

CHROM. 5376

SÉPARATION DES POLYSACCHARIDES ET ACIDES NUCLÉIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYAPATITE

G. VIDAL

Institut Merieux, Laboratoire de Chimie Bactérienne, 69 Marcy L'Étoile (France)

(Reçu le 8 février 1971; manuscrit modifié reçu le 25 mars 1971)

SUMMARY

Separation of polysaccharides and nucleic acids by chromatography on hydroxyapatite

Partial separation of polysaccharides and nucleic acids can be obtained by column chromatography on hydroxyapatite at room temperature. However, the separation depends on the phosphate concentration of these substances, their degree of denaturation, and the presence or absence of phospholipids in bacterial extracts.

INTRODUCTION

On sait que l'affinité des acides nucléiques pour l'hydroxyapatite (HTP) est liée à une plus ou moins grande concentration des ions PO_4^{2-} dans leur molécule. La séparation des différents acides nucléiques se fait par augmentation des ions PO_4^{2-} dans les tampons d'élution, et donc compétition au niveau de l'HTP avec les ions PO_4^{2-} des acides nucléiques¹. En postulant que les polysaccharides de paroi des germes Gram négatif sont moins chargés en phosphates que les acides nucléiques, on peut parvenir à une séparation effective des polysaccharides et des acides nucléiques.

L'expérimentation entreprise, dont nous donnons ici la méthode d'exploration et les résultats obtenus, montre que ce postulat n'est pas vrai pour tous les polysaccharides et acides nucléiques et que cette méthode de séparation semble être fonction de la concentration en phosphates de ces substances.

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Ce travail a été réalisé sur des phases aqueuses d'extraction selon la classique méthode de WESTPHAL ET JANN², à partir d'*Escherichia coli* et de *Bordetella pertussis*.

Chromatographies

L'hydroxyapatite utilisée est le produit commercial Bio-Gel HTP (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.).

Les colonnes sont de 15.5 à 16.5 cm × 2 cm, équilibrées en tampon phosphate

de potassium 0.005 *M*, pH = 6.8. Les différents tampons d'élution sont préparés à partir de solutions de phosphates mono- et di-potassique, aux concentrations molaires désirées et mélangées pour obtenir le même pH pour tous les tampons.

Les chromatographies sont effectuées comparativement à 4° et 21°, car on sait que la température de chromatographie joue un rôle important dans la séparation des substances sur HTP³. Des fractions de 5 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions.

Méthodes analytiques

Dosage des sucres. On utilise la technique à l'anthrone selon MOKRASCH⁴. L'intensité de coloration est mesurée au spectrophotomètre à 620 m μ , comparative-ment à une gamme-étalon de solution de glucose à des concentrations allant de 40 à 200 μ g.

Dosage des acides ribonucléiques (ARN). C'est la technique décrite par KAMALI ET MANHOURI⁵ qui est utilisée. Le ribose est dosé par une réaction à l'orcinol comparative-ment à une gamme-étalon d'ARN, l'intensité colorimétrique se mesurant au spectrophotomètre à 670 m μ .

Dosage des acides desoxyribonucléiques (ADN). Les ADN sont dosés par la technique à la diphenylamine et acide perchlorique selon BURTON⁶ avec mesures colorimétriques à 600 m μ .

Dosage des protéines. La technique d'ITZHAKI ET GILL⁷ qui est utilisée est une micro-méthode au biuret avec mesure photométrique à 310 m μ .

Mesures spectrophotométriques. Elles sont réalisées, aussi bien dans l'ultra-violet que dans le visible, avec un spectrophotomètre Beckman DB-G. La mesure des densités optiques des différentes chromatographies est effectuée à 260 m μ .

Concentration des produits de chromatographie

Lorsque ce n'est pas spécifiquement signalé, les pics d'élution sont concentrés par pervaporation à 4° et dialyse contre eau distillée pour éliminer les phosphates. En effet, des essais de concentration sur Dia-Flo (Amicon Corp., Lexington, Mass.) avec membrane PM 10 montrent que les ARN aussi bien que les sucres traversent cette membrane et ceci dans des proportions importantes: 57% pour les ARN et 60% pour les sucres.

RÉSULTATS

Chromatographie d'extrait de B. pertussis

Nous avons réalisé une chromatographie à température ambiante (21°) d'un extrait polysaccharidique de *B. pertussis*. Les dosages de sucres et d'ARN effectués sur la totalité des paliers d'élution, montrent que l'on a séparation effective d'une partie des acides nucléiques et des sucres, puisque 47% de ces derniers sont élués en tête de chromatographie dans le palier 0.005 *M*, contaminés seulement par 6% d'ARN. Cependant, plus de la moitié des polysaccharides (51%) est éluee en même temps que la majeure partie des ARN (63%) avec le palier 0.2 *M* (Tableau I).

Chromatographies d'extrait d'E. coli

Les deux chromatographies effectuées comparativement à 4° et 21°, ne mon-

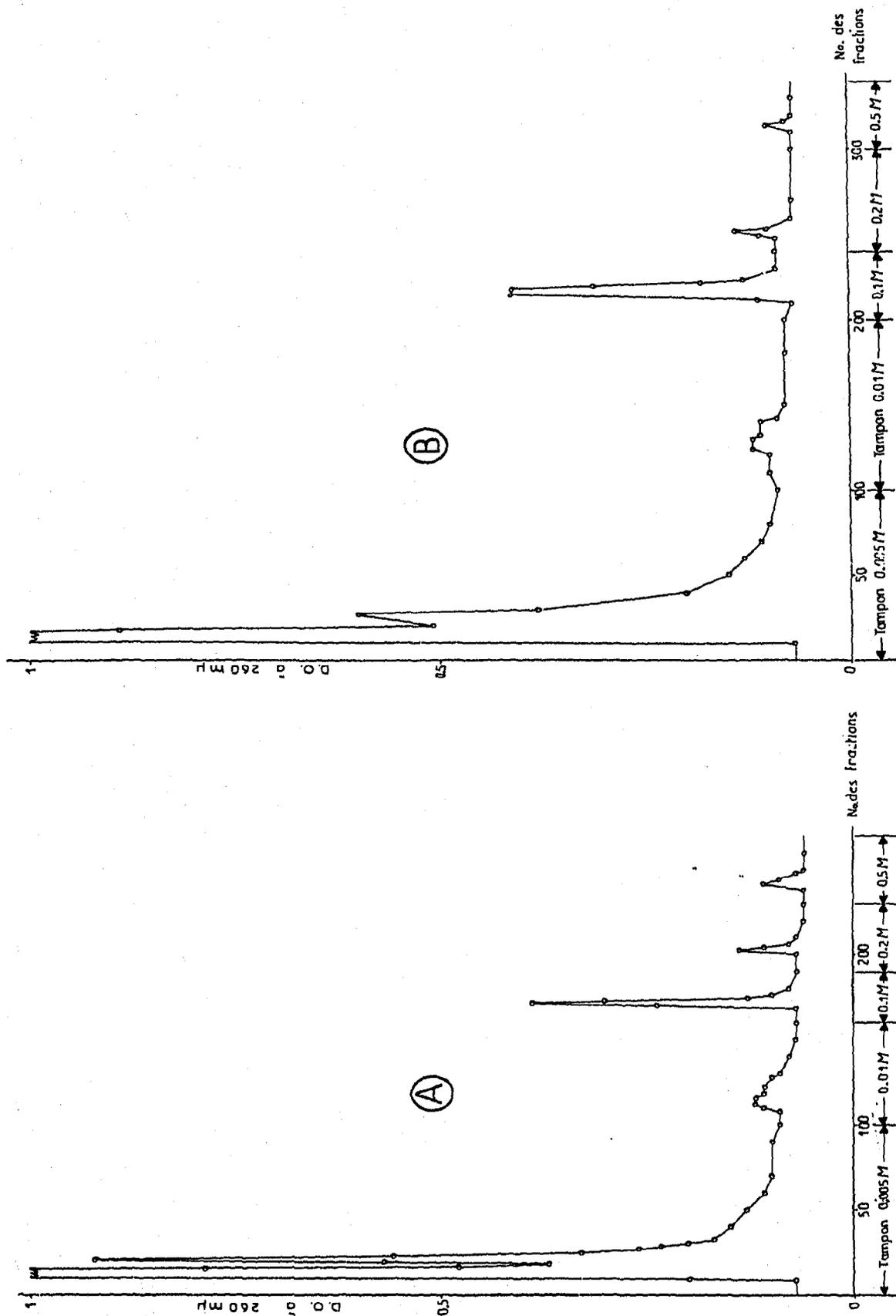


Fig. 1. Chromatographies d'extraits d'*E. coli*. Colonnes de 16 X 2 cm. Vitesse d'éluion : 25 ml/h. Volume des fractions : 5 ml. Volumes mis en chromatographie : 10 ml, contenant ARN (6.1 mg); ADN (1.8 mg); polysaccharides (1 mg); protéines (0). (A) = chromatographie à 21°; (B) = chromatographie à 4°.

TABLEAU I

CHROMATOGRAPHIE D'EXTRAIT DE *B. Pertussis*

Dosage des sucres et des ARN dans les différentes fractions.

| Matériel | A.R.N. | | Sucres | |
|-------------------------|----------------------|------|----------------------|-------|
| | $\mu\text{g totaux}$ | % | $\mu\text{g totaux}$ | % |
| Extrait mis sur colonne | 7063 | 100 | 726 | 100 |
| Palier 0.005 M | 457.65 | 6.3 | 346.1 | 47.6 |
| Palier 0.01 M | 10.1 | 0.1 | 0 | — |
| Palier 0.1 M | 365.55 | 5.1 | 0 | — |
| Palier 0.2 M | 4456.8 | 63 | 374.4 | 51.5 |
| Palier 0.5 M | 161.24 | 2.2 | 131.8 | 18 |
| Total | 5451.74 | 76.7 | 852.3 | 117.1 |

trent pas de différence dans leur courbe d'adsorption à 260 $m\mu$ (Fig. 1, A et B). Cependant, les dosages de sucres, d'ARN et d'ADN effectués sur les fractions des différents paliers, montrent que ces substances sont généralement plus fortement adsorbées sur l'HTP à 4° qu'à 21°. On obtient ainsi une meilleure séparation des différentes substances à l'éluion, et plus spécialement des polysaccharides, en opérant les chromatographies à température ambiante: en effet, 45% environ des polysaccharides sont élués dans le palier 0.005 M, contaminés seulement par 8% d'ARN, mais 31% d'ADN. De plus, à 21°, les rendements obtenus à la chromatographie sont meilleurs qu'à 4°: en effet, pour les sucres, on obtient 108.8% de récupération à 21°, contre 65.5% à 4°. Les rendements pour l'ARN restent pauvres et

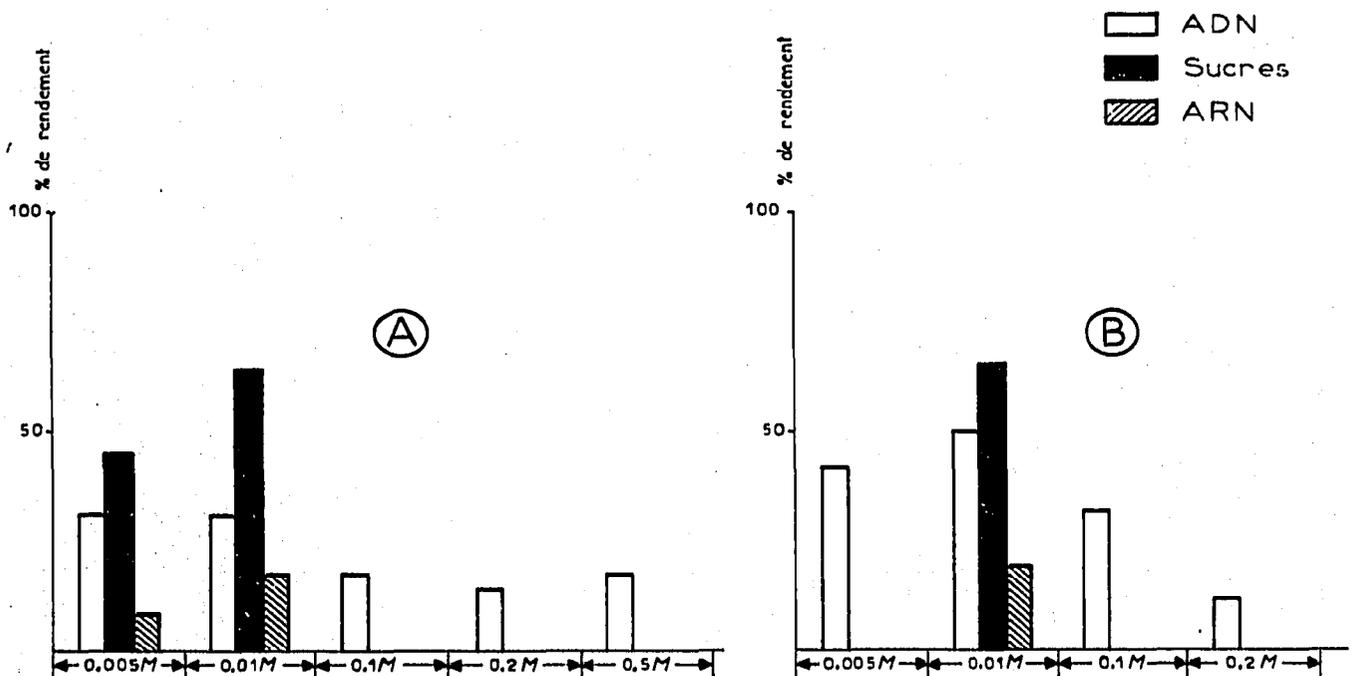


Fig. 2. Pourcentages de rendement des chromatographies d'extraits d'*E. coli*. (A) = chromatographie à 21°; (B) = chromatographie à 4°.

sont faiblement augmentés par l'élévation en température de la chromatographie: 25.9% à 21°, contre 19.5% à 4°. Seuls les ADN présentent une récupération totale, quelle que soit la température: 111.8% à 21° et 135.6% à 4° (Fig. 2A et B).

DISCUSSION

Les travaux de BERNARDI^{1,8,9}, concernant la chromatographie des acides nucléiques sur hydroxyapatite, ont montré que la séparation obtenue est fondée sur l'interaction des groupements phosphates négatifs des acides nucléiques, avec la charge positive à la surface des cristaux d'hydroxyapatite, sans aucune intervention directe ni des bases, ni des sucres. Ce même auteur¹⁰, a montré d'autre part, que l'adsorption des polypeptides et des protéines sur hydroxyapatite était fonction de la charge en groupements aspartate et glutamate des protéines: plus une protéine contient de groupements carboxyliques et plus elle est fortement adsorbée à la surface des cristaux d'hydroxyapatite.

Les acides nucléiques, dans la composition desquels entre en moyenne 10% de phosphore¹¹, sont généralement élués de l'hydroxyapatite à 0.1-0.2 M phosphates. Occasionnellement, quelques fractions mineures d'ADN natif sont éluées à 0.5 M⁸.

On pouvait donc penser qu'en partant d'extraits bactériens dépourvus de protéines, tels que ceux que nous avons utilisés, on pourrait obtenir une séparation des acides nucléiques et des polysaccharides, ces derniers, *a priori* moins chargés en phosphore, étant élués avant les acides nucléiques.

Cette hypothèse a été partiellement vérifiée pour ce qui concerne les extraits de *B. pertussis*, puisque 47.6% des polysaccharides ont été élués dans le palier 0.005 M (Tableau I). Ces polysaccharides correspondent certainement à des substances faiblement chargées en phosphore, pour lesquels l'hypothèse de produits de dégradation des polysaccharides natifs doit aussi être envisagée. Les ARN élués entre 0.005 M et 0.1 M représentent des fragments de polynucléotides plus ou moins dégradés selon le palier d'éluion, tandis que la majeure partie des ARN (63%) est éluée à 0.2 M et représente des ARN natifs. Cependant, près de 70% des polysaccharides sont encore élués dans les paliers 0.2-0.5 M. Ils correspondent à des substances fortement chargées en phosphore. On peut penser que ces substances fortement phosphorylées (plus de 10% en phosphates, si l'on établit la correspondance avec les acides nucléiques) ne sont pas composées uniquement de polysaccharides, mais de lipopolysaccharides, dont la fraction phospholipidique vient s'ajouter à la charge en phosphore.

Il en va de même pour les extraits d'*E. coli*, passés en chromatographie à 21°. En effet, à cette température, la totalité des polysaccharides (108%) est éluée entre les paliers 0.005 et 0.10 M, contaminés par 26% d'ARN et 62% d'ADN. Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus avec les extraits de *B. pertussis*. Dans le cas d'*E. coli*, les ARN et ADN élués avant 0.1-0.2 M phosphates, correspondent aussi certainement à des fragments de polynucléotides.

La comparaison des chromatographies d'extraits phénoliques d'*E. coli* aux différentes températures, montre que: (a) l'adsorption des polysaccharides est généralement plus forte à 4° qu'à 21°, puisque 40% environ des sucres ne sont pas élués à 0.5 M phosphates. Il paraît donc préférable d'effectuer les chromatographies à température ambiante. (b) Les ARN sont peu élués de la colonne (19.5% de récu-

pération à 4°, 26% environ à 21°). Et ce qui est élué correspond à des fragments d'ARN. On peut donc en conclure que le reste des ARN, probablement sous une forme dégradée, s'est combiné avec des substances fortement phosphatées, telles que des phospho-lipides. (c) La température de chromatographie n'affecte pas l'élu-tion des ADN dans leur ensemble. On remarquera seulement que plus de 60% de ces ADN sont décomposés en polynucléotides plus ou moins polymérisés, puisqu'ils sont élués dans les fractions 0.005-0.01 *M* phosphates.

Ces séparations sur hydroxyapatite mettent donc en évidence une dénaturation importante des substances contenues dans les extraits phénoliques, puisque selon BERNARDI¹, l'hydroxyapatite ne provoque pas de cassures dans les longues molécules d'ARN. Cette dégradation est variable selon les germes utilisés, puisque l'on recueille 63% d'ARN natif dans les extraits de *B. pertussis* et rien à partir des extraits d'*E. coli*. D'autre part, cette dégradation des acides nucléiques et des sucres dans les extraits phénoliques est confirmée par le fait que lors d'une concentration de l'extrait brut sur Dia-Flo, avec membrane PM 10, on retrouve près de 60% de sucres et de polyribonucléotides dans le filtrat. Il paraît peu probable que la méthode d'extraction soit en cause dans ces dénaturations d'acides nucléiques; une dégradation par les opérations de congélation-décongélation au stockage paraît plus plausible.

CONCLUSION

La chromatographie sur hydroxyapatite d'extraits bactériens de germes Gram négatif permet effectivement une séparation des polysaccharides et des acides nucléiques, dans la mesure où ces derniers ne sont pas trop dégradés par les opérations de purification et de conservation qui précèdent. Toutefois, cette séparation s'avère incomplète. On peut penser que cela est dû à la présence de phospholipides, qui modifient la charge en phosphates des polysaccharides et des polynucléotides. Cette méthode de séparation n'est donc pas applicable avec le même bonheur à tous les germes. Il semble que le rendement de purification soit essentiellement fonction de l'intégrité moléculaire des polysaccharides et acides nucléiques en présence; et du taux de concentration en phosphates des polysaccharides ou des lipopolysaccharides, qui, pour une séparation maximale, doit être inférieur à celui des acides nucléiques. D'autres expériences sont en cours dans notre laboratoire pour vérifier cette hypothèse.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur le Docteur G. Ayme, qui nous a fourni les extraits bactériens utilisés dans ce travail, ainsi que Mademoiselle N. Brocard pour son excellente collaboration technique.

RÉSUMÉ

La chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite à température ambiante permet une séparation partielle des polysaccharides et acides nucléiques: mais, cette

séparation est fonction de la concentration en phosphates de ces substances, de leur degré de dénaturation et de la présence ou absence de phospholipides dans l'extrait bactérien traité.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 G. BERNARDI, *Biochim. Biophys. Acta*, 174 (1969) 449.
- 2 O. WESTPHAL ET K. JANN, in R. L. WHISTLER (Editor), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 5, Academic Press, New York, 1965, p. 83.
- 3 G. VIDAL, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 279.
- 4 L. C. MOKRASCH, *J. Biol. Chem.*, 208 (1954) 55.
- 5 M. KAMALI ET H. MANHOURI, *Clin. Chem.*, 15 (1969) 390.
- 6 K. BURTON, *Biochem. J.*, 62 (1956) 315.
- 7 R. F. ITZHAKI ET D. M. GILL, *Anal. Biochem.*, 9 (1964) 401.
- 8 G. BERNARDI, *Biochim. Biophys. Acta*, 174 (1969) 423.
- 9 G. BERNARDI, *Biochim. Biophys. Acta*, 174 (1969) 435.
- 10 G. BERNARDI ET T. KAWASAKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 160 (1968) 301.
- 11 H. R. MAHLER ET E. H. CORDES, *Biological Chemistry*, Harper & Row, New York, 1969, p. 124.

J. Chromatogr., 59 (1971) 71-77