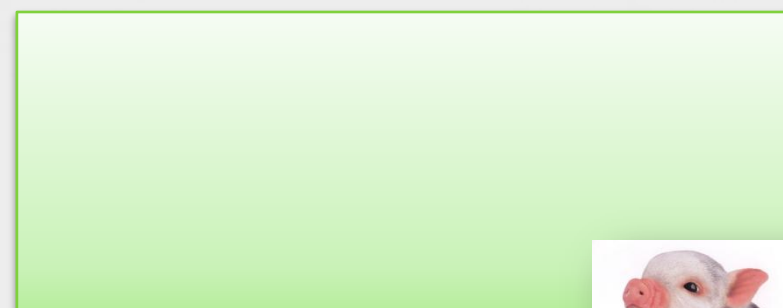
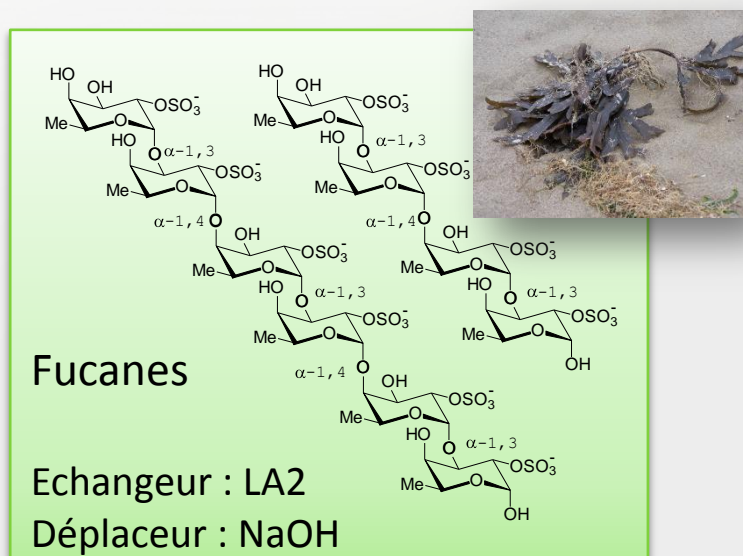


Echange d'ions faible

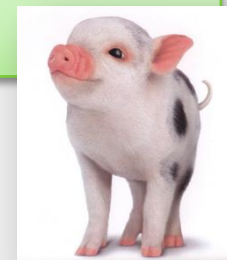
- Décrit pour la première fois par Chevolut et *al.*
- Echangeur : acide ou base **organique faible**
- Déplaceur : base ou acide fort



Neutralisation
de l'échangeur



Héparines
Echangeur : LA2
Déplaceur : NaOH



Chevolut, L.; Collic-Jouault, S.; Foucault, A.; Ratiskol, J.; Sinquin, C., J. Chrom. B **1998**, 706 (1), 43-54.

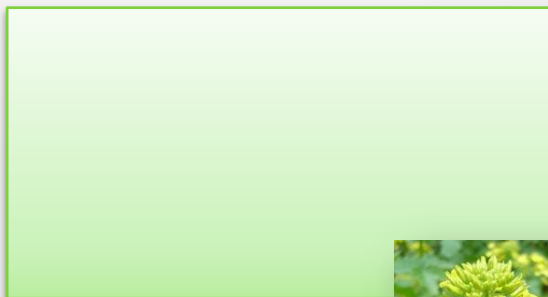
Intes, O.; Renault, J.-H.; Sinquin, C.; Zèches-Hanrot, M.; Nuzillard, J.-M., J. Chrom. A **2001**, 918 (1), 47-57.

Echange d'ions fort

- Développé à l'ICMR
- Echangeur est une espèce **organique ionique**:
 - ↪ Aliquat 336[®], BnzNCl, AOT...
- Déplaceur est un **cation** ou un **anion**: I^- , R_4N^+ ...

Composés anioniques

Glucosinolates

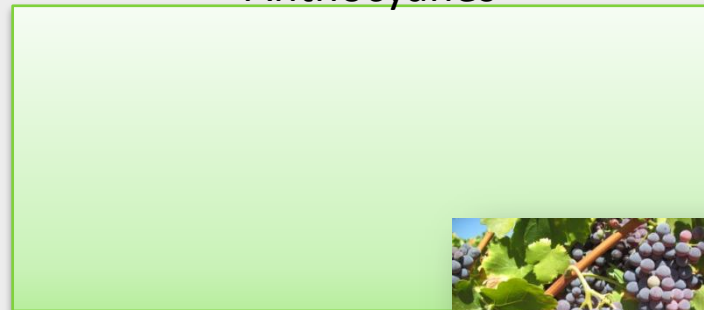


Echangeur : Aliquat 336
Déplaceur : NaI



Composés cationiques

Anthocyanes



Echangeur : AOT
Déplaceur: **TBAHS**

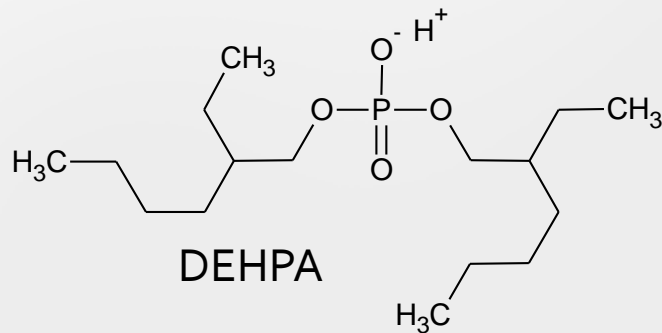


Maciuk, A.; Toribio, A.; Zeches-Hanrot, M.; Nuzillard, J.-M.; Renault, J.-H.; Georgiev, M. I.; Ilieva, M. P., *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **2005**, *28* (12/13), 1947-1957.

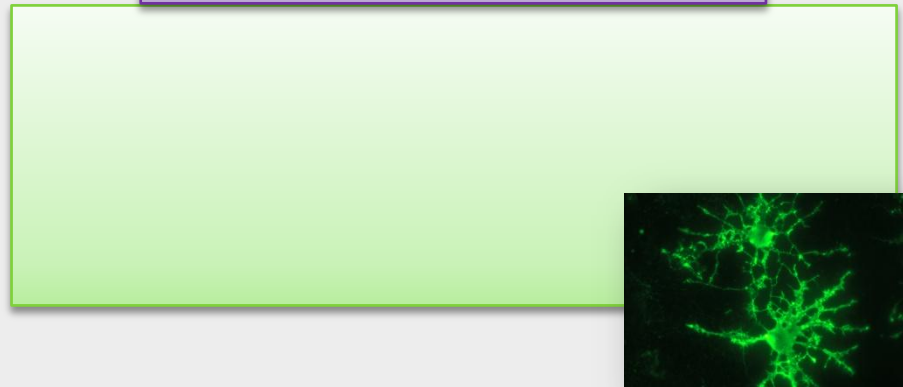
Toribio, A.; Delannay, E.; Nuzillard, J.-M.; Zèches-Hanrot, M.; Richard, B.; Waffo-Tégou, P.; Renault, J.-H., In *Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wine*, Jeandet, P.; Clément, C.; Conreux, Alexandra, Eds. Editions Tec et Doc: Paris, **2007**; pp 247-252.

Echange d'ions mixte

- Echangeur **anionique acide faible** : DEHPA
- Utilisation séquentielle de **2 déplaceurs**
 - ↪ un "fort" : Ca^{2+}
 - ↪ puis "faible" : H^+ (*neutralisation de l'échangeur*)



Polissage du Dirucotide 17 AA



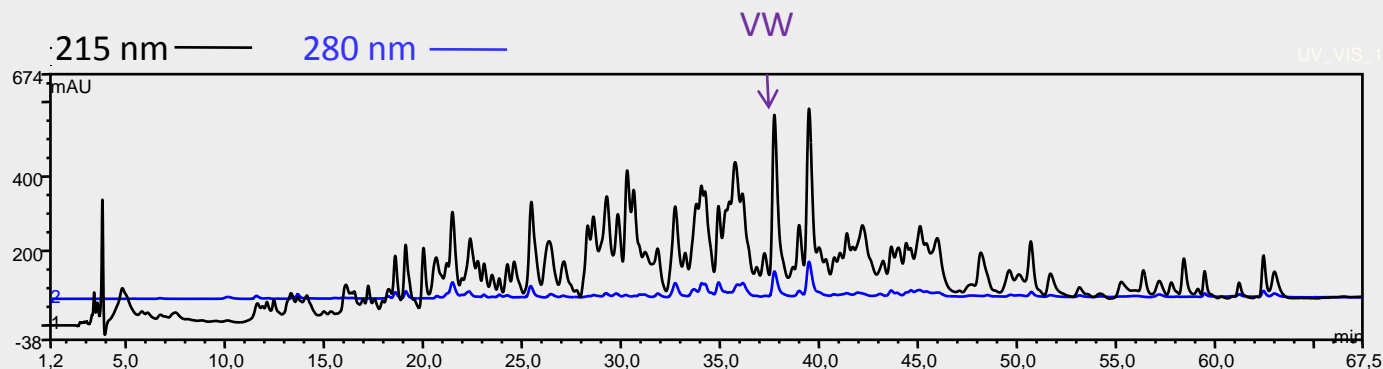
L. Boudesocque, P. Lameiras, N. Amarouche, M. Giraud, F. Quattrini, J. McGarrity, J.-M. Nuzillard, J.-H. Renault, **Ion-exchange centrifugal partition chromatography for peptide purification**, J. Chromatogr. A, 2012, doi:10.1016/j.chroma.2012.03.010

L. Boudesocque, L. Forni, M. Giraud, J. Mc Garrity, J.H. Renault; **Peptide Purification of amphoteric products, or of products liable to be converted into amphoteric products**, PCT Int. Appl. (2011), WO 2011157803 A1 20111222



Hydrolysats de RuBisCo

- Concentré de protéine blanche de luzerne
 - ↪ Hydrolyse par la Delvolase® (protéases de *Bacillus licheniformis*)
- Hydrolysats contenant environ **95 % de peptides** de poids moléculaire moyen de **600 Da**
 - ↪ soit une centaine de peptides différents
- Le **dipeptide VW (0,3 %)** est porteur d'activité biologique
 - ↪ Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine



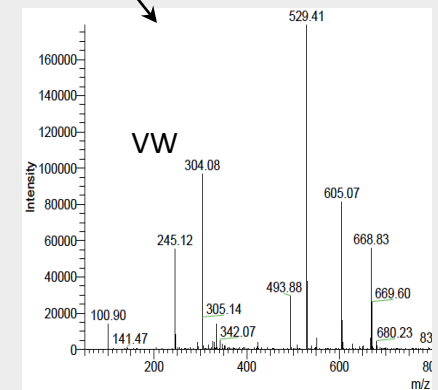
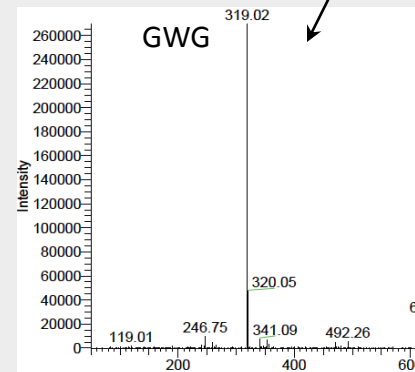
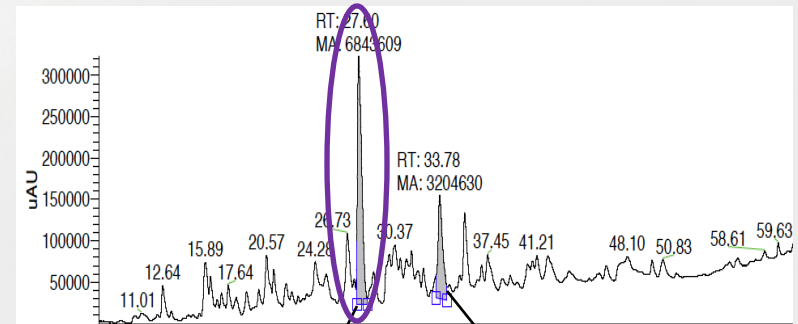
Colonne Luna C18 (250 x 4,6 id, 5 um) Phenomenex, Phase Mobile : A : eau 0.1 % TFA; B : acétonitrile 0.09% TFA. Gradient : 100 % A à 28% B en 50 min, puis 47% B en 70 min puis 100% B. Débit: 1 mL/min.

But du projet

- Utiliser la CPC pour enrichir l'extrait en peptide VW
 - ↪ développement d'un produit nutraceutique?
- Nécessite un procédé de grande sélectivité et modularité
 - ↪ Mode échange d'ions Mixte
- Première étape :
 - ↪ développement d'une méthode analytique dédiée

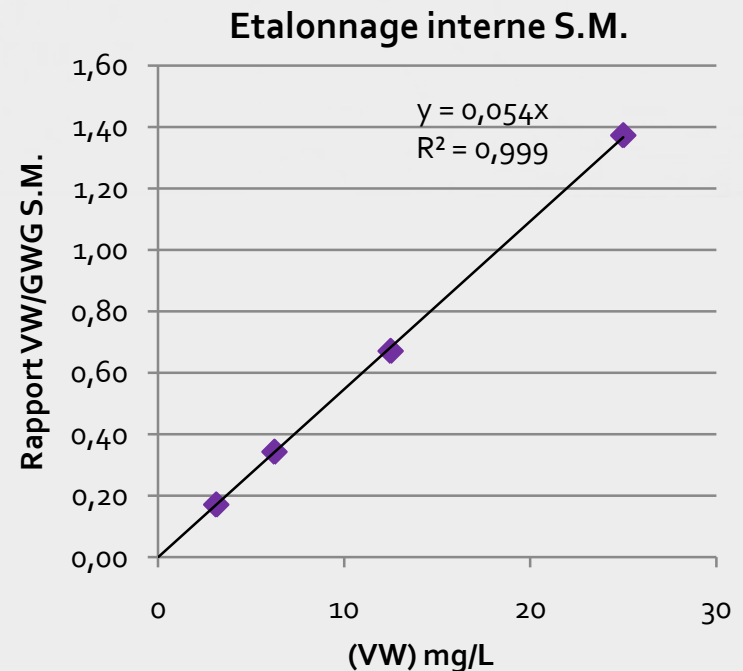
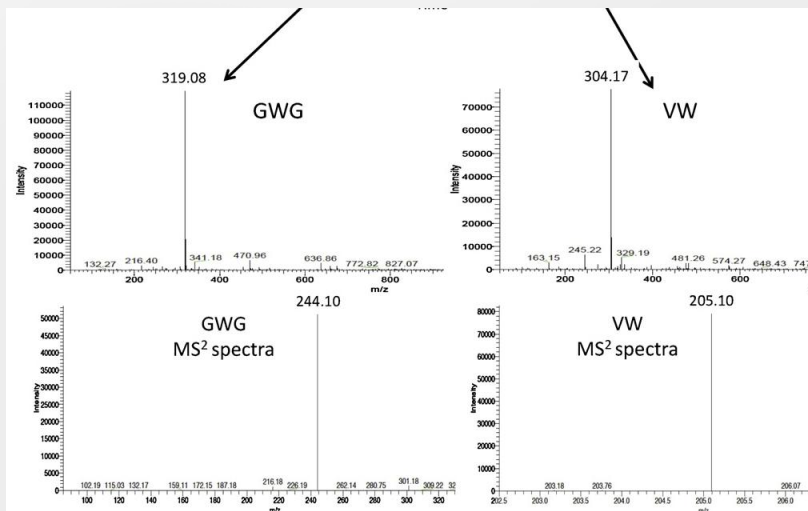
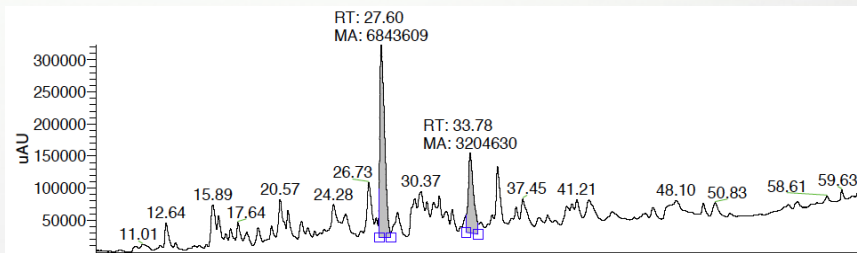
Développement d'une Méthode LC-MS/MS

- Pour quantifier le VW
 - ↳ CLHP insuffisante seule : plusieurs peptides co-élus sous le même pic
 - ↳ Solution utiliser la technologie MS/MS
- Utilisation d'un étalon interne
 - ↳ Peptide GWG
 - même facteur de réponse
 - Absent de l'hydrolysat



Développement d'une Méthode LC-MS/MS

- Etalonnage de la méthode
 - ↳ utilise le rapport VW/GWG du signal MS²



Application aux fractions issues du procédé CPC

Utilisation du procédé par MIXCPC

- Procédé très modulable :
 - ↪ 2 déplaceurs utilisés en séquentiel
 - ↪ adaptation de l'état d'ionisation de l'échangeur : DEHPA

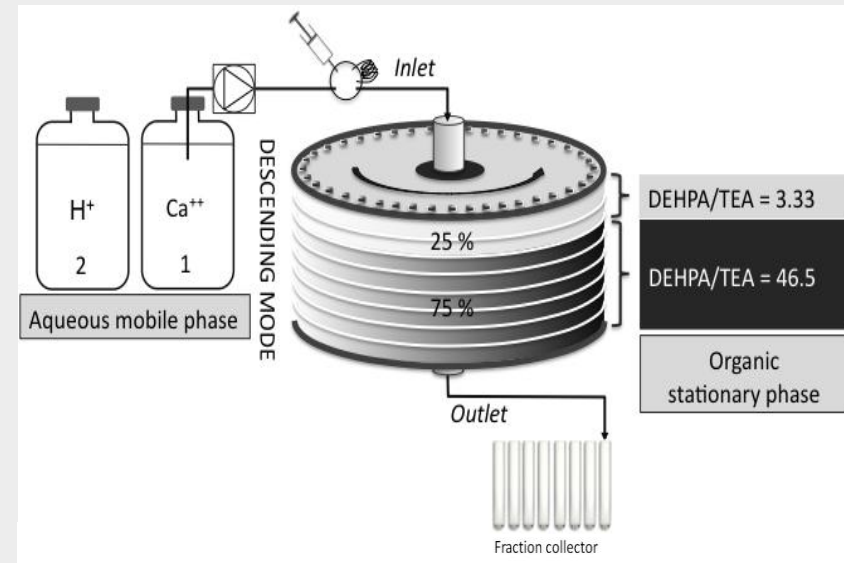
25 % en tête de colonne avec un ratio DEHPA/TEA faible

Séparation des peptides apolaires

Comme le VW

75% restant avec un ratio plus élevé

Rétention des peptides les plus polaires



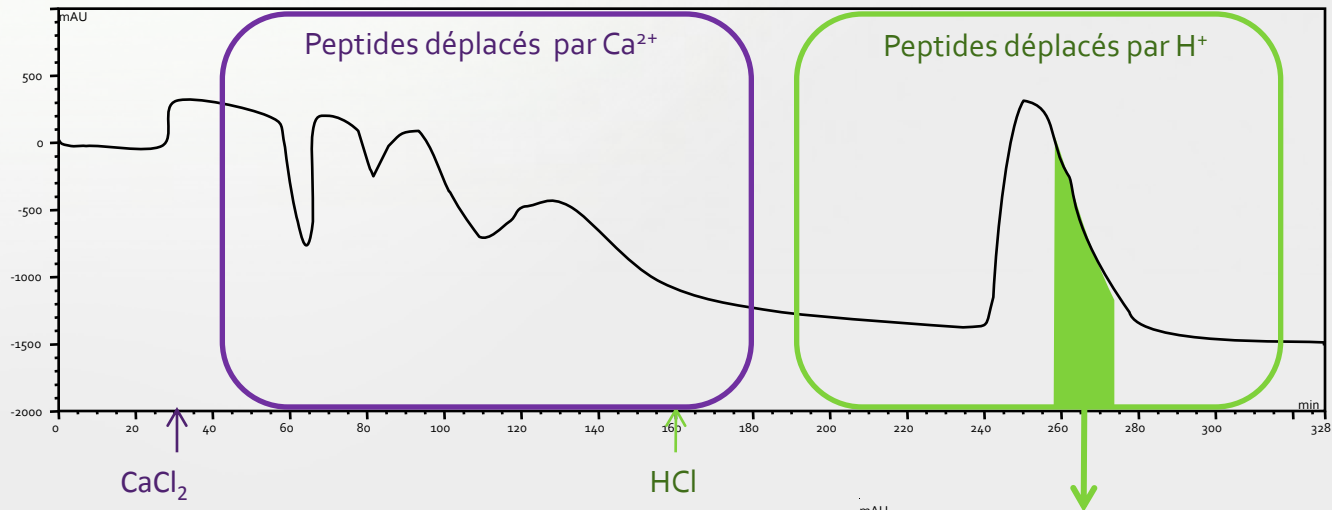
Optimisation de la quantité d'échangeur

- Ratio échangeur/analyte est un paramètre clé
 - ↪ trop faible : extraction non optimale
 - ↪ trop important : plus de compétition entre analytes
perte de résolution
- Trois valeurs testées

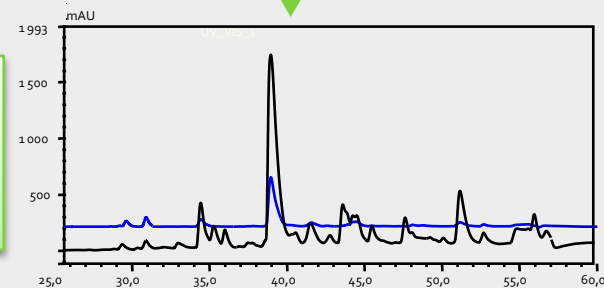
Expérience	Exp.1	Exp. 2	Exp. 3
Quantité injectée	254,6 mg	252,9 mg	254,9 mg
Ratio DEHPA/peptides	5	15	42
[CaCl ₂]	1,06 mM	3,18 mM	9 mM
[HCl]	2 mM	7,5 mM	30,7 mM
Teneur en VW de la fraction en % (m/m)	2,7	11	6,6
Facteur de Concentration	10,2	41,3	24,8
Rendement en VW (%)	97	97	96

Application du MIXCPC

Système MtBE/n-BuOH/CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v), mode descendant, DEHPA 33,6 mM TEA 30% et 2,15%, CaCl₂ 3,18 mM, HCl 7,5 mM, débit 2 ml/min, 1200 rpm, UV 215 nm



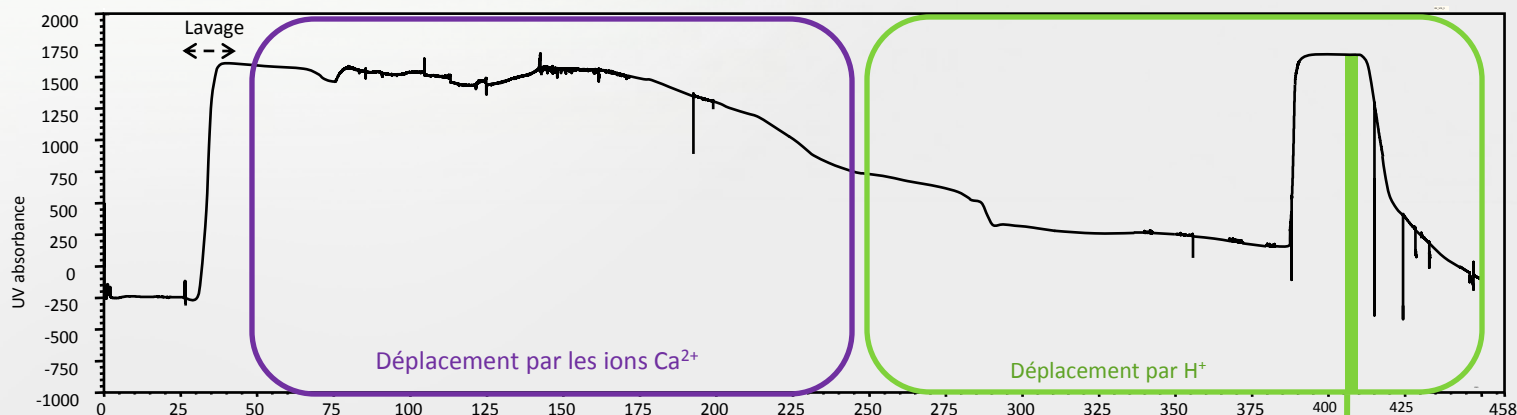
11 % de VW
Facteur d'enrichissement : **41**
Rendement **97 %** en VW



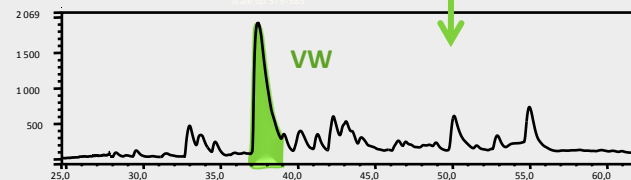
Montée en échelle du procédé

- Augmentation de la quantité injectée d'un facteur 4 (1 g d'hydrolysats)

Systeme MtBE/n-BuOH/CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v), mode descendant, DEHPA 134 mM TEA 30% et 2,15%, CaCl₂ 12,8 mM, HCl 30,1 mM, débit 2 ml/min, 1200 rpm, UV 215 nm



10,9 % de VW
Facteur d'enrichissement : **41**
Rendement **97 %** en VW



Pas d'influence sur l'efficacité
Procédé robuste
Augmentation de la durée du batch : productivité diminuée

Conclusion et perspectives

- Preuve de l'intérêt du procédé par MIXCPC
 - ↪ Capture de peptides au sein d'extraits complexes
- Procédé sélectif permettant d'obtenir
 - ↪ un facteur d'enrichissement de 40 en une étape
 - ↪ avec un rendement en peptide d'intérêt > 95 %
- Productivité à améliorer
 - ↪ Investigation du FCPE extracteur
 - ↪ Débits de travail augmentés

Remerciements

Equipe Isolement et Structures
Institut de Chimie Moléculaire de
Reims

Jean Hugues Renault
Catherine Lavaud

Laboratoire Réactions et Génie des
Procédés

Romain Kapel
Ivan Marc



Lonza

