

PREPARATION D'OSYL-PHOSPHATES MARQUES AU ^{14}C .
 2) PREPARATION DE L' α -D-GALACTOSE-1-PHOSPHATE $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ PAR
 UNE GALACTOKINASE VEGETALE.

Received on May 3, 1974

Devant les difficultés rencontrées pour obtenir aisément des glycosyl-phosphates radioactifs marqués au ^{14}C sur le sucre, il nous semble opportun de présenter ici une préparation simple, par voie enzymatique, de l' α -D-galactose-1-phosphate $[\text{U-}^{14}\text{C}]$.

Les graines de Fénugrec (*Trigonella foenum-graecum*, L.) contenant, comme polysaccharide de réserve, une galactomannane, le métabolisme du galactose y est particulièrement actif lors de leur germination.

Il se développe à ce moment une activité α galactosidasiqque (1) libérant le galactose à partir de la galactomannane de réserve. Puis, la première étape du métabolisme du galactose chez ces graines consiste en sa phosphorylation par une galactokinase (2) selon la réaction:



Après étude de cette activité galactokinasiqque, nous l'avons mise à profit afin de préparer le galactosyl-phosphate marqué, à partir d' α -D-galactose $[\text{U-}^{14}\text{C}]$.

Préparation enzymatique

Les graines de Fénugrec, après gonflement dans l'eau (24h) sont mises à germer sur coton pendant 48h à $+20^\circ\text{C}$. Après élimination des téguments et

de l'endosperme, les plantules et cotylédons, correspondant à 5 g de graines sèches, sont broyés au mortier avec du sable et en présence de 20ml d'un tampon pH 7,5 constitué par: tampon phosphate mono-, di-potassique 0,01M, β mercaptoéthanol 0,01M, EDTA 0,001M.

Le broyat, passé sur gaze, est soumis à une centrifugation à 15.000g pendant 45 mn. Le surnageant de centrifugation est dialysé contre le tampon d'extraction. Après vérification de l'absence de galactose dans l'extrait, celui-ci constitue la préparation enzymatique utilisée pour la phosphorylation de l' α -D-galactose $[U-^{14}C]$.

Préparation de l' α -D-galactose-1-phosphate $[U-^{14}C]$.

L' α -D-galactose $[U-^{14}C]$ utilisé, préparé par le Groupe des Molécules marquées ^{14}C (Service de Biochimie) du C.E.N. de Saclay, possède une activité spécifique de 172 mCi/mmole.

Le milieu réactionnel est constitué par: tampon triéthanolamine 0,5M, pH 7,5 (100 μ M), ATP (1 μ M), $MgCl_2$ (5 μ M), α -D-galactose $[U-^{14}C]$ (0,48 μ M, soit 82,5 μ Ci), NaF (1 μ M), enzyme (200 μ l) pour un volume final de 1000 μ l.

L'évolution de la réaction est suivie à intervalles réguliers par chromatographie de 1 μ l du milieu réactionnel sur papier Schleicher et Schüll 2043 b MgI, avec le solvant: isopropanol-méthyléthylcétone-acétate d'éthyle- n-butanol-eau (6:5:3:2:5 en volume), et révélation par autoradiographie (film Kodirex, Ets Kodak).

Après 1,5 h d'incubation, 70% du galactose $[^{14}C]$ sont transformés en un composé radioactif de migration chromatographique identique à celle d'un témoin interne d' α -D-galactose-1-phosphate non marqué. La transformation du galactose en osyl-phosphate n'est jamais totale, la réaction étant inhibée par l'ester phosphorique formé.

L'ensemble du milieu réactionnel est soumis à une chromatographie

préparative sur papier Schleicher et Schüll 2043 b Mgl, dans les mêmes conditions que précédemment. L'emplacement de l'ester phosphorique du galactose 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.

Identification de l'osyl-phosphate ^{14}C formé.

Le composé radioactif obtenu a pu être identifié à l' α -D-galactose-1-phosphate $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ grâce aux essais suivants:

1) Le traitement par la phosphatase acide de pomme de terre conduit à un composé radioactif de migration identique à celle d'un témoin de galactose non marqué. Il s'agit donc d'un ester phosphorique du galactose.

2) Cet ester phosphorique est acido-labile, puisqu'il est totalement converti en galactose $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ par traitement avec H_2SO_4 0,02N (1h à $+100^\circ\text{C}$).

3) Dans une dernière expérience, l'ester phosphorique a pu être transformé en UDP-D-galactose après incubation en présence d'UDP-D-glucose et de galactose-1-phosphate uridylyltransférase d'hématies humaines.

La chromatographie du milieu réactionnel révèle la présence d'un composé radioactif de migration identique à celle d'un témoin interne d'UDP-D-galactose non marqué. Après élution de l'emplacement correspondant à cette tache, le produit formé fut caractérisé par les essais suivants:

a) La chromatographie de l'hydrolysat (H_2SO_4 0,02N, 1h à $+100^\circ\text{C}$) permet d'identifier du galactose radioactif, cochromatographié avec un témoin interne de galactose non marqué.

b) Après hydrolyse enzymatique par la phosphodiesterase de venin de serpent la chromatographie de l'hydrolysat permet d'identifier du galactose-1-phosphate radioactif, cochromatographié avec un témoin non marqué.

L'uridylyltransférase des hématies étant spécifique de l' α -D-galactose-

1-phosphate, la conversion de l'ester phosphorique synthétisé par la galactokinase de Fénugrec en UDP-D-galactose permet de conclure que le galactosyl-phosphate formé possède la configuration α .

La préparation enzymatique étant exempte de galactose, et le galactose marqué étant utilisé sans entraîneur, on peut penser que l'activité spécifique du galactose-1-phosphate obtenu est identique à celle du galactose radioactif ayant servi de substrat.

M.J. Foglietti, F. Percheron ⁺ , O. Trémeau ⁺⁺ et G. Lecocq ⁺⁺

+ Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université René Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris- E.R.A.n° 99 du CNRS.

++ Service de Biochimie, C.E.N. Saclay, BP. 2 , 91. Gif-sur-Yvette, France.

Références

- 1) Clermont, S. et Villarroja, E.- C.R.Acad.Sci. Paris, 276, D, 1069 (1973)
- 2) Foglietti, M.J. et Percheron, F.- Biochimie, à l'impression (1974)