

## LES OLIGOSACCHARIDES DE TROIS GRAINES CONTENANT DES GALACTOXYLOGLUCANES (AMYLOÏDES)\*

ABBAS DALI YUCEF, JEAN ÉMILE COURTOIS ET PAUL LE DIZET

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Paris V, 4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris cédex 06 (France)<sup>†</sup>

(Reçu le 20 juin 1977; accepté sous forme modifiée, le 16 novembre 1977)

### ABSTRACT

In the seeds of *Tropaeolum* and *Tamarindus*, which have been found to have the highest content of amyloids, these polysaccharides are associated with sucrose and *O*-D-galactosylsucroses of the raffinose–stachyose series. Balsamine seeds have a low content of amyloid and do not contain the aforementioned galactosides, which are otherwise widely distributed in plant seeds. They contain sucrose and a mono-*O*-D-galactosylsucrose that has been crystallized and identified as planteose. Planteose has previously been isolated from some Sympetalous plants. As far as we know, this is the first report of its occurrence in an Archichlamydeaceous plant seed.

### SOMMAIRE

Dans les deux graines les plus riches en amyloïdes: *Tropaeolum* et *Tamarindus*, ces polysaccharides sont associés à du saccharose et des galactosides du saccharose de la série raffinose–stachyose. Les graines de *Balsamina*, à faible teneur en amyloïdes, ne contiennent pas ces galactosides largement distribués chez les Végétaux. Elles renferment du saccharose et un monogalactoside du saccharose, obtenu cristallisé, puis identifié au plantéose par plusieurs techniques. Le plantéose isolé jusqu'ici de quelques Sympétalées se trouve signalé pour la première fois, à notre connaissance, dans une graine intacte d'Archichlamydée.

### INTRODUCTION

Au cours de recherches antérieures<sup>1,2</sup> nous avons étudié la structure des D-galacto-D-xylo-D-glucanes (amyloïdes) de trois graines. Ces polysaccharides s'y trouvaient en proportions fort différentes: environ 2% chez la Balsamine (*Impatiens balsamina* L, Balsaminacées), 20% chez la Capucine (*Tropaeolum majus* L, Tropéolacées) et 40% chez le Tamarin (*Tamarindus indica* L, Coesalpinées).

\*Dédié au Professeur Dexter French pour son 60ème anniversaire.

<sup>†</sup>Et E.R.A. no 99 du C.N.R.S.

La forte teneur de la Capucine et du Tamarin en amyloïdes a permis de considérer qu'ils intervenaient comme substances de réserve dont le taux diminue régulièrement au cours de la germination<sup>1</sup>.

Dans les graines de Légumineuses riches en galactomannanes ces substances de réserve sont associées à une proportion le plus souvent élevée de galactosides du saccharose de la série raffinose-stachyose-verbascose<sup>3-6</sup>. Ces oligosaccharides, très largement distribués dans les Monocotylédones et surtout les Dicotylédones, sont métabolisés lors de la germination. Ceci nous a amenés à étudier les oligosaccharides présents dans les trois graines dont nous avons séparé les amyloïdes.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

La Capucine et le Tamarin ont permis d'isoler du saccharose et des galactosides du saccharose de la série raffinose-stachyose-verbascose. Il s'agit d'oligosaccharides largement répandus et qui ont été décelés, et souvent isolés, à partir de familles botaniques très variées. C'est pourquoi, dans la partie expérimentale, nous n'indiquerons que très sommairement les résultats obtenus avec ces deux graines. Par contre, nous développerons dans cette partie expérimentale la description du plantéose isolé de la Balsamine. Ce trisaccharide a été découvert par Wattiez et Hans<sup>7</sup> dans diverses graines du genre *Plantago*.

French *et coll.*<sup>8</sup> en ont établi la structure qui est celle d'un *O*- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2  $\rightarrow$  1)  $\alpha$ -D-glucopyranoside.

Depuis 35 ans, alors que les galactosides de la série raffinose-stachyose ont été obtenus à partir de multiples plantes, le plantéose n'a été décelé que dans un nombre très limité d'espèces, en particulier dans le laboratoire de French<sup>9,10</sup>. Jukes et Lewis<sup>11</sup> indiquent que le plantéose n'a été isolé que des plantes appartenant à des familles de la sous-classe des Sympétalées. Ils formulent des réserves, qui nous paraissent justifiées, sur le plantéose identifié par Cerbulis<sup>12</sup> dans une Archichlamydée: *Theobroma cacao* (Sterculiacées). La matière première étant constituée de graines de Cacao fermentées et torréfiées, elles contenaient, en sus du plantéose, du stachyose et du verbascose avec les deux oligogalactosides du D-glucose en dérivant, et divers monosaccharides.

Jukes et Lewis<sup>11</sup> envisagent que le plantéose du Cacao résulte d'une transgalactosylation durant la fermentation ou la torréfaction, ce qui paraît fort plausible.

Si l'on admet cette interprétation, la Balsamine représenterait, à notre connaissance, la première Archichlamydée où l'on a décelé le plantéose.

Il convient de remarquer que les Balsaminacées sont assez proches des Tropéolacées et que les graines de Capucine contiennent un amyloïde comme la Balsamine mais ne renferment pas de plantéose.

Nous signalerons en dernier lieu que dans aucune des trois graines à amyloïdes il n'a pu être observé la présence d'oligosaccharides contenant de l' $\alpha$ -D-xylose, du  $\beta$ -D-galactose ou du  $\beta$ -D-glucose, qui sont les constituants de leurs amyloïdes<sup>1,2</sup>.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

**Matériel.** — Les graines sont celles utilisées dans nos précédents mémoires<sup>1,2</sup>. Il en est de même pour les protocoles analytiques. Les oligosaccharides de référence avaient été isolés lors de nos recherches antérieures<sup>4</sup>. Le plantéose de référence (témoin, T) est celui isolé dans notre laboratoire à partir de *Plantago psyllium* par H. Hérissé<sup>13</sup>.

**Extraction du bloc des oligosaccharides.** — *A. Délipidation.* Les trois graines sont riches en lipides qu'il a été nécessaire d'éliminer de la poudre de graines.

Pour la Capucine et le Tamarin la poudre de graines décortiquées est agitée 12 h avec 3 parties d'un mélange acétone-benzène (1 : 1 v/v).

Les lipides de la Balsamine sont plus difficilement extractibles; après divers essais préliminaires, nous avons suspendu la poudre de graines non décortiquées dans 4 parties d'un mélange méthanol-chloroforme (1 : 1 v/v) à l'ébullition 4 h sous reflux. La poudre séparée a été soumise à 6 épuisements successifs par agitation de 12 h avec 3 parties d'éther de pétrole.

*B. Solubilisation.* Les poudres délipidées et desséchées sont suspendues dans 5 parties d'éthanol ou de méthanol à 100%, ceci pour éviter tout entrainement des amyloïdes, et maintenues 6 h à l'ébullition sous réfrigérant. Après filtration il est procédé à un second épuisement dans les mêmes conditions. Les liquides d'extraction sont concentrés jusqu'à consistance sirupeuse, à l'évaporateur tournant sous pression réduite. Nous ajoutons trois volumes d'éthanol qui insolubilise l'extrait brut.

*C. Chromatographie.* Elle a été réalisée qualitativement (a) de façon descendante sur papier Whatman avec le solvant 1-butanol-pyridine-eau (9 : 5 : 4, v/v); (b) sur plaque Schleicher-Schüll F 1500 avec le solvant 1-propanol-éthanol-acétate d'éthyle-acide acétique-pyridine-eau (7 : 3 : 3 : 2 : 2 : 3, v/v).

Le fractionnement par l'éthanol ou la séparation sur colonne de charbon-Célite avec un gradient d'éthanol n'ont pas été encourageants. Finalement nous avons procédé à une chromatographie descendante sur une série de papiers Whatman 3MM avec le solvant 2-propanol-butanone-acétate d'éthyle-1-butanol-eau (6 : 5 : 3 : 2 : 5, v/v). Les bandes correspondant aux oligosaccharides ont été éluées par l'eau et concentrées. Le saccharose, le raffinose, le stachyose et le verbascose ont été identifiés d'après les produits de leur hydrolyse partielle ou totale comme dans nos recherches antérieures<sup>4</sup>. Certains des oligosaccharides les plus intéressants ont été obtenus cristallisés dans l'éthanol à 70%.

*Capucine.* La poudre délipidée (100 g) a fourni 4,50 g d'extrait. La chromatographie sur papier indique la présence de faibles quantités de D-glucose et D-fructose, de saccharose abondant, de raffinose, stachyose, verbascose et d'un hétéroside dont nous poursuivons l'étude. Le raffinose en forte proportion a été obtenu cristallisé. Après 6 jours de germination, le taux des oligosaccharides globaux diminue de 38%.

*Tamarin.* La poudre délipidée (100 g) a fourni 3,70 g d'extrait, des traces de D-glucose et de D-fructose et en fortes proportions: du saccharose, du raffinose et du stachyose. Ces deux derniers ont été obtenus à l'état cristallisé.

*Balsamine.* La poudre délipidée (100 g) a fourni 4,63 g d'extract. Il contient de faibles quantités de D-glucose, D-fructose et est constitué essentiellement de saccharose et d'un corps migrant sur les chromatogrammes comme le plantéose. Ce composé (A) a été obtenu cristallisé avec  $2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

Certains lots de Balsamine ont fourni du *myo*-inositol et de petites quantités de disaccharides dont nous poursuivons l'étude. L'un est hydrolysable en D-glucose et D-fructose, l'autre en D-galactose et D-glucose.

*Identification du plantéose.* — Nous avons procédé parallèlement sur ce composé A et sur le plantéose témoin (T) préparé par Hérissé<sup>13</sup>;  $[\alpha]_D^{20} +126^\circ$  (A),  $+124^\circ$  (T) (*c* 0,5, eau).

*Dérivé peracétylé.* Le saccharide (0,1 g) est agité mécaniquement pendant 1 h dans l'anhydride acétique-pyridine (1:1 v/v, 10 ml). Le liquide est versé dans 50 ml d'eau glacée et le dérivé acétylé extrait par le dichlorométhane. La phase organique séparée est agitée avec une solution de l'hydrogénocarbonate de sodium, puis l'eau éliminée par sulfate de sodium anhydre. La concentration sous pression réduite et deux cristallisations dans l'éther ont donné le produit; p.f.  $136^\circ$  (A),  $137^\circ$  (T); mélange:  $135,5^\circ$  [Litt.:  $135^\circ$  (réf. 8),  $139^\circ$  (réf. 9)].

*Hydrolyse par une solution aqueuse d'acide sulfurique. Hydrolyse totale.* La solution (0,5M) portée 3 h à  $100^\circ$  a donné du D-galactose, D-glucose et D-fructose. Séparés par chromatographie, élués et déterminés par le réactif cupro-alcalin, ils sont en proportions équimoléculaires pour A et T.

*Hydrolyse partielle.* Pendant 3 jours à  $37^\circ$  la solution (0,025M) a donné par hydrolyse du D-glucose et l'*O*- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)-D-fructose (plantéobiose). L'hydrolyse acide totale du disaccharide séparé par chromatographie et élué a donné des quantités équimoléculaires de D-galactose et D-fructose.

*Action des enzymes.* La  $\beta$ -D-fructosidase des graines de *Trifolium* obligeamment fournie par Melle J. Williams et la  $\beta$ -D-fructosidase de levure de boulangerie, très actives toutes deux sur le saccharose et le raffinose, sont demeurées sans action sur A et T et sur le mélézitose.

L' $\alpha$ -D-galactosidase purifiée de *Trifolium*, obligeamment procurée par nos collègues du laboratoire<sup>14</sup>, a scindé totalement A et T en D-galactose et saccharose, identifiés par chromatographie.

La galactose-oxydase (EC 1.1.3.9) de Worthington Biochemical Corporation a réagi à pH 7,0; le peroxyde d'hydrogène formé est déterminé par le couple peroxydase-*o*-dianisidine. Nous avons eu recours au protocole décrit par Jack et Sturgeon<sup>15</sup>. Par rapport au D-galactose témoin, après 6 h de contact, la déshydrogénation en D-galacto-hexodialdose du D-galactose des trois trisaccharides a été de 100% pour le raffinose et de 89% aussi bien avec A que pour T.

*Action de l'acide periodique.* Les expériences ont été réalisées à  $4^\circ$  à l'abri de la lumière avec une solution d'acide periodique selon notre protocole habituel<sup>1,2,4</sup>. Le tableau I indique les résultats obtenus avec A, T et le mélézitose à titre comparatif. Avec les trois composés les quantités d'acide périodique réduit et d'acide formique libéré correspondent pratiquement à la théorie.

TABLEAU I

OXYDATION PAR L'ACIDE PERIODIQUE DES TRISACCHARIDES<sup>a</sup>

Durée de la réaction (en jours)		1	2	3
Molécules d'acide periodique réduit	Plantéose A <sup>b</sup>	4,6	4,85	5,05
	Plantéose T <sup>c</sup>	4,6	4,95	5,2
	Mélézitose	3,5	3,9	4,1
Molécules d'acide monovalent libérées	Plantéose A <sup>b</sup>	1,6	1,7	2,0
	Plantéose T <sup>c</sup>	1,6	1,7	2,05
	Mélézitose	1,55	1,6	1,85

<sup>a</sup>Les chiffres du tableau correspondent à une molécule de trisaccharide. <sup>b</sup>Composé isolé. <sup>c</sup>Plantéose témoin.

Il n'a pas été libéré de formaldéhyde avec les trois composés. Les vitesses d'oxydation des deux échantillons A et T de plantéose sont identiques.

*Perméthylation et hydrolyse.* La perméthylation a été réalisée selon la méthode d'Hakomori<sup>16</sup>. Après hydrolyse acide les dérivés *O*-méthylés ont été identifiés par chromatographie selon Petek et To-Dong<sup>17</sup>. A et T n'ont conduit qu'à trois dérivés présentant respectivement les mobilités du 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-galactose, du 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-D-glucose et du 1,3,4-tri-*O*-méthyl-D-fructose.

L'ensemble de ces résultats permet d'identifier le composé extrait de Balsamine au plantéose témoin.

## RÉFÉRENCES

- 1 J. E. COURTOIS ET P. LE DIZET, *An. Quim.*, 70 (1974) 1067-1072.
- 2 J. E. COURTOIS, P. LE DIZET ET D. ROBIC, *Carbohydr. Res.*, 49 (1976) 439-449.
- 3 D. FRENCH, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 9 (1954) 149-184.
- 4 J. E. COURTOIS, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42 (1960) 1451-1466.
- 5 J. E. COURTOIS ET F. PERCHERON, *Bull. Soc. Bot. Fr., no. spécial symposium taxonomie*, 112 (1965) 29-40.
- 6 I. C. M. DEA ET A. MORRISON, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 31 (1975) 241-312.
- 7 M. N. WATTIEZ ET M. HANS, *Bull. Acad. R. Med. Belg.*, 8 (1943) 386-396.
- 8 D. FRENCH, G. M. WILD, B. YOUNG ET W. J. JAMES, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 709-712.
- 9 D. FRENCH, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 1024-1025.
- 10 D. FRENCH, R. W. YOUNGQUIST ET A. LEE, *Arch. Biochem. Biophys.*, 85 (1959) 471-473.
- 11 C. JUKES ET D. H. LEWIS, *Phytochemistry*, 13 (1974) 1519-1521.
- 12 J. CERBULIS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 58 (1955) 406-413.
- 13 H. HÉRISSEY, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 39 (1957) 1553-1555.
- 14 J. WILLIAMS, H. VILLARROYA ET P. PETEK, *Biochem. J.*, 161 (1977) 509-515.
- 15 W. JACK ET R. J. STURGEON, *Carbohydr. Res.*, 49 (1976) 335-340.
- 16 S. I. HAKOMORI, *J. Biochem. Jpn.*, 55 (1964) 205-208.
- 17 F. PETEK ET TO-DONG, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 44 (1962) 1137-1140.