

Séparation de fragments d'ADN : approche par des techniques chromatographiques hors équilibre

Yves Claude Guillaume¹ maître de conférences-HDR, Éric Peyrin² maître de conférences-HDR,
Christiane Guinchard³ professeur

Summary : *DNA fragment separation by non equilibrium chromatographic procedures*

Slalom chromatography (SC) and hydrodynamic chromatography (HDC) are the only chromatographic procedures for the separation of polymers which are based on a non equilibrium principle. This paper describes the retention of circular and linear double stranded DNA molecules with this chromatographic mode. A new mathematical model and an interconnection between the SC and HDC mechanisms are also presented. This concept of non equilibrium chromatography can provide novel and promising basis in the area of the macromolecule separation science.

Mots clés : *Chromatographie, ADN, slalom, hydrodynamique, reptation.*

Key-words : *Chromatography, DNA, slalom, hydrodynamic, reptation.*

Steven Spielberg, dans son film culte E.T. paru en 1982, présente à un moment donné son héros extraterrestre étendu sur une table d'opération. Un scientifique apparaît alors dans le local où il se trouve et s'écrie : « *Il a de l'ADN* ». Ainsi, cette molécule est présentée comme nécessaire chez tous les êtres vivants quelle que soit leur planète d'origine. A l'instar de l'âme pour le christianisme, l'ADN a acquis un statut culturel qui doit permettre à l'homme la résolution de ses problèmes existentiels. La macromolécule d'ADN contenue dans les chromosomes encore

appelée génome a d'ailleurs été dans les années 1990 dénommée la bible, le livre de l'homme et le Saint-Graal, conférant à cette structure moléculaire l'idée d'un texte sacré capable d'expliquer les grands mystères de la vie. Le président des États-Unis d'Amérique Bill Clinton ne déclarait-il pas le 29 février dernier : « *Dans deux mois, j'aurai une annonce qui sera l'un des plus grands honneurs de ma vie. Nous annoncerons que le génome humain a été complètement séquencé* ».

L'étude des méthodes permettant l'analyse du génome de divers systèmes biologiques est donc en plein essor. C'est en 1995 que la première séquence complète du génome d'un organisme vivant, celle de la bactérie *Haemophilus Influenzae*, a été déterminée. L'électrophorèse est la principale technique qui permet de séparer des fragments d'ADN. L'électrophorèse sur gel d'agarose sert par exemple à séparer les fragments de chromosomes coupés par des enzymes de restriction. L'électrophorèse capillaire s'est également révélée être une méthode de choix. Elle permet une étude dans des conditions douces,

proches des conditions biologiques offrant une rapidité d'analyse et des résolutions efficaces. C'est une technique séparative basée sur la différence de vitesse de migration de fragments d'ADN sous l'action d'un champ électrique. L'utilisation de capillaires de faibles diamètres internes ($\leq 10 \mu\text{m}$) a permis l'utilisation de champs électriques élevés ($\leq 1\,000 \text{ V/cm}$). La technique s'est alors miniaturisée et possède un fort pouvoir résolutif. L'utilisation de l'électrophorèse en champ pulsé a permis des séparations jusqu'à des fragments de 40 000 paires de bases.

A côté de ces techniques séparatives électrophorétiques, celles chromatographiques sont également utilisées. Les modes les plus conventionnels sont basés sur la différence d'affinité des fragments d'ADN entre une phase fixe (phase stationnaire) et une phase mobile [1-8]. En chromatographie sur colonne, la phase stationnaire remplissant la colonne est un liquide imprégnant une gaine au contact d'une greffe. Dans le cas de la chromatographie d'échange d'ions, le mécanisme de

¹ Équipe de chimie thérapeutique, Laboratoire de chimie analytique, Faculté de médecine pharmacie, place Saint-Jacques, 25030 Besançon Cedex. Tél. : 03.81.66.55.46. Fax : 03.81.66.56.55. E-mail : yves.guillaume@univ-fcomte.fr

² Laboratoire de chimie analytique, Faculté de pharmacie, Domaine de La Merci, 38700 La Tronche Cedex. Tél. : 04.76.63.71.00 (poste 83-86). Fax : 04.76.51.86.67. E-mail : eric.peyrin@ujf-grenoble.fr

³ Équipe de chimie thérapeutique, Laboratoire de chimie analytique, Faculté de médecine pharmacie, place Saint-Jacques, 25030 Besançon Cedex. Tél. : 03.81.66.55.44 (26). Fax : 03.81.66.56.55. E-mail : christiane.guinchard@univ-fcomte.fr

fixation des fragments d'ADN est fonction des interactions électrostatiques entre les groupements phosphates des fragments d'ADN et les groupes cationiques de la phase stationnaire. Dans le cas de la technique chromatographique d'interaction hydrophobe, la rétention d'un fragment d'ADN est reliée à l'intensité des interactions hydrophobes qu'il établit avec la phase stationnaire. Enfin, en chromatographie de filtration sur gel, le critère de séparation des fragments d'ADN est leur taille. La séparation est fondée sur leur possibilité de pénétrer à l'intérieur des pores d'un gel constituant la phase stationnaire. Des processus chromatographiques alternatifs dénommés hors équilibre sont actuellement à l'étude. Ce sont principalement la chromatographie hydrodynamique et la chromatographie slalom utilisées pour la séparation de macromolécules biologiques flexibles comme l'ADN.

Après ces généralités, nous allons rappeler la structure de la... bible. Ensuite, nous détaillerons le mécanisme de séparation de fragments d'ADN obtenus par des enzymes de restriction par la chromatographie hors équilibre.

Structure et propriétés de l'acide désoxyribonucléique

Dans le langage courant, le terme génome concerne la macromolécule d'ADN contenue dans les chromosomes. Mais attention, il existe de l'ADN non chromosomique dans les plasmides des bactéries et dans les organites (mitochondries, chloroplastes...) des organismes eucaryotes. Le terme génome désigne aussi l'ensemble des gènes d'un organisme. La structure cristallographique de l'ADN (*figure 1*) a été élucidée par Watson et Crick [9]. Elle est composée de deux polynucléotides complémentaires appariés à la façon de deux bandes velcro. Dans une chaîne polynucléotidique, chaque nucléotide est lié par un groupement phosphate au sucre du nucléotide suivant. Les nucléotides contiennent tous un résidu désoxyribose, un groupement phosphate et une base. Ces bases sont au nombre de quatre : l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T). Elles

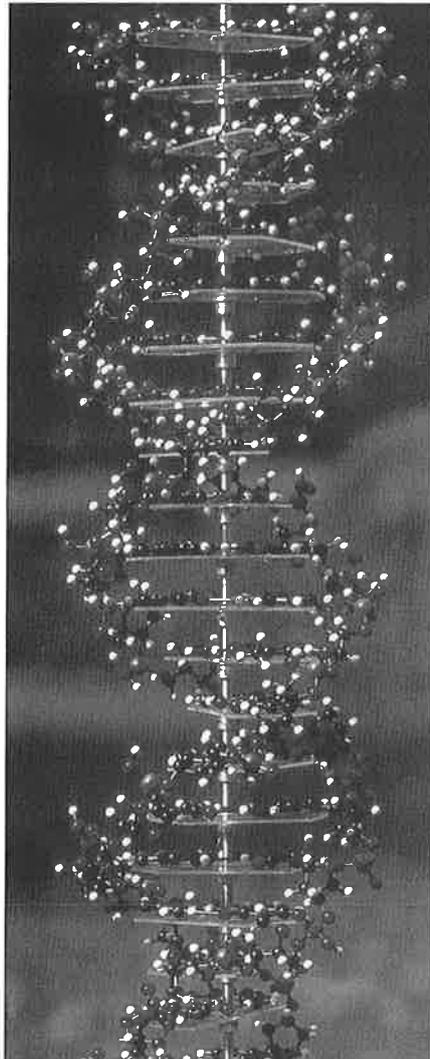


Figure 1 - Maquette de la double hélice d'ADN.

s'associent par paires A-T et G-C de manière à lier les deux brins polynucléotidiques par des liaisons hydrogène qui sont de faibles stabilités (*figure 2*). La double hélice est séparée en ses deux brins complémentaires lors d'opérations enzymatiques intervenant au cours de la réplication. Les brins séparés transitoirement servent alors de matrice pour la reconstruction de deux doubles hélices. Cette ouverture d'une molécule, qui chez l'homme fait plus d'un mètre de long au total dans un espace aussi exigu que celui d'une cellule d'une dizaine de micromètres de large, révèle bien le caractère flexible de la molécule d'ADN (*figure 3*). Dans le cas de l'ADN plasmidique qui est circulaire, sa structure est bien évidemment beaucoup plus rigide. Le diamètre de la double hélice est d'environ 20 Å, son pas de 34 Å. Un tour d'hélice contient environ 10 paires de nucléotides, la distance entre deux bases adja-

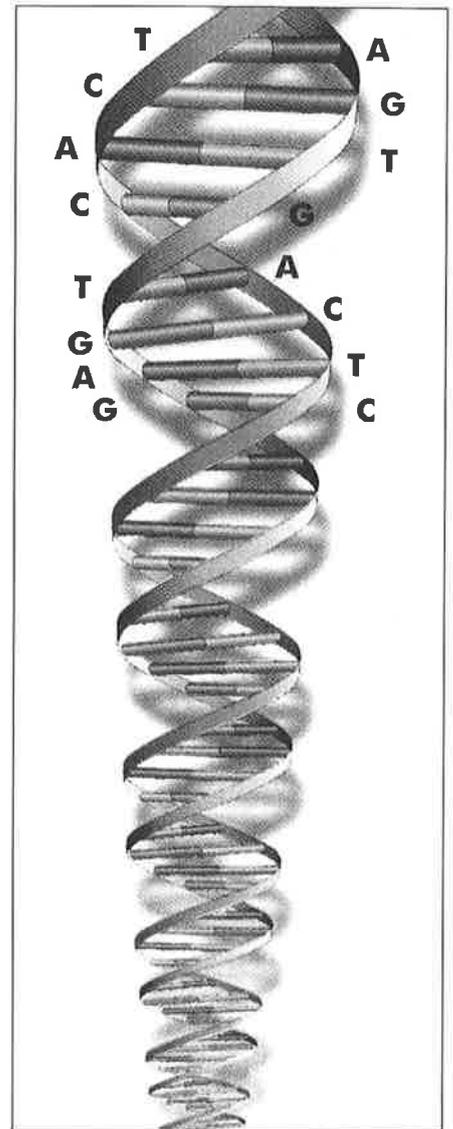


Figure 2 - Brins constituants la double hélice d'ADN : A = adénine, C = cytosine, T = thymine, G = guanine.

centes est donc de 3,4 Å. Les longueurs d'ADN sont généralement données en nombre de paires de bases.

Conformation de l'ADN en solution

Le modèle de chaîne gaussienne à longueur de chaîne persistence p est utilisé pour décrire la conformation de l'ADN en solution. L'ADN est représentée par N_k chaînons statistiques de longueur b où b , la longueur de Kuhn, est égale à deux fois la longueur de persistence de la molécule. La molécule d'ADN adopte une conformation de pelote statistique désordonnée. Sa longueur de contour est $L_c = b_0 N_0$ où N_0 est le nombre de bases et b_0 la dis-

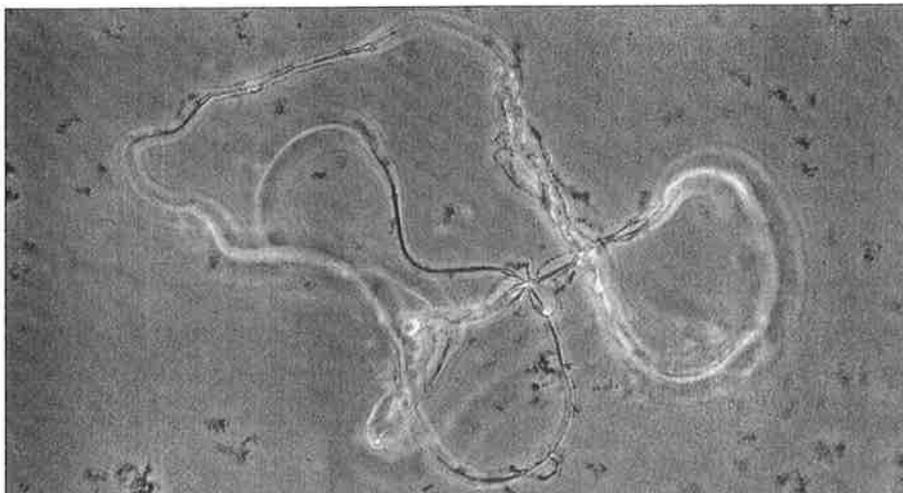


Figure 3 - Fragment d'ADN extrait d'une cellule humaine.

tance entre bases. En négligeant les interactions de volume exclus, son rayon de giration est donné par la relation

$$R_g^2 = \frac{1}{3} p L_c \left(1 - 3 \frac{p}{L_c} + 6 \frac{p^2}{L_c^2} - 6 \frac{p^3}{L_c^3} \left(1 - \exp\left(-\frac{L_c}{p}\right) \right) \right)$$

Si la longueur de contour est supérieure à la longueur de persistance ($L_c \gg p$), la conformation du polymère est décrite par une marche au hasard de pas b , la chaîne est gaussienne et $R_g = L_c^{1/2}$. Si par contre $L_c \ll p$, la conformation de la chaîne est une mesure de la distance de contour sur laquelle une corrélation d'orientation entre les unités de la chaîne existe encore ; elle est reliée à l'énergie libre de déformation locale de la chaîne. Toutes ces considérations montrent que l'ADN, sous certaines conditions physico-chimiques bien déterminées, peut perdre sa conformation en pelote et adopter une conformation plus allongée. C'est cette variabilité de structure qui est le critère de séparation de fragments d'ADN par les techniques chromatographiques hors équilibre.

Modèles théoriques décrivant la chromatographie de l'ADN hors équilibre

Les techniques chromatographiques hors équilibre sont utilisées actuellement pour la séparation de fragments d'ADN dont la taille est comprise entre 5 kb et 10 kb [13-27].

Notre groupe a développé pour la première fois des modèles mathéma-

tiques novateurs permettant de mieux appréhender les mécanismes de rétention et de séparation [22, 26-27]. Dans ces modèles, la phase stationnaire remplissant la colonne est constituée de particules de silice de diamètres d_p formant un réseau de pores à trois dimensions. Le diamètre moyen des pores est r (figure 4). La progression des fragments d'ADN à l'intérieur de ce réseau dépendra bien sûr du diamètre moyen des pores, mais également du rayon de giration de la molécule d'ADN. Sous l'action d'un flux laminaire (phase mobile) relativement faible, et si le rayon de giration du fragment d'ADN est inférieur au diamètre moyen des pores du réseau, la molécule d'ADN peut maintenir sa conformation en pelote statistique.

Dans ce cas, la vitesse relative du fragment d'ADN à l'intérieur de la colonne est fonction du rapport R_g/r .

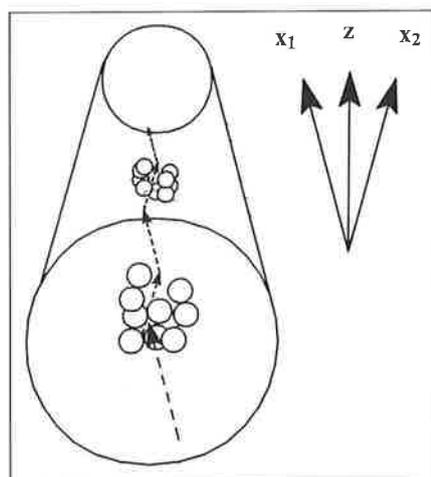


Figure 4 - Représentation de la progression d'un fragment d'ADN à travers le réseau de pores créé par les particules à l'intérieur de la colonne.

L'ordre d'éluion des fragments d'ADN en sortie de colonne est le même que celui obtenu par chromatographie de filtration sur gel. Les fragments d'ADN les plus gros (ceux ayant le rayon de giration le plus élevé) sortent en premier car ils sont exclus plus facilement des régions proches des particules où la vitesse du flux est la plus faible. Il a été montré que pour des fragments d'ADN pour lesquelles $R_g/r > 0,35$ aucune séparation n'apparaît car la différence de vitesse relative des différents fragments n'est pas suffisante.

Afin de visualiser ce mécanisme de séparation par chromatographie hydrodynamique (CHD), nous avons introduit un paramètre dénommé temps de rétention relatif (RRT) d'un fragment d'ADN. RRT peut être mesuré directement à partir du tracé chromatographique (chromatogramme) grâce au temps qui sépare le sommet du pic d'éluion du fragment d'ADN de son injection et au temps de rétention d'un composé non retenu.

La figure 5 montre la courbe de variation $\ln RRT$ fonction de $\ln N$, N étant la taille de trois fragments d'ADN plasmidiques circulaires notés P_3 , P_5 , P_{10} de taille respective 3 kb, 5 kb et 10 kb. Aux vitesses du flux les plus élevées (1,20 et 3,01 cm/min), les trois fragments ont une vitesse moyenne similaire et, par conséquent, des temps de rétention relatifs très voisins. La

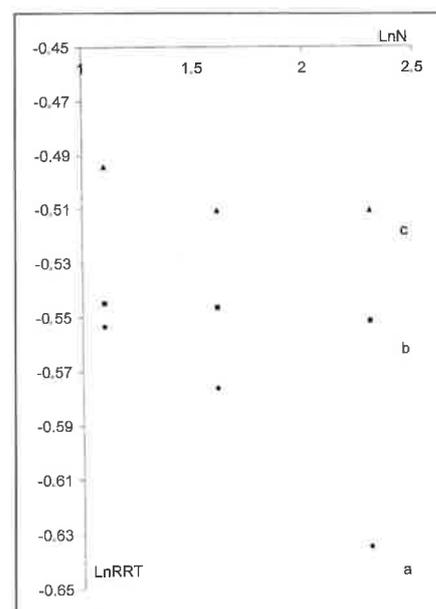


Figure 5 - Courbe $\ln RRT = f(N)$, N étant la taille d'un fragment d'ADN plasmidique (circulaire) pour trois vitesses de flux différents : (a) 0,18 cm/min, (b) 1,20 cm/min, (c) 3,01 cm/min.

séparation de ces trois brins est donc dans ces conditions impossible. Lorsque la vitesse du flux laminaire décroît (0,18 cm/min), les trois ADN plasmidiques qui ont une structure en pelote statistique progressent à travers le réseau de pores avec des vitesses relatives différentes. Ils sont retenus en fonction de leur taille respective ; le fragment de taille 3 kb étant élué en dernier ($P_3 > P_5 > P_{10}$). Les trois fragments plasmidiques pour des débits de phase mobile très faibles ($\cong 0,3$ mL/min) sont donc théoriquement séparables, confirmant bien un mécanisme de séparation hydrodynamique.

Dans le cas où le rayon de giration du fragment d'ADN est nettement supérieur au diamètre moyen des pores du réseau, la molécule d'ADN progresse à l'intérieur du réseau de pores comme un serpent se faufile dans de hautes herbes. Ce concept de reptation a été initialement introduit par De Gennes [28] pour décrire le mouvement diffusif de chaînes de polymères dans un fondu, et a été développé plus amplement par Doi et Edwards [29-30].

Dans cette technique dénommée chromatographie slalom (CS), le fragment d'ADN s'oriente suivant la direction du flux laminaire. La chaîne d'ADN adopte une conformation de chaîne de blobs gaussienne ou un blob représente une partie de la chaîne contenue dans un pore. Les pores occupés par l'ADN forment donc un tube virtuel de longueur $L = Nr$ où N représente le nombre de pores occupés ; ce tube étant bien sûr orienté dans la direction du flux. Ce flux ne doit pas avoir un débit trop élevé, de façon à maintenir une conformation gaussienne de la chaîne. La vitesse v de la molécule d'ADN le long du flux est [27]

$$v = \gamma \frac{v_m}{N} + \gamma' v_m^3$$

γ et γ' sont des constantes et v_m la vitesse du flux. Cette équation montre bien que : (i) une augmentation de la vitesse du flux accroît la vitesse d'élu-tion encore appelée de reptation du fragment d'ADN, (ii) comme le serpent cheminant à travers de hautes herbes, plus sa taille augmente (N croît), plus sa vitesse de reptation diminue. Pour une vitesse de flux constante, la variation du temps de rétention relatif d'un

fragment d'ADN en fonction de son élongation e balance entre deux régimes [22, 26]. Si l'élongation e est inférieure à une valeur critique e_c ($e < e_c$),

$$RRT = \frac{1}{(1 - K \frac{e}{d_p})} \quad (\text{Eq. 1}) ; \text{ si non,}$$

$$RRT = \frac{\frac{d_p}{K'e}}{(\exp(K'' \frac{d_p}{e}) - 1)} \quad (\text{Eq. 2}) \text{ pour}$$

$e > e_c$. K , K' et K'' dépendent de la vitesse du flux et de l'arrangement structural des particules sphériques remplissant la colonne. Ils sont dénommés facteurs de changement directionnels [22, 26].

Conformément aux équations 1 et 2, un accroissement de l'élongation du fragment d'ADN augmente son temps de rétention (ou de reptation) relatif. Les mesures de ces temps, de divers fragments d'ADN linéaires en fonction de leur taille N , ont révélé un changement distinct de pente (figure 6). Ce changement apparaît à une valeur critique de la taille de fragment de l'ADN, N_c , de l'ordre de 30 kb [22, 26-27]. Pour des valeurs de N inférieures à N_c , le temps de rétention relatif d'un fragment d'ADN est directement proportionnel à sa taille. Plus précisément, $\ln RRT$ est proportionnel au logarithme de sa taille ($\ln RRT \propto \ln N$) [27]. Dans ce domaine donc, la séparation des frag-

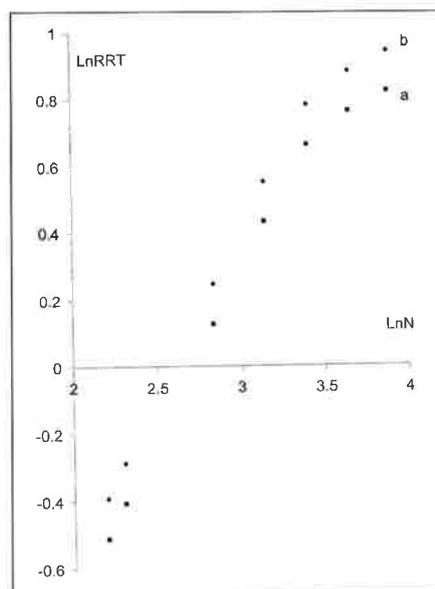


Figure 6 - Courbe $\ln RRT = f(N)$, N étant la taille d'un fragment d'ADN linéaire pour deux vitesses de flux différents : (a) 1,20 cm/min, (b) 3,01 cm/min.

ments d'ADN en fonction de leur taille est théoriquement possible.

Lorsque la vitesse du flux augmente, la molécule s'étire (e croît) et bien évidemment, à l'image du serpent, son temps de rétention relatif augmente (éq. 1 et 2) (figure 6). Il est important de noter que, dans ce domaine ($N < N_c$), une augmentation du débit peut théoriquement conduire à une amélioration de la séparation des fragments d'ADN et simultanément réduire le temps de l'analyse. Un exemple de la séparation de quatre fragments linéaires d'ADN est donné dans la figure 7 [26].

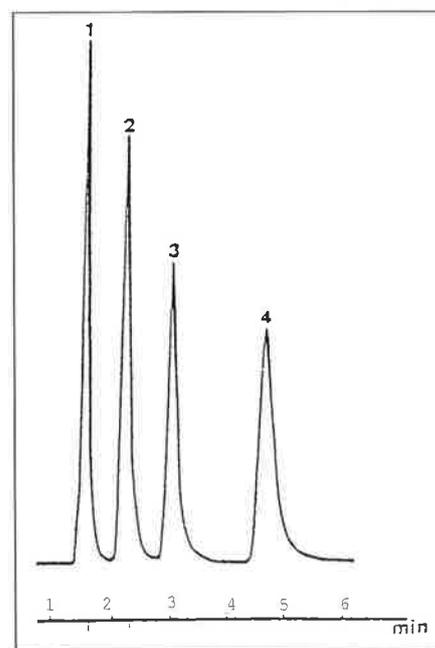


Figure 7 - Séparation de quatre fragments d'ADN par chromatographie slalom. Pics : (1) fragment de 1,50 kb, (2) fragment de 17,05 kb, (3) fragment de 29,95 kb, (4) fragment de 48,5 kb.

Au-delà de N_c ($N > N_c$), la pente de la courbe $\ln RRT$ fonction de $\ln N$ diminue et le début d'un domaine de saturation [27] apparaît pour lequel le temps de rétention relatif devient théoriquement indépendant de la taille du fragment d'ADN (figure 6). La figure 8 est la surface de réponse représentant la variation de $\ln RRT$ en fonction de la vitesse du flux, de la taille et de la nature du fragment d'ADN (circulaire ou linéaire) [27]. Deux régions peuvent être différenciées. La région située à gauche contenant tous les fragments d'ADN plasmidiques (circulaires) pour laquelle les variations du facteur de rétention relatif avec la vitesse du flux sont très faibles. Dans cette région, la séparation des fragments P_3 , P_5 , P_{10}

apparaît possible pour des vitesses très faibles (vitesse de flux $\approx 0,18$ cm/min) conformément à un mécanisme de séparation hydrodynamique (mode CHD).

Le facteur de retard $\delta = \frac{\partial \text{LnRRT}}{\partial v_m}$ est

très faible car les fragments d'ADN circulaires sont très peu flexibles. A droite de cette surface, correspondant à la deuxième région qui ne contient que des fragments d'ADN linéaires, une augmentation très forte du temps de rétention relatif d'un fragment est observé (figure 8).

En accord avec notre modèle, les formes linéaires d'ADN qui ont une structure très flexible peuvent être séparées via un mode de séparation slalom (mode CS). Dans cette deuxième région, les valeurs δ des facteurs de retard sont beaucoup plus élevées, toujours à cause de la flexibilité importante des fragments d'ADN linéaires par rapport aux fragments circulaires. Dans cette région également, les valeurs de δ les plus faibles sont obtenues dans le domaine de saturation car les fragments d'ADN linéaires ont une élévation maximale. Le milieu de cette surface (fragment d'ADN L₉, figure 8) correspond à la transition modale CHD \leftrightarrow CS. Ainsi, les mécanismes de chromatographie hydrodynamique et de chromatographie slalom sont interconnectés et forment un mode de séparation global basé sur un principe hors équilibre (contrairement aux autres techniques chromatographiques) appelé chromatographie hors équilibre ou CHE.

Conclusion

Il apparaît, dans le cadre de ces travaux conduits par notre groupe, que les méthodes chromatographiques hors équilibre peuvent être utilisées avec succès pour la séparation de macromolécules biologiques comme l'ADN. Le temps de rétention relatif d'un fragment d'ADN (RRT) a été modélisé via des équations le reliant à divers facteurs, notamment géométriques, comme la taille du réseau de pores de la colonne. La limitation actuelle de cette techni-

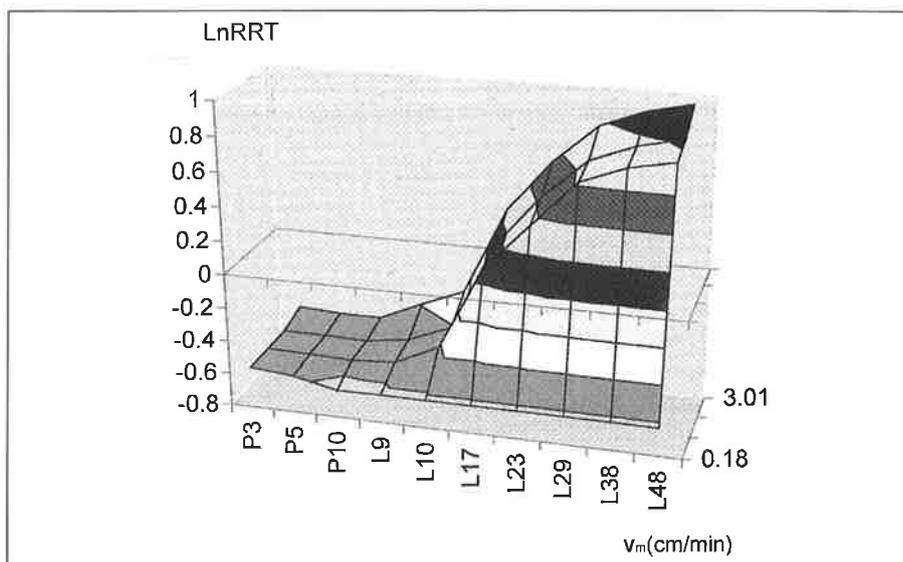


Figure 8 - Surface de réponse $\text{LnRRT}=f(v_m, X)$; v_m représente la vitesse du flux laminaire et X est assimilé à la taille et à la nature du fragment d'ADN (circulaire ou linéaire)

que pour la séparation de fragments d'ADN de taille comprises entre 3 kb et 50 kb est justement due à la taille des particules sphériques remplissant la colonne. Une diminution du diamètre de ces particules devrait améliorer le pouvoir de résolution. De nombreuses applications de ces techniques sont envisagées dans notre laboratoire, notamment dans le cadre de la séparation et du mécanisme rhéologique de polymères synthétiques.

Remerciements

Les auteurs remercient très chaleureusement Mireille Thomassin pour son aide dans la réalisation de cet article.

Références

- [1] Grushka E., Colin H., Guiochon G., *J. Chromatogr.*, **1982**, 248, p. 1789.
- [2] Boehm R.E., Martire D.E., Armstrong D.W., *Anal. Chem.*, **1988**, 60, p. 522.
- [3] Maa Y.F., Lin S.C., Horvath C., Yang U.C., Crothers D.M., *J. Chromatogr.*, **1998**, 508, p. 61.
- [4] Cole L.A., Dorsey J.G., Dill K.A., *Anal. Chem.*, **1992**, 64, p. 1324.
- [5] Hardacher D., Vailaya A., Horvath C., *Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis*, **1996**, 93, p. 377.
- [6] Wirth M.J., Fairbank R.W., Fatumbi H.O., *Science*, **1997**, 275, p. 44.
- [7] Zarzycki P.K., Lamparczyk H., *Chromatographia*, **1998**, 48, p. 377.
- [8] Peyrin E., Guillaume Y.C., Guinard C., *Biophys. J.*, **1999**, 77, p. 1206.
- [9] Watson J.D., Crick F.H.C., *Nature*, **1953**, 171, p. 737.
- [10] Kratky O., Porod O., *Rec. Trav. Chim., Pays Bas*, **1949**, 68, p. 1106.
- [11] Benoit H., Doty P., *J. of Physical Chemistry*, **1953**, 57, p. 958.
- [12] Manning G.S., *J. of Physical Chemistry*, **1969**, 51, p. 924.
- [13] Dimarzio E.A., Guttmann C.M., *Macromolecules*, **1970**, 2, p. 131.
- [14] Small H.J., *J. Colloid. Interface Sci.*, **1974**, 48, p. 147.
- [15] Hoagland D.A., Prud'homme R.K., **1989**, 22, p. 775.
- [16] Stegeman G., Kraak J.C., Poppe H., *J. Chromatogr. A*, **1981**, 550, p. 721.
- [17] Stegeman G., Kraak J.C., Poppe H., Tijssen R., *J. Chromatogr. A.*, **1993**, 657, p. 283.
- [18] Venema E., Kraak J.C., Poppe H., Tijssen R., *J. Chromatogr. A.*, **1996**, 740, p. 159.
- [19] Hirabayashi J., Kasai K.I., in *Molecular Interactions in Bioseparations*, T.T. Ngo, Ed., Plenum Press, New York, **1993**, chap. 5, p. 69.
- [20] Hirabayashi J., Ito N., Noguchi K., Kasai K.I., *Biochemistry*, **1990**, 29, p. 9515.
- [21] Boyes E., Walker D.G., McGeer P.L., *Anal. Biochem.*, **1988**, 170, p. 127.
- [22] Peyrin E., Guillaume Y.C., Villet A., Favier A., *Anal. Chem.*, **2000**, 72, p. 853.
- [23] Kasai K.I., *J. Chromatogr.*, **1993**, 618, p. 203.
- [24] Peyrin E., Guillaume Y.C., Grosset C., Ravel A., Villet A., Garrel C., Alary J., Favier A., *J. Chromatogr. A*, in press.
- [25] Viovy J.L., Duke T., *Electrophoresis*, **1993**, 14, p. 322.
- [26] Guillaume Y.C., Peyrin E., Thomassin M., Grosset C., Villet A., Robert J.F., Guinard C., *Anal. Chem.*, in press.
- [27] Guillaume Y.C., Peyrin E., Thomassin M., Ravel A., Grosset C., Robert J.F., Guinard C., *Anal. Chem.*, in press.