

Notes

Séparation chromatographique en couche mince de la créatine, la créatinine et de leurs dérivés N-phosphorylés

Depuis les travaux de LOHMANN¹, le rôle métabolique de la créatine et de son dérivé N-phosphorylé, le phosphagène, a donné lieu à de multiples études. Par contre, la genèse métabolique de la créatinine, considérée comme un produit d'excrétion élaborée dans le muscle par voie non enzymatique, a été beaucoup moins étudiée.

CAPUTTO² avait décrit un système enzymatique catalysant la conversion de la phosphocréatine en créatinine. L'existence de ce système a été mis en doute par d'autres auteurs³. Récemment, CLARK ET WARREN⁴ ont émis l'hypothèse, basée sur des considérations de structure moléculaire, que la créatine servirait surtout d'accepteur de groupements phosphoryl- alors que le donneur serait la forme cyclique: la N-phosphoryl créatinine. La discussion d'une telle hypothèse est facilitée par l'utilisation expérimentale de ce composé. Nous avons pu disposer de ce produit, synthétisé par les Etablissements Kühlmann (Paris).

Des expériences préliminaires *in vitro* ayant montré que ce composé peut être un donneur de groupements phosphoryl riches en énergie à l'ADP⁵, nous avons été amenés à analyser le mécanisme de la réaction. Dans ce but, nous avons mis au point une technique de séparation chromatographique de micro-quantités de créatine, créatinine et de leurs dérivés phosphorylés respectifs. La séparation de ces derniers s'est avérée très difficile sur le papier. Par contre, en couche mince de cellulose, nous avons pu obtenir une séparation efficace dans de bonnes conditions de reproductibilité.

Un assez grand nombre de systèmes de migration constitués de mélanges ternaires et quaternaires, d'alcools, d'aldéhydes, de bases pyridiniques en milieu alcalin ou acide se sont révélés inefficaces, ainsi que divers systèmes essayés sur C.M., DEAE- et ECTEOLA-cellulose.

La technique décrite ci-dessous nous donne régulièrement de bons résultats:

Le support est constitué de cellulose 300 MN de Macherey, Nagel & Co. (Allemagne) lavée par l'acétone, l'eau et encore l'acétone avant séchage (21 g dans 90 ml d'eau).

Le système de migration est un mélange quaternaire: propanol-acétone-ammoniaque-eau, 5:2:4:1 (solvants organiques redistillés).

La migration ascendante dure toute la nuit en chambre froide (+ 2°), ce qui a le double avantage d'améliorer la séparation entre les dérivés phosphorylés et de réduire au minimum la dégradation du phosphagène.

Les R_F obtenus sont les suivants: créatinine: 0.80; créatine: 0.59; N-phosphoryl créatine (phosphagène): 0.46; N-phosphoryl créatinine: 0.32.

Deux procédés de révélation sont utilisés concurremment. L'un révèle les quatre composés sous forme de créatinine après rupture des liaisons phosphoryl- et déshydratation de la créatine. Les plaques, après séchage, sont laissées une heure à 105°. Après

refroidissement, elles sont colorées par pulvérisation d'une solution picrosodique: (solution saturée d'acide picrique 6 ml, soude normale 6 ml, et eau 8 ml).

Les taches jaunes apparaissent plus nettement après quelques minutes d'étuve à 37°.

L'autre procédé révèle la créatine et le phosphagène après rupture de la liaison phosphoryl- par la réaction de BARRITT⁶. Après séchage, les plaques sont laissées 10 minutes à l'étuve à 100°. Le système de révélation utilisé a la composition suivante:

(1) α -naphтол: 0.20 g dans 20 ml de solution alcaline (carbonate de soude: 80 g; soude: 30 g; eau: 500 ml);

(2) diacétyle: solution à 0.5 g par litre. Les deux solutions sont mélangées extemporanément: 2 volumes de solution (1) pour 1 volume de solution (2).

Les taches roses apparaissent sur le chromatogramme, après révélation, à l'étuve à 37°.

En raison de la plus grande stabilité de la N-phosphoryl créatinine, celle-ci peut être plus facilement mise en évidence, lorsque le phosphagène est en excès (dans le tissu musculaire en particulier), après dégradation sélective de ce dernier à pH 2 (acide chlorhydrique) pendant une heure à 37°. Le pH est ramené à 7 avant chromatographie.

Nous remercions les Etablissements Kühlmann de leur aide qui a permis la réalisation de ce travail; Madame MOUNIER-PIRON de son aide technique toujours efficace.

*Laboratoire de Chimie Biologique,
Ecole de Médecine, Université de Rouen,
Rouen (France)*

G. BROUN

1 K. LOHMANN, *Biochem. Z.*, 271 (1934) 264.

2 R. CAPUTO, *Arch. Biochem. Biophys.*, 52 (1954) 280.

3 J. F. VAN PILSUM ET B. HILLER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 85 (1959) 483.

4 V. M. CLARK ET S. G. WARREN, *Nature*, 199 (1963) 657.

5 Résultats non publiés.

6 M. M. BARRITT, *J. Pathol. Bacteriol.*, 42 (1936) 441.

Reçu le 19 janvier 1966

J. Chromatog., 25 (1966) 161-162