

# ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION PARTIELLE DES GLYCOPROTÉINES DE PAROI DES CHAROPHYTES: *CHARA ASPERA* ET *NITELLA TRANSLUCENS*

MARCEL F. ALARY-BERNARD\*, MARCEL BRIENS†, MARCEL M. G. QUILLET\* et MARIE GOAS†

\*Laboratoire de Physiologie végétale, Université Catholique de l'Quest, 2, rue Volney, 49005 Angers Cédex, France;

†Laboratoire de Biologie végétale, Faculté des Sciences Biologiques, Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes Cédex, France

(Reçu le 22 mai 1979)

**Key Word Index**—*Chara aspera*; *Nitella translucens*; Charophytes; Chlorophycophytes; glycoprotein; affinity chromatography; chemical analysis.

**Abstract**—From purified cell walls and pectic, hemicellulosic and cellulosic fractions of *Chara aspera* and *Nitella translucens*, glycoproteins were isolated through affinity chromatography on concanavalin A (Con A)-Sepharose column. The chemical composition of protein fractions is qualitatively the same in both algae. The polysaccharidic moieties vary from one glycoprotein to another. None of the glycoproteins present contains cystine or hydroxyproline.

## INTRODUCTION

La paroi celluloso-pectique des plantes supérieures étudiées jusqu'à ce jour contient toujours des glycoprotéines à hydroxyproline [1-5]. Chez les Algues, la plupart des Chlorophytes possèdent aussi ce type de molécule pariétale; seules font exception les Charophytes [2, 6]. Les Phéophytes et les Rhodophytes [7] sauf *Laurencia spectabilis* [8] sont aussi, à notre connaissance, dépourvues de cet acide hydroxyaminé.

Les glycoprotéines à hydroxyproline étant toujours présentes dans la paroi des plantes supérieures, semblent jouer un rôle important. Par quel type de glycoprotéines sont-elles remplacées dans les parois des charophytes? Telle est la question que nous avons cherché à élucider en analysant la composition chimique des glycoprotéines de paroi chez *Chara aspera* Dith. Willd et *Nitella translucens* (Pers.) Agardh.

## RÉSULTATS

### *Composition globale de la paroi brute et des fractions*

Dans la paroi brute, les glucides représentent, respectivement pour *N. translucens* et *C. aspera*, 70 et 80%, les protéines 4,5 et 7,5% et les sels 4,5 et 6%. Cette dernière valeur est obtenue après le dessalage que subit la paroi de *Chara* avant le fractionnement; en réalité, chez cette algue, les sels atteignent, *in situ*, 51% de la matière sèche de la paroi.

La présence de lipides associés aux oses et (ou) aux protéines est mise en évidence par le traitement à l'éthanol à 80° GL qui est indispensable pour l'obtention des différentes fractions de la paroi des deux charophytes. La paroi brute est résolue en trois fractions:  $F_1$  (substances pectiques),  $F_2$  (hemicelluloses) et

$F_3$  (celluloses). Chez *N. translucens* et *C. aspera*, ces fractions se retrouvent sensiblement dans les mêmes proportions pondérales: 30 et 31% pour  $F_1$ , 15 et 20% pour  $F_2$ , 26 et 29% pour  $F_3$ .

### *Isolement d'une fraction glycoprotéique*

La séparation par chromatographie d'affinité sur Con A-Sépharose, des constituants de la paroi brute (PB), des substances pectiques ( $F_1$ ), des hemicelluloses ( $F_2$ ) et des celluloses ( $F_3$ ), solubilisés dans le tampon acétate NaCl, donne toujours deux fractions A et B (Fig. 1).

La fraction A, non retenue par la lectine, est composée de peptides et de polyosides. Ceux-ci proviennent d'une solubilisation partielle des substances pectiques et hemicellulosiques en milieu alcalin [9]. Il n'est pas exclu que les protéines soient en partie liées à certains polyosides. Ce travail fera l'objet d'une autre publication.

La fraction B est retenue sur colonne. Étant donnée sa nature spécifique, la lectine ne peut retenir que des glycoprotéines de type gluco [10]. La fraction B est donc constituée de glycoprotéines riches en glucose ou en stéréoisomères. Après élution, dialyse et passage sur Séphadex G-50, elle se révèle soluble dans l'eau en donnant une solution dont les caractères sont ceux d'une solution vraie. Elle précipite à l'EtOH, à 70°GL et même 60° GL, en flocons blancs qui se redissolvent plus difficilement ensuite dans l'eau: le traitement alcoolique altère certainement la structure et diminue la capacité de solvation des groupements ionisables.

Traitée par l'urée 8 M et (ou) le chlorure de guanidinium 4 M, la fraction glycoprotéique ne montre pas de perte d'azote. Ce qui indique et confirme l'existence de véritables liaisons covalentes des

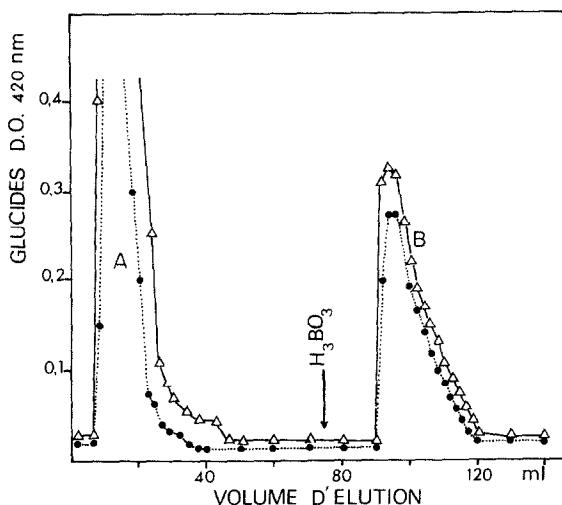


Fig. 1. Séparation de la glycoprotéine de la fraction 'paroi brute' de *Chara aspera* ( $\Delta$ ) et de *Nitella translucens* ( $\bullet$ ) sur colonne de Concanavaline A-Sépharose (1,5  $\times$  15 cm) équilibrée par un tampon acétate M/10; NaCl M,  $\text{CaCl}_2$  mM;  $\text{MnCl}_2$  mM; pH 6,8. Elution par une solution d'acide borique 0,1 M; pH 6,8.

protéines et des polyosides [7]. La reprécipitation par le MeOH n'affecte en rien le taux d'azote et confirme l'existence de ces liaisons.

#### Composition en oses de la fraction glycoprotéique B

La fraction B présente des oses et des protéines en proportion relative légèrement différente suivant son origine: 55 et 45%, 65 et 55%, 58 et 42% respectivement pour la paroi brute, la fraction 1, 2 ou 3, chez *N. translucens*, et, 45 et 50%, 50 et 45%, 48 et 52%, 55 et 45% chez *C. aspera*. La composition en oses exprimée en nmoles par rapport au glucose 100 est donnée dans le Tableau 1.

Dans la fraction glycoprotéique solubilisée à partir de la paroi brute (PB), des fractions pectique ( $F_1$ ), hémicellulosique ( $F_2$ ) et cellulosaque ( $F_3$ ), le glucose et le xylose représentent 88% des oses neutres chez *N.*

*translucens* et 84% chez *C. aspera*. Le rapport molaire du glucose au xylose varie suivant l'origine de la fraction glycoprotéique, mais se révèle sensiblement identique au niveau de la paroi brute et de chaque fraction homologue pour les deux algues.

Les autres sucres neutres, galactose, arabinose, mannose, sont également présents mais en quantité plus faible. Leur teneur varie d'une fraction à l'autre. Cependant, ils ne peuvent être considérés comme des contaminants; en effet, l'échec de toutes les tentatives de séparation par chromatographie à l'appareil automatique Technicon révèle qu'ils font partie intégrante des composés glycoprotéiques. Leur séparation n'est possible qu'après hydrolyse à l'acide trifluoroacétique (TFA).

Le galactose, l'arabinose et le mannose sont stables lorsque la fraction glycoprotéique est maintenue, pendant 1 hr, en milieu HCl N à 100°; dans ces conditions, le glucose est détruit à 45% et le xylose à 100%. Comme ces deux oses se révèlent plus sensibles à l'hydrolyse, on peut penser qu'ils interviennent dans la liaison O-glycosidique.

#### Composition en acides aminés de la fraction B

La composition en acides aminés est donnée par rapport à la sérine 100 (Tableau 2). Elle est sensiblement la même pour les fractions homologues des deux algues et varie peu suivant qu'elle provient de la paroi brute (PB) ou des trois fractions ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ).

La sérine est l'acide aminé prédominant puis viennent, en ordre d'importance décroissante, la glycine, l'acide glutamique, lalanine et l'acide aspartique. La théonine et la valine sont encore en quantités notables, les acides aminés aromatiques et basiques sont très faiblement représentés.

#### Comportement électrophorétique de la fraction B

L'électrophorèse à haute tension de la fraction glycoprotéique, à pH 5,3, en conditions boratées, permet d'obtenir six composés: 4 migrent à l'anode, 1 à la cathode et 1 ne montre aucune migration. Tous sont des glycoprotéines car ils sont révélés à la fois par les réactifs des acides aminés et des oses. Les composés sont étudiés et après hydrolyse, la composition en oses et acides aminés est déterminée.

Tableau 1. Teneurs en oses neutres de la fraction B isolée de la paroi brute (PB), des substances pectiques ( $F_1$ ), hémicellulosiques ( $F_2$ ) et cellulosaques ( $F_3$ ) de *Chara aspera* et de *Nitella translucens*

Oses	<i>Chara aspera</i>				<i>Nitella translucens</i>			
	PB	$F_1$	$F_2$	$F_3$	PB	$F_1$	$F_2$	$F_3$
Glucose	100	100	100	100	100	100	100	100
Xylose	19	30	14	8	20	25	18	7
Galactose	15	6	3	14	11	20	15	7
Arabinose	5	3	3	6	6	5	5	3
Mannose	7	8	6	4	3	4	6	0
Ramnose	2	0	0	0	0	0	0	0
Ac. Galactur.	0	0	0	0	0	0	0	0
Ac. Glucur.	0	0	0	0	0	0	0	0

Les résultats représentent la moyenne de 3 analyses, ils sont exprimés en nmoles par rapport au glucose 100.

Tableau 2. Teneurs en acides aminés de la fraction B isolée de la paroi brute (PB), des substances pectiques ( $F_1$ ), hémicellulosiques ( $F_2$ ) et cellulolosiques ( $F_3$ ) de *Chara aspera* et de *Nitella translucens*

Acides aminés	<i>Chara aspera</i>				<i>Nitella translucens</i>			
	PB	$F_1$	$F_2$	$F_3$	PB	$F_1$	$F_2$	$F_3$
Ac. aspartique	27	30	25	28	20	22	19	20
Thrénanine	18	28	16	7	19	22	17	10
Sérine	100	100	100	100	100	100	100	100
Proline	2	3	4	3	3	2	4	2
Ac. glutamique	49	48	50	47	43	40	39	41
Glycine	89	85	90	81	60	63	58	60
Alanine	33	30	35	28	31	28	33	34
Valine	25	21	20	26	21	20	19	22
Isoleucine	7	4	5	3	7	2	3	2
Leucine	10	8	7	5	8	5	6	4
Tyrosine	2	3	2	2	4	5	3	1
Phénylalanine	3	2	2	2	3	3	2	1
Lysine	10	9	9	7	9	10	8	9
Histidine	15	10	13	9	15	11	13	13
Arginine	4	3	4	1	3	3	5	3

Les résultats représentent la moyenne de 2 analyses, ils sont exprimés en nmoles par rapport à la sérine 100.

#### Composition en oses des glycoprotéines isolées (Tableau 3)

Le glucose et le xylose sont les deux glucides prédominants, ils représentent toujours plus de 60 nmoles pour cent. D'une glycoprotéine à l'autre, il apparaît des différences quantitatives entre ces 2 oses. Toutefois, il y a des similitudes de composition dans la partie glucidique entre certaines glycoprotéines,  $G_2$  et  $G_6$ ,  $G_1$  et  $G_4$  chez *C. aspera*,  $G_1$  et  $G_5$  chez *N. translucens*. La comparaison des résultats obtenus met en évidence une similitude étroite, en ce qui concerne la partie osidique, entre la glycoprotéine  $G_6$  de *N. translucens* et les glycoprotéines  $G_2$  et  $G_6$  de *C. aspera*.

#### Composition en acides aminés des glycoprotéines isolées (Tableau 4)

La glycine se révèle l'acide aminé de loin le plus important puis viennent la sérine, l'acide glutamique, l'alanine et l'acide aspartique. La thrénanine et la valine sont encore en quantité notable, les acides aminés basiques et surtout les acides aminés aromatiques ne

sont que très faiblement représentés. La partie protéique montre une grande similitude d'une glycoprotéine à l'autre.

On peut donc dire que parmi les douze glycoprotéines isolées, trois sont voisines,  $G_2$  et  $G_6$  de *C. aspera* et  $G_6$  de *N. translucens*.

#### DISCUSSION

L'extraction des fractions glycoprotéiques avant passage sur Con A-Sépharose est effectuée dans le tampon salin NaOAc et NaCl, de préférence aux tampons acide et basique, pour éviter toute altération des glycoprotéines.

L'élution des composés fixés sur la Con A-Sépharose se fait habituellement par le méthyl  $\alpha$ -D-mannoside ou par le méthyl  $\alpha$ -D glucoside [10]; dans ce travail, elle a été effectuée par l'acide borique pour éviter l'interférence du mannose et (ou) du glucose de l'éluant avec les oses identiques des glycoprotéines. L'emploi d'acide borique est possible car les glycoprotéines ne possèdent pas d'acide uronique.

Tableau 3. Teneurs en oses neutres des glycoprotéines isolées, par électrophorèse, de la fraction B de la paroi brute (PB) de *Chara aspera* et de *Nitella translucens*

Oses	<i>Chara aspera</i>						<i>Nitella translucens</i>					
	$G_1$	$G_2$	$G_3$	$G_4$	$G_5$	$G_6$	$G_1$	$G_2$	$G_3$	$G_4$	$G_5$	$G_6$
Glucose	59	67	41	59	68	64	48	29	53	58	49	66
Xylose	23	26	23	25	16	29	20	59	24	17	24	28
Galactose	9	3	20	8	7	3	14	5	12	8	11	3
Arabinose	9	3	11	8	7	3	11	4	8	17	9	3
Mannose	0	1	5	0	2	1	7	3	3	0	7	0
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Les résultats représentent la moyenne de 2 analyses; ils sont exprimés en nmoles pour 100.

Tableau 4. Teneurs en acides aminés des glycoprotéines isolées, par électrophorèse, de la fraction B de la paroi brute (PB) de *Chara aspera* et de *Nitella translucens*

Acides aminés	<i>Chara aspera</i>						<i>Nitella translucens</i>					
	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>	G <sub>4</sub>	G <sub>5</sub>	G <sub>6</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>	G <sub>4</sub>	G <sub>5</sub>	G <sub>6</sub>
Ac. aspartique	7,8	8,6	7,8	7,7	8,8	8,0	7,2	7,0	7,0	7,0	6,1	7,8
Thrénanine	5,8	6,3	5,2	6,1	6,9	6,7	6,5	6,3	6,3	6,0	7,0	7,5
Sérine	15,7	15,8	16,2	16,0	15,4	17,4	17,5	17,2	16,7	18,2	17,5	18,0
Proline	0,6	1,1	0,8	1,4	0,9	0,7	1,2	1,4	1,0	1,0	0,7	1,2
Ac. glutamique	12,5	12,3	11,3	12,4	11,0	10,5	13,3	13,4	13,2	12,3	12,0	11,6
Glycine	25,1	26,1	25,6	24,5	26,3	26,1	22,2	21,5	21,2	22,5	25,0	23,5
Alanine	9,4	9,1	8,9	9,8	10,0	10,1	9,4	9,7	10,0	9,3	10,1	8,2
Valine	7,1	6,4	8,0	8,5	6,8	8,7	6,6	7,3	8,0	8,7	7,0	7,5
Isoleucine	2,5	2,0	2,4	1,6	2,2	2,0	2,0	2,0	2,8	2,3	1,7	2,0
Leucine	3,5	2,5	3,0	2,4	3,0	3,5	2,5	2,4	2,4	1,8	3,0	2,0
Tyrosine	0,7	0,6	1,1	0,9	0,7	0,5	1,5	1,2	1,3	1,1	0,9	1,2
Phénylalanine	0,9	1,0	1,1	1,3	1,1	1,2	1,2	1,3	1,1	1,1	1,0	1,0
Lysine	2,8	2,7	3,0	2,6	1,5	2,5	3,4	3,1	3,0	2,7	2,5	3,0
Histidine	4,3	4,5	4,0	3,7	4,2	1,4	4,3	5,2	5,0	5,0	4,5	4,5
Arginine	1,3	1,0	1,6	1,1	1,2	0,7	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Les résultats représentent la moyenne de 2 analyses; ils sont exprimés en nmoles pour 100.

Toutefois, il est nécessaire de maintenir le pH à une valeur supérieure à 6,5 pour ne pas altérer la Con A-Sépharose. Les oses, dans ce cas, sont recueillis sous forme boratée. De plus, cette forme permet une meilleure séparation électrophorétique.

Le TFA est retenu de préférence à HCl et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour l'hydrolyse des oses; car, au cours d'une étude cinétique menée, au préalable, parallèlement pour les trois acides, il a donné le meilleur rendement en glucose et xylose.

Les conditions d'hydrolyse de la partie protéique: 3 hr, HCl 4 N, 100°, sont définies après une étude de l'influence de la concentration en HCl et de la durée du contact de l'acide.

Six glycoprotéines sont isolées pour chaque charophyte aussi bien à partir des fractions F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> que de la paroi brute. Il n'y a pas de différence fondamentale entre elles: elles présentent les mêmes oses et les mêmes acides aminés. Pour chaque fraction glycoprotéique, les oses représentent 55% et les protéines 45%. Pour les glycoprotéines isolées de la fraction PB<sub>i</sub>, l'importance relative de chaque acide aminé est sensiblement la même d'une glycoprotéine à l'autre.

La glycine est toujours l'acide aminé prépondérant, ce qui est aussi le cas dans les glucosylamino-glycanes [1, 11-13]. Toutefois, elle est toujours signalée comme importante dans les glycoprotéines et d'après certains auteurs, elle se situerait au voisinage des liaisons O-glycosidiques [13].

Dans la partie osidique au contraire, il apparaît des différences dans le nombre des résidus osidiques suivant la glycoprotéine considérée. Ces différences entraînent une microhétérogénéité des macromolécules isolées et expliquent leur séparation en électrophorèse [14].

Toutefois, il est intéressant de souligner la similitude de la composition chimique en oses des glycoprotéines des deux Charophytes qui diffèrent par la composition de leurs hémicelluloses: essentiellement une galacto-

arabane chez *N. translucens* et une xylo-glucane chez *C. aspera* (note en cours de rédaction).

La fraction protéique des glycoprotéines de *Nitella* et de *Chara* se révèle dépourvue d'hydroxyproline: ceci confirme les résultats déjà obtenus par Thompson [2] et Lampert [6] pour la paroi de *N. translucens*. La sérine et la thréonine pourraient jouer le même rôle que l'hydroxyproline; en effet, les liaisons sérine-xylose et thréonine-xylose ont été mises en évidence dans les tissus animaux [15] et retrouvées dans les algues, mais, à notre connaissance, seulement chez une Rhodophyte, *Porphyridium cruentum* [16]. Du travail que nous poursuivons pour établir le type de liaison O-glycosidique chez les deux Charophytes, il ressort que la sérine et, à un moindre degré, la thréonine, peuvent se lier avec le glucose et (ou) la xylose. Les glycoprotéines, isolées de *N. translucens* et de *C. aspera*, pourraient remplir la fonction attribuée par Lampert [6] dans la structure et la croissance de la paroi, aux glycoprotéines riches en hydroxyproline.

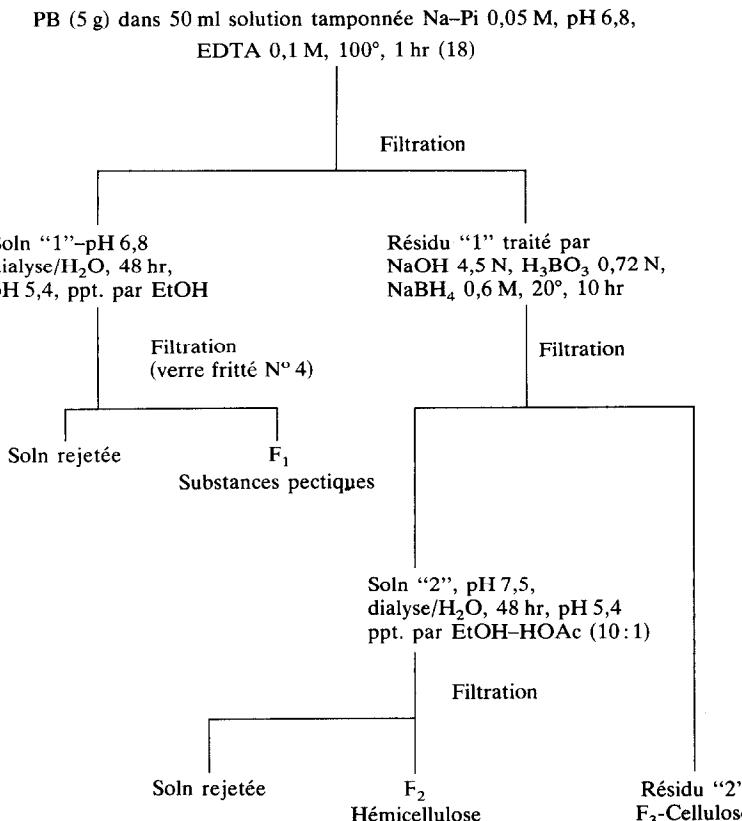
## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Nitella translucens* et *Chara aspera* sont récoltées en juillet, en période de croissance végétative et avant fructification: la première dans une mare oligotrophe à pH 6,8 à l'est du Theil-de-Bretagne (Ille-et-Vilaine), la seconde dans un étang du type eutrophe (pH 7,5) à Neuville en Jublains (Mayenne).

La préparation de la paroi est faite à partir des entremœuds, après plasmolyse et pression mécanique. Les entremœuds de *Chara aspera* sont soumis à un dessalage rapide, 2 min dans HCl N/100, suivi de 10 lavages à l'eau distillée. Le matériel (5 g) est séché sous vide sur CaCl<sub>2</sub> puis broyé au mixeur, resséché et réduit en poudre au broyeur à billes Dangoumeau. La séparation de la fraction 'paroi brute' (PB) est obtenue en gradient de saccharose et (ou) de NaCl (2 M, 1,5 M, 1 M, 0,5 M) [17]. On recueille les fractions (1,5 M), on effectue 10 lavages à l'eau, et l'opération est entièrement

renouvelée jusqu'à l'obtention d'une teneur constante en azote total, l'azote étant déterminé par la méthode du micro-Dumas à l'appareil Coleman.

Le fractionnement de la 'paroi brute', est effectué après un passage dans l'alcool bouillant à 80° GL pendant 10 min suivant le schéma ci-dessous:



*Extraction et chromatographie d'affinité.* C'est à partir de la 'paroi brute' (PB) et (ou) des fractions ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ) que la glycoprotéine est solubilisée: 1 g de matériel est introduit dans 25 ml de tampon NaOAc M/10 et NaCl M et soumis à une agitation magnétique à 4° pendant 2, 4, 6 et 7 hr. Après centrifugation à 7000 g, suivie d'une filtration sur verre fritté No. 4, le surnageant est mis en équilibre ionique pour l'utilisation de la chromatographie d'affinité sur une colonne de Con A-Sépharose (0,5 × 15 cm). Cette colonne est équilibrée avec un tampon NaOAc M/10 NaCl M. CaCl<sub>2</sub> mM, MgCl<sub>2</sub> mM et MnCl<sub>2</sub> mM. 5 ml de l'extrait sont déposés sur la colonne. On effectue un lavage par 150 ml de NaOAc M/10 et NaCl M puis on élue par 60 ml d'une solution Na<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,1 M, MnCl<sub>2</sub> mM, MgCl<sub>2</sub> mM et CaCl<sub>2</sub> mM. L'effluent et l'éluant sont recueillis en fractions de 2 ml. L'évaluation globale des oses et des protéines est faite dans chaque fraction, diluée 4 fois par de l'eau distillée, pour les oses à l'appareil automatique Technicon selon la méthode classique à l'orcinol sulfurique 0,1% et pour les protéines d'après la méthode de Lowry.

*Dialyse.* L'élimination des sels des fractions correspondant aux pics isolés par chromatographie d'affinité est réalisée dans des boyaux (Union Carbide Corp. No. 101) contre de l'eau déminéralisée, sous agitation magnétique, pendant 24 hr à 4°. Après évaporation sous vide à 30°, le résidu est repris par 1 ml d'eau déminéralisée; l'extrait obtenu est utilisé tel

quel pour l'analyse.

*L'électrophorèse.* L'électrophorèse du composé B séparé par passage sur la Con A-Sépharose est effectuée sur papier Whatmann No. 4 MM, successivement à pH 5,3 en tampon Py-HOAc-H<sub>2</sub>O (10:4:986) pendant 30 min à 45 V/cm, et, à pH 2,0 dans HCOOH 0,75 N, pendant 1 hr, à 40 V/cm. Les

composés sont révélés parallèlement par la ninhydrine et par l'aniline-acide citrique. La première électrophorèse fait apparaître 6 composés, la seconde seulement 5. Aussi, seule la première a été retenue. Chaque composé du premier électrophorégramme est élue et fait l'objet d'une analyse (acides aminés et oses). La présence éventuelle d'acides uroniques est recherchée par pulvérisation d'une solution d'aniline glucose 2%, suivie d'une chauffage à 110°.

*Détermination quantitative des oses neutres.* 5 mg de la fraction B sont hydrolysés en milieu TFA 1,5 N en tube scellé, sous vide partiel, pendant 1 hr. Après évaporation, sous vide à 35°, l'hydrolysat est repris par 5 ml H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,1 M. Une partie aliquote, 1 ml, est déposée sur la colonne de l'analyseur, puis éluee par un gradient H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> qui se charge progressivement en NaCl [19]. La densité optique de l'eluat est, après action d'une solution d'orcinol 0,1% dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70%, enregistrée en continu à 420 nm, à l'analyseur automatique Technicon.

*Détermination quantitative des acides aminés.* L'hydrolysat est réalisé pour 5 mg de la fraction B, par HCl 4 N, à 100°, en tube scellé, sous vide, pendant 3 hr. Après évaporation, le résidu est repris par 1 ml de tampon Tris HCl, pH 2,2, puis fixé sur une colonne Dowex AG 50 W-X8, H<sup>+</sup>; l'élution est faite à l'aide de 125 ml d'une solution NH<sub>4</sub>OH 2 N. Après évaporation sous vide de l'eluat ammoniacal à 37°, le résidu est repris par 1 ml de tampon citrate-HCl, pH 2,2. Les acides

aminés sont dosés selon la technique de Spackman à l'analyseur d'aminoacides Beckman et (ou) à l'appareil automatique Technicon; dans ce dernier cas, le dépôt sur la colonne est de 500  $\mu$ l.

*Hydrolyse et analyse des composés séparés par électrophorèse.* Parmi les 6 composés obtenus par électrophorèse à pH 5, 3, quatre se déplacent vers l'anode ( $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$ ,  $G_4$ ), un ne se déplace pas ( $G_5$ ) et le dernier se déplace vers la cathode ( $G_6$ ). Chacun est élué par HCl N/1000 et filtré sur verre fritté No. 4. Après évaporation sous vide à 30°, chacun est repris par 5 ml d'eau distillée. Une partie aliquote (1 ml) est hydrolysée pour l'analyse des oses dans les conditions définies précédemment et une autre partie (1 ml) hydrolysée pour l'analyses des acides aminés selon le protocole décrit plus haut.

*Remerciements*—Nous remercions M. R. Corillion et Mme. M. Guerlesquin pour la détermination des espèces de Characées à chaque récolte et P. Hervochon pour sa collaboration technique.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. Lampert, D. T. A. (1967) *Nature* **216**, 1322.
2. Thompson, E. W. et Preston, R. D. (1967) *Nature* **213**, 684.
3. Gotelli, I. B. et Cleland, R. (1968) *Am. J. Botany* **55**, 905.
4. Aronson, J. M., Klaprott, J. A. et Lin, C. (1969) II th International Botanical Congress, Abstracts 5.
5. Lampert, D. T. A. et Miller, D. H. (1971) *Plant Physiol.* **48**, 454.
6. Lampert, D. T. A. (1970) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **21**, 235.
7. Hascall, V. C. et Sadler, S. W. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 2384.
8. Court, G. J. et Taylor, I. E. P. (1979) *Phytochemistry* **18**, 411.
9. Van Soest, P. J. et Wine, R. H. (1967) *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **50**, 50.
10. Tomana, M., Niedermeier, W., Mestecky, J., Schrohenloher, R. E. et Porch, S. (1976) *Analyt. Biochem.* **72**, 389.
11. Stern, E. L. (1970) Ph.D. Thesis, University of Chicago.
12. Johnson, A. H. et Baker, J. C. (1973) *Biochem. Soc. Trans.* **I**, 277.
13. Isemura, M. et Ikenaka, T. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **404**, 11.
14. Lampert, D. T. A. (1973) *Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides* (Loewus, F., ed.) p. 152. Academic Press, New York.
15. Kornfeld, R. et Kornfeld, S. (1976) *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 217.
16. Kieras, J. F., Roden, L. et Chapman, D. J. (1977) *Biochem. J.* **165**, 1.
17. Zilling, W. et Holzel, H. (1958) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **312**, 140.
18. Stoddart, R. W., Barett, A. J. et Northcote, D. H. (1967) *Biochem. J.* **102**, 194.
19. Besle, J. M. (1974) *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* **14**, 545.