

## Note

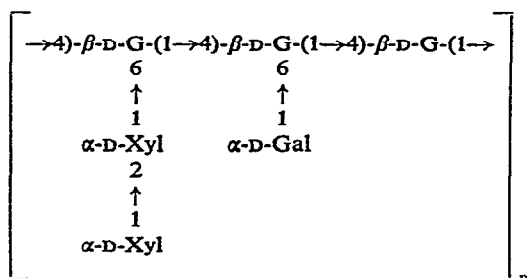
## Quelques précisions sur la structure de l'amyloïde de capucine\*

P LE DIZET

U E R de Biologie Humaine et Expérimentale et E R A n° 99 du C N R S,  
 Université René Descartes, 4, Avenue de l'Observatoire, 75-Paris VI (France)

(Reçu le 9 mars 1972, accepté après modification le 14 avril 1972)

Les amyloïdes ont été découverts au milieu du 19<sup>ème</sup> siècle<sup>1</sup>. S'ils paraissent absents chez les Monocotylédones, ils ont été décelés chez les Dicotylédones<sup>2</sup>. En général, les graines renfermant des galactomannanes ou de l'amidon en sont dépourvues. Ils semblent être constitués par une chaîne centrale d'unités de  $\beta$ -D-glucose liées en (1 $\rightarrow$ 4) sur lesquelles viennent se brancher en C-6 des unités de D-xylose, elles-mêmes substituées par des molécules de D-galactose chez le tamarin (*Tamarindus indica*)<sup>3</sup>. Chez la capucine (*Tropeolum majus*)<sup>4</sup> les branchements seraient constitués soit par de courtes chaînes de D-xylose, soit par des unités de D-galactose : la structure de base proposée par Hsu et Reeves<sup>4</sup> étant la suivante.



L'hydrolyse acide totale conduit au rapport molaire suivant D-galactose-D-glucose-D-xylose 1 3 2. Si, au cours des hydrolyses acides ménagées, nous avons retrouvé du cellobiose — confirmant ainsi la structure de la chaîne centrale de résidus D-glucose — nous n'avons jamais décelé de D-xylosyl-D-xylose, ni de D-galactosyl-D-glucose. Par contre, la présence constante de D-galactosyl-D-xylose permet de penser que la plupart des liaisons glycosidiques du D-galactose sont conjuguées en O-2 du résidu de D-xylose. La méthylation conduit en effet au 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-galactose et au 3,4 di-O-méthyl-D-xylose.

La position terminale du résidu de D-galactose est indiscutable : il est libéré le premier au cours des hydrolyses acides ménagées et la méthylation de l'amyloïde et

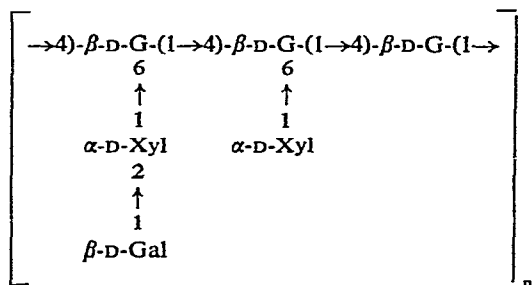
\*Dédié au Professeur Jean-Émile Courtois à l'occasion de son 65<sup>ème</sup> anniversaire.

des oligosaccharides qui en dérivent n'a jamais fourni que le 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-galactose. Quant à la configuration  $\alpha$  ou  $\beta$  de ces résidus terminaux, elle ne paraît pas établie avec certitude : forme  $\beta$  dans l'amyloïde de tamarin<sup>3</sup> et forme  $\alpha$  dans l'amyloïde de capucine<sup>4</sup>, celle-ci étant suggérée en fonction de variations du pouvoir rotatoire au cours de l'hydrolyse.

Toutefois l'hydrolyse importante du D-galactosyl-D-xylose par la  $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli*, sa résistance à l'action de différentes  $\alpha$ -D-galactosidases végétales dépourvues de  $\beta$ -D-galactosidase et son pouvoir rotatoire lévogyre sont en faveur de la configuration  $\beta$  de la liaison glycosidique du résidu de D-galactose terminal de l'amyloïde de capucine.

La présence de 2,3,4-tri-*O*-méthyl-D-xylose dans l'hydrolysât de l'amyloïde totalement méthylé, la formation de D-xylosyl-D-glucose au cours de l'hydrolyse acide ménagée et la libération de ce disaccharide par action de la cellulase commerciale "Astra" et d'une  $\beta$ -D-glucosidase de sarrasin<sup>5</sup> ayant la propriété de détacher les disaccharides, notamment à partir d'hétérosides, prouvent l'existence, dans la molécule d'amyloïde, d'un résidu de D-xylose terminal lié à un résidu de D-glucose.

On pourrait supposer qu'au cours de l'hydrolyse acide ménagée, le résidu de D-galactose terminal d'une chaîne latérale étant libéré le premier, un résidu de D-xylose devienne à son tour terminal. Mais le fait que des enzymes libèrent directement le D-xylosyl-D-glucose sans détacher un résidu de D-galactose permet d'admettre que ce résidu de D-xylose terminal préexiste dans la molécule d'amyloïde de capucine. L'ensemble des résultats que nous avons obtenus nous permet de modifier le schéma proposé par Hsu et Reeves<sup>4</sup> et de proposer la structure suivante :



#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

**Chromatographie** — Pour l'identification et la séparation des oses et des oligosaccharides nous avons utilisé, en chromatographie descendante, le papier Schleicher et Schull 2043b Mgl avec le solvant alcool butylique-pyridine-eau (9 5 4, v/v), les révélations étant effectuées avec le réactif à la  $\beta$ -naphtylamine. Les dérivés méthylés ont été identifiés et séparés sur papier Whatman n° 1 traité par le chlorure d'ammonium à 2%, en chromatographie ascendante, avec le solvant octane-2-propanol-ammoniaque 10% (50 25 2, v/v). La révélation est effectuée avec le réactif à l'oxalate d'aniline.

**Extraction** — Nous avons repris, sans modifications importantes, le protocole déjà décrit<sup>4</sup>, rendement 21 %,  $[\alpha]_D^{20} + 80,8^\circ$  (c 0,5, eau)

**Méthylation** — Le polysaccharide a été méthylé, d'abord par la méthode de Haworth<sup>6</sup>, puis par la méthode de Purdie et Irvine<sup>7</sup>. Le polysaccharide méthylé est ensuite soumis à une méthanolyse<sup>8</sup> et à une hydrolyse acide. Les dérivés méthylés identifiés ont été séparés par chromatographie sur papier : 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-galactose, 2,3,4-tri-*O*-méthyl-D-xylose, 2,3,6-tri-*O*-méthyl-D-glucose, 3,4-di-*O*-méthyl-D-xylose et 2,3 di-*O*-méthyl-D-glucose.

Nous avons toujours remarqué un déficit en 2,3 di-*O*-méthyl-D-glucose, ce qui peut s'expliquer par l'encombrement stérique de la molécule rendant l'accès difficile du réactif méthylant aux glucoses trisubstitués. Nous avons parfois observé une tache correspondant à un dérivé monométhylé du glucose sans que nous puissions juger s'il s'agit de la présence réelle de quelques unités de D-glucose tétrasubstitué ou d'une méthylation incomplète. Dans tous nos essais nous n'avons rencontré qu'un seul dérivé du D-galactose, le 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-galactose, ce qui confirme la position terminale des unités de galactose dans la molécule. Nous avons obtenu deux dérivés méthylés du D-xylose, le 2,3,4-tri-*O*-méthyle et le 3,4-di-*O*-méthyle. Les unités de D-xylose sont donc soit terminales, soit substituées en C-2. Enfin, nous avons identifié deux dérivés méthylés du D-glucose : le 2,3,6-tri-*O*-méthyle dérivant des unités de D-glucose de la chaîne centrale, et le 2,3-di-*O*-méthyle provenant de ces mêmes unités mais supportant une chaîne latérale.

**Hydrolyse acide totale** — Nous avons utilisé l'acide sulfurique 2,5M agissant pendant 4 h à 100°. La détermination quantitative des sucres réducteurs libérés a fourni la composition suivante par rapport au D-galactose : D-galactose, 1, D-glucose, 2,82–3,50, D-xylose, 1,82–2,15, D-arabinose présent en très faible quantité.

**Hydrolyse acide ménagée** — L'amyloïde, en solution aqueuse, chauffée à 100° pendant 3 jours n'a pas été hydrolysée et, soumise à l'action de l'acide sulfurique 5M à froid, il demeure inattaqué. Il est donc nécessaire d'effectuer l'hydrolyse en milieu acide et à chaud. L'étude analytique de l'hydrolyse acide ménagée en vue d'obtenir le rendement maximum en oligosaccharides nous a conduit à l'utilisation des acides sulfurique et oxalique.

**Hydrolyse par l'acide oxalique** Soumis à l'action de l'acide oxalique M pendant 2 h à 100° suivie d'une dialyse pour recueillir les oligosaccharides formés (D-galactosyl-D-xylose, D-xylosyl-D-glucose, cellobiose, tri-, tétrasaccharides et homologues supérieurs), l'amyloïde a fourni une fraction adialysable qui précipite par l'addition de 3 vol d'éthanol à 95%. Le précipité obtenu,  $[\alpha]_D^{20} + 57,2^\circ$  (c 0,816, eau), plus soluble dans l'eau que l'amyloïde, hydrolysé par l'acide sulfurique 1,25M pendant 5 h à 100° donne du D-galactose, du D-glucose et du D-xylose dans le rapport 1.6.3. Le pouvoir réducteur, exprimé en glucose par rapport au poids sec de produit, s'élève à 3,84 % (amyloïde 0,5 % de pouvoir réducteur).

**Hydrolyse par l'acide sulfurique** Il ressort des essais que nous avons effectués avec des concentrations en acide variant de 2–5mM que le D-galactose est toujours libéré le premier, le D-xylose apparaissant ensuite.

Avec l'acide 10M, le D-glucose n'apparaît en quantité notable qu'après 3 jours de contact. La libération du D-glucose coïncide avec la présence dans l'hydrolysât du cellobiose et des oligosaccharides supérieurs.

Pour l'obtention du D-galactosyl-D-xylose et du D-xylosyl-D-glucose qui nous intéressent particulièrement, nous avons retenu l'action de l'acide sulfurique 5M agissant pendant 8 jours à 100°. La quantité totale des oligosaccharides obtenus ne représente que 20 à 30% de l'amyloïde, le reste étant constitué par les monosaccharides libres. Au cours de l'hydrolyse apparaît une fraction insoluble qui, séparée et hydrolysée, renferme 8 résidus de D-glucose pour 2 de D-xylose. Tout se passe donc comme si une fraction peu substituée de la chaîne centrale avait été coupée, fraction préexistante ou démasquée par l'acide détachant les chaînes latérales.

**D-Galactosyl-D-xylose** — Ce composé a été obtenu à l'état amorphe par chromatographie préparative sur papier de l'hydrolysât par les acides dilués,  $[\alpha]_D^{20} -2,1 \rightarrow -6,3^\circ$  à l'équilibre (*c* 0,95, eau). Kooiman<sup>3</sup> a isolé à partir d'un hydrolysât partiel d'amyloïde de tamarin un 2-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosyl-D-xylose ayant  $[\alpha]_D +30^\circ$ .

L'hydrolyse acide totale par l'acide sulfurique 0,5M pendant 45 min à 100° fournit du D-galactose et du D-xylose en quantités équimolaires.

La méthylation complète suivie d'une hydrolyse donne le 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-galactose et le 3,4-di-*O*-méthyl-D-xylose. Le pouvoir réducteur, exprimé en D-xylose, est de 5,5%.

Sur des solutions aqueuses du disaccharide nous avons fait agir diverses  $\alpha$ -D-galactosidases dépourvues de  $\beta$ -D-galactosidase ainsi que la  $\beta$ -D-galactosidase d'*Escherichia coli*, qui est sans action sur la raffinose et sur le phényl- $\alpha$ -D-galactopyranoside. Après 3 h d'incubation à 37°, à pH 5,6, l' $\alpha$ -D-galactosidase du café<sup>9</sup>, l' $\alpha$ -D-galactosidase de fenugrec<sup>10</sup> et l' $\alpha$ -galactosidase de lucerne<sup>11</sup> se sont révélées inactives. Dans le même temps la  $\beta$ -D-galactosidase d'*Escherichia coli* libérait 61,5% du D-galactose de la molécule.

**D-Xylosyl-D-glucose** — Après avoir isolé ce glucide par chromatographie sur papier, d'une part à partir de l'hydrolysât obtenu par l'acide sulfurique dilué et, d'autre part, après action enzymatique, nous avons fait agir les enzymes suivantes : 8 cellulases, 3 hémicellulases, 2 pectinases, l'enzyme de *Rhamnus catharticus* et l'enzyme de sarrasin. En 24 h, à 37° et à pH 5,6, l'enzyme de sarrasin hydrolyse 29% de la molécule d'amyloïde, en libérant du D-galactose, du D-xylosyl-D-glucose et d'autres oligosaccharides qui seront étudiés ultérieurement. Les hémicellulases, les pectinases et l'enzyme de *Rhamnus catharticus* sont restées pratiquement inactives. Parmi les cellulases, seule la cellulase commerciale "Astra", après 48 h à 37° et à pH 6,8, détache une grande quantité de D-xylosyl-D-glucose accompagné d'un tri- et d'un tétrasaccharide sans qu'il y ait libération notable de D-galactose et de D-xylose.

Ce D-xylosyl-D-glucose,  $[\alpha]_D^{20} +56,3^\circ$  (*c* 0,37, eau), obtenu à l'état amorphe, libère du D-xylose et du D-glucose en quantités équimolaires après hydrolyse totale par l'acide sulfurique 0,5M pendant 45 min à 100°. Pour l'isoprimevérose obtenu après isolement, Perila et Bishop<sup>12</sup> ainsi que Hsu et Reeves<sup>4</sup> donnent les  $[\alpha]_D$  respectifs

+70° et +73,8°, tandis que Zemplén et Bognár<sup>13</sup>, pour un échantillon synthétique, rapportent  $[\alpha]_D +127^\circ$

La méthylation a fourni les deux dérivés suivants : le 2,3,4-tri-*O*-méthyl-D-xylose et le 2,3,4-tri-*O*-méthyl-D-glucose

#### RÉFÉRENCES

- 1 M. J. SCHLEIDEN, *Pogg Ann Phys Chem*, 43 (1838) 391.
- 2 P. KOOIMAN, *Acta Bot. Neer*, 9 (1960) 208
- 3 P. KOOIMAN, *Rec Trav Chim Pays-Bas*, 80 (1961) 849
- 4 D.-S. HSU ET R. E. REEVES, *Carbohydr Res*, 5 (1967) 202
- 5 R. BOURBOUZE, F. PRATVIEL ET F. PERCHERON, communication personnelle
- 6 W. N. HAWORTH, R. L. HEATH ET S. PEAT, *J Chem Soc*, (1941) 833
- 7 T. PURDIE ET J. C. IRVINE, *J Chem Soc*, 83 (1903) 1021
- 8 I. R. SIDDIQUI ET P. J. WOOD, *Carbohydr Res*, 17 (1971) 97
- 9 F. PETEK ET T. DONG, *Enzymologia*, 23 (1961) 133
- 10 E. VILLARROYA ET S. CLERMONT, communication personnelle
- 11 F. PETEK, E. VILLARROYA ET E. BAR, communication personnelle
- 12 O. PERILA ET C. T. BISHOP, *Can J Chem*, 39 (1961) 815
- 13 G. ZEMPLÉN ET R. BOGNÁR, *Ber*, 72 (1939) 1160