

CHROM. 653I

Notes

Utilisation du Séphadex G-25 comme échangeur d'ions

Application à la séparation des dérivés indoliques

La séparation des molécules de taille différente par filtration sur gel de Sephadex est une technique très répandue. Les solvants d'éluion généralement utilisés sont, soit des solvants salins, soit des solvants volatils de faible force ionique et ayant un pH voisin de la neutralité.

La rétention particulière des molécules de structure indolique permet de les séparer de molécules de taille voisine. C'est ainsi que l'on peut isoler la 5-hydroxytryptamine (sérotonine) d'un mélange contenant les acides aminés libres (sauf le tryptophane) et des peptides de faible masse moléculaire par une simple gel filtration sur une colonne de Sephadex G-25 équilibré dans un tampon phosphate pH 7.4 0.05 M

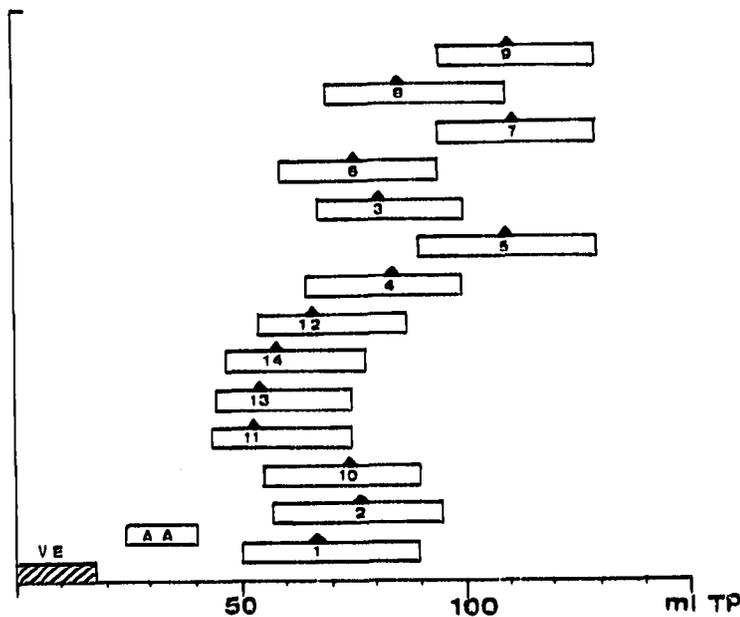


Fig. 1. Chromatographie individuelle de différents dérivés indoliques sur une colonne de gel de Sephadex G-25 (27 cm × 1.5 cm) équilibré dans le tampon phosphate pH 7.4 0.05 M élue par ce même solvant. Chaque dérivé indolique est affecté d'un numéro: 1 = acide 5-hydroxyindole acétique; 2 = acide 5-méthoxyindole acétique; 3 = 5-hydroxytryptophane; 4 = mélatonine; 5 = N-acétyl 5-hydroxytryptamine; 6 = tryptophol; 7 = 5-hydroxytryptophol; 8 = 5-méthoxytryptophol; 9 = 5-hydroxyindole acétaldéhyde; 10 = 5-hydroxytryptamine; 11 = tryptamine; 12 = 5-méthoxytryptamine; 13 = N,N-diméthyl 5-méthoxytryptamine; 14 = N,N-diméthyl 5-hydroxytryptamine. Les maxima des courbes d'éluion sont matérialisés par la pointe noire. La détection des composés est faite par mesure de l'absorption dans l'UV à 276 nm. AA = Acides aminés, VE = volume d'exclusion, TP = tampon phosphate.

(Fig. 1). Cette technique devient inapplicable si l'on veut séparer entre eux les dérivés indoliques (Fig. 1).

FELDSTEIN ET KAM KINA WONG¹ ont partiellement résolu le problème en proposant une méthode d'extraction sélective permettant de fractionner un mélange de dérivés indoliques en trois groupes: acide—acide 5-hydroxyindole 3-acétique; neutres—5-hydroxytryptophol et 5-hydroxyindole 3-acétaldéhyde et dérivé basique—5-hydroxytryptamine.

D'autres auteurs comme MACON *et al.*² et ECCLESTON *et al.*³ séparent ces trois familles de composés par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Dowex ou d'Amberlite CG 50. Ces techniques présentent l'inconvénient d'utiliser des solvants acides ou basiques relativement forts.

La grande fragilité du premier dérivé d'oxydation de la sérotonine formé dans les tissus—le 5-hydroxyindole 3-acétaldéhyde—nous a conduit à rechercher une technique simple, rapide et peu drastique permettant d'étudier quantitativement la formation de ce métabolite.

L'utilisation du Sephadex G-25 avec les solvants ioniques est basée uniquement sur la propriété de tamis moléculaire. Or ce produit possède des propriétés d'échangeur d'ions assez importantes, dues à la présence de radicaux carboxyliques (R-COO⁻) dans sa molécule. Celles-ci sont totalement inexploitablees lorsque l'on opère dans un solvant ionique. Par contre si l'on remplace ce dernier par de l'eau bidistillée désionisée (pH environ 6,5) la capacité d'échangeur d'ions devient utilisable.

Cette constatation nous a permis de mettre au point une technique simple de fractionnement d'un mélange de dérivés indoliques.

Matériels et méthodes

Le gel de Sephadex est préparé selon la méthode classique: gonflement de la poudre (Sephadex G-25 superfine) dans l'eau bidistillée pendant 5 h à 20°. Après élimination des particules en suspension la colonne de chromatographie est remplie du gel, qui sédimente sous pression normale; les dimensions de la colonne de gel sont de 27 cm × 1,5 cm et le volume d'exclusion de 17 ml. Le solvant d'équilibrage est l'eau bidistillée.

Dans une première série d'expériences, nous avons chromatographié individuellement un certain nombre de dérivés indoliques. Deux μ moles de chaque composé sont dissoutes dans 2,5 ml de tampon phosphate, pH 7,4 0,05 M, puis déposées sur la surface du gel. La colonne est éluée successivement par 140 ml d'eau bidistillée puis 100 ml de tampon phosphate. La détection des composés dans l'éluat est réalisée par mesure de l'absorption dans l'UV à 276 nm.

Dans une seconde partie nous avons tenté d'appliquer cette technique à la séparation de trois constituants d'un mélange de dérivés indoliques contenus dans un milieu biologique complexe. Deux μ moles d'acide 5-hydroxyindole acétique, de 5-hydroxytryptophol, de 5-hydroxytryptamine (forme créatinine sulfate) sont mélangées à 2,5 ml d'un surnageant de centrifugation à 800 × g obtenu à partir d'un homogénat de cerveau de rat à 10% dans le tampon phosphate. Les protéines sont rapidement précipitées par addition de 100 μ l d'acide perchlorique 15 N. Après une centrifugation à 5000 t/min* pendant 5 min, le surnageant est prélevé et le culot lavé deux fois par 0,5 ml de tampon phosphate. Les surnageants de centrifugation obtenus

* t = Revolution.

sont rassemblés, et l'acide perchlorique neutralisé par addition de 280 μ l de potasse aqueuse 5 N. Le perchlorate de potassium précipite à froid, puis est éliminé par centrifugation. Le surnageant est chromatographié selon la technique décrite. 2.5 ml du même extrait biologique, ne contenant pas de dérivés exogènes, sont soumis au même traitement de façon à éliminer la pollution due aux composés endogènes absorbants dans l'UV à 276 nm. La pureté chimique des fractions obtenues dans l'éluat de chromatographie a été contrôlée de la façon suivante. Après concentration par évaporation sous vide à 50°, une partie aliquote de chaque fraction est soumise à une chromatographie de partage descendante sur papier Whatman No. 1 dans le système de solvants isopropanol-ammoniacal à 5% (8:2) durant 20 h à 20°. Après séchage, le chromatogramme est révélé au réactif des indoles: solution de paradiméthylaminocinnamaldéhyde à 2% dans le mélange HCl 6 N-éthanol⁴.

Résultats et discussion

La chromatographie séparée de chaque dérivé indolique montre un fractionnement de ces analogues structuraux en trois groupes (Fig. 2).

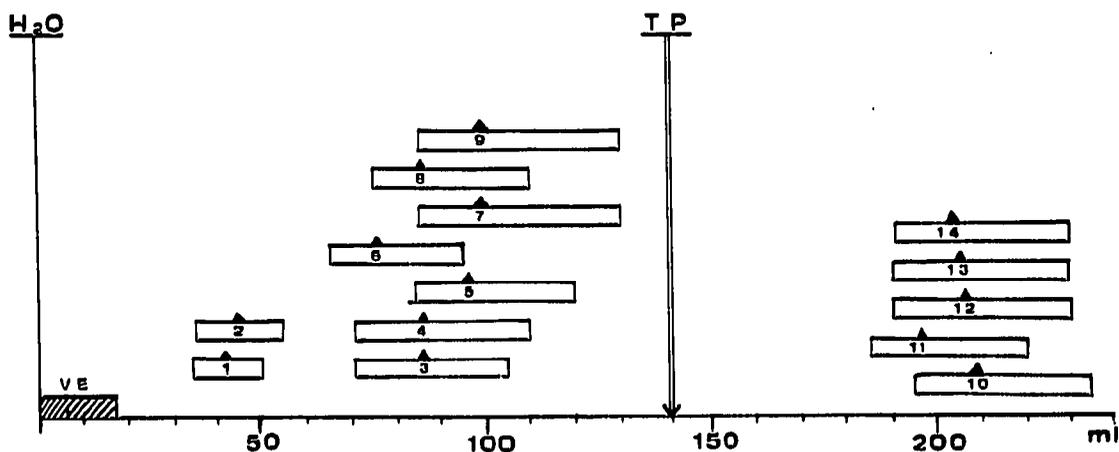


Fig. 2. Chromatographie individuelle de différents dérivés indoliques sur une colonne de Sephadex G-25 (27 cm \times 1.5 cm) équilibrée dans l'eau bidistillée désionisée; l'élution des produits est obtenue par l'eau bidistillée (140 ml) puis le tampon phosphate (100 ml). Les conventions de représentation adoptées: la correspondance chiffre-composés indoliques, les courbes d'élution et la méthode de détection, sont celles de la Fig. 1.

(1) Les acides 5-hydroxy- et 5-méthoxyindole acétique sont rapidement élués par l'eau. Ces acides faibles étant fortement dissociés en solution aqueuse diluée (forme R-COO⁻), le phénomène d'échange d'ions provoque leur exclusion rapide, les groupements acides du Sephadex étant sous une forme ionisée R-COO⁻. (L'effet de tamis moléculaire est dans ce cas très faible.)

(2) Les composés à caractère neutre—le 5-hydroxytryptophane (non dissocié à pH 6.5), le tryptophol, le 5-hydroxytryptophol, le 5-méthoxytryptophol, la N-acétyl 5-hydroxytryptamine, la mélatonine et le 5-hydroxyindole acétaldéhyde—ont un comportement voisin de celui observé lors de la gel filtration dans un solvant ionique (Fig. 1). Ces dérivés n'étant pas ionisés dans l'eau, soit par absence de groupement ionisable, soit en raison du pH de l'eau, seul le phénomène de rétention dans

la maille du Sephadex, due à la structure indolique de ces molécules, est mis en cause.

(3) Les dérivés indoliques à caractère basique—la tryptamine, la 5-hydroxytryptamine, la 5-méthoxytryptamine, la *N,N*-diméthyl 5-hydroxytryptamine (bufoténine) et la *N,N*-diméthyl 5-méthoxytryptamine—ne sont pas élués par l'eau mais par le tampon phosphate. À pH 6.5 en solution aqueuse diluée, les fonctions amines basiques sont fortement dissociées (forme N^+) et l'adsorption des composés sur le Sephadex par phénomène d'échange d'ions est totale. Les ions Na^+ et K^+ du tampon phosphate viennent déplacer ces cations et libérer les dérivés indoliques aminés. À ce facteur, vient s'ajouter la rétention importante sur le tamis moléculaire. En effet, si, seul l'échange d'ions intervenait, l'élué de ces produits par le tampon phosphate aurait lieu beaucoup plus rapidement, le volume d'exclusion de la colonne de gel n'étant que de 17 ml.

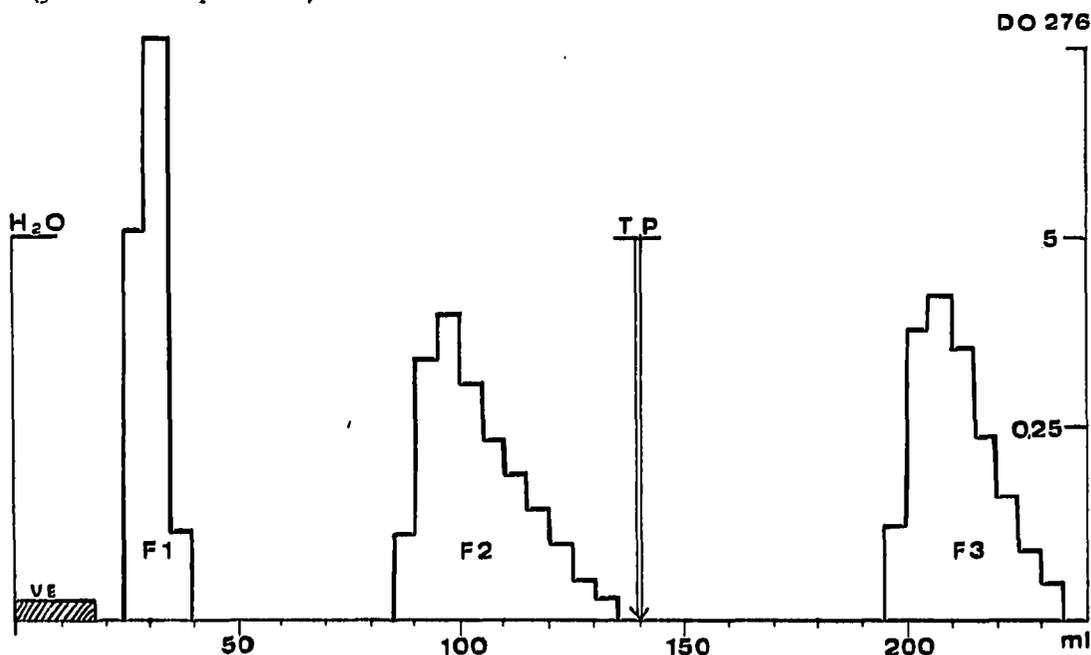


Fig. 3. Chromatographie d'un mélange de trois dérivés indoliques et d'une solution de protéines d'un milieu biologique dans le tampon phosphate, sur une colonne de gel de Sephadex G-25 (27 cm \times 1.5 cm) équilibré dans l'eau (après désécation des protéines à l'acide perchlorique). Les solvants d'élution sont: eau bidistillée (140 ml), tampon phosphate (100 ml). Détection des produits par mesure de l'absorption UV à 276 nm.

La séparation des constituants d'un mélange de trois dérivés indoliques contenus dans un milieu biologique a été réalisée selon cette technique. La Fig. 3 montre la présence de trois fractions parfaitement séparées—F1, F2 et F3—dans l'éluat de chromatographie.

La chromatographie de partage sur papier permet d'identifier respectivement dans la fraction F1 l'acide 5-hydroxyindole acétique (R_F 0.32), dans la fraction F2 le 5-hydroxytryptophol (R_F 0.84) et la 5-hydroxytryptamine (R_F 0.50) dans la fraction F3. Chacune de ces fractions est homogène quant à sa composition en dérivé indolique.

Nous avons évalué les pertes en dérivés indoliques lors de ces différentes manipulations. La chromatographie sur colonne de Sephadex G-25 en milieu aqueux, permet de récupérer $95 \pm 2\%$ de chaque molécule indolique. La précipitation des protéines par addition d'acide perchlorique, suivie de l'élimination du perchlorate de potassium, n'entraîne pas de perte supérieure à 5%. Par contre, si l'on utilise l'acide trichloracétique comme agent déféquant, les pertes atteignent 15% et l'éluion de l'acide 5-hydroxyindole acétique se trouve considérablement retardée (élution entre le 60ème et le 85ème ml).

Ces résultats sont confirmés par l'emploi de molécules radioactives à très faible concentration. L'utilisation de cette méthode de filtration directe d'un milieu biologique contenant des molécules indoliques dans le but de les séparer en trois groupes, entraîne une pollution de la fraction F1 (dérivés acides) par les molécules de faible masse moléculaire telles que les acides aminés et les petits peptides neutres et acides. Cet inconvénient peut facilement être évité, si l'on souhaite l'obtention d'une fraction purifiée, en soumettant préalablement l'extrait à une gel filtration sur Sephadex G-25 équilibré dans le tampon phosphate, qui sépare les petites molécules des composés indoliques (Fig. 1). La fraction F2 obtenue sur les colonnes aqueuses ne semble pas devoir être polluée, sauf dans le cas particulier de la présence dans l'extrait, de molécules neutres présentant une adsorption analogue à celle des indoles sur le Sephadex.

Les petites molécules à caractère basique (acides aminés et peptides) subissent également l'effet d'échange d'ions et sont, de ce fait, retenues dans la maille. Elles ne sont, cependant, pas susceptibles de polluer la fraction F3 car elles sont éluées beaucoup plus rapidement par le tampon phosphate.

Un élément important de la technique est la facilité de régénération du gel. Il suffit de le laver par 200 ml d'eau bidistillée, de manière à chasser totalement les ions contenus dans la maille. Le gel se trouve ainsi rééquilibré et prêt à une nouvelle utilisation.

Conclusion

L'utilisation des deux propriétés du Sephadex:—capacité d'échangeur d'ions associée au tamisage moléculaire—permet d'en augmenter sensiblement le champ d'application. Le problème posé par la séparation des constituants d'un mélange de composés indoliques, constitue un cas particulier très favorable, ceci en raison de la structure de ces molécules.

Cette technique trouve une application immédiate dans l'étude de l'action des monoamines oxydases tissulaires sur la 5-hydroxytryptamine. Elle permet une analyse quantitative simple et rapide des produits d'oxydation de cette amine.

Laboratoire de Biochimie, U.E.R. Sciences Biologiques,
Avenue du Général Leclerc, 35031-Rennes Cedex (France)

A. LE CAM*

- 1 A. FELDBSTEIN ET NAM KINA WONG, *Life Sci.*, 4 (1965) 183.
- 2 J. B. MACON, L. SOROLOFF ET J. GLOWINSKI, *J. Neurochem.*, 18 (1971) 323.
- 3 D. ECCLESTON, W. H. READING ET M. RITCHIE, *J. Neurochem.*, 16 (1969) 274.
- 4 M. STRELL ET U. A. KALOJANOFF, *Chem. Ber.*, 87 (1954) 1025.

Reçu le 30 novembre 1972

* L'adresse actuelle: Unité de Recherche Hépatologique U 49, I.N.S.E.R.M., Hôpital de Pontchaillou, 35 000 Rennes, France.