

# URIDINE DIPHOSPHOGALACTOSE-4 ÉPIMÉRASE DE FENUGREC: ESSAIS DE PURIFICATION ET QUELQUES PROPRIÉTÉS

SIMONE CLERMONT et FRANÇOIS PERCHERON

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université René Descartes, Paris, France

(Reçu le 6 février 1979)

**Key Word Index**—*Trigonella foenum-graecum*; Leguminosae; fenugreek; uridine diphosphogalactose 4-epimerase; enzyme properties.

**Abstract**—The presence of a UDP Gal-4 epimerase is reported in fenugreek seedlings. It occurs as a soluble enzyme which loses its activity at pHs lower than 7, with an optimum pH at 8.5. Partial purification was achieved by ammonium sulphate precipitation and hydroxyapatite chromatography. The MW is 70000 and it is linked to NAD<sup>+</sup> as in the case of the enzymes of *E. coli* and yeast.

## INTRODUCTION

Indispensables au métabolisme du galactose, les UDP galactose-4 épimerases (EC: 5.1.3.2.) sont certainement des enzymes très répandues, mais seul un nombre restreint en a été étudié [1]. Les travaux les plus approfondis concernent les épimerases de microorganismes: levure [2-6], *Escherichia coli* [7-10]. Dans le règne animal, on peut citer l'étude de l'enzyme du foie de veau [11] et de la glande mammaire bovine [12]. Les enzymes végétales ont été l'objet d'un moins grand nombre de travaux: signalée chez *Phaseolus* [13], l'UDP Gal épimerase a été étudiée dans le germe de blé [14], et son intervention dans les réactions d'interconversion des glucides pendant la différenciation du bois de diverses espèces a été décrite par Dalessandro et Northcote [15, 16]. Nous avons mis en évidence cette enzyme dans les semences germées de fenugrec où elle doit jouer un rôle très important au moment de la germination, pour l'utilisation de la galactomannane de réserve fort abondante dans la graine.

Les UDP Gal-4 épimerases catalysent la transformation réversible: UDP Gal  $\rightleftharpoons$  UDP Glc grâce à une réaction d'oxydoréduction passant par un intermédiaire cétonique (UDP oxo-4 hexose). Cette réaction met en jeu une coenzyme, le NAD<sup>+</sup> qui est réduite au cours du premier stade de la réaction et réoxydée au cours du second stade. Chez les enzymes de levure et d'*E. coli*, le NAD<sup>+</sup> est solidement lié à la protéine enzymatique qui est active sans apport supplémentaire de coenzyme. Par contre, les épimerases de blé et de foie de veau n'exercent leur action catalytique qu'en présence de NAD<sup>+</sup> exogène (qui peut être présent dans des extraits non purifiés, ou qu'on doit ajouter au milieu réactionnel).

## RÉSULTATS

### Mise en évidence de l'activité enzymatique

Nous avons initialement mis en évidence l'activité UDP Gal épimerasique par incubation d'un extrait enzymatique de semences germées de fenugrec avec de l'UDP Gal [ $^14$ C Gal]. La chromatographie sur

papier du milieu réactionnel, révélée par autoradiographie, montre la présence d'une tache radioactive de migration légèrement plus rapide que celle de l'UDP Gal (solvant I), et identique à celle de l'UDP Glc. L'élution du produit et son hydrolyse acide ( $H_2SO_4$  0.01 N, 45 min à 100°) conduisent à un ose radioactif identifié chromatographiquement au glucose (solvant II). Ultérieurement, la transformation de l'UDP Gal en UDP Glc a été confirmée par l'oxydation de ce dernier sous l'action de l'UDP Glc déshydrogénase (EC: 1.1.1.22.), en présence de NAD<sup>+</sup>.

### Méthodes de dosage de l'activité enzymatique

Pour déterminer l'activité de l'UDP Gal épimerase, nous avons utilisé le plus souvent la réaction dans le sens UDP Gal  $\rightarrow$  UDP Glc, en dosant l'UDP Glc formé par la technique à l'UDP Glc déshydrogénase [17] qui oxyde ce nucléoside-diphosphate-ose en UDP glucuronate, en présence de NAD<sup>+</sup> dont la transformation en NADH est suivie par mesure de l'absorption à 340 nm. Deux modalités techniques ont été utilisées:

(a) le procédé en une étape où la déshydrogénase et le NAD<sup>+</sup> sont ajoutés directement au milieu d'incubation de l'épimerase;

(b) le procédé en deux étapes: après incubation de l'UDP Gal avec la préparation enzymatique, la réaction d'isomérisation est arrêtée par chauffage et l'UDP Glc est dosé ensuite par la déshydrogénase.

Cette méthode n'a pu être utilisée lors d'expériences mettant en jeu des effecteurs de l'épimerase agissant aussi sur la déshydrogénase (mercapto-2 éthanol par exemple). Dans ce cas, nous avons, après arrêt de la réaction d'épimerisation, dosé le glucose par la méthode à la glucose-oxydase [18], après avoir vérifié que cette enzyme était insensible aux effecteurs aux doses utilisées. Ceci nécessite l'hydrolyse acide ménagée de l'UDP Glc formé. Cette dernière technique donne des résultats identiques à celle à l'UDP Glc déshydrogénase avec les mêmes échantillons enzymatiques.

La détermination a été parfois réalisée dans le sens de l'épimerisation Glc  $\rightarrow$  Gal, en opérant de façon analogue, par dosage du galactose par la galactose-oxydase [19], après hydrolyse convenable de l'UDP Gal apparu.

### Extraction et purification partielle de l'épimérase

Dans les graines germées de fenugrec, la même activité spécifique est observée dans les plantules et dans les téguments. Cependant, comme ces derniers ne renferment que 1.5 pour cent de l'activité totale et retiennent une forte proportion de la galactomannane de réserve, très visqueuse, il est préférable de pratiquer le broyage et l'extraction de l'enzyme sur les plantules débarrassées des téguments.

L'épimérase présente une grande sensibilité aux variations de pH et perd en grande partie son activité en dessous de 7. Des essais d'extraction à pH 6.8 ont conduit à des activités 5 fois plus faibles. Ceci a fait choisir un milieu de pH 7.7 (la préparation obtenue à ce pH perd 80 pour cent de son activité si elle est maintenue 10 hr à pH 5 puis ramenée à pH 7.7).

L'extraction est donc réalisée par broyage des plantules en présence d'un tampon phosphate à pH 7.7, suivi d'une centrifugation (30 min à 30 000 g); l'épimérase est présente dans le surnageant. L'extrait obtenu est ensuite traité par le sulfate d'ammonium à 80 pour cent de saturation à +4°. Le précipité, redissous et dialysé contre le tampon phosphate reste, comme le liquide extractif, très trouble, mais après centrifugation à 120 000 g, un traitement par la bentonite [20] permet d'éliminer diverses protéines, et conduit à une solution limpide, avec augmentation de l'activité spécifique. L'étape suivante consiste en une chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite. Là encore, cette opération a dû être conduite à pH 7.7 en tampon phosphate 0.001 M, bien que ce pH soit moins favorable à la fixation des protéines qu'un pH plus bas, généralement adopté. A cette molarité, les pigments flavoniques présents dans l'extrait ne sont pas retenus sur la colonne. Une augmentation de la molarité du tampon, par paliers, permet l'élution de l'UDP Gal épimérase pour une molarité de 0.02 M. Dans cette opération, on récupère 60 % de l'activité enzymatique déposée sur la colonne.

Des essais de chromatographie sur DEAE-Sephadex ont été abandonnés, l'élution de l'enzyme ne conduisant pas à un pic net. C'est donc l'élutat d'hydroxylapatite en tampon 0.02 M qui a servi aux expériences ultérieures (activité spécifique = 15 nkat/mg de protéines).

### Propriétés de l'enzyme

A +4° nous observons une bonne conservation de l'activité enzymatique pendant 3 jours, l'addition de mercapto-2 éthanol n'apportant aucune modification. Après congélation à -20°, la conservation s'étend sans dommage jusqu'à 8 mois. Les ions  $Mg^{2+}$  et l'EDTA à une concentration de 0.16 à  $1.6 \times 10^{-3}$  M n'ont pas d'action inhibitrice ou activatrice sur l'activité épimérasique.

Le pH optimum de l'UDP Gal épimérase de fenugrec, déterminé en tampon Tris-maléate, est situé à 8.5. Contrairement à l'épimérase de *Phaseolus* qui admet indifféremment comme substrats des nucléoside-diphosphate-oses à UDP ou TDP, l'enzyme de fenugrec n'épimérase pas le TDP Glc en TDP Gal. Son poids moléculaire déterminé par filtration sur gel d'acrylamide agarose (Ultrogel AcA 44-Ets LKB) est de 70 000.

Si toutes les UDP Gal épimérases exercent leur activité grâce à du NAD<sup>+</sup> comme coenzyme d'oxydoréduction, on doit faire une distinction en deux groupes d'enzymes:

celles où le NAD<sup>+</sup> est assez solidement lié (bien que

de façon non covalente) à la protéine enzymatique (*Candida*, *E. coli*) et qui restent actives, après purification, sans apport de coenzyme;

celles où le NAD<sup>+</sup>, lié de façon beaucoup plus lâche, est aisément éliminé (dialyse, chromatographie sur colonne). L'activité de l'enzyme n'est restaurée que par addition de NAD<sup>+</sup> exogène. Dans les extraits bruts, c'est le NAD<sup>+</sup> tissulaire qui permet à l'activité enzymatique de se manifester.

L'UDP Gal épimérase de fenugrec paraît retenir solidement le NAD<sup>+</sup>, d'après les arguments expérimentaux suivants:

à tous les stades de sa préparation, l'enzyme est active sans addition de NAD<sup>+</sup>: une dialyse prolongée contre le tampon d'extraction et la chromatographie sur hydroxylapatite n'entraînent pas de perte d'activité;

l'addition de NAD<sup>+</sup> au milieu d'incubation, à la concentration de  $5 \times 10^{-4}$  M, n'augmente pas l'activité. Après une préincubation de l'enzyme avec du NAD<sup>+</sup> à la concentration de  $5 \times 10^{-3}$  M, on constate même une inactivation totale de l'enzyme;

des essais d'élimination du NAD<sup>+</sup> par adsorption sur charbon selon Feingold [14] ont entraîné une perte totale de l'activité, qui n'est pas restaurée par addition de NAD<sup>+</sup> ( $5 \times 10^{-4}$  M). Ces conditions expérimentales semblent provoquer la dénaturation de l'enzyme ou sa fixation sur le charbon;

par action du dodécylsulfate de sodium à 0.1 pour cent en présence de mercapto-2 éthanol, ou par action de l'urée 6 M, suivies de dialyse, on observe également une perte d'activité, que l'addition de NAD<sup>+</sup> ne rétablit pas.

Il semble donc que toute tentative d'élimination du NAD<sup>+</sup> soit infructueuse, ou qu'elle entraîne une dénaturation de l'enzyme. Le fait qu'une addition ultérieure de coenzyme soit sans effet est en faveur de sa liaison ferme avec la protéine enzymatique.

### DISCUSSION

En comparant nos résultats à ceux de la littérature nous faisons les constatations suivantes. L'UDP Gal épimérase de fenugrec n'est pas protégée par le mercapto-2 éthanol et n'est pas activée par  $Mg^{2+}$ . Ceci la différencie de l'UDP Gal épimérase de levure [2, 3]. L'EDTA et  $Mg^{2+}$  sont sans effet comme sur l'UDP Gal épimérase d'*E. coli* [7]. Feingold utilise de l'EDTA et du mercapto-2 éthanol pour protéger l'enzyme brut de blé [14].

Comme les enzymes de glandes mammaires bovines [12] et de blé [14] celle de fenugrec perd son activité à un pH inférieur à 7. Le pH optimum est de 8.5, voisin de celui de toutes les UDP Gal épimérases déjà décrites. Le PM de 70 000 est situé entre celui de l'UDP Gal épimérase d'*E. coli* (79 000) et de l'UDP Gal épimérase de glandes mammaires (60 000). A la différence de celle d'*E. coli* [9], l'UDP Gal épimérase de fenugrec n'épimérase pas le TDP Glc.

L'enzyme de *Trigonella* n'est pas activée par addition de NAD<sup>+</sup> à une concentration de  $5 \times 10^{-4}$  M tout comme celle d'*E. coli* [7]; contrairement à l'UDP Gal épimérase de blé ou de foie de veau, elle ne nécessite donc pas d'apport de NAD<sup>+</sup> exogène. Les différences observées vis-à-vis de l'UDP Gal épimérase de blé, peuvent paraître étonnantes, en particulier pour les exigences en

NAD<sup>+</sup> et l'action des effecteurs. Il est probable que cette enzyme joue un rôle moins important chez le *Phaseolus* et le blé, où le métabolisme du galactose est certainement peu actif, car il s'agit de graines à amidon. Chez le fenugrec, le polysaccharide de réserve est une galactomannane très riche en galactose (rapport molaire Gal/Man = 1). Ceci implique au moment du développement de la graine une intense transformation du glucose en galactose, pour accumuler le polysaccharide, tandis qu'à l'inverse, au moment de la germination, les besoins énergétiques nécessitent que la quasi-totalité du galactose de réserve soit transformée en glucose. La présence de NAD<sup>+</sup> lié de façon suffisamment solide avec la protéine enzymatique peut alors assurer à l'enzyme une meilleure efficacité, la coenzyme étant présente en permanence au moment des besoins. Il en est de même pour les UDP Gal épimérasées du cambium et du xylème du sycomore et du peuplier [15] qui sont nécessaires pour assurer les interconversions conduisant aux précurseurs de la biosynthèse des hémicelluloses.

#### PARTIE EXPÉIMENTALE

**Réactifs.** UDP Gal [ $^{14}\text{C}$  Gal] (Radiochemical Centre, Amersham), activité spécifique: 347 mCi/mmol; UDP Glc, UDP Glc déshydrogénase, NAD<sup>+</sup> (Boehringer); Galactostat et Glucostat (Worthington Biochemical Corporation); Ultrogel (LKB).

**Préparation de l'extrait enzymatique.** 10 g de graines sèches de fenugrec, après lavage et gonflement une nuit dans l'eau, sont mises à germer 48 hr sur coton. Après élimination des téguments, les plantules sont broyés au 'Polytron' dans 50 ml de tampon  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ – $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.7, 0.001 M. L'extrait enzymatique, après passage sur gaze, est centrifugé 30 min à 30 000 g. Le surnageant est précipité par le sulfat d'ammonium à 80% de saturation, pendant 2 hr. Après centrifugation 30 min à 30 000 g, le précipité de protéines est remis en solution dans 6 ml du même tampon et dialysé contre le tampon. Après une nouvelle centrifugation 30 min à 30 000 g, on traite le surnageant par la bentonite: celui-ci est ramené à un volume tel que la concentration en protéines soit de 5 à 10 mg/ml; il est additionné de la moitié de son volume d'une suspension de bentonite à 35 mg/ml.

**Mise en évidence de l'activité UDP Gal-4 épimérasique.** Séparation UDP Gal [ $^{14}\text{C}$  Gal] et UDP Glc [ $^{14}\text{C}$  Glc]: papier Schleicher et Schüll 2043 bMgl: mélange-solvant I: *i*-PrOH–MeCOEt–EtOAc–*n*-BuOH–H<sub>2</sub>O (6:5:3:2:5) Auto-radiogramme. Identification du galactose: mélange-solvant II: *n*-BuOH–Py–H<sub>2</sub>O (9:5:4).

**Mesure de l'activité enzymatique.** Dans la technique par l'UDP Glc déshydrogénase en 1 étape, le milieu d'incubation comprend: UDP Gal 0.025 M (50 µl), NAD<sup>+</sup> 0.03 M (100 µl), tampon glycine–NaOH, pH 8.7, 0.1 M (800 µl), UDP Glc déshydrogénase ( $3 \times 10^{-2}$  UI), extrait enzymatique (25 µl). L'incubation est faite à 25°. L'essai est lu à 340 nm contre le témoin enzyme. L'activité est proportionnelle au temps pendant les 10 premières minutes. Dans la technique en deux étapes, le milieu d'incubation comprend: UDP Gal 0.025 M (50 µl), tampon glycine–NaOH, pH 8.7, 0.1 M (50 µl), préparation enzymatique (25 µl). On incube 10 min à 25°. On inactive 2 min à 100°. On centrifuge. Pour la 2ème étape, on reprend 100 µl de l'essai auxquels sont ajoutés tampon glycine–NaOH, pH 8.7, 0.1 M (1.3 ml), NAD<sup>+</sup> 0.03 M (100 µl), UDP Glc déshydrogénase ( $3 \times 10^{-2}$  UI). On incube 30 min à 25° et on mesure la *A* à 340 nm par rapport au témoin enzyme. L'activité spécifique est exprimée en unités correspondant au nombre de nmol d'UDP Gal transformées par sec et par mg de protéines (nkat/mg de protéines).

Dans la technique à la glucose-oxydase par le 'Glucostat', les milieux d'incubation sont les suivants: UDP Gal 0.025 M (50 µl), tampon glycine–NaOH, pH 8.7, 0.1 M (350 µl), solution enzymatique (25 µl), eau (75 µl). Incubation à 25°. Addition de 100 µl d'HCl N, hydrolyse 30 min à 100°, addition de 100 µl de NaOH N puis de 1.3 ml d'eau et de 2 ml de réactif 'Glucostat'. Incubation 10 min à la température ambiante. Arrêt de la réaction par 1 goutte d'HCl 4 N. Lecture après 5 min à 425 nm, contre un témoin.

Le dosage du galactose à la galactose-oxydase par le 'Galactostat' se fait ainsi: à 500 µl de milieu enzymatique, addition de 100 µl d'HCl N, hydrolyse 30 min à 100°, addition de 100 µl de NaOH N puis de 1.3 ml d'eau et de 2 ml de réactif 'Galactostat'. Incubation 60 min à 37°. Arrêt de la réaction par 0.3 ml d'une solution d'EDTA 0.5 M. Lecture à 425 nm contre un témoin.

**Dosage des protéines.** La concentration en protéines est évaluée selon la méthode de Lowry [21], l'étalonnage étant réalisé avec de la sérumalbumine bovine, ou par mesure de l'absorption différentielle à 260 et 280 nm, selon Warburg et Christian [22].

**Détermination du poids moléculaire.** Il a été évalué sur colonne d'Ultrrogel AcA 44, équilibrée avec un tampon phosphate 0.05 M. La colonne est étalonnée au préalable avec du bleu dextran, de la myoglobine, de l'ovalbumine, de la sérumalbumine, de la lactate-déshydrogénase et des  $\gamma$ -globulines.

**Chromatographie sur hydroxylapatite.** Elle a été réalisée selon la méthode de Levin [23].

#### RÉFÉRENCES

1. Glaser, L. (1972) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed.) Vol. VI, pp. 355–380. Academic Press, New York.
2. Darrow, R. A. et Rodstrom, R. (1968) *Biochemistry* 7, 1645.
3. Darrow, R. A. et Rodstrom, R. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 2036.
4. Bertland, A. U. et Kalckar, H. M. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61, 629.
5. Bertland, A. U. (1970) *Biochemistry* 9, 4649.
6. Ray, M. et Bhaduri, A. (1976) *Eur. J. Biochem.* 70, 319.
7. Wilson, D. B. et Hogness, D. S. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 2469.
8. Wilson, D. B. et Hogness, D. S. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 2132.
9. Nelse-Tuen, G. J. et Kirkwood, S. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 7533.
10. Maitra, U. S. et Ankcl, H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1477.
11. Maxwell, E. S. (1957) *J. Biol. Chem.* 229, 139.
12. Tsai, C. M., Holmberg, N. et Ebner, K. E. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 233.
13. Neufeld, E. F. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
14. Fan, D. F. et Feingold, D. S. (1969) *Plant Physiol.* 44, 599.
15. Dalessandro, G. et Northcote, D. H. (1977) *Biochem. J.* 162, 267.
16. Dalessandro, G. et Northcote, D. H. (1977) *Biochem. J.* 162, 281.
17. Strominger, J. L., Maxwell, E. S., Axelrod, J. et Kalckar, H. M. (1957) *J. Biol. Chem.* 224, 79.
18. Washko, M. E. et Rice, E. W. (1961) *Clin. Chem.* 7, 542.
19. Avigad, G., Amaral, D., Asensio, C. et Horecker, B. L. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 2736.
20. Jacob, J. L. et Sontag, N. (1974) *Biochimie* 56, 1315.
21. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
22. Warburg, O. et Christian, W. (1941) *Biochem. Z.* 310, 384.
23. Levin, O. (1962) in *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., eds.) Vol. V, pp. 27–32. Academic Press, New York.