

CHROM. 5859

Chromatographie sur couche mince de bases et désoxyribonucléosides analogues puriques et pyrimidiques

Au cours de l'étude de la réaction de transfert du groupe désoxyribosyl d'une base purique (ou pyrimidique) à une base purique (ou pyrimidique), catalysée par un extrait de *Lactobacillus helveticus*, on a fait appel à la chromatographie sur couche mince pour la détermination qualitative et quantitative des produits formés. Les bases et désoxyribonucléosides ont fait l'objet de nombreuses études chromatographiques tant sur papier¹⁻³ que sur couche mince⁴. Nous avons donc cherché à adapter au présent problème quelques uns des solvants couramment employés. FINCK ET ADAMS² ont utilisé sur papier les solvants: (I) (phase organique) acétate d'éthyle-eau-acide formique (60:35:5) et (II) alcool butylique tertiaire-méthyl-éthyl cétone-eau-ammoniaque ($d = 0.920$) (40:30:20:10). D'après les données de WYATT¹ nous avons utilisé les variantes suivantes: (III) *n*-butanol-eau-ammoniaque ($d = 0.920$) (86:10:5); (IV) isopropanol-eau-ammoniaque ($d = 0.920$) (70:20:10); (V) solution aqueuse à 5% de phosphate disodique saturé d'alcool isoamylique; (VI) eau distillée pH 6-7.

Au moyen de ces six solvants employés sur couche mince il a été possible de caractériser sans ambiguïté les désoxyribonucléosides de 33 bases analogues. Les R_f de 35 bases puriques et 21 bases pyrimidiques ont également été déterminés. A l'exception des désoxyribonucléosides naturels et de quelques rares désoxyribonucléosides analogues, les dérivés étudiés ici n'existent pas dans le commerce et pour la plupart n'avaient jamais été préparés. Il était donc nécessaire de faire un contrôle d'identité de ces composés aussi rigoureux que possible. À cet effet ils ont été préparés par transfert d'un groupe [¹⁴C]désoxyribosyl sur la base analogue (B_A) correspondante selon la réaction:



$TdR^* =$ Thymidine-[¹⁴C]désoxyribosyl.

Matériel et méthodes

Bases naturelles et analogues. Les produits obtenus ont été fournis par Sigma, Calbiochem, Aldrich ou Schwarz. La pureté en a été contrôlée par chromatographie sur couche mince dans les six solvants indiqués. Sur 56 composés commerciaux, 23 se sont révélés impurs et ont été purifiés par chromatographie sur papier en utilisant les solvants appropriés. Les produits ont été considérés purs lorsqu'ils ne donnaient qu'une tache dans les six solvants utilisés en couche mince et que leur spectre UV était conforme aux données de la littérature⁶ aux trois pH habituels (pH \sim 1,0; pH = 6.5; pH \sim 10.0).

Chromatographie sur couche mince. Les plaques de verre usuelles (20 \times 20 cm) soigneusement dégraissées sont recouvertes d'une couche de cellulose MN 300 de 250 μ m d'épaisseur. De façon générale, aucun traitement activateur n'a été employé. Après dépôt des solutions en touches fines le développement est réalisé en cuves de verre étanches placées dans un volume de température uniforme de 22-24°. Après séchage, les plaques sont autoradiographiées (film Kodirex) pour repérer les positions des composés

radioactifs (désoxyribonucléosides). De même, les positions de tous les composés visibles en lumière UV (254 m μ) sont repérées et les R_F mesurés.

Préparation de thymidine radioactive (thymidine-[¹⁴C]désoxyribosyl). On prépare d'abord* la désoxyinosine marquée au ¹⁴C sur désoxyribosyl par incubation en quantités équimolaires de désoxyadénosine uniformément marquée (produit du Commissariat à l'Énergie Atomique, Saclay) et hypoxanthine dans un tampon phosphate 0.01 M de pH 6.0 en présence de *trans*-N-désoxyribosylase (E.C. 2.4.2.6.); rendement en désoxyinosine 45%. Les produits de la réaction sont séparés sur papier (Whatman 3) avec l'eau comme solvant de développement. La désoxyinosine obtenue est ensuite incubée avec de la thymine (rapport donneur-accepteur (1:1) dans le même tampon en présence de *trans*-N-désoxyribosylase et xanthine oxydase (E.C. 1.2.3.2.). Le rendement en thymidine par rapport à la désoxyinosine employée est toujours supérieur à 75%. Les produits sont aisément séparés et purifiés par deux chromatographies successives sur papier (Whatman 3) développées par le solvant II puis par le solvant VI.

Ultérieurement la désoxyinosine- [¹⁴C] a été préparée très simplement par désamination de la désoxyadénosine à l'aide d'une préparation d'adénosine-amino-hydrolase de muqueuse intestinale (E.C. 3.5.4.4a) (Sigma 200 U/mg) à pH 7.5 dans un tampon phosphate 0.05 M. Dans ces conditions la désoxyinosine obtenue est uniformément marquée comme le produit de départ mais le rendement est pratiquement quantitatif. Le transfert du désoxyribosyl [¹⁴C] sur la thymine permet d'obtenir comme précédemment la thymidine-[¹⁴C]désoxyribosyl.

TABLEAU I

 R_F DES BASES ET DÉSOXYRIBOSIDES PURIFIÉS

Solvants: (I) Acétate d'éthyle-eau-acide formique (60:35:5); (II) *tert.*-butanol-méthyl-éthyl-cétone-eau-ammoniaque 12 N (40:30:20:10); (III) *n*-butanol-eau-ammoniaque 12 N (86:10:5); (IV) isopropanol-eau-ammoniaque 12 N (70:20:10); (V) solution 5% de Na₂HPO₄ saturé avec l'alcool isoamylique; (VI) eau distillée pH \approx 6 à 7.

Substances	Solvants					
	I	II	III	IV	V	VI
Acide urique	0.03	0.28	0.04	0.27	0.29	0.67
Adénine	0.02	0.56	0.39	0.51	0.36	0.34
Adénine-désoxyriboside	0.10	0.73	0.47	0.64	0.46	0.52
Amino-imidazole-carboxamide	0.04	0.62	0.33	0.59	0.56	0.56
2-Amino, 6-méthylmercapto-purine	0.43	0.70	0.54	0.66	0.20	0.22
2-Amino, 6-méthylmercapto-purine-désoxyriboside	0.59	0.85	0.64	0.81	0.33	0.43
2-Amino-purine	0.07	0.48	0.28	0.53	0.36	0.41
2-Amino-purine-désoxyriboside	—	0.75	0.45	0.68	0.51	0.58
Amino-pyrrolo pyrimidine	0.18	0.91	0.65	0.78	0.23	0.23
8-Aza, 2,6-diamino-purine	0.07	0.27	0.04	0.24	0.17	—
8-Aza, 2,6-diamino-purine-désoxyriboside	—	0.74	0.29	0.63	0.36	0.40
8-Azaguanine	0.07	0.28	0.02	0.27	0.35	0.43
8-Azaguanine-désoxyriboside	0.08	0.52	0.05	0.52	0.57	0.64
8-Azaxanthine	0.22	0.27	0.03	—	0.35	0.73

(Continué à p. 390)

* La conversion directe A* dr* + T \rightarrow Tdr* donne un faible rendement?; il est donc préconisé d'utiliser la désoxyinosine: l'hypoxanthine libérée est oxydée par la xanthine oxydase en acide urique qui n'est pas un substrat de la réaction de transfert. L'équilibre est ainsi déplacé vers la formation quantitative de Tdr*.

TABLEAU I (continué)

Substances	Solvants					
	I	II	III	IV	V	VI
8-Azaxanthine-désoxyriboside	—	0.70	0.09	0.60	0.50	—
6-Benzylamino-purine	0.77	0.91	0.90	0.94	0.23	0.25
6-Benzylamino-purine-désoxyriboside	0.97	0.96	0.91	0.94	0.31	0.39
Caféine	0.86	0.89	0.75	0.91	0.67	0.76
6-Chloroguanine	—	—	0.30	0.68	0.35	0.35
6-Chloropurine	0.76	0.75	0.44	0.80	0.34	0.61
6-Chloropurine-désoxyriboside	0.61	0.91	0.71	0.88	0.66	0.77
8-Chlorotheophylline	0.93	0.82	0.41	0.78	—	0.75
2,6-Diamino-purine	0.03	0.49	0.17	0.40	0.24	0.15
2,6-Diamino-purine-désoxyriboside	0.03	0.74	0.23	0.56	0.38	0.36
2,6-Dichloropurine	0.95	0.87	0.66	0.83	0.25	0.61
2,6-Dichloropurine-désoxyriboside	—	0.94	0.88	0.92	0.65	0.74
Guanine-désoxyriboside	0.04	0.43	0.16	0.43	0.55	0.57
6-n-Hexylamino-purine	0.86	0.95	0.92	0.95	0.07	0.10
6-n-Hexylamino-purine-désoxyriboside	0.96	0.98	0.94	0.96	0.15	0.19
6-n-Hexyl-mercapto-purine	0.94	0.95	0.94	0.95	0.03	0.02
6-n-Hexyl-mercapto-purine-désoxyriboside	0.96	0.96	0.94	0.95	0.03	0.06
2-Hydroxy, 6-mercapto-purine	0.23	0.38	0.06	0.33	0.30	0.32
2-Hydroxy, 6-mercapto-purine désoxyriboside	0.17	0.50	0.05	0.47	0.41	—
2-Hydroxy, 6-methyl-purine	0.05	0.43	0.09	0.46	0.57	0.65
Hydroxy pyrrolo-pyrimidine	0.37	0.76	0.53	0.69	0.45	0.48
Hypoxanthine	0.00	0.39	0.15	0.44	0.54	0.60
Hypoxanthine-désoxyriboside	0.06	0.49	0.15	0.53	0.69	0.75
2-Mercapto, 6-hydroxy-purine	0.18	0.43	0.08	0.37	0.10	0.31
6-Mercapto-guanine	0.08	0.31	0.06	0.30	0.29	0.23
6-Mercapto-guanine-désoxyriboside	0.07	0.38	0.08	0.40	0.53	0.46
2-Mercapto-purine	0.04	0.63	0.15	0.58	0.48	0.49
2-Mercapto-purine-désoxyriboside	0.04	—	0.15	—	—	0.71
6-Mercapto-purine	0.19	0.50	0.17	0.48	0.37	0.37
6-Mercapto-purine-désoxyriboside	0.12	0.49	0.12	0.51	0.63	0.65
6-Methoxy-purine	0.59	0.69	0.47	0.70	0.48	0.60
6-Methoxy-purine-désoxyriboside	—	0.88	0.70	0.87	0.67	0.78
6-Methyl-amino-purine	—	0.69	0.53	0.66	0.34	0.42
6-Methyl-amino-purine-désoxyriboside	—	0.85	0.64	0.84	0.50	0.61
7-Methyl-guanine	0.03	0.31	0.13	0.33	0.37	0.44
6-Methyl-purine	0.32	0.65	0.41	0.69	0.50	0.63
6-Methyl-purine-désoxyriboside	—	0.85	0.65	0.85	0.70	0.80
6-Phenylamino-purine	0.94	0.93	0.84	0.85	0.08	0.14
6-Phenylamino-purine-désoxyriboside	0.96	0.95	0.86	0.93	0.20	0.25
Purine	0.30	0.66	0.37	0.70	0.52	0.67
Purine-désoxyriboside	—	0.84	0.58	0.81	0.72	0.80
Théobromine	0.47	0.61	0.33	0.58	0.59	0.69
Théophylline	0.65	0.68	0.36	0.70	0.51	0.69
Xanthine	0.09	0.30	0.06	0.31	0.41	0.48
Xanthine 9-(β -D-désoxyriboside)	0.05	0.43	0.05	0.47	0.56	0.72
Xanthine 7-(β -D-désoxyriboside)	0.05	0.39	0.05	0.43	0.58	0.64

Préparation des désoxyribonucléosides analogues. En présence de *trans*-N-désoxyribosylase on obtient le transfert du groupe [14 C]désoxyribosyl de la thymidine à l'une quelconque des bases analogues convenables. La formation d'un dérivé radioactif est considérée comme une indication valable que la base employée est substrat de la réaction et que le produit est le désoxyribonucléoside correspondant. Dans les cas douteux le produit est isolé et utilisé comme donneur en présence d'une base

TABLEAU II

 R_F DES BASES ET DÉSOXYRIBOSIDES PYRIMIDIQUES

Solvants: (I) Acétate d'éthyle-eau-acide formique (60:35:5); (II) *tert.*-butanol-méthyl-éthyl-cétone-eau-ammoniaque 12 N (40:30:20:10); (III) *n*-butanol-eau-ammoniaque 12 N (86:10:5); (IV) isopropanol-eau-ammoniaque 12 N (70:20:10); (V) solution 5% de Na₂HPO₄ saturé avec l'alcool isoamylique; (VI) eau distillée pH \approx 6 à 7.

Substances	Solvants					
	I	II	III	IV	V	VI
Acide barbiturique	0.40	0.42	0.07	0.47	0.60	0.93
Acide isobarbiturique	0.15	0.16	0.02	0.14	0.71	0.70
Acide isobarbiturique-désoxyriboside	0.09	0.23	0.03	0.24	—	—
2-Amino-pyrimidine	0.55	0.86	0.72	0.79	0.69	0.70
4-Amino-pyrimidine	—	0.83	0.65	0.79	0.62	—
6-Azathymine	0.75	0.50	0.17	0.54	0.74	0.81
6-Azauracile	0.59	0.46	0.12	0.51	0.77	0.80
6-Azauracile-désoxyriboside	—	0.58	0.17	—	—	—
5-Bromouracile	0.55	0.63	0.27	0.60	0.58	0.67
5-Bromouracile-désoxyriboside	—	0.60	0.23	0.58	0.76	0.78
6-Chlorothymine	0.82	0.73	0.38	0.73	0.52	0.75
Cytosine	0.03	0.52	0.27	0.52	0.71	0.60
Cytosine-désoxyriboside	0.02	0.63	0.29	0.62	0.77	0.74
4,6-Diamino-pyrimidine	0.07	0.67	0.43	0.62	0.46	0.24
4,6-Dihydroxy-pyrimidine	0.15	0.31	0.06	0.41	0.73	0.89
5-Fluouracile	0.52	0.47	0.13	0.53	0.75	0.79
5-Fluouracile-désoxyriboside	—	0.49	0.10	0.57	0.85	0.85
2-Hydroxy, 4-méthyl-pyrimidine	0.13	0.63	0.37	0.65	0.85	0.90
2-Hydroxy-pyrimidine	0.16	0.50	0.22	0.57	0.85	0.88
4-Hydroxy-pyrimidine	0.36	0.55	0.25	0.62	0.77	0.85
4-Hydroxy-pyrimidine-désoxyriboside	—	0.83	0.58	0.82	—	—
Isocytosine	0.10	0.47	0.25	0.47	0.74	0.70
5-Méthyl-cytosine	0.03	0.62	0.34	0.61	0.71	0.57
5-Nitrouracile	0.45	0.64	0.19	0.56	0.55	0.76
2-Thiocytosine	—	—	—	0.52	0.60	0.64
Thymine	0.50	0.65	0.44	0.65	0.72	0.77
Thymidine	0.35	0.72	0.42	0.70	0.79	0.83
Uracile	0.31	0.57	0.29	0.53	0.72	0.72
Uracile-désoxyriboside	0.24	0.64	0.28	0.56	0.80	0.84

naturelle dont les caractéristiques chromatographiques du désoxyribonucléoside sont bien définies.

Résultats

L'ensemble des mesures est rassemblé dans les deux tableaux de R_F . Chaque valeur est la moyenne de plusieurs mesures de migrations indépendantes. Un certain nombre de valeurs trop dispersées n'ont pas été indiquées.

Les solvants utilisés ici ne représentent que quelques systèmes parmi bien d'autres, cependant l'expérience montre qu'ils permettent pratiquement toujours de séparer les mélanges habituels. En particulier l'eau distillée (solvant VI) sépare très facilement les désoxyribonucléosides des bases correspondantes. Il en est de même du solvant V et dans une moindre mesure du solvant IV. Par contre, les solvants I et II sont plus généralement employés pour la séparation des bases entre elles.

De plus on remarquera que tous ces solvants ont un pH assez élevé pour ne pas risquer d'hydrolyser les désoxyribonucléosides au cours du développement.

L'ensemble de ces solvants s'est donc révélé très utile notamment dans l'étude de la spécificité de la *trans*-N-désoxyribosylase.

*Département de Biologie,
Service de Biophysique,
Centre d'Études Nucléaires de Saclay,
B.P. no. 2-91-Gif-sur-Yvette (France)*

J. HOLGUIN-HUESO

R. CARDINAUD

- 1 G. R. WYATT, dans E. CHARGAFF ET J. N. DAVIDSON (Éditeurs), *The Nucleic Acids*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1955, p. 243.
- 2 K. FINCK ET W. ADAMS, *J. Chromatogr.*, 22 (1966) 118.
- 3 W. J. REEVES, JR., A. S. SEID ET D. M. GREENBERG, *Anal. Biochem.*, 30 (1969) 474.
- 4 G. PATAKY, dans J. C. GIDDINGS ET R. A. KELLER (Éditeurs), *Advances in Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 1968, p. 47.
- 5 A. W. SCHRECKER, D. W. JACOBSEN ET J. KIRCHNER, *Anal. Biochem.*, 26 (1968) 474.
- 6 M. J. KAMLET, dans J. P. PHILLIPS ET F. C. NACHOD (Éditeurs), *Organic Electronic Spectral Data*, Vol. 4, Interscience Publishers, New York, 1963.
- 7 R. CARDINAUD ET K. V. VISWANATHAN, *J. Label. Compounds*, 2 (1966) 35.

Reçu le 20 octobre, 1971

J. Chromatogr., 66 (1972) 388-392