

ETUDE DES POLYSACCHARIDES DE RÉSERVE DE DEUX GRAINES DE LILIACÉES: *ASPARAGUS* *OFFICINALIS* L., ET *ENDYMION NUTANS* DUMORT

RENÉE GOLDBERG

Laboratoire de Physiologie végétale, I rue Victor Cousin, Paris V

(Received 14 January 1969)

Résumé—Les graines d'*Asparagus officinalis* et d'*Endymion nutans* renferment d'importantes quantités de polysaccharides solubles dans la soude. Ces hémicelluloses se présentent sous la forme de longues molécules linéaires constituées par l'enchaînement de molécules de glucose β et de mannose β liées par leurs carbones 1 et 4; à l'extrémité de ces glucomannanes on trouve des molécules d' α galactose. Les semences d'Asperge ne contiennent qu'un seul type de glucomannanes (dont le rapport mannose/glucose=1) alors que celles de Jacinthe semblent posséder au moins deux sortes de polysaccharides différant par la valeur du rapport mannose/glucose.

Abstract—The seeds of *Asparagus officinalis* and *Endymion nutans* contain large quantities of NaOH-soluble polysaccharides. These hemicelluloses are linear molecules consisting of β -glucose and β -mannose 1 \rightarrow 4 linked with α -galactose as a terminal group. The seeds of *Asparagus* are containing only one type of glucomannan (for which the ratio mannose/glucose=1) whereas those of *Endymion* seem to have at least two kinds of polysaccharide, differentiated by the mannose/glucose ratio.

INTRODUCTION

D'ASSEZ nombreuses graines renferment des quantités relativement importantes de polysaccharides contenant du mannose. Les mannanes des graines de *Phytelphas macrocarpa* et de *Phoenix dactylifera* sont connues depuis longtemps; des galactomannanes ont été isolées à partir d'un certain nombre de semences, en particulier chez les Légumineuses.¹ On ne connaît, par contre, que peu de graines contenant des glucomannanes.² Or, nous avons constaté que certaines semences de Liliacées renferment des polysaccharides dont l'hydrolyse acide libère essentiellement du glucose et du mannose (cas des graines d'*Allium capa*, *Allium porum*, *Asparagus officinalis*,³ *Endymion nutans*.⁴ Nous nous sommes proposé d'extraire et d'étudier les polysaccharides constitutifs des semences d'*Asparagus officinalis* et d'*Endymion nutans*. Ces recherches constituent la première partie d'un travail plus vaste sur le rôle physiologique des composés à mannose au cours de la maturation et de la germination des semences.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Semences d'Asparagus Officinalis

A partir des semences mûres et après élimination des glucides solubles dans l'alcool aqueux et dans l'eau, les polysaccharides ont été isolés par des traitements successifs par des

¹ R. SOMME, *Acta Chem. Scand.* **20**, 589 (1966).

² B. N. STEPANENKO, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**, 1519 (1960).

³ R. GOLDBERG, *C. R. Acad. Sci.* **261**, 5605 (1965).

⁴ R. GOLDBERG, *C. R. Acad. Sci.* **256**, 3495 (1963).

TABLEAU 1. EXTRACTION DES POLYSACCHARIDES DES SEMENCES D'ASPERGE

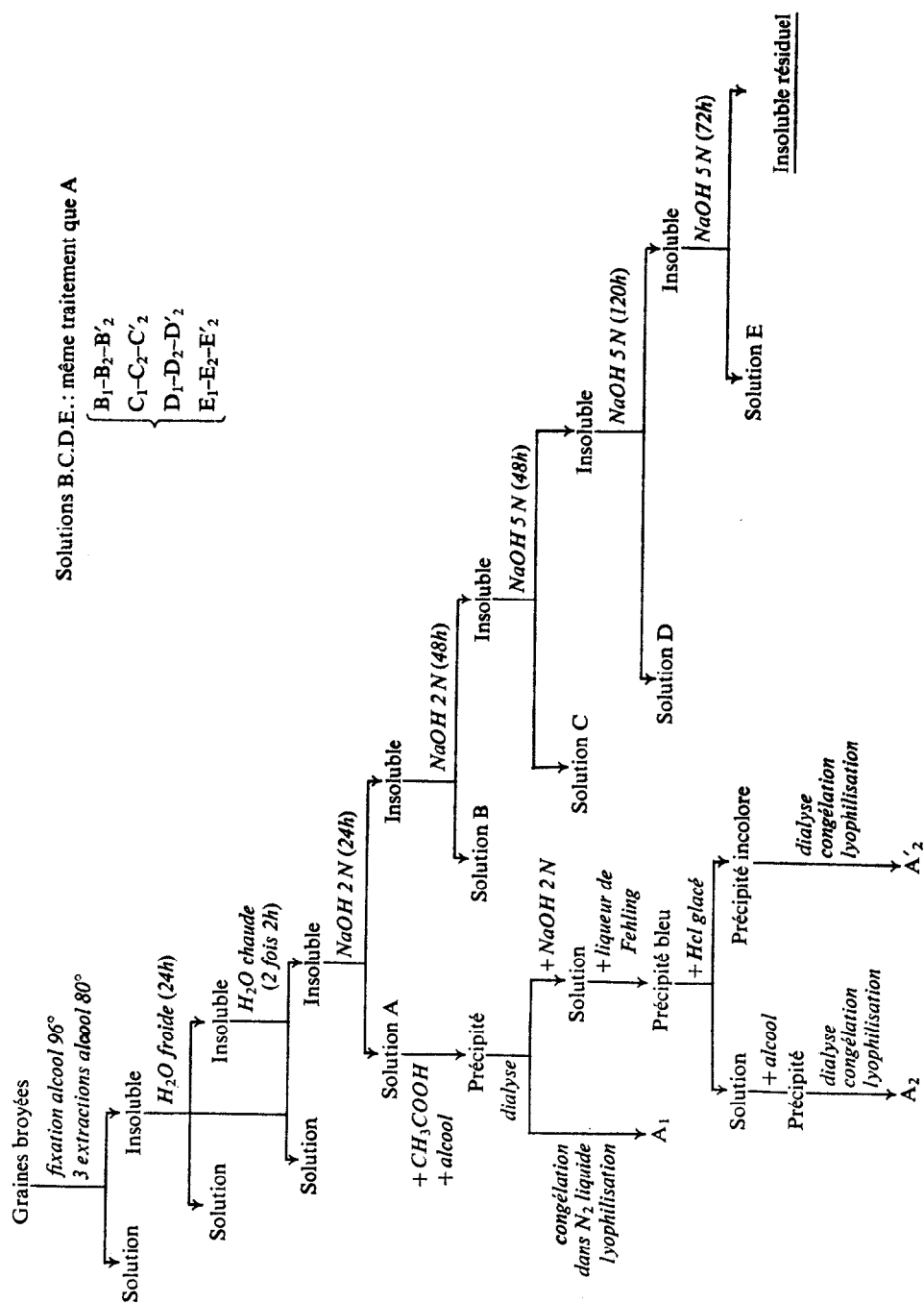


TABLEAU 2. COMPOSITION CHIMIQUE DES DIFFÉRENTES FRACTIONS DE POLYSACCHARIDES

Fraction étudiée	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	E ₁	A' ₂	B' ₂	C' ₂	D' ₂	E' ₂	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂	E ₂	Insol. résiduel
mg d'azote contenus dans 100 mg de "polysaccharide"	0,5	0,8	0,6	0,09	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
mg de substances réductrices libérées par l'hydrolyse de 100 mg de polysaccharides	75	60	60	66	70	68	72	62	75	62	68	73	75	77	82	53
Rapport mannose/glucose obtenu après hydrolyse des diverses fractions	0,81	1,02	1,11	0,97	1,06	1,04	1,04	1,03	0,99	0,97	0,98	0,94	0,97	1,09	0,94	1,0

Obtenues par épuisements successifs par des solutions de soude de plus en plus concentrées et pendant des temps variables (voir Tab. 1).

solutions de soude de plus en plus concentrées. Nous avons ainsi obtenu une série de fractions différant par leur degré de purification et leur solubilité dans la soude. Le Tableau 1 résume les opérations conduisant à l'obtention de ces diverses fractions.

Composition des Diverses Fractions Obtenues par Extraction Sodique

Analyse de la composition chimique (Tab. 2). Les diverses fractions sont à peu près exemptes d'azote sauf les fractions A₁, B₁ et C₁. Dans ces trois cas la présence d'azote est due vraisemblablement à l'entraînement de traces de protéines (extractions aqueuses préalables insuffisantes pour éliminer toutes les protéines). L'insoluble résiduel contient encore 1% d'azote.

Il n'a pas été possible d'obtenir 100% de sucres réducteurs après hydrolyse acide; en effet, les conditions de cette hydrolyse (durée 3 heures, acidité 3 N) provoquent une destruction

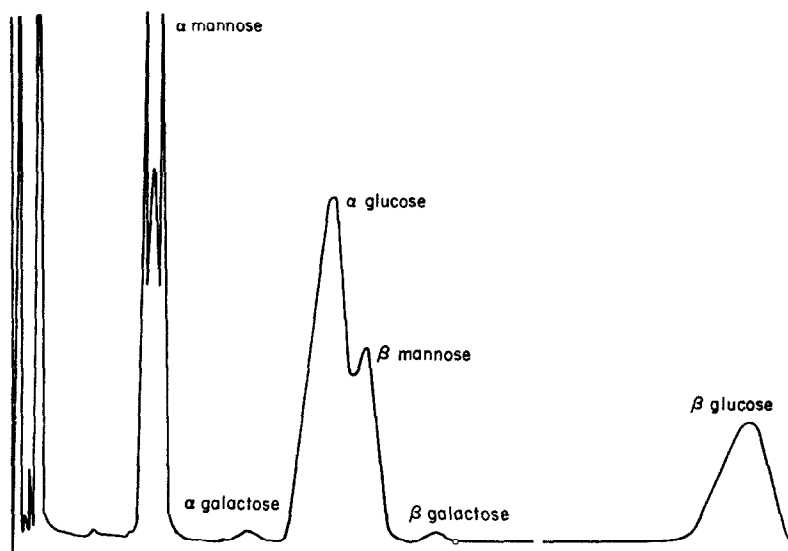


FIG. 1. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES POLYSACCHARIDES D'ASPERGE.
(Après hydrolyse acide et silylation des oses libérés), fraction B'₂.

non négligeable des hexoses libérés tout en étant insuffisantes pour produire une hydrolyse totale (un léger résidu insoluble subsiste toujours à la fin de l'hydrolyse). Les variations observées entre les diverses fractions sont peut-être dues à des différences dans la granulométrie des poudres obtenues après lyophilisation, ce qui entraînerait une hydrolyse inégale.

Toutes les fractions possèdent sensiblement le même rapport mannose/glucose (=1). Seule la fraction obtenue lors de la première extraction par la soude, et non purifiée ultérieurement par la liqueur de Fehling (A₁), contient un peu plus de glucose que de mannose (mannose/glucose=0,80); ce glucose supplémentaire provient peut-être d'hexoses associés aux composés pectiques incomplètement éliminés lors des traitements préalables par l'eau bouillante. L'insoluble résiduel obtenu après toutes les extractions par la soude, libéré après hydrolyse acide, comme les diverses fractions de polysaccharides extraits par la soude, autant de glucose que de mannose. On peut donc penser que les traitements par la soude

n'ont pas épuisé totalement le matériel végétal. L'insoluble résiduel est constitué essentiellement par des polysaccharides semblables à ceux extraits par la soude; il ne contient que fort peu de cellulose; en effet, une hydrolyse plus forte (dans les conditions requises pour obtenir la dégradation de la cellulose) ne permet plus de libérer de sucres réducteurs.

Toutes les fractions contiennent également des traces de galactose (Fig. 1).

Tamissage moléculaire sur gel Séphadex. Les diverses fractions se sont comportées de façon identique lors de leur filtration sur gel Séphadex: jusqu'au gel G 150, les polysaccharides passent immédiatement à la limite du volume d'exclusion de la colonne. Avec le gel G 200, par contre, on note un ralentissement de la migration mais sans distinguer plusieurs pics de sortie. Les diverses fractions extraites par la soude ont donc ici le même comportement et, d'après nos analyses, apparemment la même composition chimique.

Etude de la Structure des Polysaccharides

Essais d'hydrolyses enzymatiques. Les amylases α et β sont sans action sur les polyosides, ce qui implique l'absence de liaisons α 1 \rightarrow 4 entre les molécules de glucose; la maltase, la β glucosidase et la β galactosidase sont également inactives ce qui exclut la présence d' α glucose, de β glucose ou de β galactose à l'extrémité des molécules de polysaccharides. Par contre, l'action hydrolysante de la cellulase permet de supposer l'existence de liaisons de type β 1 \rightarrow 4.

Essai d'hydrolyse par un extrait enzymatique provenant de graines d'Asperge. Action de l'extrait enzymatique "brut": l'extrait utilisé correspond à la fraction protéique d'un broyat de semences précipitée par le sulfate d'ammonium entre 50 et 75% de saturation. Après 24 heures d'incubation à 37° avec 50 mg de polysaccharides (fraction B₂) 2 ml de solution enzymatique (soit environ 64 mg de protéines) libèrent un mélange de sucres réducteurs (6,2 mg) contenant 49% de glucose, 48% de mannose et 3% de galactose.

Action des diverses fractions obtenues après tamissage moléculaire sur gel Séphadex G 100 de l'extrait enzymatique brut: si on fait agir sur les polysaccharides ces diverses fractions protéiques, on constate que certaines d'entre elles provoquent la libération d'une quantité relativement importante de galactose; ces fractions sont celles qui possèdent la plus forte activité α galactosidasique (Fig. 2). Cette fraction enzymatique qui possède une forte activité hydrolasique et α galactosidasique étant par ailleurs extrêmement peu active sur les β galactosides (ex. sur le lactose), on peut penser que les extrémités des chaînes de polysaccharides sont constituées par des molécules d' α galactose.

Etude des polysaccharides méthylés. Les chromatographies sur papier des produits obtenus après hydrolyse acide des polysaccharides méthylés confirment ces premiers résultats. En effet, on observe des quantités importantes de 2,3,6-triméthyl-glucose et de 2,3,6-triméthyl-mannose ainsi que des traces de 2,3,4,6-tétraméthyl-galactose, ce qui prouve l'existence de liaisons 1 \rightarrow 4 et la présence de galactose en fin de chaîne. De plus, on remarque l'absence de dérivés diméthylés des oses obtenus après hydrolyse acide des polysaccharides, il n'y aurait donc pas de ramification dans leur molécule.

Pouvoir rotatoire. En solution dans la soude, les polysaccharides dévient très faiblement la lumière polarisée vers la gauche ce qui confirme la forme β des molécules de glucose et de mannose.

Hydrolyse ménagée des polysaccharides. Afin de déterminer si nous nous trouvions en présence de glucomannanes ou d'un mélange de glucanes et de mannanes, nous avons fait subir aux polysaccharides des graines d'Asperge une hydrolyse acide ménagée; les oligosides ainsi libérés ont été chromatographiés sur papier puis élués séparément (Tab. 3).

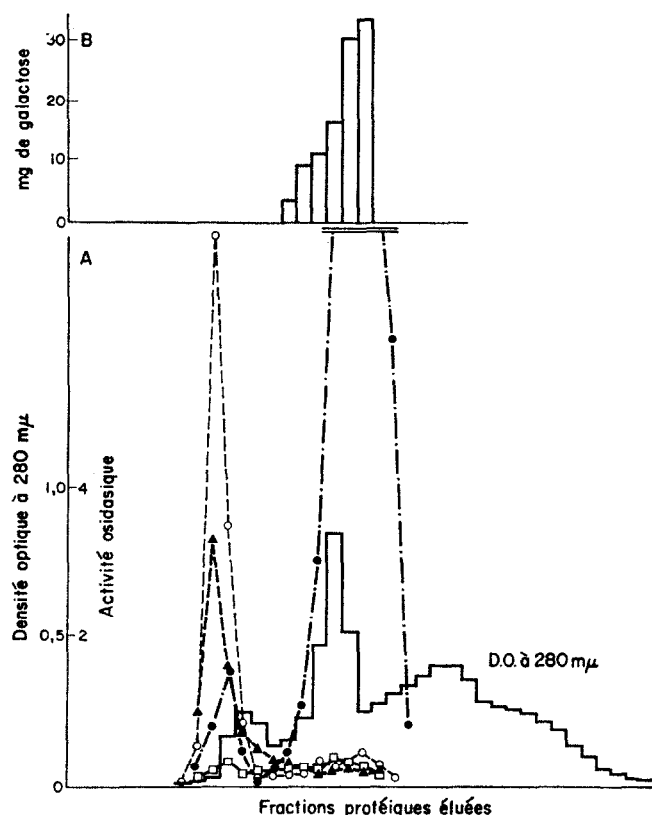


FIG. 2. ACTIVITÉ DES DIVERSES FRACTIONS PROTÉIQUES OBTENUES APRÈS TAMISAGE MOLÉCULAIRE DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE DE GRAINES D'ASPERGE.

A: activités α mannosidasique (\circ --- \circ --- \circ), β mannosidasique (\square --- \square --- \square), α et β glucosidasiques (\triangle --- \triangle), α galactosidasique (\bullet — \bullet).

B: quantité de galactose libéré lors de l'hydrolyse des polysaccharides par les diverses fractions protéiques (en mg pour 100 mg d'oses libérés).

L'hydrolyse de chaque oligoside ainsi obtenu donne à la fois du glucose et du mannose; l'un d'eux libère en plus du galactose. Les polysaccharides des graines d'Asperge sont donc des molécules mixtes composées de maillons de glucose et de mannose avec probablement quelques molécules de galactose.

TABLE 3. COMPOSITION DES OLIGOSIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE MÉNAGÉE DES POLYSACCHARIDES

R_{fGL} de l'oligoside élué à partir du chromatogramme	0,11	0,30	0,45	0,68
Hexose libéré après hydrolyse acide				
Mannose	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
Galactose	—	—	+	—

Les graines d'Asperge contiennent donc des glucomannanes; ces polysaccharides se présentent comme de grosses molécules linéaires (probablement plus de 800 unités de β glucose et de β mannose reliées par leurs carbones 1 et 4) et vraisemblablement terminées par des molécules d' α galactose. Cette structure est semblable à celle que Andrews, Hough et Jones avaient décrite pour les polysaccharides des graines d'*Iris sibirica* et d'*Iris ochroleuca*.⁵

Semences d'Endymion Nutans

Les techniques d'extraction utilisées pour les semences d'Asperge ont été appliquées aux semences de Jacinthe des bois, mais, seules deux fractions A et B ont été isolées (correspondant respectivement aux deux extractions par la soude 2 N et aux trois extractions par la soude 5 N); nous avons également étudié l'insoluble résiduel.

Le Tableau 4 contient les résultats des analyses de ces fractions; à la différence des graines d'Asperge, celles de Jacinthe semblent contenir au moins deux sortes d'hémicelluloses différant entre elles par le rapport mannose/glucose; l'insoluble résiduel semble très voisin

TABLEAU 4. COMPOSITION CHIMIQUE DES DIFFÉRENTES FRACTIONS DES POLYSACCHARIDES ISOLÉES DES SEMENCES DE JACINTHE DES BOIS

Fraction étudiée	A	B	Insoluble final
mg d'azote contenus dans 100 mg de polysaccharides	0,8	0	0,8
mg de substances réductrices libérées par l'hydrolyse acide de 100 mg de polysaccharides	65	70	51
Rapport mannose/glucose	0,95	1,65	1,60

des polysaccharides B. Les deux fractions A et B ont le même comportement lors de la filtration sur gel Séphedax (non retenues sur G 150; sortie ralentie sur G 200). Là encore, l'analyse des produits obtenus après hydrolyse acide des polysaccharides méthylés permet de conclure dans les deux cas à une structure non ramifiée (absence de dérivés diméthylés). Les chaînes linéaires sont constituées par des molécules de glucose et de mannose liées par leurs carbones 1 et 4, des molécules de galactose occupant les extrémités (présence de 2,3,6-triméthyl-glucose et de 2,3,6-triméthyl-mannose ainsi que de traces de 2,3,4,6-tétraméthyl-galactose).

Comme pour l'étude des polysaccharides des graines d'Asperge, nous avons tenté d'hydrolyser les hémicelluloses des semences de Jacinthe par diverses enzymes de provenance commerciale. Les amylases α et β sont inactives; la cellulase, par contre, hydrolyse les fractions A et B; les molécules de glucose sont donc vraisemblablement sous forme β . Les α et β glucosidases ainsi que la β galactosidase sont sans action; on peut donc conclure à la présence d' α galactose aux extrémités des chaînes des deux polysaccharides A et B. Par ailleurs leur hydrolyse ménagée libère des oligosides contenant tout à la fois du glucose et du mannose, il s'agit donc ici de glucomannanes.

⁵ P. ANDREWS, L. HOUGH, et J. K. N. JONES, *J. Chem. Soc.* 1186 (1960).

Conclusion

Nous trouvons donc dans les graines des deux espèces de Liliacées étudiées ici, des polysaccharides constitués principalement par du glucose et du mannose. La structure de ces hémicelluloses est conforme à celle observée dans le cas de graines de familles très voisines:⁵ glucose et mannose reliés par leurs carbones 1 et 4, galactose à l'extrémité des molécules de polysaccharides. Le mannose et le glucose sont sous forme β , ce qui semble être une constante des hémicelluloses des végétaux supérieurs (alors que les mannanes des levures, par contre, sont constituées d' α mannose), mais le galactose, présent en très faible quantité, est sous forme α . Les liaisons 1 \rightarrow 4 sont également très répandues parmi les polysaccharides végétaux. Une caractéristique des Liliales réside peut-être dans l'existence de grosses molécules linéaires (et non ramifiées comme dans le cas des tubercules de certaines Orchidées).⁶ Les deux espèces étudiées présentent en outre un autre point commun: leurs glucomannanes contiennent autant de glucose que de mannose; cependant, les graines d'*Endymion* possèdent également des glucomannanes dont le rapport mannose/glucose est voisin de 1,60.

Nous publierons prochainement les résultats concernant d'une part la localisation de ces polysaccharides dans les diverses parties des semences, et d'autre part, leur mode d'utilisation au cours de la germination.

TECHNIQUES

Extraction (Tab. 1)

Après avoir éliminé par une série d'extractions successives les glucides solubles dans l'alcool, dans l'eau froide et dans l'eau bouillante, nous avons isolé à partir de l'insoluble résiduel plusieurs fractions de polysaccharides en traitant cet insoluble par la soude. Chacune des fractions extraites par la soude est neutralisée par l'acide acétique, précipitée par l'alcool puis soumise à dialyse. Une partie de ce précipité est congelée dans l'azote liquide et lyophilisée (ex. A₁), le reste est redissous dans la soude et précipité par la liqueur de Fehling; le cuivre est alors éliminé par l'acide chlorhydrique glacé; la solution chlorhydrique est précipitée par l'alcool, le précipité est dialysé, congelé dans l'azote liquide et lyophilisé (ex. A₂); le précipité incolore qui subsistait après l'addition d'HCl est également dialysé, congelé et lyophilisé (A'₂). Nous avons ainsi étudié comparativement les diverses poudres obtenues après lyophilisation et l'insoluble résiduel.

Dosage de l'Azote

Après minéralisation d'une partie aliquote de chaque fraction (environ 20 mg), la quantité d'azote est estimée colorimétriquement par le réactif de Nessler selon la méthode décrite par Koch et McMeekin.⁷

Etude des Oses Constitutifs de Chaque Fraction

Après hydrolyse acide (HCl 3 N 3 h à 100°) la quantité de sucres réducteurs est déterminée selon la méthode de Nelson-Somogyi.⁸ La chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilyls des oses ainsi libérés⁹ est réalisée dans des conditions identiques à celles utilisées lors de l'étude de l'évolution des hémicelluloses d'Asperge au cours de la germination.¹⁰

Tamassage Moléculaire sur Gel Séphadex

Tamassage des diverses fractions de polysaccharides: 50 mg de chacune des fractions sont dissous dans 10 ml de soude N; le pH est abaissé à 9,0 par de l'acide chlorhydrique et le volume de la solution est amené à 20 ml avec du tampon "tris" 0,10 M (pH 9,0). 1 à 2 ml de celle solution sont déposés d'une colonne de gel Séphadex (hauteur 1 m diamètre 0,5 cm) puis élués par du tampon "tris" pH 9,0. Les diverses fractions (de 1,5 ml chacune) obtenues après filtration, sont dosées par le réactif à l'anthrone.¹¹

Fractionnement de la préparation enzymatique utilisée lors de l'étude de l'hydrolyse enzymatique des

⁶ M. DALOUL, F. PETEK et J. E. COURTOIS, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **45**, 1247 (1963).

⁷ F. C. KOCH et T. L. MCMEEKIN, *J. Am. Chem. Soc.* **46**, 2066 (1924).

⁸ J. NELSON, *J. Biol. Chem.* **153**, 175 (1944).

⁹ C. C. SWEETLEY, R. BENTLEY, M. MAKITA et D. D. WELLS, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2497 (1963).

¹⁰ R. GOLDBERG, *C. R. Acad. Sci.* **264**, 1036 (1967).

¹¹ R. DREYWOOD, *Ind. Eng. Anal. Edit.* **18**, 499 (1967).

polysaccharides: la solution enzymatique est obtenue à partir de graines d'Asperge non germées dans les conditions décrites précédemment.¹² 5 ml de cette solution (soit environ 100 unités de D.O. à 280 nm) sont déposés au sommet d'une colonne de gel Séphadex G 100 (90 cm de haut et 2,5 cm de diamètre) imbibée de tampon acétate pH 4,7 0,10 M puis élués par ce même tampon. Les fractions recueillies sont d'environ 12 ml chacune. L'action de ces diverses fractions sur les polysaccharides est alors recherchée.

Incubations Enzymatiques

Hydrolyse des polysaccharides: 50 mg de polysaccharides sont laissés 20 hs au bain marie à 37° dans 10 ml de tampon en présence de l'enzyme étudiée. Nous avons testé successivement les enzymes de provenance commerciale suivantes: amylase α , amylase β , maltase (NBC); β glucosidase, β galactosidase (SIGMA); cellulase, hémicellulase (FLUKA). De plus, nous avons étudié l'action sur les polysaccharides de diverses fractions protéiques obtenues après tamisage moléculaire sur gel Séphadex G 100 de la préparation enzymatique de graines d'Asperge. Les réactions sont arrêtées par immersion dans l'eau bouillante pendant 2 minutes. Les échantillons sont alors filtrés, amenés à volume déterminé puis analysés quantitativement (dosage des substances réductrices libérées) et qualitativement (syllation et chromatographie en phase gazeuse).

Recherche des activités α et β glucosidiques, α et β mannosidiques, α galactosidique des diverses fractions protéiques: les différentes fractions protéiques recueillies après filtration sur gel Séphadex G 100 de la préparation enzymatique obtenue à partir de graines d'Asperge, sont placées au bain marie à 37° dans du tampon acétate 0,10 M pH 4,7 en présence de substrats spécifiques: α et β phényl-glucosides, α et β phényl-mannosides, α phényl-galactoside. Le phénol libéré est dosé en milieu alcalin au spectrophotomètre à 285 nm.

Préparation des divers substrats: les phényl-tétracétyl-glucosides sont préparés selon la méthode de Montgomery,¹³ puis désacétylés par le méthylate d'ammonium.¹⁴ Les phényl-tétracétyl-mannosides sont obtenus par la technique de Helferich et Winkler,¹⁵ et désacétylés par le méthylate d'ammonium. L' α phényl-galactose nous a été donné par Madame Lechevallier.¹⁶

Méthylation des Oses Constitutifs des Polysaccharides

Nous avons fait successivement:

(a) 10 méthylation par le diméthylsulfate en présence de soude.¹⁷

(b) 2 ou 4 méthylation par l'iodure de méthyle (Me I) en présence d'oxyde d'argent.¹⁸

(a) Après dissolution de 1 g de polysaccharides dans 20 ml de soude à 30 %, on ajoute 6 ml de soude à 30 % et 3 ml de diméthylsulfate; cette opération est répétée 10 fois, un intervalle de 10 min étant observé entre chaque addition. Le mélange est agité 24 h à la température du laboratoire puis plongé dans un bain marie bouillant; le précipité qui apparaît alors en surface est recueilli par filtration, lavé à l'eau chaude et séché sous vide. Ce produit partiellement méthylé est dissous dans 20 ml de dioxane et subit neuf autres méthylation de ce type.

(b) Le polysaccharide partiellement méthylé est dissous dans 20 ml de diméthylsulfoxyde; on ajoute alors 20 ml de Me I et 5 g d'oxyde d'argent fraîchement préparé; après 48 heures d'agitation en erlenmeyer bouché, on verse à nouveau 20 ml de Me I et 5 g d'oxyde d'argent. Après 48 heures d'agitation le mélange est centrifugé; le précipité est extrait par du CHCl_3 et à nouveau centrifugé. Après cinq extractions de ce type, les surnageants sont réunis et lavés par une solution d'hyposulfite de sodium à 15 % afin d'éliminer l'iode. La CHCl_3 solution est alors traitée par l'eau (qui entraîne les sels minéraux) puis déshydratée (SO_4Na_2), et concentrée sous pression réduite. Le résidu sirupeux est desséché sous azote et conservé au dessiccateur. Dans le cas des polysaccharides de Jacinthe, deux nouvelles méthylation ont été nécessaires.

Etude des Produits Méthylés

Quelques mg de polysaccharides méthylés sont dissous dans une solution hydroalcoolique puis hydrolysés par SO_4H_2 2 N (2 heures à 100°). Après neutralisation par le CO_3Sr et élimination du précipité formé, la solution obtenue est chromatographiée sur papier dans les conditions mises au point par Petek¹⁹ (chromatographie ascendante de 24 heures dans le mélange isooctane-isopropanol-solution aqueuse d'ammoniaque à 10 % 65:25:2) et les hexoses méthylés sont alors révélés par le réactif de Partridge²⁰ (oxalate d'aniline). Les di,

¹² R. GOLDBERG, C. R. Acad. Sci. **264**, 2899 (1967).

¹³ E. MONTGOMERY, N. R. RICHTMEYER et C. S. HUDSON, J. Am. Chem. Soc. **64**, 690 (1942).

¹⁴ J. A. JOHNSON, J. Org. Chem. **22**, 954 (1957).

¹⁵ B. HELFERICH et S. WINKLER, Ber. Dtsche Chem. Ges. **66**, 1556 (1933).

¹⁶ D. LECHEVALLIER, Thèse Doct., Paris (1966).

¹⁷ W. N. HAWORTH, J. Chem. Soc. **113**, 188 (1918).

¹⁸ T. PURDIE et J. C. IRVINE, J. Chem. Soc. **83**, 1021 (1903).

¹⁹ F. PETEK, Bull. Soc. Chim. Fr. **263**, (1965).

²⁰ S. M. PARTRIDGE, Nature **164**, 443 (1949).

tri, tétra-O-méthyl-glucosides et galactosides ont été déterminés en se référant à la position de substances témoins; le 2,3,6-tri-O-méthyl-mannose a été déterminé par son R_f .

Hydrolyse Ménagée des Polysaccharides

Les polysaccharides restent 3 heures à 100° en présence de SO_4H_2 0,1 N. Après neutralisation par CO_3Sr , la solution est chromatographiée sur papier Whatmann no 3 (chromatographie descendante de 40 heures dans le solvant n-BuOH-acide acétique- H_2O 5:1:2). Les glucides anisi séparés sont élués par l'alcool à 50° (15 min à l'ébullition; deux fois) et l'eau bouillante (deux fois 15 min). Chaque fraction est hydrolysée ($\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$ 30' à 100°), neutralisée, silylée et analysée par chromatographie en phase gazeuse.

Remerciements—Nous remercions très sincèrement Monsieur le Professeur Courtois. C'est dans son laboratoire de la Faculté de Pharmacie de Paris qu'ont été menées les chromatographies sur papier des polysaccharides méthylés.