

CHROM. 11,505

## Note

---

### Nouvelle méthode de séparation de nucléosides dérivés de l'adénosine par chromatographie liquide à haute performance

#### Application au dosage de la S-adénosyl-L-homocystéine-hydrolase du foie de rat

B. E. CHABANNES, J. N. BIDARD, N. N. SARDA et L. A. CRONENBERGER

*Institut National des Sciences Appliquées, Service de Chimie Biologique, Bâtiment 406, 20 Avenue Albert Einstein, 69621 Villeurbanne (France)*

(Reçu le 25 septembre 1978)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été récemment utilisée par Schatz *et al.*<sup>1</sup> pour séparer la S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) de ses catabolites (adénosine, inosine, hypoxanthine, xanthine, acide urique) produits dans divers organes de rat et de souris, et aussi pour doser l'activité enzymatique SAH-hydrolase (EC 3.3.1.1.).

Dans la méthode de ces auteurs, la séparation est obtenue par chromatographie en phase inversée et en milieu alcalin. Elle nécessite un changement du solvant d'élution en cours d'analyse. Le dosage de l'activité SAH-hydrolase dans le sens hydrolytique implique l'utilisation de l'adénosine désaminase pour déplacer l'équilibre vers l'adénosine: en définitive, on mesure la concentration de l'inosine.

La méthode que nous proposons permet un dosage rapide de la SAH et de ses analogues structuraux, ainsi que de l'activité SAH-hydrolase. Elle consiste à réaliser une HPLC avec appariement d'ions (paired ion chromatography, PIC). La SAH, après appariement avec un acide alcane sulfonique (contre-ion) forme un complexe neutre convenablement retenu par la phase stationnaire non-polaire. Le dosage de l'activité SAH-hydrolase, qui peut être importante pour la régulation du taux de SAH dans les tissus animaux, est réalisé dans le sens de la synthèse thermodynamiquement plus favorable<sup>2,3</sup>, à partir de l'adénosine et de DL-homocystéine. Cette manière de procéder, qui n'engage pas deux réactions enzymatiques consécutives, autorise, par exemple, l'étude de l'inhibition de la SAH-hydrolase par des molécules dont la structure est voisine de l'adénosine ou de la SAH.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### *Produits*

L'inosine (I), la 1,N<sup>6</sup>-éthénoadénosine, la 2',3'-isopropylidène adénosine (IPA), la 2'-déoxyadénosine (DOA), la S-adénosyl-L-méthionine chlorhydrate (SAM), la 7-déazaadénosine (DAA) ont été obtenues chez Sigma (St. Louis, Mo., U.S.A.). Le 6-mercaptopurine-9-riboside (MPR), l'adénosine (A), l'hypoxanthine (HX) proviennent de Fluka (Buchs, Suisse). L'arabinosyladénine (AA) et la DL-homocystéine, bas :

libre, ont été fournies par ICN Pharmaceuticals (Cleveland, Ohio, U.S.A.) et la xanthine (X) par NBC (Cleveland, Ohio, U.S.A.). Le méthanol (pour analyse) est de Carlo Erba (Milan, Italie). La S-adenosyl-L-homocystéine sulfoxide (SAHO) et la S-adenosyl-L-homocystéine sulfone (SAHO<sub>2</sub>) ont été préparées à partir de la SAH suivant la méthode de Borchardt et Wu<sup>4</sup>.

#### *Préparation de la SAH*

La SAH employée provient soit de Sigma soit d'une préparation biochimique réalisée suivant la technique de De la Haba et Cantoni<sup>2</sup> par condensation de l'adénosine et de la DL-homocystéine sous l'action de la SAH hydrolase du foie de rat partiellement purifiée. La SAH obtenue est purifiée par chromatographie sur Sephadex G-10 (Pharmacia, Uppsala, Suède) puis cristallisation dans l'eau selon Knudsen et Yall<sup>5</sup>. Les principales propriétés physiques du produit obtenu (analyse élémentaire, point de fusion, coefficient d'extinction moléculaire,  $R_f$  dans divers systèmes chromatographiques) sont analogues à celles du produit commercial.

#### *Séparation chromatographique des nucléosides*

La phase solide ( $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub>, colonne de longueur 30 cm et diamètre intérieur 0.4 cm) et le chromatographe (modèle 204 U muni d'une pompe 6000 A, d'un injecteur à septum et à boucle U6 KV, d'un détecteur avec filtre à 254 nm M 440 et d'un enregistreur "omniscrite" Houston Instrument) ont été mis à notre disposition par Waters Assoc. (Milford, Mass., U.S.A.). Les différents composés en solution dans l'eau bidistillée ou dans HCl 10<sup>-2</sup> N (4 à 40 nmoles/ml) sont injectés avec une seringue Hamilton de 25  $\mu$ l. La phase mobile, solution aqueuse de méthanol (17.5%) et d'un contre-ion, l'acide heptane sulfonique ou PIC B7 (Waters Assoc.) (2.5  $\times$  10<sup>-4</sup> M), est filtrée avant emploi sur filtre Millipore (FHUP 04800). Cette phase circule dans la colonne à un débit constant de 1 ml/min déterminant une pression d'environ 2000 p.s.i.

#### *Mesure de l'activité de la SAH-hydrolase*

La source d'enzyme est la fraction protéique, précipitée entre 40 et 50% de la saturation au sulfate d'ammonium, d'un surnageant à 20,000 g d'un homogénat de foie de rat (rats Wistar mâles, 250-300 g). Dans un volume final de 2 ml, 5  $\mu$ moles d'adénosine, 10  $\mu$ moles de DL-homocystéine, 10  $\mu$ moles de thiodiglycol et 100  $\mu$ moles de tampon phosphate de sodium sont incubés avec 0.1 à 0.6 mg de protéines. Après 30 min à 37° la réaction est stoppée par chauffage au bain-marie bouillant et le milieu réactionnel est filtré sur disque Millipore (HAWP 02500). La quantité de SAH formée est déterminée par deux méthodes.

*Méthode (a).* 25  $\mu$ l de filtrat, dilué au besoin avec de l'eau bidistillée, est injectée dans la colonne de Bondapak C<sub>18</sub>. La SAH séparée de l'adénosine est dosée, après enregistrement de l'absorption à 254 nm, par comparaison de la hauteur du pic obtenu avec une gamme étalon déterminée par injection de quantités variables de SAH (0.5 à 4 nmoles de SAH pour 25  $\mu$ l).

*Méthode (b).* La SAH formée et l'adénosine sont séparées suivant une technique dérivée de celle de Shapiro et Ehninger<sup>6</sup>: 1 ml de filtrat est dilué à 2 ml avec de l'eau distillée et passé sur une colonne de résine Dowex 1-X8 (CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>) (10  $\times$  12 mm). Après lavage avec 100 ml d'eau pour éliminer l'adénosine, la SAH est éluée par 28 ml de tampon KCl-HCl 0.1 M, pH 2.5 et dosée par spectroscopie ultra-violette à 260 nm.

## RÉSULTATS

La séparation des différents nucléosides testés est illustrée sur la Fig. 1 qui représente la densité optique à 254 nm enregistrée en fonction du temps de rétention des différents composés injectés. La xanthine, l'hypoxanthine ont le même temps de rétention que l'inosine. La SAH commerciale (Sigma) et la SAH préparée par voie biochimique présentent toutes deux le même temps de rétention et l'injection de leur mélange dans la colonne ne donne naissance qu'à un seul pic. La 1,N<sup>6</sup>-éthénoadénosine n'est pas séparée de la SAH. Le mercaptopurine-9-D-riboside, dont le temps de rétention est de 4.5 min, est très bien séparé des autres métabolites étudiés; il n'est pas représenté sur la figure car il a été détecté par enregistrement de la densité optique à 320 nm. Enfin la SAHO<sub>2</sub> est éluée avec la SAHO.

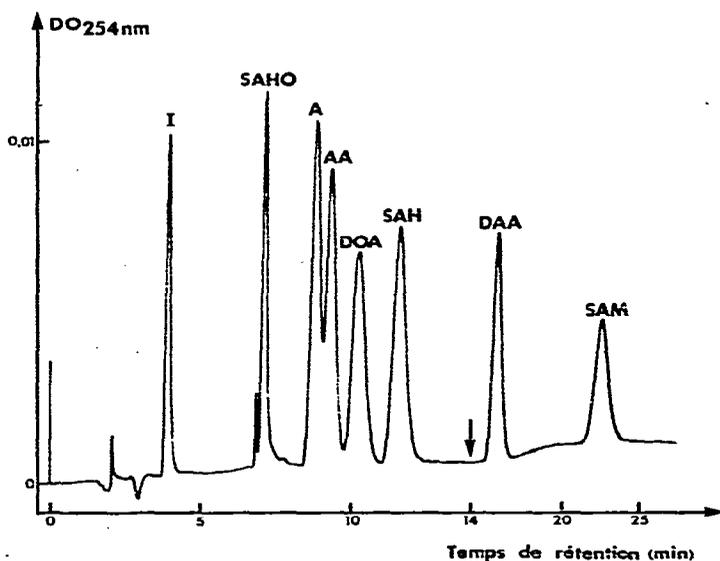


Fig. 1. Chromatogramme représentatif de la séparation de la SAH et de ses dérivés sur une colonne à phase inversée de  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub>. Élué par une solution aqueuse à 17.5% de méthanol contenant un contre-ion, l'acide heptane sulfonique ou PIC B7 ( $2.5 \times 10^{-4}$  M). Débit: 1 ml/min. La flèche (14 min) indique un ralentissement de la vitesse d'enregistrement. Quantités injectées de chaque composé (pmoles dans 50  $\mu$ l): I, 160; SAHO, 130; A, 260; AA, 260; DOA, 240; SAH, 260; DAA, 680; SAM, 390.

La Fig. 2 est la courbe étalon de dosage de la SAH par HPLC obtenue en mesurant la hauteur du pic d'absorption à 254 nm en fonction de la quantité de SAH injectée.

La Fig. 3 permet de comparer l'activité de la SAH-hydrolase déterminée par mesure directe de la SAH formée par HPLC et par dosage de la SAH après séparation de l'adénosine par chromatographie sur colonne de résine.

La mesure de l'activité catéchol-O-méthyltransférase est possible par une méthode très voisine de celle qui permet le dosage de l'activité SAH-hydrolase. Étant donné que les substrats (SAM et dopamine ou noradrénaline) et les produits de la réaction enzymatique (SAH et 3-méthoxytyramine ou normétanéphrine respectivement)

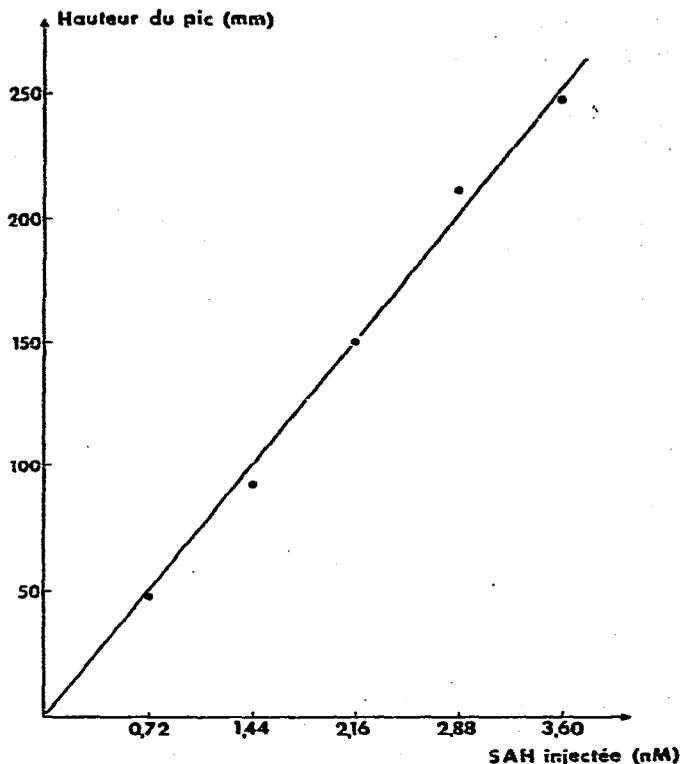


Fig. 2. Dosage de la SAH par HPLC: courbe étalon. Des quantités variables de SAH, en solution dans 25  $\mu$ l d'eau distillée, sont injectées sur une colonne de  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub>. Phase mobile: solution aqueuse à 17,5% de méthanol contenant de l'acide heptane sulfonique ou PIC B7 ( $2,5 \times 10^{-4}$  M). A la sortie de la colonne, l'absorption ultra-violette à 254 nm est enregistrée: la hauteur du pic d'absorption est proportionnelle à la quantité de SAH injectée.

TABLEAU I

SÉPARATION PAR HPLC DES SUBSTRATS ET DES PRODUITS FORMÉS PAR ACTION DE LA CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE SUR LA DOPAMINE ET LA NOR-ADRÉNALINE

Soluté	Volume de rétention* (ml)	D.O. $\times 10^3$ /nmole**	
		$\lambda = 254$ nm	$\lambda = 280$ nm
<i>Substrats</i>			
L-SAM	8.3	24	—
Dopamine ou	7.2	—	6.0
Noradrénaline	6.0	—	5.8
<i>Produits</i>			
L-SAH	5.2	70	—
3-Méthoxytyramine ou	9.1	—	5.6
Normétanéphrine	6.85	—	6.0

\* Phase stationnaire:  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub>; phase mobile: méthanol à 35% contenant de l'acide heptane sulfonique (PIC B7;  $2,5 \times 10^{-4}$  M). Débit: 1 ml/min.

\*\* Densité optique correspondant à la hauteur du pic par nmole de substance injectée.

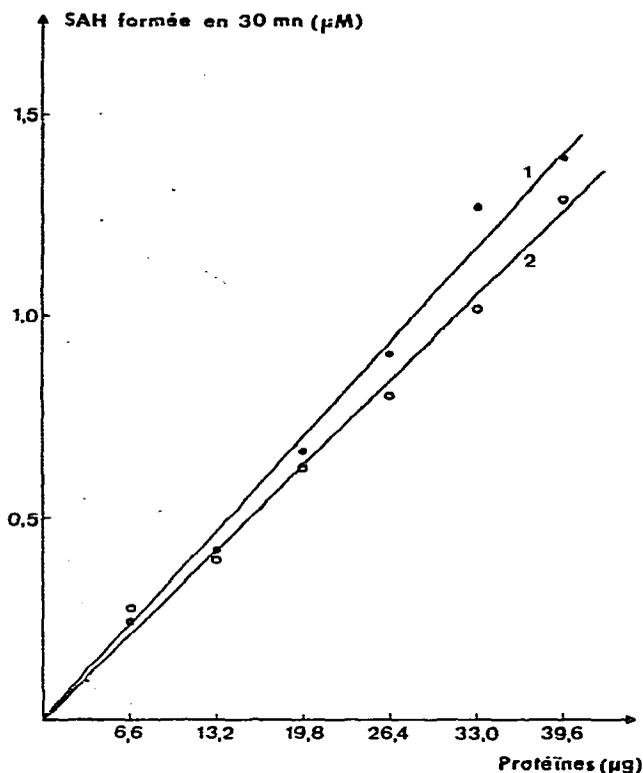


Fig. 3. Activité de la SAH-hydrolase de foie de rat dans le sens de la synthèse. 100 à 600  $\mu$ l de préparation enzymatique (6.6 à 39.6  $\mu$ g de protéines) est mise en incubation avec 5  $\mu$ moles d'adénosine, 10  $\mu$ moles de DL-homocystéine et 10  $\mu$ moles de thiodiglycol pendant 30 min à 37° (volume final = 2 ml). La SAH formée est dosée directement par HPLC (courbe 1, ●) ou, après séparation de l'adénosine résiduelle par chromatographie sur Dowex 1-X8 (CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>), par spectroscopie ultra-violette (courbe 2, ○).

sont très bien séparés par HPLC, il est possible d'augmenter la quantité de méthanol dans la phase mobile jusqu'à 35%. Les volumes de rétention deviennent moins importants comme le montre le Tableau I.

#### DISCUSSION

La Fig. 1 montre que la xanthine, l'hyoxanthine et l'inosine ne sont pas séparées par ce système contrairement à celui de Schatz *et al.*<sup>1</sup>. L'adénosine se déplace plus rapidement que la SAH; ce résultat est également différent de celui de Schatz *et al.*<sup>1</sup>, qui ont constaté qu'avec leur système la SAH sortait la première. Ces différences proviennent probablement de l'emploi dans notre cas de l'acide heptane sulfonique (PIC B7) comme ligand des nucléosides à la phase solide de la colonne. Il doit se former d'abord un complexe ionique entre la fonction amine primaire en 6 du nucléoside et le groupement carboxyle de l'acide heptane sulfonique: la chaîne en C<sub>7</sub> de ce dernier confère à la molécule formée un caractère lipophile. Au contact de la résine il se forme une liaison hydrophobe entre cette chaîne en C<sub>7</sub> et la chaîne en C<sub>18</sub> de la résine. Mais le caractère lipophile des différents complexes obtenus dépend aussi des groupements polaires portés par les nucléosides testés. Plus ces complexes seront lipo-

philes, plus leurs temps de rétention sur la colonne de Bondapak C<sub>18</sub> seront importants. Ainsi la SAH sort plus lentement que l'adénosine probablement à cause de la chaîne hydrocarbonée de l'homocystéine qui lui donne un caractère plus lipophile. Le temps de rétention élevé de la SAM peut résulter de la présence sur sa molécule d'un cation sulfonium qui lui permet de fixer une deuxième molécule d'acide heptane sulfonique. Le blocage des deux hydroxyles "cis" en 2' et 3' du ribose par un groupement isopropyle donne naissance à un composé beaucoup moins polaire que l'adénosine: l'isopropylidène adénosine, dont le temps de rétention est supérieur à celui de la SAM.

Dans les conditions d'incubation employées, il n'y a pas de formation de SAH par condensation chimique de l'adénosine et de la DL-homocystéine, ce que met en évidence la chromatographie du milieu réactionnel des essais effectués par incubation des substrats seuls ou avec la préparation enzymatique dénaturée par la chaleur. L'incubation séparée des deux substrats avec l'enzyme intacte ne donne pas naissance à un produit qui viendrait interférer avec la SAH par HPLC. La SAH dosée est donc uniquement produite par action de l'enzyme. Dans nos conditions opératoires, il n'y a, d'autre part, pas d'oxydation de la SAH produite: par HPLC on n'enregistre pas de traces de SAHO ni de SAHO<sub>2</sub>.

L'augmentation du débit de 1 à 2 ml/min diminue le temps de rétention de l'adénosine (4.5 min contre 8.9 min) et de la SAH (5.5 min contre 11.7 min) sans modifier leur nette séparation. C'est pourquoi nous avons choisi ce débit de 2 ml/min dans l'étude de l'activité de la SAH-hydrolase. La courbe étalon de la Fig. 2 met en évidence une bonne proportionnalité entre la hauteur du pic d'absorption ultra-violette enregistrée et la quantité de SAH injectée. Cette méthode permet donc de mesurer directement la quantité de SAH formée par incubation de l'adénosine, de l'homocystéine et de la SAH-hydrolase. Les résultats obtenus par la méthode (a) (dosage direct de la SAH formée par HPLC) et par la méthode (b) (dosage UV de la SAH après séparation de l'adénosine par chromatographie sur résine Dowex) sont très semblables (Fig. 3). L'avantage de la méthode (a) sur la méthode (b) est une plus grande sensibilité de la détection de la SAH par HPLC. Avec la méthode (b), la plus petite quantité de SAH formée pendant l'incubation dans les conditions opératoires décrites ci-dessus qui peut être dosée avec précision est environ 100 nmoles. Par HPLC, la quantité de SAH injectée doit être au minimum 0.07 nmoles pour être détectée. En supposant que l'on injecte directement 50  $\mu$ l du milieu réactionnel (sur 2 ml), la plus petite quantité de SAH formée mesurable est proche de 3 nmoles, soit une quantité 30 fois plus petite.

Cette méthode de dosage de la SAH-hydrolase par mesure directe de la SAH formée par HPLC a certainement un avantage sur celle de Schatz *et al.*<sup>1</sup> puisque notre système chromatographique ne nécessite qu'une seule phase mobile: le changement de phase mobile en cours d'analyse comme le font ces auteurs diminue la sensibilité et la reproductibilité de la méthode. La ligne de base est modifiée lors du passage du deuxième solvant d'élution.

Les auteurs qui ont mesuré l'activité de la SAH-hydrolase dans le sens de la synthèse ont en général employé une méthode radiochimique: incubation de l'adénosine-<sup>14</sup>C-8 avec l'homocystéine et la SAH-hydrolase suivie de l'isolement et de la détermination de l'activité totale de la SAH élue<sup>4,7-9</sup>. Cette méthode également très sensible nécessite des substrats radiochimiquement purs et une purification de la SAH formée. D'où un avantage supplémentaire de notre technique.

Enfin signalons que la méthode que nous décrivons peut être utilisée avec des substrats radioactifs. Après détection, l'éluat peut être fractionné et l'activité de chaque substance séparée par HPLC peut être mesurée avec précision.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur Weiss et la société Waters Assoc. d'avoir eu l'obligeance de mettre à notre disposition l'appareil HPLC utilisé.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. A. Schatz, C. R. Vunnam et O. Z. Sellinger, *Life Sci.*, 20 (1977) 375.
- 2 G. de la Haba et G. L. Cantoni, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 603.
- 3 T. Deguchi et J. Barchas, *J. Biol. Chem.*, 246 (1971) 3175.
- 4 R. T. Borchardt et Y. S. Wu, *J. Med. Chem.*, 17 (1974) 862.
- 5 R. C. Knudsen et I. Yall, *J. Bacteriol.*, 112 (1972) 569.
- 6 S. K. Shapiro et D. J. Ehninger, *Anal. Biochem.*, 15 (1966) 323.
- 7 J. E. Poulton et V. S. Butt, *Arch. Biochem. Biophys.*, 172 (1976) 135.
- 8 J. D. Finkelstein et B. Harris, *Arch. Biochem. Biophys.*, 159 (1973) 160.
- 9 O. Kajander, T. Eloranta et A. Raina, *Biochim. Biophys. Acta*, 438 (1976) 522.