

NUCLÉOSIDE-DIPHOSPHATE-oses ET MÉTABOLISME GLUCIDIQUE AU COURS DE LA GERMINATION CHEZ LE FENUGREC

A. SIOUFI, F. PERCHERON et J. E. COURTOIS

Laboratoire de Chimie Biologique et Equipe de Recherche Associée "Osides et Osidases" du C.N.R.S.,
Faculté de Pharmacie, 4, Avenue de l'Observatoire, Paris 6^{ème}, France

(Received 23 July 1969)

Abstract—UDP-glucose, UDP-galactose and GDP-mannose have been identified in *Trigonella foenum graecum* seedlings. A study of the variation of galactomannan, verbascose, stachyose, galactinol, α -galactosidase and β -mannanase during the germination of the seeds has been undertaken and an attempt to relate the metabolism of all these constituents has also been made. Sugar-nucleotides are shown to be essential factors in the metabolic pathways leading to the synthesis of the cell-wall polysaccharides.

Résumé—L'UDP-glucose, l'UDP-galactose et le GDP-mannose ont été identifiés dans les graines germées de *Trigonella foenum graecum*. Une étude sur la variation de la galactomannane, du verbascose, du stachyose, du galactinol, de l' α -galactosidase et de la β -mannanase des graines a été effectuée au cours de la germination. Un essai d'interprétation métabolique en relation avec les constituants étudiés est discuté. Cet essai métabolique met en relief le rôle prépondérant des nucléotide-sucres dans la synthèse des polysaccharides des membranes cellulaires et des tissus de soutien.

PARMI les glucides du Fenugrec, la graine de *Trigonella foenum graecum* L., on distingue une galactomannane¹⁻³ et des galactosides du saccharose. Les graines de Fenugrec renferment en outre de la trigonelline et de la choline, ainsi que des sapogénines (tigogénine, diosgénine).⁴ Enfin, on rencontre dans les graines de Fenugrec des enzymes, notamment des osidases.⁵⁻⁷

Chez tous les végétaux supérieurs, les principaux sucres (D-galactose, acide D-glucuronique, acide D-galacturonique, D-xylose, L-arabinose) entrant dans la composition des polysaccharides dérivent de l'UDP-D-glucose.

Nous avons utilisé les graines de Fenugrec pour essayer d'y caractériser les nucléotide-sucres éventuellement présents tout en étudiant leur importance métabolique en relation avec les autres constituants glucidiques (galactomannane, oligosaccharides, osidases).

RESULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

Nucléotides et Nucléoside-diphosphate-oses

Pour étudier la variation de la teneur des nucléotides et nucléotide-sucres des graines de Fenugrec pendant la germination, nous avons analysé par chromatographie sur colonne de

¹ D. ANDERSON, *Ind. Eng. Chem.* **41**, 2887 (1949).

² P. ANDREWS, L. HOUGH et J. K. N. JONES, *J. Chem. Soc.*, 2744 (1952).

³ K. M. DAOUD, *Biochem. J.* **26**, 255 (1932).

⁴ W. KARRER, *Konstitution und Vorkommen der Organischen Pflanzenstoffe*, Birkhäuser Edit., Basel et Stuttgart (1958).

⁵ J. E. COURTOIS et F. PERCHERON, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **43**, 167 (1961).

⁶ S. BRAUGIRAUD et F. PERCHERON, *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **259**, 3879 (1964).

⁷ S. BRAUGIRAUD, F. PERCHERON, J. E. COURTOIS et C. LANCHEC, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**, 621 (1968).

résine échangeuse d'anions Dowex 1 trois extraits nucléotidiques correspondant aux graines sèches, aux graines à la fin du gonflement dans l'eau (24 hr) et aux graines après 48 hr de germination.

Afin de nous assurer de la reproductibilité de nos résultats, nous avons préparé trois extraits pour chaque stade et nous les avons analysés par chromatographie dans des conditions identiques. Les résultats que nous avons obtenus sont schématisés dans les trois graphiques d'élution représentés par Fig. 1-3.

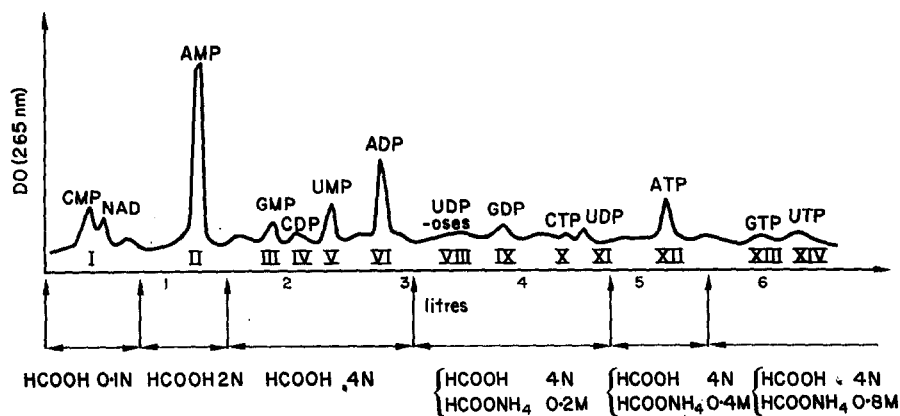


FIG. 1. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT NUCLÉOTIDIQUE DE GRAINES SÈCHES DE FENUGREC SUR COLONNE DE RÉSINE DOWEX 1 ÉCHANGEUSE D'ANIONS.

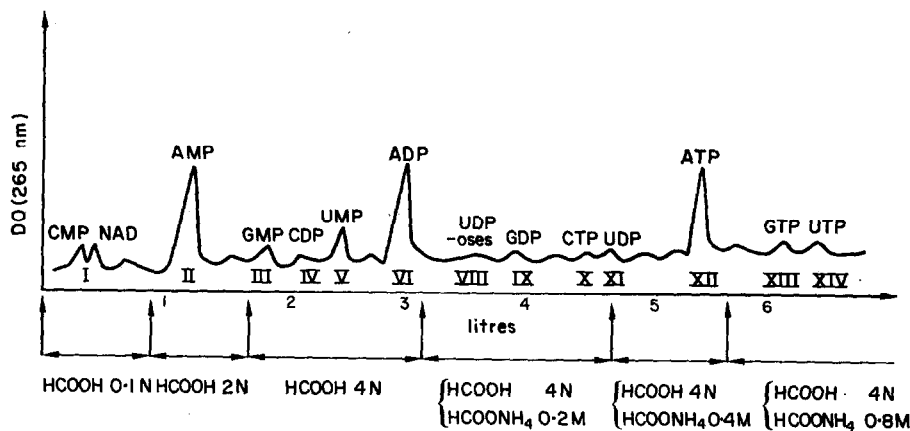


FIG. 2. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT NUCLÉOTIDIQUE DE GRAINES DE FENUGREC GONFLÉES 24 hr DANS L'EAU SUR COLONNE DE RÉSINE DOWEX 1 ÉCHANGEUSE D'ANIONS.

Nous avons étudié en détail uniquement les pics qui, d'après nous, renferment les nucléotides les plus intéressants au point de vue métabolique (Tableau 1).

Oligosaccharides

L'étude des variations des oses, oligosaccharides et polyols au cours de la germination des graines de Fenugrec nous a montré que le *stachyose* est l'oligosaccharide le plus important quantitativement. Les trois galactosides du saccharose (verbascose, stachyose et raffinose)

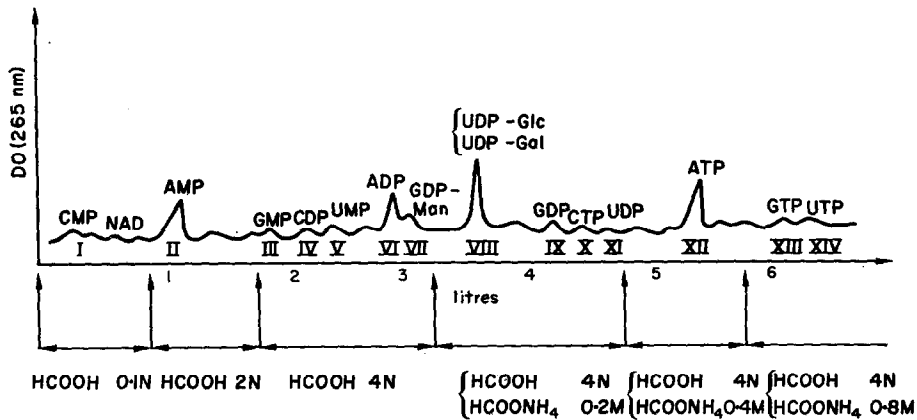


FIG. 3. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT NUCLÉOTIDIQUE DE GRAINES DE FENUGREC GERMÉES 48 hr SUR COLONNE DE RÉSINE DOWEX 1 ÉCHANGEUSE D'ANIONS.

TABLEAU 1. IDENTIFICATION DES NUCLÉOTIDES CONSTITUANT LES PRINCIPAUX PICS

Numéro du pic	Base constitutive	Rapport molaire ribose/base	Rapport molaire phosphate/base		Nucléotide identifié
			acido-labile	Total	
II	Adénine	0,96	0	1,08	AMP
V	Uracile	1	0	1,12	UMP
VI	Adénine	0,97	0,90	1,79	ADP
VII	Guanine	0,96	0,87	2	GDP-Man
VIII	Uracile	1,10	1,02	2,02	{UDP-Glc UDP-Gal
XII	Adénine	0,92	1,89	2,92	ATP

TABLEAU 2. VARIATIONS DES OSES, OLIGOSACCHARIDES ET POLYOLS AU COURS DE LA GERMINATION DES GRAINES DE FENUGREC

	Graines sèches	Graines gonflées 24 hr	Graines germées 24 hr	Graines germées 48 hr
Verbascose (en mg/100 g de graines sèches)	176	120	74	40
Digalactosido-inositol ¹²	traces	traces	traces	traces
Stachyose (en mg/100 g de graines sèches)	1190	920	338	210
Digalactosido-glucose (manninotriose)	traces	traces	traces	traces
Galactinol ¹²	traces	traces	traces	traces
Raffinose	+	±	traces	traces
Myo-inositol	++	+	±	±
Saccharose	traces	traces	traces	traces
Galactose	+++	++	+	±
Glucose	+	+	±	traces
Fructose	++	+	±	±

diminuent après 48 hr de germination. Nous constatons également la présence de traces de galactosides de l'inositol, dont le galactinol (Tableau 2).

Galactomannane

La galactomannane des graines de Fenugrec varie quantitativement et qualitativement pendant la germination. 100 g de graines sèches renferment 14 g de galactomannane dont le rapport molaire mannose/galactose est égal à 1,05. Les 100 g de graines sèches, après 48 hr de germination, ne contiennent plus que 2 g de galactomannane avec un rapport mannose/galactose égal à 7,45.

Osidases

L' α -galactosidase et la β -mannanase des graines de Fenugrec ont montré une augmentation importante de leur activité pendant la germination (voir Tableau 3).

Essai d'interprétation métabolique

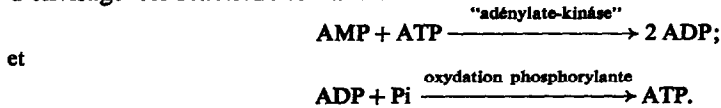
La comparaison entre les différentes variations des principaux constituants étudiés dans les graines de Fenugrec au cours de la germination (Tableau 3) nous permet de proposer une interprétation métabolique tenant compte des corrélations entre les variations des constituants étudiés.

TABLEAU 3. VARIATIONS DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS ÉTUDIÉS DANS LES GRAINES DE FENUGREC AU COURS DE LA GERMINATION

Graines	Sèches	Gonflées 24 hr	Germées 24 hr	Germées 48 hr
Galactomannane				
Poids (en g/100 g de graines sèches)	14	14	8,40	2
Rapport molaire Man/Gal	1,05	1,17	1,54	7,45
Oligosaccharides (en mg/100 g de graines sèches)				
Verbascose	176	120	74	40
Stachyose	1190	920	338	210
Activité spécifique				
α -Galactosidase (en μ g de Gal/min/mg de protéine)	0,5	9,7	10	23,6
β -Mannanase (en μ g de composés réducteurs/h/mg de protéine)	1,5	6,5	9	103
Nucléotides (en μ moles/100 g de graines sèches)				
AMP	20	13,10		4,12
ADP	9,60	10		5,20
ATP	4,32	12,60		6,28
UMP	3	2,80		1,30
Nucléotide-oses (en μ moles/100 g de graines sèches)				
UDP-Glc	3,92	4,12		12,38
UDP-Gal				
GDP-Man				3,20

Pendant le gonflement des graines dans l'eau, l'AMP diminue de 40 pour cent, l'ADP reste constant, l'ATP augmente de 280 pour cent et les nucléotide-sucres sont à l'état de traces. L'augmentation de l'ATP au cours de l'imbibition est peut-être due à l'accroissement de la respiration de la graine. Pour expliquer l'augmentation de l'ATP au cours de l'imbibition,

la diminution de l'AMP et le taux approximativement constant de l'ADP, il est possible d'envisager les réactions suivantes:



Après germination de 48 h, l'AMP, l'ADP et l'ATP diminuent de 50 pour cent environ; par contre les nucléotide-sucres augmentent assez sensiblement. Cette diminution des trois nucléoside-phosphates de l'adénine pourrait s'expliquer par le fait que c'est l'ATP qui sert d'agent phosphorylant pour les autres nucléoside-phosphates en vue de donner naissance à des nucléotides conjugués (nucléotide-sucres).

L'augmentation de l'UDP-Glc et de l'UDP-Gal est contrebalancée par une diminution de l'UMP ce qui nous permet de supposer que les nucléotides libres des graines constituent une réserve qui sera utilisée pour former les nucléotides conjugués pendant les dernières étapes de la germination.

Après 48 hr de germination, nous avons une diminution générale des nucléotides. Ceci résulte probablement d'une biosynthèse rapide d'acides nucléiques. Par contre, pendant l'imbibition, sur une base molaire, ce qui a disparu est à peu près équivalent à ce qui a été synthétisé. Donc, il n'y a pas eu de matériel nouveau introduit par dégradation d'acides nucléiques ou par synthèse nouvelle de purines ou pyrimidines.

La disparition de la galactomannane (polysaccharide de réserve) correspond à l'apparition des osidases au cours de la germination. La galactomannane des graines sèches de Fenugrec est constituée d'une chaîne d'unités β -D-mannopyranosyl liées en (1 \rightarrow 4), ces unités mannosyl étant substituées en 6 par une molécule d' α -D-galactopyranose dans une proportion telle que Man/Gal égale 1,05 (Fig. 4).

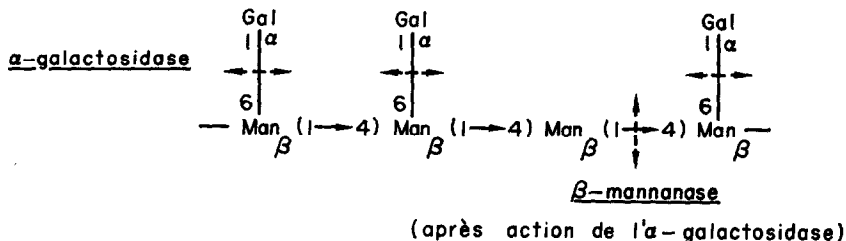


FIG. 4. ACTION DE L' α -GALACTOSIDASE ET DE LA β -MANNANASE SUR LA GALACTOMANNANE DES GRAINES SÈCHES DE FENUGREC.

Pendant la germination des graines, ce rapport augmente pour arriver à 7,45 à la fin des 48 hr de germination; ainsi nous avons affaire à une β -mannane substituée par un nombre restreint d'unités α -galactose. Ceci est expliqué par la puissante activité de l' α -galactosidase des graines après 48 hr de germination, en comparaison avec l'activité moins prononcée de la β -mannanase.

L' α -galactosidase libère donc de l' α -galactose et la β -mannanase (endopolysaccharidase) libère du mannatriose, du mannobiose et très peu de mannose, après action de l' α -galactosidase.⁸ Le mannose peut alors être phosphorylé en mannose-6-phosphate ou en mannose-1-phosphate ou bien ce mannose est épimérisé en glucose? Quant au galactose, il est probablement transformé en galactose-1-phosphate par l'intermédiaire d'une galactokinase. Le

⁸ J. E. COURTOIS et P. LE DIZET, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 1695 (1968).

galactose-1-phosphate en présence d'UTP va donner de l'UDP-Gal qui peut être épimérisé en UDP-Glc.

Ces nucléotide-oses (UDP-Glc, UDP-Gal, GDP-Man) apparus dans les graines pendant la germination vont servir de substrats pour les enzymes assurant les nombreuses inter-conversions qui conduiront aux dérivés glucidiques qui prendront part à la biosynthèse des membranes cellulaires ou des tissus de soutien.

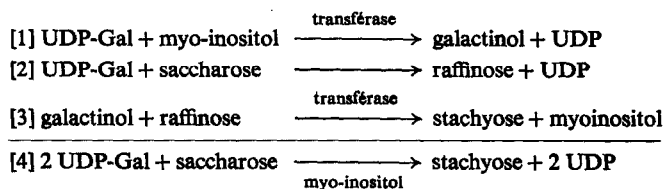
Le saccharose, constituant que l'on trouve presque partout chez les végétaux supérieurs est fréquemment accompagné d'oligosaccharides qui sont des galactosides du saccharose. Ces oligosaccharides se retrouvent en quantité importante dans les graines sèches et les autres organes des végétaux supérieurs (surtout les organes de réserve). Les graines des Légumineuses et notamment les graines de Fenugrec sont surtout riches en stachyose. La biosynthèse de ces oligosaccharides a lieu pendant les stades terminaux de la maturation des graines. La perte en eau des tissus des végétaux supérieurs est grossièrement parallèle à une augmentation en raffinose et ses homologues supérieurs.⁹ La concentration en saccharose baisse rapidement et le glucose qui se trouve dans les tissus diminue plus lentement.

Sans aucun doute, la biosynthèse du saccharose dans les graines de Fenugrec a lieu par l'intermédiaire de l'UDP-Glc.¹⁰ Par contre, la biosynthèse des galactosides du saccharose semble sujette à des controverses. Nous ne pensons pas que l' α -galactosidase (α -D-galactoside-galactohydrolase) des graines de *Trigonella foenum graecum* puisse synthétiser le raffinose par transfert du galactose issu de la dégradation de la galactomannane sur le saccharose. Les constantes d'équilibre des réactions catalysées par les glycohydrolases sont normalement en faveur de l'hydrolyse plutôt que de la synthèse des liaisons glycosidiques,⁹ et les concentrations en accepteur sont insuffisantes dans les conditions physiologiques.

Aussi, il nous semble plus probable que la biosynthèse des galactosides du saccharose dans les graines de Fenugrec ait lieu par la voie des uridine-diphosphate-sucres en présence d'un donateur de groupe galactosyl: le galactinol ou α -D-galactopyranosyl (1 \rightarrow 1) myo-inositol, l'inositol de la molécule servant uniquement comme transporteur. La répartition du galactinol chez les végétaux supérieurs a été étudiée par Senger et Kandler.¹¹ Sa présence chez les Légumineuses a été signalée pour la première fois par Petek, Villarroja et Courtois¹² dans les graines de *Vicia sativa*. A nouveau nous le rencontrons dans les graines de Fenugrec.

D'après Hassid,¹⁰ la formation du galactinol précède celle du stachyose.

Nous pouvons donc écrire les réactions suivantes:



La réaction [1] a été étudiée par Frydman et Neufeld¹³ avec un extrait enzymatique de pois. Pridham et Hassid¹⁴ ont utilisé un extrait de graines de *Vicia faba* et des composés

⁹ E. J. BOURNE, M. W. WALTER et J. B. PRIDHAM, *Biochem. J.* **97**, 802 (1965).

¹⁰ W. Z. HASSID, *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **18**, 253 (1967).

¹¹ M. SENGER et O. KANDLER, *Phytochem.* **6**, 1533 (1967).

¹² F. PETEK, E. VILLARROYA et J. E. COURTOIS, *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **263**, 195 (1966).

¹³ R. B. FRYDMAN et E. F. NEUFELD, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**, 121 (1963).

¹⁴ J. B. PRIDHAM et W. Z. HASSID, *Plant Physiol.* **40**, 984 (1965).

radioactifs pour élucider le mécanisme de la réaction [2]. Enfin, un extrait enzymatique de *Phaseolus vulgaris* a servi à Tanner et Kandler¹⁵ pour établir la réaction [3].

Toutes nos tentatives en vue de trouver un autre nucléoside-diphosphate relié au galactose (notamment l'ADP-Gal) ont été sans résultat. D'ailleurs, d'après Bourne *et al.*⁹ puis Hassid,¹⁰ il serait invraisemblable ou très peu probable que l'ADP-Gal joue un rôle significatif dans la biosynthèse du raffinose.

Le raffinose lui-même ne peut pas servir comme donateur de groupe galactosyl car la transférase de la réaction [3] n'hydrolyse pas le raffinose. Si on avait affaire à une α -galactosidase au lieu de la transférase, elle aurait hydrolysé le raffinose beaucoup plus qu'elle n'aurait synthétisé le stachyose.¹⁵ Le stachyose ainsi synthétisé est une substance de réserve dont le galactose pourra être utilisé pour édifier les polysaccharides des membranes.

Ainsi donc, les nucléotide-oses apparus dans les graines germées de Fenugrec sont l'élément essentiel du métabolisme glucidique de la graine en voie de germination. Grâce à ces nucléotide-oses, les polysaccharides des membranes cellulaires et des tissus de soutien vont pouvoir être formés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous travaillons sur des lots de 50 g de graines sèches de Fenugrec. Ces graines ont pu subir une imbibition de 24 hr dans l'eau ou une imbibition de 24 hr suivie de 24 hr ou de 48 hr de germination.

Extraction, Purification, Séparation et Caractérisation des Nucléotides et Nucléoside-diphosphate-oses

L'extrait nucléotidique est préparé soit en milieu acide perchlorique dilué 0,3 N,¹⁶ soit en milieu éthanolique à 60 pour cent à chaud.¹⁷ Le rendement en nucléotides et nucléotide-sucres est le même avec ces deux techniques d'extraction. L'extrait obtenu est impur, souillé de pigments, de coloration jaune brunâtre. Ces pigments sont retenus sur la colonne de résine Dowex 1 échangeuse d'anions qui sert à séparer les différents nucléotides et interfèrent lors des lectures spectrophotométriques et de l'examen des chromatogrammes en u.v. La positivité de certaines réactions¹⁸ nous porte à penser qu'au moins une partie de ces pigments est constituée de polyhydroxyflavonoïdes. Nous purifions cet extrait par passage à travers une colonne de Polyclar A.T. (poly-N-vinylpyrrolidone sous forme de résine, distribuée par la firme "Fine Dyestuffs and Chemical" Ltd, Manchester).^{19, 20}

La séparation des nucléotides et des nucléoside-diphosphate-oses contenus dans l'extrait nucléotidique purifié est réalisée par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'anions Dowex 1-X8 (200-400 mesh) conditionnée sous forme H—COO⁻. Nous utilisons un grand excès de résine dépassant la capacité requise pour fixer les anions de l'échantillon à analyser. Après percolation de l'extrait nucléotidique, nous procédons à l'élution basée sur la technique de l'*elution par gradient convexe* selon Hurlbert *et al.*²¹ Cette élution est affectée par les variations de pH et de concentration en sels, la température environnante (4°) et la

¹⁵ W. TANNER et O. KANDLER, *European J. Biochem.* 4, 233 (1968).

¹⁶ J. J. SAUKKONEN, *Chromatog. Rev.* 6, 53 (1964).

¹⁷ F. A. ISHERWOOD et F. C. BARRETT, *Biochem. J.* 104, 922 (1967).

¹⁸ T. A. GEISSMANN, in *Modern Methods of Plant Analysis* (edited by K. PEACH and M. W. TRACEY), Vol. III, p. 450, Springer-Verlag, Berlin (1955).

¹⁹ T. Y. LIN et W. Z. HASSID, *J. Biol. Chem.* 241, 3283 (1966).

²⁰ R. R. SELVENDRAN et F. A. ISHERWOOD, *Biochem. J.* 105, 723 (1967).

²¹ R. B. HURLBERT, H. SCHMITZ, A. F. BRUMM et V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.* 209, 23 (1954).

vitesse d'écoulement (0,5 ml/min) étant maintenues constantes. Ces opérations sont conduites sur un collecteur automatique de fractions (Gilson Medical Electronics) placé dans une enceinte réfrigérée, avec enregistrement automatique des pics d'absorption à 265 nm. Les fractions correspondant à un même pic d'absorption sont collectées et la nature de la base constitutive du nucléotide contenu dans chaque pic est identifiée: par le rapport DO à 275 nm/DO à 260 nm en solution formique;²¹ et par les caractéristiques spectrales des nucléoside-phosphates.²² Après avoir identifié la base constitutive, nous évaluons la concentration du pic en nucléotide en nous basant sur le coefficient d'extinction moléculaire.

Ayant déterminé la concentration du pic en nucléotide, nous effectuons un dosage de ribose par une méthode au phloroglucinol,²³ et un dosage de phosphate²⁴ acido-labile (après hydrolyse du nucléotide en milieu acide perchlorique *N* à 100° pendant 15 min) et de phosphate total (libéré par chauffage en tube scellé en milieu acide perchlorique à 70 pour cent, à 100°, pendant 90 min).

Les nucléotide-oses sont identifiés à l'aide du venin de serpent *Crotalus adamanteus* (Sigma). Après action de la pyrophosphatase et de la 5'-nucléotidase contenues dans ce venin, l'ose-1-phosphate libéré est identifié par chromatographie sur papier avec le solvant [*n*-propanol-ammoniac-eau, 5:4:1, v/v] après révélation avec un révélateur des composés phosphorés.²⁵ Le nucléoside formé est caractérisé par chromatographie sur couche mince de cellulose (feuille mince Kodak "Eastman Chromagram Sheet" 6065) avec le solvant [méthanol-acide chlorhydrique concentré-eau, 65:17:18, v/v].²⁶

L'UDP-Glc est caractérisé par une réaction spécifique avec l'UDP-Glc déshydrogénase (Sigma) à NAD⁺.²⁷ L'acide glucuronique formé est identifié par la réaction de Dische au carbazole sulfurique.²⁸

L'hydrolyse d'un nucléoside-diphosphate-ose en milieu acide sulfurique 0,01 *N* pendant 15 min à 100° libère l'ose, qui est caractérisé par chromatographie sur couche mince de SiO₂ gel,²⁹ et le nucléoside-diphosphate qui est identifié après chromatographie sur papier avec le solvant de Leloir³⁰ [éthanol-acétate d'ammonium M (pH 7,5), 75:30, v/v].

Enfin, nous avons séparé l'UDP-Gal de l'UDP-Glc (le pic VIII étant constitué par leur mélange) par chromatographie sur papier à l'aide du solvant [éthanol-méthyléthylcétone-tétraborate de morphilinium 0,5 M dans EDTA sodique 0,01 M (7:2:3, v/v)].³¹

Extraction, Purification et Analyse de la Galactomannane

La galactomannane est extraite en milieu aqueux. Elle est purifiée par trois précipitations successives en milieu éthanolique à 50 pour cent suivies d'une dialyse. Le produit obtenu après dessiccation sous vide est dépourvu de pouvoir réducteur, et son hydrolyse ne donne que du galactose et du mannose.

L'hydrolyse de la galactomannane en vue de la détermination du rapport molaire Man/Gal est réalisée en milieu H₂SO₄ 4 *N* pendant 4 hr. Le mannose et le galactose libérés sont séparés quantitativement par chromatographie sur papier avec le solvant [*n*-butanol-

²² R. TINELLI, *Bull. Soc. Chim. France* 273 (1965).

²³ G. ASHWELL, in *Methods in Enzymology* (edited by E. F. NEUFELD and V. GINSBURG), Vol. VIII, p. 86, Academic Press, New York (1966).

²⁴ R. L. DRYER, A. R. TAMMES et J. I. ROUTH, *J. Biol. Chem.* **225**, 177 (1957).

²⁵ A. DESJOBERT et F. PETEK, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **38**, 871 (1956).

²⁶ K. HECK et U. HAGEN, *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 685 (1964).

²⁷ J. L. STROMINGER, E. S. MAXWELL, J. AXELROD et H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.* **224**, 79 (1957).

²⁸ Z. DISCHE, *J. Biol. Chem.* **167**, 189 (1947).

²⁹ A. LOMBARD, *J. Chromatog.* **26**, 283 (1967).

³⁰ A. C. PALADINI et L. F. LELOIR, *Biochem. J.* **51**, 426 (1952).

³¹ H. CARMINATTI, S. PASSERON, M. DANKERT et E. RECONDO, *J. Chromatog.* **18**, 342 (1965).

pyridine-eau, 9:5:4, v/v]. Après élution aqueuse, ils sont dosés par la méthode de Nelson³² et Somogyi.³³

Identification des Oses, Oligosaccharides et Polyols

Le surnageant hydro-alcoolique obtenu après précipitation de la galactomannane en milieu alcoolique contient les oses, les oligosaccharides et les polyols. Après concentration par évaporation sous vide, puis dialyse, l'extrait est purifié par passage à travers 2 colonnes de résine Amberlite I.R. 120 H⁺ et Amberlite IR4B OH⁻.

Les oses, les oligosaccharides et les polyols sont séparés par chromatographie semi-quantitative sur papier dans différents solvants: [isopropanol-méthyléthylcétone-acétate d'éthyle-*n*-butanol-eau, 6:5:3:2:6 ou 5, v/v] et [isopropanol-*n*-butanol-eau, 7:1:2, v/v]. La révélation des chromatogrammes est réalisée soit avec un réactif au AgNO₃ alcalin³⁴ ou l'ortho-phénylène diamine.³⁵ Le myo-inositol est révélé avec un réactif basé sur la réaction de Scherer-Gallois.³⁶ Le stachyose et le verbascose sont dosés au moyen d'un réactif à l'anthrone.³⁷

Activité spécifique de la β -mannanase et de l' α -galactosidase

L'extraction de ces enzymes est réalisée par broyage des graines avec une solution de NaCl à 9 pour cent puis agitation mécanique pendant 2 hr à 4°. Après filtration, dialyse et centrifugation, le surnageant est précipité avec du (NH₄)₂SO₄ à 80 pour cent. Le précipité protéique est redissous dans H₂O, et dialysé. La solution ainsi débarrassée des sels constitue l'extrait enzymatique brut contenant l' α -galactosidase et la β -mannanase.

Le dosage des protéines de l'extrait enzymatique est réalisé par une microméthode du biuret selon Zamenhof.³⁸ L'activité de la β -mannanase est estimée par rapport à la mannane de Corozo. Les oligomannosides (surtout mannotriose et mannobiose) apparus dans le milieu après action de l'enzyme³⁹ sont dosés suivant la méthode de Nelson-Somogyi et exprimés en mannose.

L'activité de l' α -galactosidase est déterminée par rapport au phényl- α -D-galactoside. Le galactose libéré est également dosé par la méthode de Nelson-Somogyi. Nous n'avons pu déceler aucune activité de l' α -galactosidase des graines germées de Fenugrec vis-à-vis du mélibiose (substrat physiologique). Petek *et al.*⁴⁰ ont préparé une α -galactosidase purifiée à partir des graines germées de *Vicia sativa*. Cette α -galactosidase est également dépourvue d'activité sur le mélibiose.

³² N. NELSON, *J. Biol. Chem.* **153**, 375 (1944).

³³ M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.* **160**, 69 (1945).

³⁴ W. E. TREVELYAN, D. P. PROCTER et J. S. HARRISON, *Nature* **160**, 444 (1950).

³⁵ M. C. LANING et S. S. COHEN, *J. Biol. Chem.* **189**, 109 (1951).

³⁶ P. FLEURY, J. E. COURTOIS et P. MALANGEAU, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **35**, 537 (1953).

³⁷ J. MONTREUIL et G. SPIK, *Microdosage des Glucides*, fasc. 1, Fac. Sci. Lille éd. (1963).

³⁸ S. ZAMENHOF, in *Methods in Enzymology* (edited by S. P. COLOWICK et N. O. KAPLAN), Vol. III, p. 702, Academic Press, New York (1967).

³⁹ S. CLERMONT-BEAUGIRAUD et F. PERCHERON, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**, 41 (1968).

⁴⁰ F. PETEK, E. VILLARROYA et J. E. COURTOIS, *European J. Biochem.* **8**, 395 (1969).