

ACTION D'UNE GLUCANASE DE *PENICILLIUM NOTATUM* SUR LES GALACTOXYLOGLUCANES

ABbas DALI-YOUCEF, PAUL LE DIZET et JEAN-EMILE COURTOIS

E.R.A n° 99 du CNRS, Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Pharmacie, 4, A. de l'Observatoire, 75270 Paris 06, France

(Revisé reçu le 24 mai 1979)

Key Word Index—*Impatiens balsamina*; Balsaminaceae; *Tropaeolum majus*; Tropaeolaceae; *Tamarindus indica*; Leguminosae; amyloid; galactoxyloglucan; *Penicillium notatum* glucanase; cellulase.

Abstract—Repetitive action of purified β -glucanase from *P. notatum* on amyloids provided a means of establishing the structure of these polysaccharides. There is a central chain of 1 \rightarrow 4 linked β -glucose moieties (sometimes 1 \rightarrow 3 linked) which is branched with nearly equivalent proportions of 1 \rightarrow 6 linked α -D-xylose and 1 \rightarrow 6 linked β -D-galactosyl 1 \rightarrow 2 α -D-xylose moieties. The region substituted by disaccharide is inaccessible to the action of the enzymic preparation, thus confirming the irregularity of these substituents on the central β -glucose chain.

INTRODUCTION

Les galactoxyloglucanes dénommées également amyloïdes sont des polysaccharides décelés dans les graines de Dicotylédones. Nous les avons rencontrés dans des proportions fort différentes dans les graines de *Impatiens balsamina* (Bs) (2%), de *Tropaeolum majus* (capucine) (Cp) (20%) et de *Tamarindus indica* (Tm) (40%). Les structures de ces amyloïdes sont relativement voisines avec toutefois une plus forte proportion de glucose pour Bs [1–4]. Les rapports moléculaires des oses constitutifs de ces polysaccharides sont groupés dans le Tableau 1. Ils sont obtenus après hydrolyse acide totale et microdosage selon la méthode de Nelson [5] et Somogyi [6].

Au cours des études qui ont permis d'établir la structure probable de ces galactoxyloglucanes par l'emploi de différentes enzymes, Courtois *et al.* [7] ont remarqué que la cellulase 'Astra' de *P. notatum* réalisait le clivage le plus sélectif en libérant de l' α -xylosyl 1 \rightarrow 6 glucose et laissant une fraction soluble non dialysable. Nous avons désiré compléter les recherches antérieures de notre groupe en étudiant de façon plus approfondie l'action de la β -glucanase. Nos essais avaient principalement pour but l'étude de la fraction non dialysable du polysaccharide soumis à l'action de l'enzyme. Les saccharides détachés et devenus dialysables n'ont été suivis chromatographiquement qu'à titre indicatif. Leurs proportions respectives n'étaient appréciées qu'approximativement d'après l'intensité des taches sur les chromatogrammes réalisés selon les protocoles couramment utilisés dans nos recherches [1–5].

Tableau 1. Proportions moléculaires des différents oses des amyloïdes natifs de balsamine, capucine et tamarin (en prenant le galactose comme unité)

Graines	Galactose	Xylose	Glucose	Arabinose
Bs	1	1.8–1.9	4.07–5.0	0.2–0.37
Cp	1	1.9–2.1	2.9–3.4	0.1
Tm	1	1.83–2.06	2.8–3.2	0.1

Nous avons donc étudié la fraction non dialysable après action de la β -glucanase sur: (1) l'amyloïde intact; (2) l'amyloïde dégradé partiellement au cours de la germination; (3) l'amyloïde dégradé par voie chimique: (a) par hydrolyse acide partielle des amyloïdes de Cp et Tm; et (b) par attaque partielle par l'acide périodique (P.I.) de l'amyloïde de Cp. Dans cet article, nous étudierons successivement l'action de la β -D-glucanase sur ces différents substrats. Nous aborderons par la suite une étude plus détaillée de l'amyloïde résiduel résultant de l'action de la cellulase 'Astra' sur l'amyloïde de Cp dégradé après 8 jours de germination.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Action du complexe enzymatique sur les amyloïdes intacts de Bs et Cp. Cette opération effectuée selon le protocole décrit précédemment par Courtois *et al.* [7] provoque une libération importante de xylosido-glucose et aboutit à l'obtention d'un polysaccharide résiduel dont l'hydrolyse acide totale suivie d'un microdosage selon la méthode de Nelson–Somogyi, conduit aux résultats mentionnés dans le Tableau 2 (amyloïde natif). Les précédents auteurs avaient trouvé des résultats sensiblement voisins [7].

Le polysaccharide résiduel remis en solution dans l'eau est, après dialyse, soumis à un nouveau contact avec le complexe enzymatique purifié. L'analyse chromatographique du dialysat nous permet de déceler les sucres libérés en plus ou moins grande quantité. L'ensemble des résultats obtenus est mentionné dans le Tableau 2 (amyloïde natif). L'amyloïde résiduel soumis à un troisième contact n'est plus attaqué.

En suivant le pourcentage de libération du glucose et du xylose, nous observons, après la seconde hydrolyse, que le xylosido-glucose était en faible quantité alors qu'il était le seul libéré après le premier contact avec l'enzyme (Tableau 3). L'augmentation de la libération du glucose s'explique par la présence importante de glucose et de cellobiose dans le même hydrolysat.

L'action du complexe enzymatique sur les amyloïdes dégradés après 6 jours de germination pour Bs et 8 jours

Tableau 2. Tableau récapitulatif des résultats obtenus après action du complexe enzymatique purifié de *Penicillium notatum* sur les amyloïdes intacts et dégradés

Substrats	Origine des substrats	Dégradation par voie enzymatique							
		Amyloïde natif				Amyloïde dégradé par la germination			
		Balsamine		Capucine		Balsamine 6e jour		Capucine 8e jour	
	Rapports moléculaires	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Première Affusion	Gal	1	1	1	1	1	1	1	1
	Glc	4	2.77	3	2.45	3.10	1.62	2.73	1.54
	Xyl	2	1.15	2	1.09	1.03	1.03	1.04	0.97
	Sucres libérés	Xylosido-glucose		Xylosido-glucose		Celllobiose Glucose Arabinose		Celllobiose Glucose Arabinose	
Deuxième Affusion	Gal	1	1	1	1				
	Glc	2.77	1.62	2.45	1.50				
	Xyl	1.15	0.98	1.09	1.02				
	Sucres libérés	Celllobiose glucose Xylosido-glucose Arabinose Xylose		Celllobiose glucose Xylosido-glucose Arabinose Xylose		La seconde affusion n'a pas apporté de changements			

Tableau 3. Pourcentages de libération du glucose et du xylose au cours de l'hydrolyse des amyloïdes initiaux de balsamine et de capucine par la β -D-glucanase

	Bs	Cp	
	Après la 1ère hydrolyse	Après la 2ème hydrolyse	Après la 1ère hydrolyse
Glc	30.75	59.50	18.33
Xyl	42.50	51.00	45.50
			50.00
			49.00

pour Cp s'effectue dans les mêmes conditions opératoires. D'après les résultats obtenus (Tableau 2), il semble que l'amyloïde dégradé par la germination corresponde à une zone d'unités Glc substituées en partie par le D-galactosyl 1 \rightarrow 2 D-xylose. L'action de l'enzyme paraît se traduire par un fractionnement assez poussé de la chaîne d'unités Glc.

L'action du complexe enzymatique sur les amyloïdes traités soit par l'acide oxalique M soit par un excès de P.I. conduit à des polysaccharides où le galactose a partiellement ou totalement disparu [2-4, 7].

Dans nos expériences, les amyloïdes dégradés par voie chimique ont été obtenus soit par action de l'acide oxalique M pendant 2 hr à 100° [1], soit par action du

1/10 seulement de la quantité théorique d'acide périodique pour la rupture de toutes les liaisons α -glycol sur les amyloïdes intacts. Les rapports moléculaires obtenus, pour ces amyloïdes partiellement dégradés, avant et après action de la β -D-glucanase sont résumés dans le Tableau 4.

L'attaque du complexe enzymatique purifié de *P. notatum* a donc porté sur les unités glucose et xylose jusqu'à une limite qui ne s'éloigne jamais du rapport Glc/Xyl égal à 1.5-2 et provoquant de ce fait un raccourcissement de la chaîne. Nous n'avons jamais retrouvé de galactose ni à l'état libre ni à l'état combiné, ce qui est en faveur de cette interprétation. Il semble donc que cette étude nous a permis d'isoler la zone de la molécule où les unités β -D-glucose sont substituées par le galactosido-xylose. De plus, l'hypothèse émise par Courtois *et al.* [7] selon laquelle un glucose est intercalé entre deux unités glucose supportant un D-galactosyl-D-xylose nous apparaît être sérieusement renforcée.

Etude de l'amyloïde résiduel de Cp obtenu après action du complexe enzymatique sur l'amyloïde de Cp dégradé après 8 jours de germination. Nous avons étudié en détail cet amyloïde parce qu'il fut le plus aisément préparé [8]. C'est un produit très soluble dans l'eau, légèrement réducteur, ne migrant pas en chromatographie, même après dix jours de contact avec différents solvants.

Tableau 4. Dégradation par voie chimique

Substrats	Origine des substrats	Amyloïde après hydrolyse partielle par l'acide oxalique				Amyloïde dégradé partiellement par l'acide périodique			
		Capucine		Tamarin		Balsamine		Capucine	
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Affusion unique	Gal	1	1	0	0	1	1	1	1
	Glc	6	4	5	3	6.2	2.78	5.2	2.35
	Xyl	3	1.5	1	1	3.35	1.53	3.3	1.25
	Sucres libérés	Celllobiose Xylosido-glucose Glucose Xylose		Celllobiose Xylosido-glucose Glucose Xylose		Celllobiose Xylosido-glucose Glucose Xylose		Celllobiose Xylosido-glucose Glucose Xylose	

Une étude cinétique réalisée en milieu sulfurique 0.05 N à 100° nous a permis d'obtenir du galactosido 1 → 2 xylose en quantité suffisamment importante. Isolé et hydrolysé, il fournit une molécule de glucose et une de xylose. Il migre en chromatographie sur papier comme un échantillon témoin [9] préparé par Courtois et al. à partir de l'amyloïde intact.

L'hydrolyse enzymatique par la β -galactosidase non purifiée mais dépourvue d' α -galactosidase, isolée des graines de *Trifolium repens* [10, 11] a libéré du galactose nettement décelable par chromatographie, accompagné de xylosido-glucose et de cellobiose. Il est certain que la préparation utilisée n'étant pas purifiée, il nous est difficile d'interpréter le processus d'hydrolyse. Néanmoins, nous avons recueilli une donnée intéressante: la certitude que l'amyloïde est sous forme d'une molécule suffisamment dépolymérisée pour que les β -galactosidases puissent en détacher le galactose terminal. En effet, la plupart des β -galactosidases sont incapables de détacher le galactose des substrats de poids moléculaire élevé [12]. Dans le même temps et dans les mêmes conditions, les différentes α -galactosidases que nous avons utilisées sont demeurées sans action, ce qui confirme la forme β du galactose terminal proposée par Courtois et al.

La perméthylation [13] suivie d'hydrolyse et d'un dosage à l'hypoiodite nous a donné les résultats suivants exprimés en rapports moléculaires: 2,3,4,6 tétra-*O*-méthylgalactose (1), 2,3,6 tri-*O*-méthylglucose (0,78), 3,4 di-*O*-méthylxylose (0,99), 2,3 di-*O*-méthylglucose (0,93). Courtois et Le Dizet, par des protocoles de méthylation différents, avaient étudié les amyloïdes non dégradés de Bs et Cp; le glucose était retrouvé pour 1/3 sous forme de dérivé triméthylé en 2,3,6 et pour 2/3 sous forme de dérivé diméthylé en 2,3. Le 3,4 di-*O*-méthylxylose, le 2,3,4 tri-*O*-méthylxylose et le 2,3,4,6 tétra-*O*-méthylgalactose étaient en quantités sensiblement équimoléculaires. Or, avec l'amyloïde résiduel, la première remarque qui s'impose est la disparition de 2,3,4 tri-*O*-méthylxylose, ce qui implique qu'il n'y a plus dans la molécule de restes de D-xylose non substituée directement aux unités D-glucose de la chaîne centrale.

Alors qu'avec l'amyloïde intact, pour deux unités de 2,3 di-*O*-méthylglucose, il n'y avait qu'une seule molécule de 2,3,4,6 tétra-*O*-méthylgalactose et une de 3,4 di-*O*-méthylxylose, avec l'amyloïde résiduel, ces trois dérivés sont dans des proportions sensiblement égales. Ceci tend donc à indiquer qu'une partie des unités de Glc, celles ayant conduit au dérivé 2,3 *O*-méthylé sont substituées en 6 par des unités Xyl susceptibles d'être 3,4 *O*-méthylées, elles-mêmes substituées en 2 par Gal terminal conduisant, lui, au dérivé 2,3,4,6 *O*-méthylé.

L'hypothèse émise par Courtois et al. [7] selon laquelle les résidus de D-glucose non substitués se localisent dans les zones de l'amyloïde où figurent les branchements de D-galactosyl-D-xylose semble confirmée par la pré-

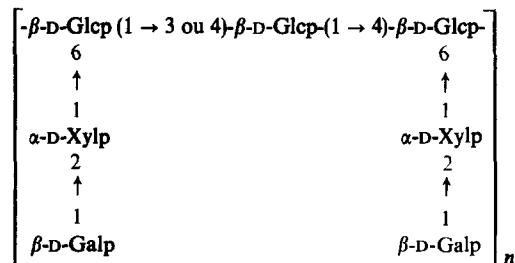


Fig. 1. Structure proposée pour l'amyloïde résiduel obtenu après action de l'enzyme purifiée de *P. notatum* sur les amyloïdes natifs et dégradés.

sence de 2,3,6 tri-*O*-méthylglucose. Ce Glc non substitué par le galactosido-xylose est en proportion inférieure à celle qui est substituée.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de suggérer un schéma-type de cet amyloïde résiduel provenant des amyloïdes dégradés soit après germination, soit après action de la D-glucanase de *P. notatum*. Il est vraisemblable que l'amyloïde attaqué par P.I., puis par la glucanase réponde également à ce schéma (Fig. 1).

PARTIE EXPÉIMENTALE

La purification de la cellulase de *P. notatum* provenant de la firme A.B Astra (Läkeme del AB, Södertälje, Suède) est réalisée sur colonne d'hydroxyapatite selon le protocole décrit par Courtois et al. [7]. L'action de la β -D-glucanase purifiée de *P. notatum* s'effectue toujours selon les procédés adoptés par ces mêmes auteurs. Les rapports moléculaires des oses constitutifs des différents polysaccharides sont établis en prenant le galactose comme unité. La méthylation est réalisée selon la méthode d'Hakomori et le dosage des produits méthylés selon la méthode à l'hypoiodite comme dans nos travaux antérieurs [4-7].

RÉFÉRENCES

1. Le Dizet, P. (1972) *Carbohydr. Res.* **24**, 505.
2. Courtois, J. E. et Le Dizet, P. (1973) *C.R. Acad. Sci. Ser. D* **277**, 1957.
3. Courtois, J. E. et Le Dizet, P. (1974) *C.R. Acad. Sci. Ser. C* **178**, 81.
4. Courtois, J. E. et Le Dizet, P. (1974) *An. Quim.* **70**, 1067.
5. Nelson, N. (1944) *J. Biol. Chem.* **153**, 375.
6. Somogyi, M. (1945) *J. Biol. Chem.* **160**, 61.
7. Courtois, J. E., Le Dizet, P. et Robic, D. (1976) *Carbohydr. Res.* **49**, 439.
8. Dali-Youcef, A. (1978) Thèse Doct. Univ. Pharm., Paris.
9. Kooiman, P. (1963) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **124**, 35.
10. Williams, J., Villarroya, E. et Petek, F. (1977) *Biochem. J.* **161**, 509.
11. Petek, F., Villarroya, E. et Courtois, J. E. (1969) *Eur. J. Biochem.* **8**, 395.
12. Wallenfels, K. (1961) *Adv. Carbohydr. Chem.* **16**, 239.
13. Hakomori, J. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)* **55**, 205.