

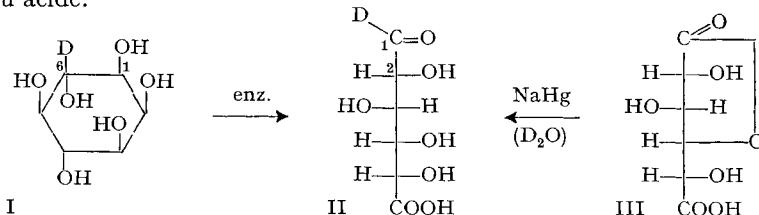
244. Sur la glucogenèse à partir de la D-glucuronolactone-1-D chez le Rat phloriziné, et sur la stéréospécificité de quelques réactions enzymatiques

par Th. Posternak, W. H. Schopfer et E. Charollais

(4 X 60)

Dans des travaux antérieurs^{1,2)} nous avons étudié chez le Rat phloriziné le mécanisme de la glucogenèse à partir de ms-inositol marqué à différents carbones par du deutérium. Les emplacements de l'isotope dans le glucose urinaire étaient en accord avec un schéma d'après lequel le cyclitol se convertirait d'abord en acide D-glucuronique; la glucogenèse s'effectuerait à partir de ce dernier par une suite de réactions dont on avait montré l'existence dans les tissus animaux. Ces conclusions ont été confirmées en principe par des essais au moyen d'inositol marqué par du ¹⁴C³).

Dans le présent travail nous examinons quelques aspects de cette glucogenèse. D'après le schéma indiqué, le ms-inositol-6-D (I) utilisé autrefois²⁾ se transformeraient en acide D-glucuronique-1-D (II). Nous avons synthétisé ce produit intermédiaire par une méthode dont le principe avait été indiqué par SUTTER & REICHSTEIN⁴⁾: réduction de la D-glucosaccharolactone-1,4 (III) par l'amalgame de sodium dans D₂O en milieu acide.



Administré par voie intrapéritonéale à des rats phlorizinés, le glucuronate de sodium deutérié ne produit qu'une incorporation insignifiante d'isotope dans le glucose urinaire, conformément à des travaux antérieurs qui avaient montré que c'est la D-glucuronolactone qui est la forme métaboliquement active. La D-glucuronolactone-1-D donne lieu effectivement, dans nos conditions d'expériences, à une incorporation de 7 à 12%. A partir du ms-inositol-6-D, il s'était formé du glucose marqué essentiellement en C-1 et C-3²); à partir de la D-glucuronolactone-1-D, on observe les mêmes emplacements principaux de marquage.

La détermination des quantités de deutérium fixées aux différents carbones du glucose a été effectuée, comme indiqué autrefois²⁾, par dosage de l'isotope dans divers dérivés et produits de dégradation: p-nitrophénylhydrazone, phénylglucosazole, phényl-2-formyl-4-osotriazole, acide phényl-2-osotriazole-carboxylique-4, gluconate de potassium. Le tableau suivant indique les résultats obtenus.

¹⁾ TH. POSTERNAK, W. H. SCHOPFER & D. REYMOND, Helv. 38, 1283, 1660 (1955).

²⁾ TH. POSTERNAK, W. H. SCHOPFER, D. REYMOND & C. LARK, Helv. 41, 235 (1958).

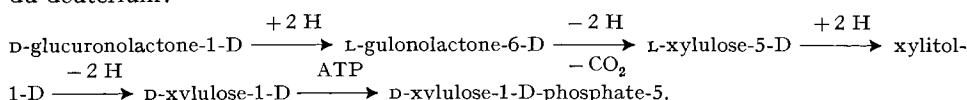
³⁾ L. ANDERSON & R. H. COOTS, Biochim. biophysica Acta 28, 660 (1958).

⁴⁾ M. SUTTER & T. REICHSTEIN, Helv. 27, 1210 (1938).

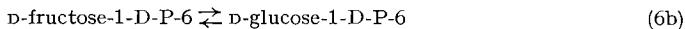
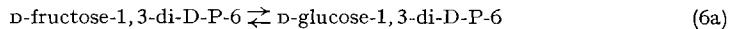
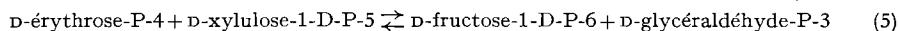
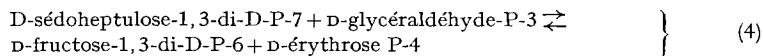
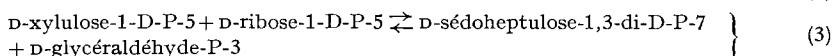
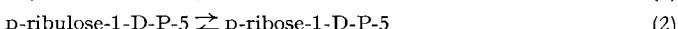
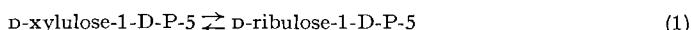
N°s des carbones du glucose	D en % du D total du glucose	
	Série A (2 rats). Glucose de l'urine de 24 h contenant 0,173 at.% D en excès	Série B (2 rats) Glucose de l'urine des 12 premières heures contenant 0,23 at.% D en excès
1	69,6 ± 3,2	56,5 ^{a)}
2	0	—
3	16,1	21,8 ^{a)}
4 + 5 + 6	14,3 ± 3,2	—
	Série A	Série B
% D en C-3/% D en C-1	0,23	0,38

Après administration à des rats et à des cobayes de L-gulonolactone⁵⁾ marquée en C-6 par du ¹³C ou du ¹⁴C, EISENBERG et coll.⁶⁾ avaient constaté de même, dans le glucose du glycogène hépatique, une répartition principale en C-1 et C-3. Les rapports C-3/C-1 des quantités d'isotope présentes dans ces deux emplacements allaient de 0,24 à 0,36; ils sont du même ordre que les valeurs 0,23 (urine de 24 h) et 0,38 (urine des 12 premières heures) que nous observons. Partant du ms-inositol-6-D, nous avions trouvé, il est vrai, un rapport plus élevé: 0,82-0,85 (urine de 24 h); une explication sera apportée dans une publication ultérieure.

On peut tirer de cette étude au moyen de précurseurs deutériés quelques conclusions quant à la stéréospécificité de certains enzymes intervenant dans la glucogenèse. Au cours de cette dernière, la glucuronolactone-1-D est transformée en D-xylulose-1-D-phosphate-5 par des réactions qui ne peuvent entraîner d'élimination du deutérium:



Au cours des processus ultérieurs («pentose phosphate pathway») il intervient notamment les fermentes suivants: transcétolases, transaldolase, isomérasées, épimérase.

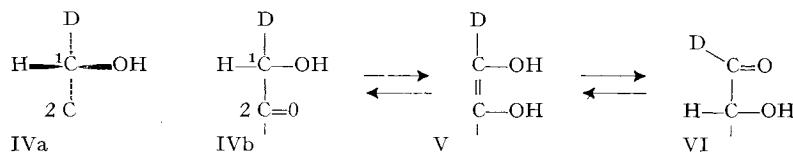


⁵⁾ Ce produit se forme *in vivo* par hydrogénéation de la glucuronolactone.

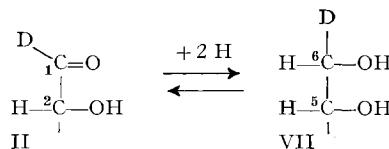
⁶) F. EISENBERG JR., P. G. DAYTON & J. J. BURNS, *J. biol. Chemistry* **234**, 250 (1959).

La réaction de la phosphopentose-3-épimérase (réaction (1)) ne peut entraîner d'élimination du deutérium en C-1. Les transcétolases (réactions (3) et (5)) et la transaldolase (réaction (4)) effectuent des transferts réversibles du groupement $-\text{CHDOH}$ présent en position 1 dans le xylulose, le sédoheptulose et le fructose; ces transferts, sous forme de glycolaldéhyde ou de dihydroxyacétone «activés», ne comportent pas d'échanges de deutérium, ni apparemment de réarrangements stéréochimiques du groupement.

Il intervient d'autre part deux isomérasées, la phosphoribos-isomérase (réaction (2)) et la phosphogluco-isomérase (réactions (6)), dont l'action comporte probablement la formation intermédiaire d'un diénol en C-1, C-2⁷). Le fait que l'isotope administré sous forme de D-inositol-6-D ou de glucuronolactone-1-D se retrouve en partie en C-1 dans le glucose final, indique que dans le cas de ces deux enzymes l'enolisation ne provoque pas d'échanges du deutérium sous forme d'ion. Les deux cétooses, xylulose et fructose, ayant en position 1 un groupement $-\text{CHDOH}$ de même origine, et partant de même configuration, en raison des transferts mentionnés ci-dessus, il faut attribuer la même stéréospécificité aux deux isomérasées. Cette conclusion vient d'être confirmée par ROSE & O'CONNELL⁸⁾ qui ont indiqué en outre, en se basant sur l'action de l'oxydase de l'acide glycolique, la configuration absolue IVa du groupe $-\text{CHDOH}$ nécessaire pour la rétention de l'isotope lors de l'isomérisation (IVb-VI).



Le groupe $-\text{CHDOH}$ en position 1 des deux cétooses a son origine dans celui en position 6 de la L-gulonolactone. On en déduit la stéréospécificité (II-VII) de l'hydrogénéation de l'acide D-glucuronique-1-D (II) (ou de sa lactone) en acide (ou lactone) gulonique-6-D (VII) sous l'action du ferment à base de TPN, décelé entre autres dans le rein de Rat⁹⁾. Cette stéréospécificité est la même que celle indiquée par VAN EYS & KAPLAN¹⁰⁾ pour l'alcool-déhydrase de la levure.



Ajoutons, puisque le glucose final contient du deutérium en C-3, que lors de la réaction (4) de la transaldolase il n'y a pas de départ d'isotope fixé en C-3 du sédoheptulose-phosphate-7. On pourrait se faire la représentation suivante:

⁷⁾ Y. J. TOPPER, J. biol. Chemistry 225, 419 (1957); W. A. WOOD & M. W. McDONOUGH, Federation Proc. 18, 354 (1959).

⁸⁾ I. A. ROSE & E. L. O'CONNELL, Biochim. biophysica Acta 42, 159 (1960).

⁹⁾ M. UL HASSAN & A. L. LEHNINGER, J. biol. Chemistry 223, 123 (1956); A. P. GROLLMAN & A. L. LEHNINGER, Arch. Biochem. Biophysics 69, 458 (1957).

¹⁰⁾ J. VAN EYS & N. O. KAPLAN, J. Amer. chem. Soc. 79, 2784 (1957).

Lors du transfert, la «dihydroxyacétone activée» forme avec l'enzyme une combinaison analogue à celle dont on a montré l'existence entre l'aldolase et la phosphodihydroxyacétone¹¹⁾. Dans cette dernière combinaison, un des atomes d'hydrogène du phosphotriose est bien échangeable sous forme de proton mais c'est celui qui, lors de l'addition au groupement aldéhydique de l'accepteur, est éliminé avec formation de la liaison carbone-carbone.

Ce travail a bénéficié de l'appui du FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE auquel nous exprimons toute notre gratitude. — Nous remercions vivement M. le professeur T. REICHSTEIN, Bâle, de l'envoi d'échantillons des deux glucosaccharolactones. — Les dosages de deutérium ont été effectués par M. J. NEMETH, Urbana, Ill.

Partie expérimentale

Acide D-glucuronique-1-D (II) et D-glucuronolactone-1-D. — D-glucosaccharolactone-1,4 (III). 10 g de D-glucosaccharate acide de potassium sont transformés en acide libre par passage sur une colonne de 200 g de Dowex 50 (forme H⁺); on concentre dans le vide jusqu'à consistance sirupeuse et amorce la cristallisation avec un échantillon de glucosaccharolactone-1,4. Au bout d'un temps allant jusqu'à 2 semaines, on obtient une masse entièrement cristalline contenant régulièrement, à côté de la lactone-1,4, une certaine quantité de la lactone-3,6. La séparation s'effectue par extractions répétées avec de petites quantités d'acétone glacé¹²⁾: c'est ainsi que 1,24 g de mélange est extrait à 3 reprises au moyen de 4 ml d'acétone à 4°. L'insoluble est séparé par centrifugation et consiste essentiellement en lactone-3,6 de F. 128–129°; les solutions acétонiques déposées par évaporation une quantité approximativement égale de lactone-1,4 de F. imprécis vers 90°. Pour augmenter le rendement, il est évidemment indiqué de transformer la lactone-3,6 par l'intermédiaire de son sel de potassium en acide libre et de répéter les opérations.

Chromatographie sur papier: WHATMAN No. 1; n-butanol/acide acétique H₂O 40:10:50; révélation par le réactif de TOLLENS à chaud¹³⁾. Distances parcourues à 20–22° en 90 h: glucosaccharolactone-1,4 13,2 cm; glucosaccharolactone-3,6 7,3 cm. Le système de dissolvants indiqué convient ainsi pour le contrôle de pureté des deux lactones.

D-glucuronate-1-D de sodium. La réduction de la lactone-1,4 par l'amalgaem de sodium a été effectuée en principe dans les conditions indiquées par SUTTER & REICHSTEIN⁴⁾. L'opération a lieu à l'abri de l'humidité de l'air avec forte agitation mécanique et refroidissement dans la glace. 1,5 g de lactone dissous dans 13 ml de D₂O à 99,8% est additionné de 22 g d'amalgame de sodium à 2,5%; on introduit immédiatement la quantité théoriquement nécessaire d'une solution à 20% d'acide sulfurique dans l'eau lourde obtenue en traitant SO₃ par D₂O. L'opération est répétée avec 22 g, 11 g et 5 g d'amalgame, soit en tout 60 g, la quantité totale d'acide sulfurique deutérié employée étant de 8,7 ml. L'acide glucuronique formé est dosé, soit d'après NELSON¹⁴⁾ soit par la méthode à l'orcinal¹⁵⁾; trouvé: 1,25 g. L'élimination du Na₂SO₄ et la précipitation du glucosaccharate résiduel comme sel de baryum sont effectuées comme décrit⁴⁾. Après élimination quantitative des ions Ba⁺⁺ par H₂SO₄, on fait passer sur une colonne de Dowex-50 (H⁺). Le liquide est concentré dans le vide; on neutralise avec précaution par NaOH à la phénolphthaleine et précipite le glucuronate de sodium par addition graduelle de 10 vol. d'alcool absolu; la recristallisation s'effectue par dissolution dans la quantité minimum d'eau bouillante, suivie d'addition de 10 vol. d'alcool. Rendement: 60–70% de la quantité trouvée par dosage. Calculé (1 at. D et 8 at. H) 11,1 at. % D en excès; trouvé 11,6 at.% D en excès, dont 95,6% sont en position 1 et sont éliminés lors de l'oxydation en acide glucosaccharique selon MOORE & LINK¹⁶⁾.

¹¹⁾ I. A. ROSE & S. V. RIEDER, J. Amer. chem. Soc. 77, 5764 (1955); B. BLOOM & Y. J. TOPPER, Science 124, 982 (1956).

¹²⁾ F. SMITH, J. chem. Soc. 1944, 634.

¹³⁾ TH. POSTERNAK, D. REYMOND & W. HAERDI, Helv. 38, 191 (1955).

¹⁴⁾ N. NELSON, J. biol. Chemistry 153, 375 (1944).

¹⁵⁾ F. C. CHARALAMPOUS & C. LYRAS, J. biol. Chemistry 228, 1 (1957).

¹⁶⁾ S. MOORE & K. P. LINK, J. biol. Chemistry 133, 293 (1940).

D-glucurono-1-D-lactone-3,6. Le sel de sodium est transformé en acide libre par passage sur une colonne Dowex-50 (H^+). La solution concentrée à consistance sirupeuse est reprise par l'acide acétique glacial¹⁾ (30 ml par g d'acide glucuronique); on porte rapidement à l'ébullition, refroidit immédiatement et abandonne quelques heures. Les cristaux de glucurone séparés sont lavés à l'éther; on recristallise par dissolution dans l'alcool méthylique bouillant (4 ml pour 150 mg), suivie d'addition après refroidissement de 1,5 vol. d'éther; F. 178–180°.

Autres techniques employées. — *Traitements des animaux.* On a utilisé des rats WISTAR mâles adultes (SPRICH, Biel-Benken) d'un poids allant de 290 à 345 g. La quantité totale de glucuronolactone administrée en 3 injections intrapéritonéales était de 200 mg par animal. Pour le traitement préalable par la phlorizine, l'horaire des injections et l'isolement du glucose urinaire, nous renvoyons à nos indications antérieures^{1,2)}. Le glucose a été isolé dans une série d'expériences A de l'urine de 24 h, dans une autre série B de l'urine des 12 premières heures.

Dégradations du glucose. Nous avons effectué, selon les prescriptions décrites antérieurement^{1,2)}, les préparations des dérivés et des produits de dégradation du glucose utilisés pour les dosages de deutérium: p-nitrophénylhydrazone, phénylglucosazone, gluconate de potassium, phényl-2-formyl-4-osotriazole et acide phényl-2-osotriazole-carboxylique-4.

RÉSUMÉ

La préparation de l'acide-D-glucuronique-1-D et de la D-glucuronolactone-1-D est décrite. En confirmation du mécanisme indiqué autrefois pour la glucogenèse à partir du ms-inositol, la D-glucuronolactone-1-D se convertit chez le Rat phloriziné en glucose marqué essentiellement en C-1 et en C-3. On en tire des conclusions quant à la stéréospécificité de certaines réactions enzymatiques intermédiaires.

Genève, Laboratoires de chimie biologique et
organique spéciale de l'Université
Berne, Institut de Botanique de l'Université

¹⁷⁾ W. F. GOEBEL & F. H. BABERS, J. biol. Chemistry 700, 574 (1933).

245. Die Glykoside der Knollen von *Raphionacme burkei* N. E. BR.¹⁾

Glykoside und Algykone, 220. Mitteilung²⁾

von J. BINKERT, O. SCHINDLER und T. REICHSTEIN

(22. VIII. 60)

Raphionacme HARV. ist eine zur Familie der Asclepiadaceen gehörende Pflanzengattung, von der etwa 25 Arten aus dem tropischen Afrika sowie aus Südafrika beschrieben sind³⁾; ihre Unterscheidung ist jedoch teilweise nicht gesichert⁴⁾. Die Gattung scheint nicht viel Stoffe zu produzieren, die für den Säugetier-Organismus toxisch sind, denn verschiedene Arten werden von den Eingeborenen als Nahrungs-

¹⁾ Auszug aus Diss. J. BINKERT, Basel 1956.

²⁾ 219. Mitt.: B. FECHTIG, J. v. EUW, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, Helv. 43, 1570 (1960).

³⁾ F. THONNER: Die Blütenpflanzen Afrikas, Berlin 1908, p. 471.

⁴⁾ Über die südafrikanischen Pflanzen schrieb uns Herr A. A. BULLOCK aus den Royal Botanical Gardens Kew am 3. 3. 1960 wie folgt: A whole series of forms has been described from the barren lands stretching from the southwestern seabord to the Transvaal, but the material available is not strictly comparable. I am inclined to think, however, that all belong to the same species.