

SÉPARATION DES PHOSPHODÉRIVÉS DE L'ADÉNOSINE ET DES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

JACQUES PICARD

*Laboratoire de Biochimie de l'École Nationale de Médecine de Tours,
et Laboratoire d'Étude de l'Os et de la Croissance,
Hôpital des Enfants Malades, Paris (France)*

(Reçu le 5 juin 1961)

La présence simultanée de nucléotides et de mucopolysaccharides acides dans les extraits salins ou acides de divers tissus et notamment de cartilage nécessite la séparation de ces substances. Les études enzymatiques sur le rôle des nucléotides dans la biogénèse des mucopolysaccharides imposent également une séparation convenable.

Celle-ci peut être médiocrement résolue par l'usage de charbons actifs qui adsorbent les nucléotides mais retiennent partiellement les mucopolysaccharides. La précipitation du chondroïtine-sulfate* par les halogénures de cétyltriméthyl-ammonium n'est pas rigoureusement quantitative dans des milieux salins^{1,2}. Le fractionnement sur colonne de résines anioniques, Dowex I ou II, permet la séparation des nucléotides, du PAPS³⁻⁵, du chondroïtine-sulfate. Mais le fractionnement s'accompagne d'une hydrolyse partielle du PAPS. En outre, dans les expériences avec marquage du PAPS par du ³⁵S, il est délicat d'isoler ce phosphodérivé totalement exempt de radiosulfate.

L'identification des fractions obtenues par ces méthodes est le plus souvent réalisée par électrophorèse sur papier. Cette technique, largement utilisée dans la séparation des nucléotides, permet d'isoler les phosphodérivés de l'adénosine. Nous la pratiquons avec un tampon citrate 0.04 M à pH 3.8 sous 30 V/cm⁶. Mais son application à la séparation des mucopolysaccharides acides ne donne pas d'aussi bons résultats⁷⁻¹⁰. En dépit de variations portant sur la nature du tampon, sa force ionique, son pH, le déplacement des mucopolysaccharides s'accompagne de traînées mal localisées qui, même peu importantes, nuisent à l'individualisation des nucléotides et de leurs phosphodérivés ou sulfophosphodérivés, présents sur la même bande de papier.

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER UNIDIMENSIONNELLE

Dans ces essais, les substances utilisées sont des préparations commerciales (AMP, ADP, ATP PABST, héparine) ou synthétisées au laboratoire (chondroïtine-sulfate¹¹,

* Abréviations utilisées: CSA, CSB, CSC, pour chondroïtine-sulfate A, B ou C; AMP, ADP, ATP, pour adénosine-monophosphate, diphosphate, triphosphate; GMP pour guanosine-mono-phosphate; APS pour adénosine-5'-phosphosulfate; PAPS pour 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate.

PAPS synthétisé par voie enzymatique^{10, 15} et purifié selon HILZ ET LIPMANN¹¹ et ROBBINS ET LIPMANN⁹). Divers auteurs séparent nucléotides et mucopolysaccharides par chromatographie sur papier^{11, 12}. Parmi les systèmes solvants les plus utilisés, les mélanges acide isobutyrique-ammoniaque-eau permettent de bonnes séparations des nucléotides et de leurs phosphodérivés, mais les mucopolysaccharides, chondroïtine-sulfate, héparine, ne migrent pas; en outre, le PAPS, placé entre l'ATP qui le précède et l'anion sulfate qui le suit immédiatement, s'identifie malaisément dans ce groupe de substances; la détection par absorption en lumière ultraviolette et autoradiographie, s'il est fait usage de dérivés marqués avec du ³⁵S, risque d'être trompeuse: les spots peuvent être confluent en U.V. (excès d'ATP) ou sur les films radiographiques (excès de radiosulfate), lorsque la teneur en PAPS est faible. Cependant, avec l'un des systèmes solvants utilisés pour la séparation de CSA, CSC, et de l'héparine¹³, le système formiate d'ammonium 0.04 *N*-isopropanol (60:40), nous avons séparé CSA et héparine, anion sulfate, PAPS, et l'ensemble des nucléotides et phosphodérivés qui migrent à des vitesses différentes (Tableau I).

TABLEAU I

SÉPARATION DE MUCOPOLYSACCHARIDES SULFATES ET DE PHOSPHODÉRIVÉS DE L'ADÉNOSINE
(Système solvant: formiate d'ammonium 0.04 *N*-isopropanol (60:40))

<i>Substance</i>	<i>R_F</i>
CSA	0.90
Héparine	0.46
AMP-ADP-ATP	0.65
APS-PAPS	0.68
Sulfate	0.72

La séparation complète des phosphodérivés de l'adénosine et de ces substances est alors réalisée par chromatographie bidimensionnelle ou par chromatographie électrophorèse.

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER BIDIMENSIONNELLE

Sur une grande feuille de papier Whatman No. 1 lavée (40 × 40 cm), on dépose près d'un angle 5 à 20 μ l d'une solution contenant 5 à 20 μ g de nucléotides ou dérivés pour 10 à 20 μ g de mucopolysaccharide-sulfate. La chromatographie est d'abord pratiquée dans le système formiate d'ammonium 0.04 *M*, pH 4.3-isopropanol (60:40) durant 12 heures à 20° (chromatographie descendante). Puis après séchage à la température du laboratoire, on développe dans la seconde dimension dans le système acide isobutyrique-ammoniaque 1 *M*-versenate disodique 0.1 *M* (100:60:1.6)¹⁶ durant 15 heures (chromatographie descendante). Après développement et séchage du chromatogramme, les phosphodérivés sont identifiés en lumière U.V. (Mineralight); le PAPS est repéré également par autoradiographie. Le CSA est révélé par la technique de coloration au bleu d'alcan¹⁷. Les phosphates d'adénosine sont identifiés sur le même chromatogramme que le CSA (Fig. 1). La bonne séparation du PAPS en

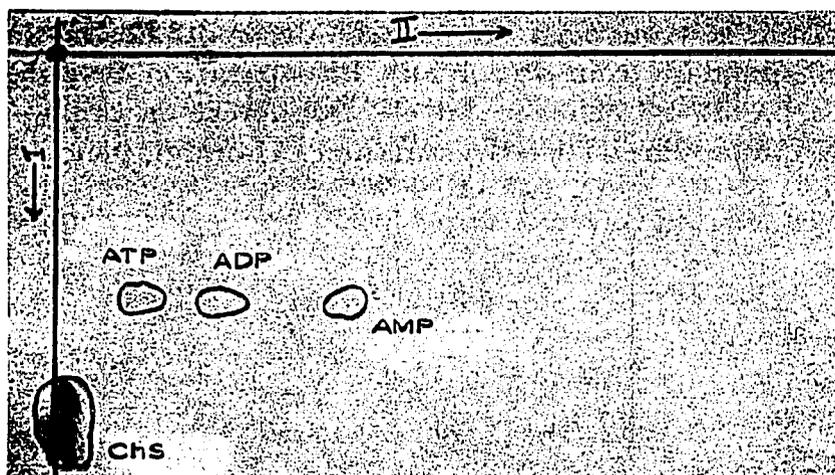


Fig. 1. Chromatographie bidimensionnelle (explications dans le texte).

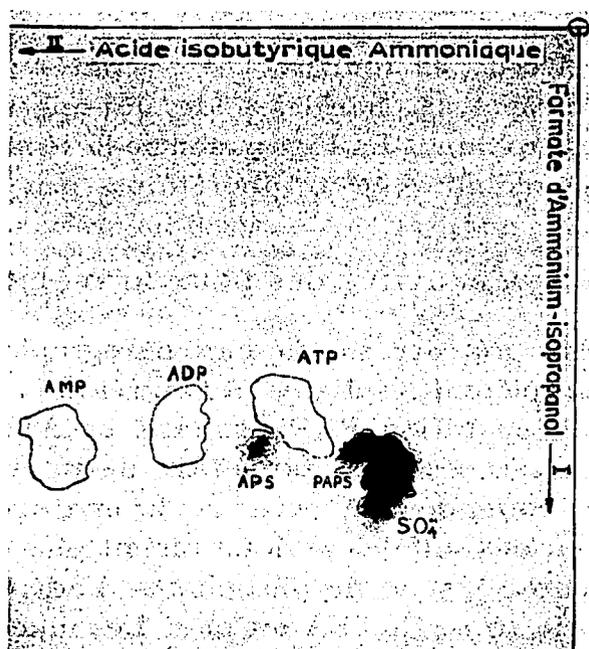


Fig. 2. Chromatographie bidimensionnelle, autoradiogramme (explications dans le texte).

présence de ces phosphodérivés, de l'anion sulfate et du CSA apparaît sur la Fig. 2, qui représente l'autoradiogramme d'un chromatogramme obtenue par analyse d'un incubat de cartilage en présence d'ATP et de ^{35}S .

CHROMATOÉLECTROPHORÈSE

Une première séparation des phosphates d'adénosine et du CSA est réalisée par chromatographie sur papier descendante, système formiate d'ammonium-isopropanol, durant 8 heures, comme précédemment. Après séchage de la feuille à la température du laboratoire, la position des nucléotides et dérivés est précisée par examen en lumière U.V. On découpe sur le chromatogramme une large bande (8 cm)

dont le bord supérieur se trouve à 1 cm en deçà des spots des nucléotides et dont le bord inférieur correspond au front du solvant. La séparation des substances présentes à l'extrémité de la bande est achevée par électrophorèse en tampon citrate 0.04 M, à pH 3.8 sous 30 V/cm (appareil type Grassmann et Hannig), pendant 60 minutes. Les

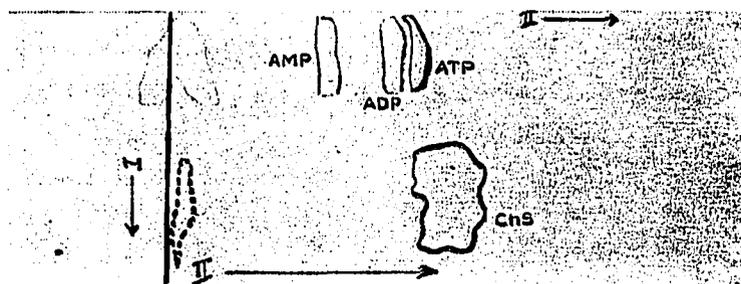


Fig. 3. Chromatoélectrophorèse.

phosphates d'adénosine, décelés en lumière U.V., séparés par électrophorèse, sont nettement distincts des mucopolysaccharides acides qui migrent plus vite au cours du développement chromatographique. La Fig. 3 montre la séparation ATP et CSA par cette technique, malgré les mobilités électrophorétiques peu différentes.

VALEUR RELATIVE DES DEUX MÉTHODES

La chromatographie électrophorétique présente sur la chromatographie bidimensionnelle des avantages: élimination complète des sulfates (à l'extrémité anodique de la bande) et des phosphates; meilleure séparation PAPS-sulfate, et ATP-PAPS; résultats plus rapidement obtenus. Mais elle nécessite davantage de produit, au moins 10 μg de phosphates d'adénosine et 20 μg de CSA. Avec la chromatographie bidimensionnelle, les R_F des mucopolysaccharides-sulfates se déterminent plus aisément que les mobilités. Des quantités inférieures à 5 μg de phosphates d'adénosine (à 1 μg de PAPS marqué ^{35}S) sont séparés de 10 μg de CSA ou plus. Les mucopolysaccharides acides, colorés par le bleu d'alcan, forment en chromatographie bidimensionnelle des taches nettement limitées, sans laisser de traînées comme dans l'électrophorèse. L'acide hyaluronique peut également être identifié par chromatographie électrophorétique sans difficulté.

Ces méthodes permettent d'une manière plus générale les séparations des mucopolysaccharides acides et des nucléotides.

RÉSUMÉ

Description de techniques de séparation des phosphates d'adénosine, de mucopolysaccharides-sulfates et des sulfates par chromatographie sur papier bidimensionnelle et par chromatographie électrophorétique. Techniques applicables en général à la séparation des nucléotides et sulfodérivés, et des mucopolysaccharides acides.

SUMMARY

Methods are described for the separation of adenosine phosphates, mucopolysaccharide sulphates, and sulphates by two-dimensional paper chromatography and chromatoelectrophoresis. The techniques are in general applicable to the separation of nucleotides and sulpho derivatives, and of acid mucopolysaccharides.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹¹ J. E. SCOTT, *Chem. & Ind. (London)*, (1955) 1568.
- ²² J. E. SCOTT, in D. GALICK, *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 8, Interscience, New York, 1960, p. 145.
- ³³ P. ROBBINS ET F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 229 (1957) 837.
- ⁴⁴ J. BADDILEY, J. BUCHANAN ET R. LETTERS, *J. Chem. Soc.*, (1957) 1067.
- ⁵⁵ C. PASTERNAK, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 438.
- ⁶¹ J. PICARD ET P. CARTIER, *Bull. soc. chim. biol.*, 41 (1959) 563.
- ⁷⁷ G. P. KERBY, *J. Clin. Invest.*, 34 (1955) 1738.
- ⁸⁸ K. G. RIENITS, *Biochim. J.*, 53 (1953) 79.
- ⁹⁹ E. KODICEK ET G. LOEWI, *Proc. Roy. Soc. (London)*, B 144 (1955) 100.
- ¹⁰⁰ J. ADAMS, *Nature*, 186 (1960) 555.
- ¹¹¹ H. HILZ ET F. LIPMANN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 41 (1955) 880.
- ¹²² S. SUZUKI ET J. STROMINGER, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 257.
- ¹³³ L. SPOLTER ET W. MARX, *Biochim. Biophys. Acta*, 58 (1960) 123.
- ¹⁴⁴ J. EINBINDER ET M. SCHUBERT, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 591.
- ¹⁵⁵ F. D'ARRABIO ET F. LIPMANN, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 211.
- ¹⁶⁶ H. A. KREBS ET R. HEMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 172.
- ¹⁷⁷ J. HEREWIANS ET J. P. WAERMAN, *Clin. Chim. Acta*, 3 (1958) 430.

J. Chromatog., 7 (1962) 223-227