

De l'adénosine tétraphosphate

IV. Chromatographie bidimensionnelle des nucléotides sur diéthylamino-éthyl-cellulose*

L'adénosine tétraphosphate (AtétraP) est un nucléotide de l'adénine contaminant certaines préparations commerciales d'adénosine triphosphate¹⁻³ (ATP), dont il ne diffère que par la présence d'un phosphate supplémentaire en bout de chaîne⁴⁻⁷.

Ce nucléotide peut être aisément séparé des autres nucléotides de l'adénine par chromatographie sur papier⁸. Cette méthode ne permet pas de le séparer de certains autres nucléotides, en particulier de l'inosine monophosphate (IMP), du guanosine diphosphate (GDP) et du cytidine triphosphate (CTP).

Les mono-, di- et triphosphates des ribonucléosides se laissent aisément séparer sur couche mince de diéthylaminoéthyl-cellulose (DEAE-cellulose) à l'aide d'un développement à l'acide chlorhydrique dilué (RANDERATH⁹). Ce procédé permet également de séparer l'adénosine tétraphosphate de l'ATP mais non de l'uridine triphosphate (UTP) et de l'inosine triphosphate (ITP). Cette séparation peut être obtenue à l'aide d'un autre solvant utilisé par RANDERATH¹⁰ qui, par contre, ne sépare pas correctement l'adénosine tétraphosphate de l'ATP et du guanosine triphosphate (GTP).

Ce travail décrit brièvement comment utiliser ces deux développements pour réaliser une séparation satisfaisante de l'adénosine tétraphosphate des autres ribonucléoside triphosphates, au cours d'une chromatographie bidimensionnelle sur DEAE-cellulose. Le procédé permet l'analyse quantitative.

Ce travail a fait l'objet d'une communication préliminaire¹¹.

Méthodes

Produits utilisés. Tous les nucléotides proviennent de Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo., Etats-Unis d'Amérique). La cellulose pure, sans gypse (MN 300) et la DEAE-cellulose (MN 300) proviennent de Macherey, Nagel & Co. (Düren, Allemagne). Tous les autres réactifs sont des produits pro analysi à l'exception de l'acétone toute pure et de la triéthylamine B.D.H. (Poole, Angleterre).

Préparation des plaques. 8 g de DEAE-cellulose sont mis en suspension dans 250 ml HCl *N*, lavés plusieurs fois à l'aide de HCl et d'eau puis additionnés de 2 g de cellulose et amenés à 100 ml (voir STAHL¹² et BÖRNIG ET REINICKE¹³). La pâte est appliquée sous une épaisseur de 0.3 mm. Les plaques, de 20 cm de côté, sont séchées à température ordinaire, activées 40 min à 50° et conservées en présence de silicagel.

Pose des échantillons. La quantité de nucléotide appliquée est de 10 à 15 n-moles; il importe peu que la solution soit diluée (environ 1 mM) ou plus concentrée. La zone dans laquelle se répand l'échantillon peut atteindre 5 mm de diamètre sans inconvénient.

Développements. Le premier solvant, HCl 0.08 *N*, a été utilisé à la chambre froide (4°) pour éviter toute hydrolyse, pendant près de 2 h durant lesquelles le front se déplace de 12 à 13 cm. Le second solvant, conçu par MARKHAM ET SMITH¹⁴ et modi-

* Ce travail a été réalisé grâce à l'aide financière du Fonds national de la Recherche scientifique et du Fonds de la Recherche scientifique médicale de Belgique.

fié par RANDEATH¹⁰, est fait de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sat.-NaAc *M*-isopropanol (80:18:2) et a été appliqué dans une direction perpendiculaire à celle du premier, à la température du laboratoire, pendant 10 à 12 min durant lesquelles le front se déplace de 8 à 9 cm. De meilleures séparations sont obtenues lorsque ce solvant a été préparé au moins un jour à l'avance.

Les plaques acidifiées par le premier solvant sont neutralisées et lavées avant application du second solvant: par la triéthylamine à 8 vol. % dans l'acétone (1 fois) puis par l'acétone (3 fois). Il est indispensable d'effectuer cette neutralisation en laissant la solution acétonique de triéthylamine parcourir la plaque dans le sens qui sera suivi par le second solvant.

Extraction. Les tâches révélées par leur fluorescence en lumière ultraviolette (lampe "Mineralight" de Ultra-Violet Products, Inc., San Gabriel, Calif., Etats-Unis d'Amérique), sont prélevées à l'aide d'une lame de rasoir et transférées dans un petit tube de centrifugeuse auquel on ajoute 2 ml HCl 0.2 *N*. On extrait par inversions brusques et répétées sur le doigt recouvert de parafilm, centrifuge et filtre la solution sur-nageante sur verre poreux (Jena G4). L'absorbance du filtrat est mesurée à 257 et 290 nm (voir DEVIGNE *et al.*⁸), un échantillon témoin sans nucléotide étant traité de la même manière.

Résultats et discussion

Nous avons confirmé que l'acide chlorhydrique très dilué (0.02 *N*) déplace essentiellement les monophosphates des ribonucléosides, tandis que l'acide chlorhydrique plus concentré (0.04 *N*) déplace les mono- et les diphosphates; la concentration de HCl doit atteindre 0.08 *N* pour qu'on observe un déplacement appréciable des triphosphates, à froid tout au moins.

Les valeurs de R_F que nous observons sont généralement inférieures, pour ce solvant, à celles décrites par RANDEATH⁹. Nous avons constaté en particulier que le lavage répété de la DEAE-cellulose s'accompagne d'une augmentation des valeurs de R_F .

Comme on le voit au Tableau I, l'adénosine tétraphosphate se sépare correctement de l'ATP, mais migre à la vitesse de l'UTP lorsque HCl 0.08 *N* est utilisé comme seul agent de développement. Le second solvant distingue par contre l'adénosine tétraphosphate des autres nucléosides triphosphates à l'exception de l'ATP.

TABLEAU I

R_F DES NUCLÉOSIDE TRIPHOSPHATES ET DE L'ADÉNOSINE TÉTRAPHOSPHATE

Le premier solvant est HCl 0.08 *N*. Le second solvant est fait d'un mélange de sulfate d'ammonium saturé, d'acétate de sodium *M* et d'isopropanol (dans les proportions 80:18:2).

| Nucléotide | Premier solvant | Second solvant |
|--------------------------|-----------------|----------------|
| Adénosine triphosphate | 0.28 | 0.53 |
| Cytidine triphosphate | 0.36 | 0.91 |
| Guanosine triphosphate | 0.25 | 0.73 |
| Inosine triphosphate | 0.20 | 0.83 |
| Uridine triphosphate | 0.10 | 0.90 |
| Adénosine tétraphosphate | 0.09 | 0.59 |

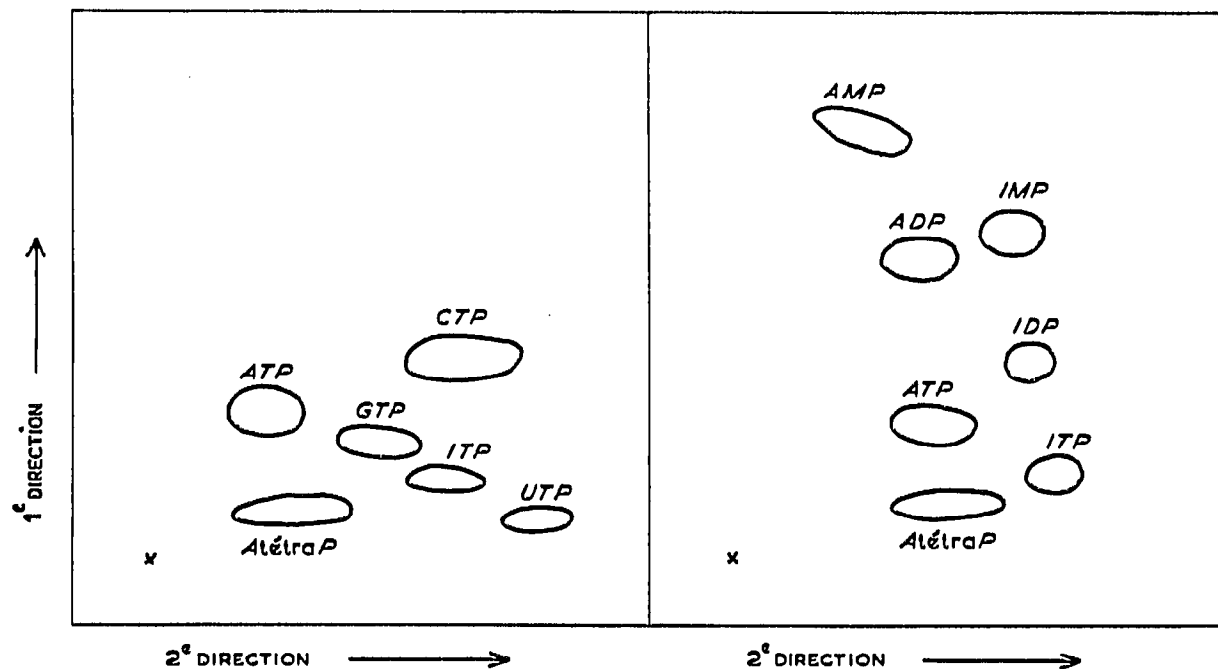


Fig. 1. Séparation des ribonucléotides sur DEAE-cellulose. Solvants utilisés: 1° direction = 0.08 N; 2° direction = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sat.-NaAc M-isopropanol (80:18:2). Abréviations utilisées: AMP, ADP, ATP et AtétraP pour les mono-, di-, tri- et tétraphosphates d'adénosine; IMP, IDP et ITP pour les mono-, di- et triphosphates d'inosine; GTP, CTP et UTP pour les triphosphates de guanosine, de cytidine et d'uridine.

Il en résulte que l'application successive et perpendiculaire des deux développements (avec neutralisation et lavage intermédiaire) doit permettre de séparer tous les constituants envisagés. C'est ce qu'illustre la Fig. 1 dans sa partie gauche; celle-ci montre aussi, dans sa partie droite, la répartition de l'adénosine tétraphosphate et des mono-, di- et triphosphates d'inosine et d'adénosine après chromatographie bidimensionnelle.

TABLEAU II

ANALYSE D'UN MÉLANGE DE NUCLÉOTIDES DE L'ADÉNINE

| Nucléotide | Chromatographie sur | | |
|--------------------------|---------------------|------------------|-------|
| | Papier* | DEAE-cellulose** | |
| | | (%) | A (%) |
| Adénosine monophosphate | 20.0 | 21.0 | 20.8 |
| Adénosine diphosphate | 21.4 | 19.5 | 21.2 |
| Adénosine triphosphate | 50.0 | 51.0 | 50.1 |
| Adénosine tétraphosphate | 7.0 | 8.6 | 8.5 |
| Adénosine pentaphosphate | 1.6 | | |

* Solvant²⁰ fait d'acide isobutyrique, d'ammoniaque N et d'acide éthylènediamine tétraacétique 0.1 M (dans les proportions 100:60:1.6); récupération de l'ordre de 100%.

** Développement (A) dans une seule direction à l'aide de HCl 0.08 N; récupération de 98-99%; (B) comme en (A) suivi, après lavage, par un développement dans la seconde direction à l'aide d'un mélange de sulfate d'ammonium saturé, d'acétate de sodium M et d'isopropanol (dans les proportions 80:18:2); récupération de 90-98%.

Le premier solvant sépare en fonction de la charge électrique (monophosphates en tête); le second solvant sépare en fonction de la nature de la base azotée du nucléotide.

La méthode proposée sépare sur couche mince, comme les méthodes de chromatographie bidimensionnelle sur papier^{15, 16} ou les méthodes combinant l'électrophorèse sur papier et la chromatographie sur papier^{17, 18}.

Une autre méthode de chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de poly(éthylèneimine)-cellulose, plus récemment proposée par RANDE-RATH ET RANDE-RATH¹⁹, n'aurait pas permis l'isolement de l'adénosine tétraphosphate.

Le Tableau II montre la comparaison des analyses d'un mélange de nucléotides par chromatographie sur papier et par chromatographie sur DEAE-cellulose. Les résultats sont tout à fait comparables. La chromatographie sur papier permet toutefois la séparation des tétra- et pentaphosphates d'adénosine.

En résumé, l'adénosine tétraphosphate et les nucléotides en général peuvent être aisément séparés et dosés par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de DEAE-cellulose.

*Laboratoire de Biochimie, Institut Supérieur
d'Education Physique, et Laboratoire de Recherches
pour la Protection des Populations Civiles,
Université de Liège, Liège (Belgique)*

K. JAROSZEWICZ*
M.-J. DEGUELDRE-GUILLAUME
C. LIÉBECQ

- 1 C. LIÉBECQ, résultats inédits.
- 2 D. H. MARRIAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 492.
- 3 C. LIÉBECQ, G. HUNEBELLE ET M. LOUIS, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 39 (1957) 813.
- 4 D. H. MARRIAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 278.
- 5 I. LIEBERMAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 3373.
- 6 C. LIÉBECQ, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 43 (1961) 331.
- 7 C. LIÉBECQ, K. JAROSZEWICZ ET A. LALLEMAND, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 43 (1961) 571.
- 8 J. DEVIGNE, M.-J. DEGUELDRE-GUILLAUME ET C. LIÉBECQ, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 44 (1962) 751.
- 9 K. RANDE-RATH, *Angew. Chem.*, 74 (1962) 484.
- 10 K. RANDE-RATH, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 6 (1961-1962) 452.
- 11 K. JAROSZEWICZ ET C. LIÉBECQ, *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, 72 (1964) 521.
- 12 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch*, Springer Verlag, Berlin, 1964, p. 35.
- 13 H. BÖRNIG ET C. REINICKE, *Acta Biol. Med. Germ.*, 11 (1963) 600.
- 14 R. MARKHAM ET J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 49 (1951) 401.
- 15 A. DEUTSCH ET R. NILSSON, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 858.
- 16 R. BERGKVIST ET A. DEUTSCH, *Acta Chem. Scand.*, 9 (1955) 1398.
- 17 R. BERGKVIST, *Acta Chem. Scand.*, 11 (1957) 1465.
- 18 R. BERGKVIST, *Acta Chem. Scand.*, 12 (1958) 752.
- 19 E. RANDE-RATH ET K. RANDE-RATH, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 126.
- 20 H. A. KREBS ET R. HEMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 172.

Reçu le 14 mars 1966

* Boursier de la Commission administrative du Patrimoine de l'Université de Liège. Adresse actuelle: Zaklad Fizjologii Akademii Medycznej, Białystok, Pologne.