

STRUCTURE DE LA MANNANE DU PALMIER *ERYTHEA EDULIS*

DANIEL ROBIC et FRANÇOIS PERCHERON

Laboratoire de Chimie Biologique et Equipe de Recherches Associées du C.N.R.S. No. 99, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université René Descartes, 4, Avenue de l'Observatoire, Paris VI, France

(Reçu le 10 décembre 1972. Accepté le 10 janvier 1973)

Key Word Index—*Erythea edulis*; Palmae; palm; polysaccharides; $\beta(1 \rightarrow 4)$ mannan.

Abstract—The palm kernels from *Erythea edulis* contain, as a reserve polysaccharide, a $\beta(1 \rightarrow 4)$ mannan, with a structure closely similar to other palm mannans. This structure was deduced from the results of partial hydrolysis, acetolysis and methylation.

Résumé—L'endosperme des noix du palmier *Erythea edulis* contient, comme polysaccharide de réserve, une mannane $\beta(1 \rightarrow 4)$ de structure analogue à celle d'autres espèces de palmiers. Cette structure a été déterminée par l'étude des produits d'hydrolyse acide partielle, d'acétolyse et de méthylation.

INTRODUCTION

LES MANNANES sont des polysaccharides qu'on rencontre chez divers organismes: chez les microorganismes tels que les levures, où elles présentent une prédominance de liaisons $\alpha(1 \rightarrow 6)$; chez les algues, où les liaisons osidiques β sont de plusieurs types; et chez les végétaux supérieurs, principalement les palmiers, où les liaisons entre les résidus manno-pyranosyl sont $\beta(1 \rightarrow 4)$.

Les mieux connues des mannanes végétales sont celles des graines des palmiers *Phytelephas macrocarpa*, ou corozo (ivoire végétal)¹ et de *Phoenix canariensis*.² Nous avons isolé des graines d'une autre espèce de palmier, *Erythea edulis* S. Wats, une mannanne insoluble dans l'eau et soluble dans les alcalis dont nous décrivons ici l'étude structurale.

RESULTATS ET DISCUSSION

La mannanne a été isolée de la poudre d'albumen des noix d'*Erythea edulis* par extraction à la potasse suivie de purification sous forme de dérivé cuprique. L'hydrolyse acide totale du polysaccharide fournit du mannose qui a été identifié, grâce au point de fusion de sa phénylhydrazone et de sa phénylosazone. La CP de l'hydrolysat révèle la présence de mannose et de traces de galactose. La proportion de galactose a été trouvée égale à 1% par réductimétrie après élution des taches, et à 1,6% par dosage direct par la galactose oxydase.³

L'étude de la structure de la mannanne a été réalisée grâce à l'hydrolyse partielle, l'acéto-lyse et la méthylation. L'hydrolyse partielle par l'acide oxalique *N* a permis d'isoler par chromatographie préparative sur papier des oligomannosides, identifiés au mannobiose,

¹ ASPINALL, G. O., HIRST, E. L., PERCIVAL, E. G. V. and WILLIAMSON, I. R. (1953) *J. Chem. Soc.* 3184.

² LE DIZET, P. (1963) Thèse d'Ingénieur Docteur, Paris.

³ AVIGAD, G., AMARAL, D., ASENSIO, C. and HORECKER, B. L. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 2736.

mannotriose et oligosaccharides supérieurs, mais le rendement de cette hydrolyse est très faible car le polysaccharide est insoluble, ce qui rend son attaque difficile par l'acide. Ces mêmes oligomannosides furent obtenus en quantités plus importantes par acétolyse. On obtient ainsi un mélange de dérivés acétylés d'oligosaccharides, qui, après désacétylation a été fractionné par chromatographie préparative sur papier conduisant à l'isolement de mannobiose et mannotriose cristallisés. Le mannobiose ne libère à l'hydrolyse que du mannose; le degré de polymérisation d'après le pouvoir réducteur est de 2. La masse moléculaire déterminée par mesure de l'absorption de sa phénylosazone⁴ correspond parfaitement à celle d'un hexobiose. La valeur négative du pouvoir rotatoire, le comportement vis-à-vis de l'acide périodique ainsi que la migration chromatographique confirment bien que nous sommes en présence de $O\text{-}\beta\text{-D-mannopyranosyl-(1}\rightarrow 4\text{)}\text{-}\beta\text{-D-mannopyranose}$.

Le mannotriose: l'hydrolyse acide totale ne libère que du mannose; alors que l'hydrolyse partielle libère mannose et mannobiose. L'oxydation périodique ne révélant pas de palier d'oxydation mais une attaque continue de la molécule par superoxydation est compatible avec celle d'un trisaccharide à liaison (1 → 4). Le pouvoir rotatoire est conforme à celui de la littérature pour le β mannotriose. L'ensemble de ces données conduit à attribuer à ce trisaccharide la structure $O\text{-}\beta\text{-D-mannopyranosyl-(1}\rightarrow 4\text{)}\text{-}O\text{-}\beta\text{-D-mannopyranosyl-(1}\rightarrow 4\text{)}\text{-}\beta\text{-D-mannopyranose}$.

La mannane a été ensuite soumise à la méthylation selon la méthode d'Hakomori,⁵ puis selon la méthode de Purdie.⁶ Nous avons pu montrer la présence dans l'hydrolysat du produit méthylé du 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-mannose, 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-galactose, 2,3,6-tri-*O*-méthyl-D-mannose, 2,3-di-*O*-méthyl-D-mannose. La séparation de ces mêmes dérivés par GLC nous a permis d'évaluer le rapport des surfaces des pics correspondant au tri-*O*-méthyl-D-mannose à ceux du tétra-*O*-méthyl-D-mannose et du tétra-*O*-méthyl-D-galactose et nous a conduit à envisager la présence de 1 mannose ou 1 galactose terminal ou branché, pour 11 résidus de mannose en chaîne linéaire $\beta(1\rightarrow 4)$.

Ce résultat permet de concevoir, soit une longueur de chaîne (DP) de 11, avec un branchement de mannose en 6 sur l'une des unités de la chaîne, une chaîne sur deux environ possédant un galactose branché ou terminal, soit des chaînes plus longues, présentant un branchement (galactose ou mannose) pour 11 unités de mannose. Les difficultés, et la non reproductibilité de la détermination du degré de polymérisation par oxydation périodique après réduction du polysaccharide⁷ ne nous ont pas permis d'obtenir une valeur satisfaisante. La non concordance entre les valeurs trouvées pour la teneur en galactose par les méthodes classiques et par GLC peut s'expliquer par les difficultés qu'on rencontre toujours pour doser des traces d'un ose en présence de quantités beaucoup plus importantes d'un autre ose.

La mannane que nous avons isolée à partir des graines d'*Erythea edulis* présente une structure de base identique à celles des mannanes de palmiers déjà connues. Le point le plus obscur, qui n'a pas été résolu pour les autres mannanes, est celui de la présence de faibles quantités de galactose: nous avons constaté que ce galactose pouvait-être libéré par hydrolyse, par l' α -galactosidase de luzerne, ce qui confirme sa liaison covalente avec le polysaccharide.

⁴ BARRY, V. C., McCORMICK, J. E. and MITCHELL, P. W. D. (1955) *J. Chem. Soc.* 222.

⁵ HAKOMORI, S. (1964) *J. Biochem.* 55, 205.

⁶ PURDIE, T. and IRVINE, J. C. (1903) *J. Chem. Soc.* 83, 1021.

⁷ HAY, G. W., LEWIS, B. A., SMITH, F. and UNRAU, A. M. (1962) *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. V, p. 251, Academic Press, New York.

Peut-être ce galactose, en occupant une position terminale à l'extrémité non réductrice des chaînes de mannose, peut-il constituer un signal d'arrêt lors de la biosynthèse du polysaccharide; Kooiman⁸ a récemment montré que le galactose de la galactomannane de *Cocos nucifera* était libéré du polysaccharide au cours de la maturation de la graine. Dans ce cas le polysaccharide présent chez des graines non mûres d'*Erythea edulis* serait peut-être plus riche en galactose. Une autre hypothèse serait que le galactose ferait partie d'un polysaccharide contaminant présent dans le tégument entourant les graines. Nous avons vérifié que l'hydrolyse acide du tégument ne libère que peu de galactose; en tout état de cause, il est difficile de prendre une position définitive sur l'existence et l'emplacement du galactose sur la molécule de mannane.

EXPERIMENTALE

Techniques analytiques générales: les R_g ont été déterminés par chromatographie descendante sur papier Schleicher und Schüll 2043 b Mgl avec *n*-BuOH-pyridine-H₂O (9:5:4) (A). Les dosages réductimétriques ont été effectués à l'aide du réactif de Somogyi-Nelson.^{9,10} Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un appareil Carl Zeiss avec un tube polarimétrique de 0,5 dm. Les points de fusion ont été pris au tube capillaire et ne sont pas corrigés. L'oxydation périodique des oligomannosides a été conduite par l'acide périodique 0,1 M à 0° et à l'obscurité. L'acide périodique consommé a été déterminé suivant la méthode de Fleur et Lange,¹¹ l'acide formique libéré titré après addition d'éthylène glycol.¹² Le formaldéhyde a été dosé par réaction avec l'acide chromotropique¹³ après distillation suivant la technique originale de Boyd et Logan.¹⁴ La séparation des dérivés méthylés par GLC a été réalisée sur appareil 'Girdel' (détecteur à ionisation de flamme) équipé d'une colonne capillaire inox de 3,2 mm × 3 m composée de 10% de Carbowax 20 M sur chromosorb W HMDS, 80/100 (four: 160°, injecteur: 250°).

Extraction. Les noix sont débarrassées de leur tégument et broyées jusqu'à obtention d'une poudre fine. La poudre est délipidée par traitement au C₆H₆, les oses et oligosides éliminés par traitement à l'alcool à 70% à reflux pendant 2 hr, 100 g de matière première sont mis en contact avec 500 ml de KOH à 7% pendant 24 hr. Après centrifugation le marc est repris par 500 ml de KOH à 7%, puis 400 ml de KOH à 14%. Les phases potassiques sont réunies, neutralisées par HOAc (40 ml) et versées dans 6 l. d'EtOH froid. Le polysaccharide est essoré et séché sous vide; poids obtenu 23 g.

Purification. Le produit brut est dissous dans la soude 2 N et on ajoute la liqueur de Fehling jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de précipitation. Le complexe est lavé à l'eau froide et détruit par HCl 5 N à 0°. Le précipité de polysaccharide est essoré et lavé jusqu'à neutralité. L'opération est répétée 2 fois (Rdt: 14%). La mannane purifiée a un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{21} -36,6^\circ$ (*c* 1, NaOH N).

Acétylyse. On ajoute lentement sous agitation 2,5 g de mannane dans Ac₂O-HOAc-H₂SO₄ (10:10:1) (63 ml) sans refroidir. On laisse en contact 96 hr à la temp. du laboratoire. Après filtration des résidus, le filtrat est versé goutte à goutte dans 500 ml de glace pilée en agitant. Le précipité est filtré, lavé à l'eau froide, et le filtrat extrait au CHCl₃ (2 × 50 ml) puis on évapore le solvant (Rdt: 3,81 g). Les oses peracétylés sont dissous dans CHCl₃-MeOH (1:2) (30 ml) et désacétylés par 10 ml de NaOMe 0,1 M pendant 12 hr. Après neutralisation par l'H₂SO₄, la solution est fractionnée par chromatographie préparative avec le solvant A: le mannobiose (54 mg) cristallise d'H₂O-MeOH, F 186° identique à celui d'un témoin authentique. Le spectre IR présente la bande à 877 cm⁻¹ caractéristique des liaisons pyranosidiques, ce qui est confirmé par la valeur du pouvoir rotatoire: $[\alpha]_D^{21} -5,28^\circ$ (*c* 1, H₂O) à l'équilibre. (Litt.¹⁵ $[\alpha]_D^{25} -7,7^\circ \rightarrow -2,2^\circ$). Sa migration chromatographique dans le solvant A est R_g 0,59. Nous avons calculé une masse moléculaire de 535 (théorie 520, absorption à 395 nm) pour la phénylosazone (F 200-201°). L'oxydation périodique a révélé le comportement habituel des disaccharides liés en (1 → 4) (voir Tableau 1). Le mannotriose (52 mg) cristallisé d'H₂O-EtOH F 130°, $[\alpha]_D^{21} -21,11^\circ$ (*c* 0,8, H₂O) à l'équilibre (Litt.¹⁵ $[\alpha]_D^{25} -24,7^\circ \rightarrow -23,3^\circ$). La migration chromatographique est R_g 0,24. La masse moléculaire déterminée par la méthode de Bougault¹⁶ donne la valeur de 526 (théorie 504). L'oxydation périodique ne révèle pas non plus de palier.

⁸ KOOIMAN, P. (1971) *Carbohydr. Res.* **20**, 329.

⁹ SOMOGYI, M. (1945) *J. Biol. Chem.* **160**, 61.

¹⁰ NELSON, N. (1944) *J. Biol. Chem.* **153**, 375.

¹¹ FLEURY, P. et LANGE, J. (1933) *J. Pharm. Chim.* **17**, 107.

¹² GUERNET, M. (1963) Thèse Doct. Etat Sciences, Paris.

¹³ EEGRIWE, E. (1937) *Z. Anal. Chem.* **110**, 22.

¹⁴ BOYD, M. S. and LOGAN, M. A. (1942) *J. Biol. Chem.* **146**, 279.

¹⁵ WHISTLER, R. L. and SMITH, C. G. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 3795.

¹⁶ BOUGAULT, J. (1917) *J. Pharm. Chim.* **16**, 97.

Méthylation. L'anion diméthylsulfinique a été préparé suivant la méthode de Corey et Chaykovsky.¹⁷ 250 mg de mannane sont ajoutés à 20 ml de diméthylsulfoxyde sous N₂. 10 ml de base sont ensuite introduits dans le milieu par une seringue. On laisse en contact 6 hr, puis on refroidit avant d'injecter 7 ml d'MeI. On laisse sous agitation une nuit. Le produit est extrait au CHCl₃ (50 ml) puis concentré à l'état de sirop. On soumet ensuite le résidu à deux méthylations par la méthode de Purdie (5 ml MeI, 1 g Ag₂O). Le produit méthylé est à nouveau extrait au CHCl₃ et concentré. L'examen du spectre IR montre qu'il est totalement méthylé. Son pouvoir rotatoire est de $[\alpha]_D^{21} -12,55^\circ$ (c 1,6, CHCl₃). Après hydrolyse (H₂SO₄ 4 N, 4 hr à 100°) et neutralisation par SrCO₃, les oses méthylés sont caractérisés par chromatographie ascendante sur papier.¹⁸ La révélation à l'oxalate d'aniline¹⁹ donne quatre taches. une tache principale de R_f 0,40 correspondant au 2,3,6-tri-*O*-méthyl-*D*-mannose; trois taches de faible intensité: de R_f 0,93 correspondant au 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-*D*-mannose de R_f 0,73 correspondant au 2,3,4,5-tétra-*O*-méthyl-*D*-galactose de R_f 0,14 correspondant au 2,3-di-*O*-méthyl *D*-mannose.

TABLEAU 1 OXYDATION PERIODIQUE DU MANNOBIOSE*

Durée d'oxydation (jours)	Mol de PI consommées	Mol d'acide formique libérées	Mol de HCHO libérées
1	4,08	1,29	0,88
2	4,14	1,76	
4	5,10	2,18	
8	6,28	3,55	

* Résultats exprimés par mole de disaccharide.

Remerciements—Nous adressons nos vifs remerciements au Professeur J. E. Courtois pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour ses conseils lors de sa réalisation. Les fruits d'*Erythea edulis*, récoltés à Cannes, nous ont été aimablement fournis par Monsieur et Madame M. Butel, que nous remercions très vivement de même que Monsieur P. Augé de la Station de Botanique et de Pathologie Végétale à Antibes qui s'est obligamment chargé de l'identification de cette matière première. Nos remerciements vont également à MM. F. Petek et E. Villaroya qui nous ont fait don d' α -galactosidase purifiée de graines de luzerne germées.

¹⁷ COREY, E. J. and CHAYKOVSKY, M. (1962) *J. Am. Chem. Soc.* **28**, 254.

¹⁸ PETEK, F. et TO DONG, (1962) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **44**, 1137.

¹⁹ PARTRIDGE, S. M. (1949) *Nature* **164**, 443.