

RHAMNODIASTASE ET α -L-RHAMNOSIDASE DE *FAGOPYRUM ESCULENTUM*

RICHARD BOURBOUZE, FLORE PRATVIEL-SOSA et FRANÇOIS PERCHERON

Equipe de Recherches Associée du C.N.R.S. No. 99, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,
Université René Descartes, 4, Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

(Reçu le 9 juin 1974)

Key Word Index—*Fagopyrum esculentum*; Polygonées; rhamnodiastase, α -L-rhamnosidase; enzymatic hydrolysis of glycosides.

Abstract—Rhamnodiastase and α -L-rhamnosidase of buckwheat have been isolated and partially purified by chromatography on a column of DEAE-Sephadex. These two enzymes hydrolyze various flavonoid glycosides and so can be useful in structural studies.

INTRODUCTION

L'hydrolyse enzymatique, comme méthode de caractérisation et d'étude structurale de la partie glucidique des flavonosides, est susceptible de fournir des données complémentaires des techniques physico-chimiques [1]. La rhamnodiastase de Bridel et Charaux [2] (complexe enzymatique obtenu à partir des graines de divers *Rhamnus*) a été maintes fois utilisée en phytochimie, car elle hydrolyse notamment le rutoside en quercétol et rutinose (α -L-rhamnosyl 1 \rightarrow 6 glucose). Cette activité β -glucosidasique particulière, dite de rhamnodiastase, a été décelée chez diverses espèces végétales [3]. Chez le sarrasin, il a été démontré que l'enzyme hydrolysant certains hétéroglycosides complexes avec libération d'un disaccharide était bien distincte des β -glucosidasides classiques comme celle de l'amande [4].

Nous décrivons l'isolement et la purification partielle d'une rhamnodiastase et d'une α -L-rhamnosidase à partir des graines germées de sarrasin, et leur activité sur divers hétérosides naturels.

RESULTATS

Pour suivre la purification de la rhamnodiastase et de l' α -L-rhamnosidase, nous avons effectué la synthèse de substrats plus solubles que les hétérosides naturels: le *p*-nitrophényl- β -D-rutinoside [5] et le *p*-nitrophényl- α -L-rhamnoside [6].

Isolement et purification partielle de la rhamnodiastase et de l' α -L-rhamnosidase

Les protéines solubles à pH 5 des graines germées de sarrasin sont précipitées par le sulfate d'ammonium à 80% de saturation et passées sur une colonne de DEAE-Sephadex. Les fractions hydrolysant le *p*-nitrophényl- β -D-rutinoside et le *p*-nitrophényl- α -L-rhamnoside, éluées par un gradient linéaire en NaCl sont rassemblées et soumises à un traitement thermique pendant dix minutes à 50°. Les activités rhamnodiastasique et α -rhamnosidasique sont purifiées cinquante fois par rapport à l'extrait aqueux, et ceci avec un rendement proche de 40%.

Au cours de cette purification, le repérage de la rhamnodiastase peut être réalisé grâce à un substrat synthétique commercial, le: *p*-nitrophényl- β -D-galactoside. Le profil d'élution de l'activité hydrolysante envers ce substrat de la colonne de DEAE-Sephadex, laisse apparaître une forte activité β -galactosidasique au niveau des protéines non retenues, puis une seconde β -galactosidase élue au début du gradient. Ensuite l'activité se maintient et présente même de nouveau un léger maximum dans la zone d'élution de la rhamnodiastase, correspondant à l'activité propre de celle-ci pour les β -D-galactosides.

L'ensemble des fractions après dialyse et concentration présente une activité spécifique de

Tableau 1. Hétérosides naturels utilisés. Cités selon leur ordre d'apparition dans le texte (voir Résultats Expérimentaux)

Nom commun	Hydrolyse enzymatique	Aglycone et substituants osidiques
Salicoside	+	Saligénol- β -D-glucoside
Vicioside	+	Diamino-2,4-oxy-6-pyrimidine-5- β -D-glucoside
Quercitroside	+	Quercétol-3- α -L-rhamnoside
Amygdalosite	+	Mandélonitrile- $[\beta$ -D-glucosyl(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucoside
Prunaside	+	Mandélonitrile- β -D-glucoside
Quercétol-3-sophorosite	+	Quercétol-3- $[\beta$ -D-glucosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucoside
Peltatoside	+	Quercétol-3- $[\alpha$ -L-arabinosyl(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucoside
Géosite	+	Eugénol- $[\alpha$ -L-arabinosyl(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucoside
Vicianoside	+	Mandélonitrile- $[\alpha$ -L-arabinosyl(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucoside
Robinoside	+	Kempférol-3- $[\alpha$ -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactoside-7- α -L-rhamnoside
Rutoside	+	Quercétol-3- $[\alpha$ -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucoside
Hespéridoside	+	Hespéretol-7- $[\alpha$ -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucoside
Naringoside	+	Naringénol-7- $[\alpha$ -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucoside
Hétéroside de <i>Populus</i>	±§	Kempférol-3- $[\beta$ -D-glucosyl(1 \rightarrow 3)]- $[\alpha$ -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucoside
Anthocyanoside	+	Cyanidol-3- $[\beta$ -D-xylosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucoside-5- β -D-glucoside
Xanthorhamnoside	+	Rhamnétol-3- $[\alpha$ -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 4 ou 5)]- α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6)-galactoside
Catharticoside	—	Rhamnocitol-4'- $[\alpha$ -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 4 ou 5)]- α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6)-galactoside

* Libération du glucose terminal.

† Libération du glucose et d'arabinose; pas de vicianose décelable.

‡ Libération du disaccharide; aussi, pour robinoside, le rhamnose en C-7.

§ Libération de rhamnose et de glucose; pas de laminaribiose ou kempferol.

• Libération du glucose en C-5.

‡ Libération de trisaccharide et rhamnose.

54 nM/mn/mg avec le *p*-nitrophényl- β -D-rutinoside comme substrat, et de 25 nM/mn/mg avec le *p*-nitrophényl- α -L-rhamnoside. L'activité totale obtenue à partir de 300 g de graines sèches est de 1,3 Unités pour la rhamnodiastase, et de 0,6 Unités pour l' α -rhamnosidase. Une purification plus poussée de la rhamnodiastase (celle-ci n'a cependant pas été obtenue entièrement séparée de l' α -rhamnosidase) et l'étude de quelques-unes de ses propriétés sont l'objet d'une autre publication [11].

Nous avons étudié l'influence de la concentration en substrat sur la vitesse d'hydrolyse du *p*-nitrophényl- α -L-rhamnoside et du rutinose par l' α -rhamnosidase à son pH optimum [4]. A pH 5, les K_m calculés sont de $3,3 \times 10^{-4}$ M pour le *p*-nitrophényl- α -L-rhamnoside et de $2,2 \times 10^{-3}$ M pour le rutinose. Les rapports V_m/K_m indiquent une plus grande spécificité catalytique de l'enzyme pour l'hétéroside phénolique malgré une hydrolyse plus rapide du rutinose.

Hydrolyse enzymatique de divers hétérosides naturels

Cette préparation enzymatique a été testée sur le plus grand éventail possible d'hétérosides naturels,

de façon à ce que varient dans le substrat, aussi bien la partie glucidique que l'aglycone (Tableau 1).

Hétérosides de monosaccharides. Le salicoside, le vicioside et le quercitroside sont hydrolysés.

Hétérosides de disaccharides. L'attaque de l'amygdalosite s'effectue préférentiellement par le glucose terminal. On décèle du prunaside dans le milieu réactionnel; celui-ci est ensuite hydrolysé ainsi que le gentiobiose apparu à l'état de traces au début de la réaction enzymatique.

Le quercétol-3-sophorosite est attaqué par le glucose terminal; le monoglucoside du quercétol est ensuite également hydrolysé. Les hétérosides du vicianose: peltatoside, géosite et vicianoside sont hydrolysés avec libération d'arabinose et de glucose. Nous n'avons pas décelé de vicianose; cependant la présence d'un produit de transosylation de R_f moindre que celui du vicianose, ainsi que l'apparition précoce de quercétol dans le cas du peltatoside, nous incitent à envisager la libération par la rhamnodiastase du disaccharide qui serait ensuite rapidement hydrolysé. Avec le robinoside et le rutoside on obtient les deux disaccharides correspondants: robinobiose et rutinose. Ces deux disaccharides sont ensuite hydrolysés par

l' α -L-rhamnosidase qui libère également le rhamnose en 7 du robinoside.

L'hespéridoside et le naringoside nécessitent une attaque primitive par l' α -L-rhamnosidase avant d'être hydrolysés sous forme des monoglucosides correspondants par la rhamnodiastase. Seul le glucose combiné en position 5 de l'aglycone d'un anthocyanoside est libéré.

Hétérosides de trisaccharides. Le xanthorhamnoside [7] est hydrolysé avec libération du trisaccharide et de rhamnose, par contre le catharticoside [7] n'est pas attaqué.

Le kempférol-3-*O*-rhamnodiglycoside de *Populus* est faiblement hydrolysé avec libération de rhamnose et de glucose; on ne décèle ni laminaribiose ni kempférol. L'attaque primitive semble due à l' α -L-rhamnosidase, suivie de la libération du glucose devenu terminal par la rhamnodiastase.

DISCUSSION

Cette purification partielle: chromatographie sur DEAE-Sephadex suivie d'un traitement thermique, permet d'éliminer les β -glucosidases et β -galactosidases spécifiques, présentes dans les graines germées de sarrasin. Nous évitons ainsi, afin de permettre leur détection chromatographique, une hydrolyse trop rapide de certains holosides susceptibles d'être libérés par la rhamnodiastase.

La rhamnodiastase de sarrasin révèle une absence de spécificité pour l'aglycone et possède un champ d'action étendu pour une glycosidase. Elle hydrolyse les liaisons holosidiques et hétérosidiques engageant un radical isostère du β -D-glucose en C₁, C₂ et C₃, c'est-à-dire les restes β -D-glucosyl, β -D-galactosyl et α -L-arabinosyl. Néanmoins sa propriété la plus remarquable réside dans les dimensions de son site catalytique lui permettant d'accepter éventuellement un diholoside et même un triholoside.

L'attaque des oligosaccharides liés à une aglycone s'effectue préférentiellement par leur extrémité non réductrice. Pour que se manifeste un mode d'action proprement rhamnodiastatique, c'est-à-dire la libération d'un holoside, un disaccharide (1 \rightarrow 6) semble nécessaire, celui-ci devant être lié en position 3 sur l'aglycone dans le cas des flavonosides.

Lorsque le disaccharide libéré correspond au

gentiobiose et au vicianose, celui-ci est difficilement décelable car il est rapidement hydrolysé à son tour par la rhamnodiastase. Le robinobiose et le rutinose au contraire persistent plus longtemps dans le milieu réactionnel, par suite de l'activité α -rhamnosidasique moindre de la préparation enzymatique. La charge nette positive portée par l'hétérocycle des aglycones anthocyaniques empêche toute attaque des substituants osidiques en 3 de ce noyau.

L' α -L-rhamnosidase qui accompagne la rhamnodiastase libère les restes α -L-rhamnosyl terminaux ou branchés des holosides, ainsi que ceux liés en 3 ou 7 sur l'aglycone. L' α -L-rhamnosidase de sarrasin révèle une plus large spécificité envers les rhamnosides naturels par comparaison aux autres α -L-rhamnosidases déjà étudiées: l' α -L-rhamnosidase du mollusque *Turbo cornutus* n'hydrolyse pas le naringoside, et celle d'*Aspergillus niger* (la naringinase commerciale) est sans action sur l'hespéridoside et le quercitroside [8].

La préparation enzymatique de sarrasin, par son activité rhamnodiastatique et α -L-rhamnosidasique, peut constituer un outil complémentaire intéressant pour l'identification de la partie glucidique de composés hétérosidiques; elle peut être également utile pour la préparation d'holosides.

Nous avons décrit précédemment la préparation de robinobiose, à partir de robinoside, et l'établissement de la structure d'un trisaccharide de *Rhamnus cathartica* [α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 3) α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 6) D-galactopyranose]: par action de l' α -L-rhamnosidase, on obtient un disaccharide dont le dérivé méthylé et le spectre de R.M.N. sont identiques à ceux du robinobiose [9].

PARTIE EXPERIMENTALE

Conditions de germination. Les graines (300 g) de sarrasin (*Fagopyrum esculentum* M. Ets. Vilmorin Paris.) sont gonflées une nuit dans H₂O et mises à germer sur coton humide pendant 2 jours à la lumière et température du laboratoire.

Extraction et purification. Les graines germées sont broyées dans du tampon acétate 0,1 M de pH 5. Après agitation pendant 2 h le broyat est centrifugé à 1000 g pendant 15 min et le surnageant abandonné une nuit à 4°. Après une centrifugation de 30 mn à 5000 g le surnageant est amené à 80% de saturation en (NH₄)₂SO₄. Les protéines précipitées sont reprises par H₂O (environ 50 ml), dialysées et centrifugées 45 mn à 20.000 g. La solution protéique est équilibrée par dialyse contre du tampon acétate 0,1 M de pH 5, 20 Ml (environ 200 mg de protéines) sont passés sur une colonne de DEAE-Sephadex A 50 (1,6 \times 15 cm) équilibrée avec le tampon acétate 0,1 M de pH 5. Une fraction protéique renfermant une intense activité β -galactosidasique et

β -glucosidasique est éluée avec le tampon d'équilibrage, puis nous installons un gradient linéaire de 0 à 0,5 M en NaCl (200 ml dans chaque flacon). Des fractions de 5 ml sont collectées pour le repérage des activités enzymatiques. Une seconde β -galactosidase est éluée au début du gradient et les fractions hydrolysant le *p*-nitrophényl- β -D-rutinoside et le *p*-nitrophényl- α -L-rhamnoside sont éluées pour une molarité en NaCl voisine de 0,3. Celles-ci sont rassemblées, dialysées et concentrées sur membrane PM 30 (Amicon) jusqu'à un volume voisin de 10 ml. Afin d'inactiver totalement une β -glucosidase éluée parallèlement de la colonne de DEAE-Sephadex, la préparation obtenue est soumise à un traitement thermique pendant 10 mn à 50°.

Dosage des protéines. Par la méthode de Lowry [10], l'étalonnage étant réalisé avec de la sérum albumine bovine.

Repérage des activités enzymatiques. Le repérage des diverses activités enzymatiques s'effectue par mesure du *p*-nitrophénol libéré des arylglycosides nitrés correspondants. Le milieu réactionnel comprend: 0,1 ml de substrat 5 mM, 0,1 ml d'éluat de la colonne de DEAE-Sephadex. Après un temps d'incubation de 30 min à 37° avec le *p*-nitrophényl- β -D-rutinoside et le *p*-nitrophényl- α -L-rhamnoside comme substrats, ou de 10 min avec le *p*-nitrophényl- β -D-galactoside, la réaction enzymatique est arrêtée par addition de 1 ml de Na_2CO_3 0,2 M et l'intensité de la coloration jaune que développe le *p*-nitrophénol est mesurée à 400 nm.

Essais enzymatiques. Pour les essais d'hydrolyse enzymatique des hétérosides naturels, le mélange réactionnel comprend: 1 mg d'hétéroside en suspension dans 0,075 ml H_2O , 0,025 ml de tampon phosphate disodique 0,2 M—acide citrique 0,1 M de pH 5, 0,1 ml de préparation enzymatique. Après 24 hr d'incubation à 45°, le milieu réactionnel est chromatographié sur papier (Schleicher et Schüll) avec le système solvant *n*-BuOH—pyridine— H_2O (9:5:4). Les oses libérés sont révélés par *o*-phénylènediamine oxalate. Pour préciser la cinétique de l'attaque de certains hétérosides, des prélèvements à des temps variables du milieu réactionnel sont chromatographiés sur plaques. Chro-

matographique sur plaques de gel de silice (Schleicher et Schüll) avec le système solvant EtOAc—HOAc—MeOH— H_2O (60:15:15:10); révélation par une solution éthanolique d' H_2SO_4 à 5% et chauffage à 80°. Chromatographie sur plaques de micropolyamide (Schleicher et Schüll F 1500) avec le système solvant MeOH—HOAc— H_2O (19:1:1); révélation par une solution de AlCl_3 à 5% dans MeOH et les plaques sont observées sous une lampe UV.

Remerciements.—Nous adressons tous nos remerciements à Monsieur le Professeur J. E. Courtois pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Nous remercions vivement M. le Professeur R. Paris pour ses échantillons de xanthorhamnoside et de catharticoside, M. le Professeur Lebreton pour son échantillon de pelatioside et M. le Professeur L. Birkofer pour son échantillon d'anthocyanoside.

BIBLIOGRAPHIE

1. Harborne, J. B. (1965) *Phytochemistry* **4**, 107.
2. Bridel, M. et Charaux, C. (1926) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **8**, 170.
3. Suzuki, H. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 476.
4. Bourbouze, R. (1974) Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Université Paris V.
5. Bourbouze, R., Pratviel-Sosa, F. et Percheron, F. (1972) *Carbohydr. Res.* **24**, 444.
6. Westphal, O. et Feier, H. (1956) *Chem. Ber.* **89**, 582.
7. Schmid, R. D., Varenne, P. et Paris, R. (1972) *Tetrahedron* **28**, 5037.
8. Kurosawa, Y., Ikeda, K. et Egami, F. (1973) *J. Biochem.* **73**, 31.
9. Pratviel-Sosa, F., Wyld, R., Bourbouze, R. et Percheron, F. (1973) *Carbohydr. Res.* **28**, 109.
10. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
11. Bourbouze, R., Pratviel-Sosa, F. et Percheron, F. (1974) *Biochimie* **56**, 1305.