

ÉTUDE COMPLÉMENTAIRE DE LA STRUCTURE DE TROIS GALACTOXYLOGLUCANES (AMYLOÏDES) DE GRAINES*

JEAN ÉMILE COURTOIS, PAUL LE DIZET ET DANIEL ROBIC

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Université Paris V, 4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris 06 (France)

(Reçu le 26 novembre 1975; accepté le 20 février 1976)

ABSTRACT

D-Galacto-D-xylo-D-glucans (amyloids) from *Balsamina*, *Tropaeolum*, and *Tamarindus* seeds behave in a similar manner in the presence of various glycosidase preparations: slow depolymerization by enzymes from several germinated or non-germinated seeds, and hydrolysis into monosaccharides and oligosaccharides by commercial cellulase and hemicellulase preparations from fungi. A purified cellulase from *Penicillium notatum* gave a dialyzable fraction almost exclusively composed of α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-glucose residues and a nondialyzable fraction composed of chains of β -D-(1 \rightarrow 4)[with some (1 \rightarrow 3)]-glucopyranosyl residues; β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-xylosyl groups are linked to some of the β -D-glucosyl residues at O-6. The presence of (1 \rightarrow 3)-linkages in the D-glucan chain of the *Balsamina* was verified by methylation and sequential periodate oxidation-borohydride reduction; the distribution of the substituents on the D-glucan chain is not regular. The main D-glucan backbone, where the β -D-glucosyl residues are partly linked at O-6 to β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 2)-D-xylosyl groups, is linked to D-glucan chains where almost all the D-glucose units are linked at O-6 by one α -D-xylosyl group. The presence of 3,6-di-O-methyl-D-glucose after permethylation and hydrolysis suggests that the xyloglucan chains are linked to O-2 of the D-glucosyl units of the galactoxyloglucan backbone.

SOMMAIRE

Les D-galacto-D-xylo-D-glucanes (amyloïdes) des graines de *Balsamina*, *Tropaeolum* et *Tamarindus* se sont comportées d'une façon similaire avec diverses préparations de glycosidases: lente dépolymérisation par les enzymes de quelques graines germées ou non-germées; hydrolyse en monosaccharides et oligosaccharides par les préparations commerciales de cellulases et hémicellulases d'origine fongique. La cellulase de *Penicillium notatum* a été purifiée. Elle scinde les amyloïdes en une fraction dialysable constituée presque exclusivement d' α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-glucose et en une fraction non-dialysable constituée d'une chaîne d'unités β -D-

*Dédié à la mémoire du Professeur E. J. Bourne.

glucopyranosyles reliées en (1→4) et quelques liaisons (1→3); une partie des unités de D-glucose sont branchées en C-6 par des restes de β -D-galactopyranosyl-(1→2)- α -D-xylose. La présence de liaisons (1→3) dans la chaîne de D-glucane de l'amyloïde de *Balsamina* a été vérifiée par perméthylation et oxydation par l'acide periodique, alternées avec la réduction du polysaccharide oxydé. La répartition des substituants le long de la chaîne de glucane est irrégulière. Sur une chaîne centrale de D-glucane où une partie des unités de D-glucose sont substituées en C-6 par les restes de β -D-galactopyranosyl-(1→2)-D-xylose se rattachent des chaînes de D-glucane où presque tous les résidus de D-glucose sont substitués en C-6 par des résidus d' α -D-xylopyranosyle. La présence de 3,6-di-*O*-méthyl-D-glucose après perméthylation et hydrolyse laisse envisager que les chaînes de xyloglucanes se rattachent en C-2 sur des résidus de D-glucose non substitués en C-6 de la chaîne centrale de galactoxyloglucane.

INTRODUCTION

Au cours de recherches antérieures¹⁻⁴ nous avons comparé trois D-galacto-D-xylo-D-glucanes (amyloïdes) de graines. Ces amyloïdes s'y trouvaient en proportions fort différentes: environ 2% chez la balsamine (Bs) (*Impatiens balsamina* L.-Balsaminacées); 20% chez la capucine (Cp) (*Tropaeolum majus* L.-Tropaeolacées) et 40% chez le tamarin (Tm) (*Tamarindus indica* L.-Coesalpinées).

Les structures antérieurement proposées pour Tm⁵⁻⁸ et Cp⁹ ont dans leur ensemble été confirmées. Nous y avons adjoint quelques modifications. Bs qui, à notre connaissance, n'avait pas encore été étudié présente une structure similaire avec une plus forte proportion de D-glucose.

Sur une chaîne d'unités β -D-glucopyranosyles liées en (1→4) se trouvent branchés en C-6 des proportions sensiblement égales de résidus α -D-xylopyranosyles et β -D-galactopyranosyl-(1→2)- α -D-xylopyranosyles. Chez Cp et Tm, environ 66% des résidus de D-glucose sont substitués en C-6 et 50% chez Bs.

En vue de compléter nos recherches nous avons étudié l'action de diverses préparations de glycosidases sur les trois amyloïdes. Une des cellulases a fourni principalement de l' α -D-xylopyranosyl-(1→6)-D-glucose et il subsistait une fraction non-dialysable renfermant la presque totalité du D-galactose de l'amyloïde. Ce résidu, après perméthylation, puis hydrolyse a permis d'identifier, parmi les dérivés *O*-méthylés, le 2,4,6-tri-*O*-méthyl-D-glucose. Nous en avons déjà décelé de faibles proportions à partir des trois amyloïdes. Ceci nous a conduits à étudier de façon plus approfondie la méthylation de Bs afin de prouver la présence de quelques liaisons (1→3) dans la chaîne de D-glucane. L'oxydation par l'acide periodique a confirmé l'existence de telles liaisons dans les trois amyloïdes.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Action de diverses préparations de glycosidases. — Les β -D-galactosidases d'*Escherichia coli*, de foie de bœuf et de graines de sarrasin, très efficaces sur le

β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-xylose et sur le lactose, n'ont exercé aucune action sur les trois amyloïdes. Il est vraisemblable que les centres actifs de ces enzymes ne peuvent accepter des molécules de la taille des amyloïdes. Nous avons signalé que des α -D-galactosidases purifiées, actives sur les D-galacto-D-mannanes, n'avaient pas libéré de D-galactose à partir des amyloïdes. Ce résultat constituait un argument indirect en faveur de l'absence de liaisons α -D-galactosidiques terminales dans les amyloïdes. Comme il était prévisible, les α -amylases salivaire ou pancréatique n'ont manifesté aucune action sur les amyloïdes.

Diverses préparations de graines germées contenant diverses glycosidases associées ont réalisé une lente et partielle dépolymérisation des trois amyloïdes, sans libérer aucun des trois monosaccharides constitutifs. Ce fut le cas avec les préparations obtenues par extraction aqueuse et précipitation par l'éthanol à partir des graines de caféier, d'amandier, de *Rhamnus cathartica* et de graines germées de sarrasin et de fenugrec. Ces faibles activités ne justifiaient pas une purification des enzymes. Cependant, nous signalons ces faits car ils indiquent que, lors de la germination, la plante peut dépolymériser les D-xylo-D-glucanes de la paroi primaire des cellules. La structure de ces corps est assez similaire à celle des amyloïdes¹⁰.

L'exoglucanase de *Sporocytophaga myxococcoides*¹¹ n'a pas libéré de D-glucose à partir de Bs. Ceci tend à confirmer les données de la perméthylation⁴ indiquant que les résidus de D-glucose en position terminale non-réductrice sont substitués par des groupes D-xylosyles.

Les préparations commerciales de cellulases et d'hémicellulases provenant d'Aspergillacées et de Basidiomycètes renferment de nombreuses glycosidases associées. Elles ont fourni des résultats complexes: dès le début de leur action elles ont libéré une faible proportion des trois monosaccharides constitutifs, associés à une série de disaccharides et d'oligosaccharides.

Le comportement le plus sélectif a été observé avec la cellulase Astra de *Penicillium notatum* qui libère principalement du α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-glucose¹⁻⁴. Il subsiste une fraction non-dialysable. Son étude n'a pu être entreprise qu'après purification de la préparation enzymatique qui contenait des pigments et des polysaccharides hydrolysables en D-mannose, D-glucose et D-galactose.

Les tentatives de purification par précipitation fractionnée avec le sulfate d'ammonium ou sur colonne de Sephadex G-25 se sont révélées infructueuses. Nous avons finalement retenu la fixation sur colonne d'hydroxylapatite, suivie d'une élution par des solutions de molarités croissantes de tampon phosphate de potassium de pH 6,8. À la concentration 1mM sont extraits les polysaccharides et les pigments contaminants. À 0,1M sort une D-glucanase hydrolysant l'(hydroxyéthyl)cellulose, les cellodextrines, la laminarane et les trois amyloïdes. Cette D-glucanase demeure associée à une faible proportion de cellobiase et de D-glucose-oxydase dont la plus grande partie est éluee ensuite par le tampon 0,2M. Il n'y a pas de D-galactose-oxydase dans la fraction 0,1M. Cette D-glucanase n'attaque pas à partir de l'extrémité réductrice terminale: elle hydrolyse à des vitesses très voisines l'amyloïde Tm et ce polysaccharide réduit par le borohydrure de potassium.

Action de la D-glucanase purifiée de Penicillium notatum. — À pH 6,8 et à 37° l'enzyme provoque immédiatement un abaissement de la viscosité des solutions des trois amyloïdes. Après 48 h nous procédons à une inactivation thermique de l'enzyme et dialysons dans un boyau de cellophane contre de l'eau distillée.

(a) *Étude du dialysat.* — Il renferme presque exclusivement l' α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-glucose. Il est associé à de petites quantités d'oligosaccharides dont les trois plus abondants ont été séparés par chromatographie sur papier et élués par l'eau. Cp et Tm ont conduit aux mêmes constituants: (1) Un trisaccharide libérant par hydrolyse acide totale 1 résidu de D-xylose et 2 résidus de D-glucose. L'hydrolyse acide partielle le scinde en D-xylose, D-glucose, cellobiose et α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-glucose. Il s'agit donc d'un oligosaccharide résultant de la fixation d'un groupe α -D-xylopyranosyle en O-6 ou en O-6' sur un reste de cellobiose. (2) Un tétrasaccharide libérant par hydrolyse totale 2 molécules de D-xylose et 2 molécules de D-glucose. (3) Un hexasaccharide dont l'hydrolyse acide totale fournit 2 molécules de D-xylose, 2 de D-glucose et 2 de D-galactose.

(b) *Étude de la fraction non-dialysable.* — Elle ne se colore pas par l'iode comme les amyloïdes initiaux. Elle correspond à 50 à 60 % du polysaccharide initial (Cp et Tm) et même 75 % (Bs). Après hydrolyse acide totale, les proportions moléculaires des monosaccharides D-galactose, D-xylose et D-glucose sont voisines de 1:1:2 pour Cp et Tm et de 1:1:3-3,5 pour Bs. La β -D-galactosidase de *E. coli* demeure sans effet sur ces composés.

L'addition de 3 volumes d'éthanol insolubilise environ 50 % des composants pour Cp et Tm et 43 % pour Bs. Les fractions ainsi précipitées ont sensiblement les mêmes proportions en ces trois monosaccharides que la fraction non-dialysable globale. Il en a été de même en réalisant des précipitations par l'éthanol à différentes concentrations.

La fraction demeurée en solution dans l'éthanol à 76% a été évaporée à sec, reprise par l'eau et soumise à une chromatographie descendante sur papier dans le système-solvant butanol-pyridine-eau (2:1:1, v/v). Une migration très lente de deux semaines a différencié trois oligosaccharides de poids moléculaire élevé. Ceux obtenus à partir de Cp, classés d'après leurs mobilités croissantes, fournissent par hydrolyse acide totale les rapports moléculaires suivants pour D-galactose:D-xylose:D-glucose: oligosaccharide A (80 mg): 1:0,93:2,2; oligosaccharide B (20 mg): 1:1,1:3,0; oligosaccharide C (33 mg): 1:0,98:1,58.

L'ensemble de la fraction non-dialysable a été soumis à la perméthylation suivie d'hydrolyse. Les dérivés O-méthyles ont été identifiés par chromatographie sur papier. Les fractions non-dialysables provenant des trois amyloïdes ont conduit aux mêmes dérivés. Ce sont qualitativement ceux déjà obtenus à partir des amyloïdes intacts¹⁻⁴.

Nous avons donc décelé les dérivés O-méthyles suivants: 3,4-di-O-méthyl-D-xylose et 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-galactose en proportions sensiblement égales. Le 2,3,4-tri-O-méthyl-D-xylose est en quantité très minime alors qu'il était équivalent aux deux dérivés précédents dans les amyloïdes intacts. Ceci tend donc à indiquer que

la presque totalité des restes de D-xylose sont glycosylés par des restes de D-galactose. La proportion de 2,3,6-tri-*O*-méthyl-D-glucose est nettement plus élevée qu'avec l'amyloïde intact; il en résulte que les unités de D-glucose non-branchées en C-6 se rencontrent principalement dans cette fraction non-dialysable. Ce résultat concorde avec le fait que le 2,3-di-*O*-méthyl-D-glucose provenant des restes de D-glucose substitués en C-4 et C-6 est proportionnellement moins abondant à partir des fractions non-dialysables que des amyloïdes intacts. De faibles quantités de 2,3,4-tri-*O*-méthyl-D-glucose dérivent des extrémités non-réductrices terminales branchées en C-6. Les fractions non-dialysables ont fourni irrégulièrement des traces du 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-glucose que nous n'avions pas décelé à partir des amyloïdes intacts.

L'extrémité non-réductrice de certains des oligosaccharides à poids moléculaire élevé associés dans la fraction non-dialysable pourrait donc être constituée d'un reste de D-glucose non-substitué.

Les amyloïdes intacts avaient conduit à de faibles quantités d'un composé migrant par chromatographie comme le 2,4,6-tri-*O*-méthyl-D-glucose. Dans les fractions non-dialysables des trois amyloïdes, ce dérivé s'est révélé bien plus abondant et identifiable sans ambiguïté. Il paraît ne pouvoir correspondre qu'à des liaisons (1→3) entre les unités β -D-glucopyranosyles de la chaîne de D-glucane. Toutefois, l'intervention d'une réaction enzymatique de transfert ne pouvait être exclue. Dans le but de vérifier qu'il ne s'agissait pas d'un artefact provoqué par une telle enzyme, nous avons étudié de façon plus approfondie la méthylation de l'amyloïde intact de Bs.

Perméthylation et hydrolyse de l'amyloïde de balsamine. — La séparation des dérivés *O*-méthyles par chromatographie préparative a permis d'identifier, sous forme de leurs anilides, les dérivés du 2,3-di-*O*-méthyl-D-glucose, du 2,3,4-tri-*O*-méthyl-D-xylose, du 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-galactose et, principalement, du 2,4,6-tri-*O*-méthyl-D-glucose. Les dérivés du 3,6-di-*O*-méthyl-D-glucose et du 3,4-di-*O*-méthyl-D-xylose qui avaient migré de façon similaire sur papier ont été convertis en acétates d'alditols et identifiés par g.l.c. associée à la spectrométrie de masse.

La fragmentation a permis d'identifier un nouveau dérivé di-*O*-méthyle à partir de l'amyloïde: le 3,6-di-*O*-méthyl-D-glucose. Il existe donc, dans la chaîne, des unités de D-glucose substituées à la fois en C-4 et en C-2.

Le dosage à l'hypoiodite des fractions séparées donne le rapport molaire suivant: 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-galactose: 1; 2,3,4-tri-*O*-méthyl-D-xylose: 1; mélange des 2,3,6- et 2,4,6-tri-*O*-méthyl-D-glucose: 3,34; mélange des 3,4-di-*O*-méthyl-D-xylose et des 2,3- et 3,6-di-*O*-méthyl-D-glucose: 2,09.

Oxydation par l'acide periodique. — La perméthylation suivie d'hydrolyse indique que, dans la chaîne de D-glucane, certaines unités de D-glucose sont liées à l'unité de D-glucose précédente par une liaison (1→3) et ne sont pas substituées en C-6. En outre, quelques unités de D-glucose sont substituées en C-2 et C-4. Dans les deux cas, l'acide periodique ne devrait pas attaquer ces unités de D-glucose ne possédant plus de groupements α -glycol libres. Deux principaux obstacles de cette oxydation sont la formation d'hémiacétals entre les groupes aldéhydiques formés et les fonctions alcooliques et l'attaque secondaire progressive, suroxydation à partir de l'extrémité

réductrice lorsqu'elle conduit à un dérivé du dialdéhyde tartronique du type R-O-CH-(CHO)₂. Il est possible d'obvier au premier obstacle en réduisant les fonctions aldéhydiques en fonctions alcooliques et en ajoutant à nouveau de l'acide periodique, ce qui a donné des résultats satisfaisants avec une galactomannane¹². Par contre, l'alditol provenant de l'extrémité terminale non-réductrice est plus aisément attaqué que le monosaccharide dont il dérive, ce qui facilite la suroxydation. Afin de savoir s'il restait des résidus de D-glucose non attaqués après oxydation periodique poussée, nous avons procédé à quatre oxydations successives entre lesquelles s'intercalait la réduction des fonctions aldéhydiques présentes. La suroxydation ne pouvait que détruire en arrivant à leur niveau, par récurrence, les résidus de glucose soit liés en 1→3, soit substitués en 2 et 4.

Le Tableau I montre que la suroxydation se manifeste dès le début et se poursuit ensuite régulièrement. En effet, la proportion d'acide formique est déjà supérieure à la théorie après la première oxydation de 30 h. À la fin de la troisième étape, les quantités d'oxydant réduit et d'acide libéré sont très supérieures à la théorie. Au début de l'oxydation il apparaît une augmentation de la viscosité avec Tm et un

TABLEAU I

ACIDE PERIODIQUE^a (PI) RÉDUIT ET GROUPES ACIDES^a (Ac) LIBÉRÉS PAR OXYDATIONS PROGRESSIVES^b

Étapes	Origine du polysaccharide					
	Balsamine ^c		Capucine ^d		Tamarin ^d	
	PI	Ac	PI	Ac	PI	Ac
1	8,25	2,75	4,93	2,14	5,02	2,57
2	4,36	1,47	4,56	1,55	4,82	1,66
3	1,59	0,73	1,60	0,64	1,66	0,77
Totaux	14,20	4,95	11,09	4,33	11,50	5,00

^aEn moles. ^bEn 3 étapes successives de 30 h entre lesquelles s'intercale une réduction par le borohydrure. ^cPour l'amyloïde de balsamine, les valeurs sont rapportées à un élément de chaîne β-D-Galp-(1→2)-α-D-Xylp-(1→6)-β-D-Glcp-(1→4)-β-D-Glcp-(1→4)-β-D-Glcp-(1→4)-[α-D-Xylp-(1→6)]-β-D-Glcp susceptible de réduire 9 mol de HIO₄ en libérant 2 mol d'acide formique. ^dPour les amyloïdes de capucine et de tamarin, les valeurs sont rapportées à un élément de chaîne β-D-Galp-(1→2)-α-D-Xylp-(1→6)-β-D-Glcp-(1→4)-β-D-Glcp-(1→4)-[α-D-Xylp-(1→6)]-β-D-Glcp qui devrait théoriquement réduire 8 mol de HIO₄ en libérant 2 mol d'acide formique.

précipité avec Bs et Cp qui se redissout après réduction par le borohydrure. L'attaque par l'acide periodique débute très préférentiellement sur les groupes D-galactopyranosyles terminaux des branchements qui sont les plus accessibles. Après 24 h de contact avec l'oxydant, les résidus de D-galactose sont totalement oxydés dans Bs; le rapport moléculaire glucose:xylose initialement de 2,25 s'est élevé à 3,6 dans le polysaccharide oxydé puis réduit. Dans les mêmes conditions, avec Cp, les rapports molaires galactose:xylose:glucose initialement de 1:2:3 se sont élevés à 1:3,3:8,8. Avec Tm, ils s'élèvent de même de 1:2:3 à 1:4,3:7,7. Dans Bs, les branchements sur la

chaîne de D-glucane sont moins nombreux et de ce fait les résidus de D-galactose plus éloignés, ce qui explique la disparition plus rapide de ces résidus dans Bs que dans Cp et Tm.

Les résidus de D-xylose situés dans les branchements sont également attaqués plus rapidement que les résidus de D-glucose. Ces résultats confirment que les empêchements stériques entravent l'accessibilité à l'oxydant.

Le Tableau II montre qu'une partie du D-glucose échappe à l'oxydation périodique. Si l'on tient compte de la suroxydation très manifeste, il apparaît bien qu'au moins 2 % des restes de D-glucose initiaux sont liés de telle façon qu'ils ne sont pas attaqués par l'acide périodique. Cette proportion de D-glucose résistant est toujours supérieure dans la fraction non-dialysable après action de la D-glucanase que dans l'amyloïde initial. Ce résultat concorde avec l'observation que cette fraction perméthylée nous avait permis d'identifier plus facilement le 2,4,6-tri-O-méthyl-D-glucose que l'amyloïde intact.

TABLEAU II

PROPORTION DE D-GLUCOSE (%) INITIALEMENT PRÉSENT RETROUVÉ DANS L'HYDROLYSAT DE LA FRACTION SOUMISE À DES OXYDATIONS PÉRIODIQUES PAR ÉTAPES SUIVIES DE RÉDUCTION^a

Étapes	Origine du polysaccharide					
	Balsamine		Capucine		Tamarin	
	A	B	A	B	A	B
1	44,0	21,3	50,4	20,6	47,4	24
2	4,6	3,5	8,4	3,3	5,0	5,8
3	2,0	3,2	2,6	3,2	1,8	3,3
4	1,8	2,7	1,5	2,1	1,8	1,9

^aA, Amyloïde purifié. B, Fraction non-dialysable après action de la D-glucanase.

L'action de la D-glucanase purifiée de *P. notatum* montre bien l'irrégularité de répartition des substituants: certaines zones comprennent presque exclusivement des unités de D-xylose et d'autres des résidus de D-galactopyranosyl-(1→2)-D-xylose. Les résidus de D-glucose non-substitués paraissent se localiser principalement dans les zones où figurent à leurs côtés les branchements de D-galactosyl-D-xylose. Le schéma de répartition alternée de branchements de D-xylose et D-galactosyl-D-xylose, avec un ou deux résidus de D-glucose non-substitués intercalés, qui avait été adopté jusqu'ici¹⁻⁹, doit être abandonné pour les trois amyloïdes étudiés dans ce travail.

D'autre part, nous avons pu montrer par perméthylation puis hydrolyse, qu'il existait dans la chaîne de D-glucane des liaisons (1→4) prédominantes mais aussi des liaisons (1→3). L'oxydation périodique a fourni des résultats en accord avec l'existence de telles liaisons. Il en résulte que les amyloïdes ne sont pas des celluloses naturellement branchées mais plutôt un type de lichénanes branchées. On peut donc s'interroger sur le fait que la D-glucanase rompt les liaisons β-D-glucosidiques des

Purification de la D-glucanase. — La cellulase de *Penicillium notatum* a été obligeamment fournie par AB Astra (Läkemedel AB, Södertälje, Suède). L'hydroxylapatite a été préparée selon le protocole de Tiselius modifié par Levin¹⁴⁻¹⁵. Le tampon de phosphate de potassium a un pH de 6,8. Sur une colonne (16,5 × 2,5 cm) d'hydroxylapatite, on dépose la cellulase Astra (2 g) dispersée à froid dans le tampon 1mM (30 ml) et centrifugée pendant 20 min à 9000 t/min à 4°. L'élution par le tampon 1mM élimine les pigments et des polysaccharides contenant du galactose, du glucose et du mannose. Le tampon 0,01M élue la majeure partie de la D-glucanase et le tampon 0,1M la D-glucose-oxydase.

Perméthylation et hydrolyse. — C'est un protocole similaire à celui décrit par Andrews *et al.*¹⁶ qui a conduit aux résultats les plus réguliers.

Dans le cas de Bs, le polysaccharide (2,5 g) est dissous dans NaOH 2M (100 ml) et conservé pendant 12 h à 0°. On ajoute goutte à goutte ou par affusions, alternativement, le sulfate de méthyle (36 ml) et des pastilles de NaOH (30 g). Après neutralisation par l'acide acétique, on dialyse contre de l'eau distillée. La fraction non-dialysable est concentrée à 100 ml et soumise à des additions successives et alternées de sulfate de méthyle (95 ml) et de NaOH (40 g). Après une nouvelle dialyse, l'amyloïde méthylé est extrait par le chloroforme (500 ml) en 3 fois. On déshydrate par Na₂SO₄ anhydre et évapore à consistance sirupeuse. On procède ensuite à deux méthylations¹⁷ successives par l'iodure de méthyle et Ag₂O. Après extraction chloroformique et agitation avec Na₂SO₄ anhydre, on évapore. L'amyloïde méthylé (3 g) est dissous dans du méthanol avec 2 % de HCl (350 ml) et maintenu pendant 18 h à l'ébullition à reflux. La mixture est ensuite neutralisée par Ag₂CO₃ et évaporée sous pression réduite. On complète par une action de H₂SO₄ 0,25M pendant 24 h à 100°, suivie de neutralisation par SrCO₃, filtration et évaporation du filtrat à l'état de sirop (rdt. 2 g).

Séparation par chromatographie sur papier des dérivés O-méthyles. — Des feuilles de papier Whatman n° 1 sont traitées préalablement par une solution de NH₄Cl à 2 %. La séparation est réalisée par chromatographie ascendante dans le solvant octane-2-propanol-ammoniaque à 10 % (50:25:2, v/v). La révélation est faite à l'oxalate d'aniline. Les bandes de papiers découpées sont extraites par du chloroforme. Plusieurs chromatographies successives ont été nécessaires pour bien séparer les 2,3,6- et 2,4,6-tri-O-méthyl-D-glucose. Le 2,3-di-O-méthyl-D-glucose se différencie bien du 3,6-di-O-méthyl-D-glucose et 3,4-di-O-méthyl-D-xylose. Ces deux corps ont été finalement séparés par chromatographie en phase gazeuse sous la forme d'acétates d'alditol.

Les anilides des dérivés O-méthyles suivants ont été préparés sous forme cristalline: 2,3,4-tri-O-méthyl-D-xylose, p.f. 98° (litt.¹⁷ p.f. 101–102°; 2,3-di-O-méthyl-D-glucose, p.f. 130° (litt.¹⁸: p.f. 134°); 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-galactose, p.f. 200° (litt.¹⁹: p.f. 197°); 2,4,6-tri-O-méthyl-D-glucose, p.f. 164°; p.f. du mélange, 164° (litt.²⁰: p.f. 161–162°).

Le mélange de 3,6-di-O-méthyl-D-glucose et 3,4-diméthyl-D-xylose est transformé en alditoles acétates par réduction et acétylation²¹. Les oses méthylés, dissous

dans le chloroforme (1 ml) avec D_2O (1 ml), sont réduits par $NaBH_4$ (50 mg) pendant 24 h. L'excès de réactif est détruit par l'addition de résine Dowex 50 (x-8, H^+). Après filtration, HBO_2 est éliminé par addition de méthanol et évaporation ($5\text{ ml} \times 5$). Le résidu est ensuite acétylé par un mélange d'anhydride acétique (1 ml) et de pyridine (1 ml). Après évaporation en présence de benzène et de méthanol, le résidu est repris par le chloroforme. On injecte dans un chromatographe en phase gazeuse (colonne 3% OV-1, Chrom Q, 170°), couplé avec un spectromètre de masse (appareil AEI-MS 30 couplé à un ordinateur DS 50). La fragmentation classique des dérivés partiellement méthylés d'alditols acétates²² a permis d'identifier parmi les deux dérivés méthyles celui en O-3,6 du D-glucose. Le pic de base se situe à m/e 43 ($CH_3-C=O^+$). Les fragments primaires se situent à m/e 45 ($CH_2=O^+-CH_3$) et m/e 190 par rupture entre C-5 et C-6 ou C-3 et C-4, respectivement. Les fragments secondaires à m/e 130 et m/e 88 proviennent du fragment m/e 190.

Dosage iodométrique des dérivés O-méthyles. — Nous procédons à une extraction par le chloroforme des bandes de papiers découpées des chromatogrammes; après évaporation jusqu'à disparition de toute odeur de chloroforme, nous additionnons 2 ml d'eau distillée, 2 ml de I_2 0,1M et 2 ml de Na_2CO_3 à 15%. Après contact de 4 h à $+4^\circ$ dans l'obscurité, nous acidifions par HCl et titrons l'excès de I_2 par $Na_2S_2O_3$ 40mM.

Oxydation par l'acide periodique. — L'amyloïde (250 mg) est dispersé dans l'eau (47,5 ml) et additionné de HIO_4 1M (2,5 ml). Après 30 h de contact à 15° dans l'obscurité, on dialyse contre de l'eau distillée, renouvelée 4 fois, pour éliminer HIO_3 et éventuellement HIO_4 non-réduit. On ajoute du borohydrure de potassium (2 g) et on laisse en contact pendant 16 h à la température du laboratoire sous agitation magnétique. Après neutralisation à pH 6,0 par l'acide acétique, on dialyse pendant 48 h contre de l'eau distillée. On concentre ensuite à environ 50 ml sous vide et on ajoute de l'acide periodique 1M (2,5 ml). Le même cycle d'opérations est répété 3 fois de suite.

Le produit de chaque série d'opérations est hydrolysé par addition de H_2SO_4 pour obtenir une concentration 1,25M et chauffage de 6 h à 100° . Dans l'hydrolysats neutralisé, on détermine les monosaccharides séparés après chromatographie sur papier et élution selon le protocole habituel⁴. De plus, le D-glucose a été déterminé séparément avec le système D-glucose-oxydase-peroxydase-dianisidine (Trousse Boehringer).

Dans des essais parallèles, nous déterminons en outre la quantité de HIO_4 réduit par la méthode indirecte²³ à As_2O_3 -KI et l'acidité libérée par alcalimétrie après addition de 1,2-éthanediol.

RÉFÉRENCES

- 1 P. LE DIZET, *Carbohydr. Res.*, 24 (1972) 505-509.
- 2 J. E. COURTOIS ET P. LE DIZET, *C.R. Acad. Sci. Sér. D*, 277 (1973) 1957-1959.
- 3 J. E. COURTOIS ET P. LE DIZET, *C.R. Acad. Sci. Sér. C*, 178 (1974) 81-83.
- 4 J. E. COURTOIS ET P. LE DIZET, *An. Quim.*, 70 (1974) 1067-1072.
- 5 N. A. KHAN ET B. P. MUKHERJEE, *Chem. Ind. (London)*, (1959) 1413-1414.

- 6 P. KOOIMAN, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 80 (1961) 849-865.
- 7 H. C. SRIVASTAVA ET P. P. SINGH, *Carbohydr. Res.*, 4 (1967) 326-342.
- 8 H. C. SRIVASTAVA ET T. N. KRISHNAMURTHY, *Stärke*, 24 (1972) 369-372 et 405-412.
- 9 D. S. HSU ET R. E. REEVES, *Carbohydr. Res.*, 5 (1967) 202-209.
- 10 P. ALBERSHEIM dans J. B. PRIDHAM (Ed.), *Plant Carbohydrate Biochemistry*, Academic Press, Londres, 1974, pp. 145-164.
- 11 M. CHARPENTIER ET D. ROBIC, *C.R. Acad. Sci. Sér. D*, 279 (1974) 863-866.
- 12 M. F. ISHAK ET T. PAINTER, *Acta Chem. Scand.*, 27 (1973) 1268-1276.
- 13 G. J. LEONARD ET G. N. RICHARDS, *Carbohydr. Res.*, 41 (1975) 143-162.
- 14 A. TISELIUS, S. HJERTEN ET Ö. LEVIN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 132-155.
- 15 Ö. LEVIN, *Methods Enzymol.*, 5 (1962) 27-32.
- 16 P. ANDREWS, L. HOUGH ET J. K. N. JONES, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4029-4032.
- 17 T. PURDIE ET J. C. IRVINE, *J. Chem. Soc.*, 83 (1903) 1021-1037.
- 18 E. SCHLÜCHTERER AND M. STACEY, *J. Chem. Soc.*, (1945) 776-783.
- 19 E. W. PUTMAN AND W. Z. HASSID, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 2221-2223.
- 20 H. GRANICHSTÄDTEN AND E. G. V. PERCIVAL, *J. Chem. Soc.*, (1943) 54-58.
- 21 H. BJÖRNDAL, B. LINDBERG ET S. SVENSSON, *Acta Chem. Scand.*, 21 (1967) 1801-1804.
- 22 H. BJÖRNDAL, B. LINDBERG ET S. SVENSSON, *Carbohydr. Res.*, 5 (1967) 433-440.
- 23 P. FLEURY ET J. LANGE, *J. Pharm. Chim.*, 17 (1933) 107-113.