

PREPARATION D'OSYL-PHOSPHATES MARQUES AU  $^{14}\text{C}$ .  
I) PREPARATION DU MANNOSE-1-PHOSPHATE [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] PAR UNE  
NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASE VEGETALE

Received on May 3, 1974

A notre connaissance, il ne semble pas que le D-mannose-1-phosphate radioactif, marqué au carbone sur le mannose, puisse être obtenu aisément auprès des centres de préparation de molécules marquées.

Cet ester phosphorique présentant un intérêt pour l'étude de différentes enzymes du métabolisme du mannose (phosphorylase, phosphomutase, GDP-mannose pyrophosphorylase), nous avons recherché un moyen simple de préparation de celui-ci.

Au cours d'expériences sur l'utilisation des nucléoside-diphosphate-oses par les graines de Fénugrec (Trigonella foenum-graecum, L.) pendant leur germination, une activité nucléotide-pyrophosphatasique particulière a pu être mise en évidence (1). Cette activité hydrolysante s'exerce sur divers nucléoside-diphosphate-oses dont l'hydrolyse conduit à la libération du glycosyl-phosphate et du mononucléotide correspondants. L'action de l'enzyme est particulièrement importante sur le GDP-mannose, car le métabolisme du mannose chez la graine utilisée est très actif (2) (3); son polysaccharide de réserve étant constitué par une galactomannane (4).

Cette hydrolyse fut donc mise à profit pour la préparation du D-mannose-1-phosphate [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] à partir du GDP-mannose [ $\text{U-}^{14}\text{C}$  Man] .

### Préparation enzymatique

Les graines de Fénu grec, après gonflement dans l'eau (24h) sont mises à germer sur coton pendant 48 à 72 h à +20°C. Les plantules et les cotylédons, après élimination des téguments, sont broyés au mortier avec du sable, en présence de tampon Tris(hydroxyméthyl)aminométhane 0,2M-HCl, pH 7,5. Le broyat, passé sur gaze, est centrifugé à 1500g pendant 10 mn. Le surnageant est ensuite soumis à une centrifugation à 18000g pendant 1 heure. Le culot, remis en suspension dans le même tampon, est à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions.

Le culot ainsi lavé est dépourvu de nucléoside-diphosphate-oses. Remis en suspension dans le même tampon, à raison de 3 ml pour 10g de graines, il constitue la préparation enzymatique particulière utilisée pour hydrolyser le GDP-mannose  $[U-^{14}C]$ .

### Préparation du D-mannose-1-phosphate $[U-^{14}C]$

Le GDP-Man  $[U-^{14}C \text{ Man}]$  utilisé (Radiochemical Center, Amersham, Grande-Bretagne) possède une activité spécifique de 83 mCi/mMole.

200  $\mu$ l de solution de GDP-Man  $[U-^{14}C]$  (5  $\mu$ Ci, soit 60 nMoles) sont mis à incuber à +25°C avec 2 ml de la préparation enzymatique. L'évolution de la réaction est suivie à intervalles réguliers par chromatographie de 10  $\mu$ l de milieu réactionnel sur papier Schleicher et Schüll 2043 b Mgl, avec le solvant : isopropanol - méthyléthylcétone - acétate d'éthyle - n-butanol - eau (6:5:3:2:5 en vol.), et révélation par autoradiographie (film Kodirex, Ets Kodak). Ces essais permettent de préciser la durée optimale de la réaction. Après 2 heures d'incubation, le milieu réactionnel ne contient plus qu'un seul composé radioactif, de migration identique à celle d'un témoin interne d' $\alpha$ -D-mannose-1-phosphate non marqué. L'ensemble du milieu réactionnel est alors soumis à une chromatographie préparative dans les mêmes conditions que précédemment.

L'emplacement de l'ester phosphorique du mannose est repéré par "scanning" (appareil Berthold LB 2723), puis les bandes correspondant au produit radioactif sont éluées à l'eau distillée, et l'éluat concentré sous pression réduite.

La préparation enzymatique étant dépourvue de nucléoside-diphosphate-oses, et le substrat marqué étant utilisé sans entraîneur, il est permis de penser que l'activité spécifique du mannose-1-phosphate obtenu est identique à celle du GDP-mannose employé comme substrat, ou qu'elle en est très proche. Identification de l'osyl-phosphate marqué obtenu

Le composé radioactif obtenu par hydrolyse du GDP-mannose  $\left[ \text{U}^{14}\text{C Man} \right]$  a pu être identifié au mannose-1-phosphate  $\left[ \text{U}^{14}\text{C} \right]$  grâce aux essais suivants:

1) Il est hydrolysé en milieu acide dilué ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,02N, 1 h à  $+100^\circ\text{C}$ ) en donnant un composé radioactif de migration chromatographique identique à celle d'un témoin interne de mannose non marqué.

2) Il est hydrolysé par la phosphatase acide de pomme de terre, en donnant du mannose radioactif identifié par chromatographie.

Cette préparation enzymatique hydrolysant également d'autres nucléoside diphosphate-oses (avec un rendement inférieur), il est bien sûr possible de l'utiliser pour préparer d'autres osyl-phosphates, mais dans les cas où la kinase ou la phosphorylase existent, l'emploi de ces enzymes est préférable, la matière première étant moins onéreuse.

F.Percheron, S.Clermont et M.J.Foglietti<sup>+</sup>

<sup>+</sup> Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université René Descartes  
4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris - E.R.A. n°99 du C.N.R.S.

Références

- 1) Clermont, S. , Foglietti, M.J. et Percheron, F. - C.R.Acad.Sci.Paris , 276 , D , 843 (1973)
- 2) Clermont-Beaugiraud, S. et Percheron, F. - Bull.Soc.Chim.Biol., 50 , 633 (1968)
- 3) Foglietti, M.J. et Percheron, F. - C.R.Acad.Sci.Paris , 274 , D, 130 (1972)
- 4) Andrews, F., Hough, L. et Jones, J.K.N. - J.Chem.Soc. , 2744 (1952)