

50 376
1992
302

N° d'ordre : 1025

61301

50 376
1992
302

Présentée à

**L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS**

pour l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

en Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : BIOCHIMIE



par



Julien SOLO KWAN

**Caractérisation structurale des glucides
extracellulaires produits par la suspension
cellulaire de Silène (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause).**

Soutenue le 4 décembre 1992 devant la commission d'examen :

Président :	André VERBERT,	Professeur à l'Université de Lille
Rapporteurs :	Philippe DEBEIRE,	Directeur de Recherche à l'INRA, Lille
	Jean Paul JOSELEAU,	Professeur à l'Université de Grenoble
Examineurs :	Bernard FOURNET,	Professeur à l'Université de Lille
	Henri MORVAN,	Professeur à l'Université de Limoges



030 042560 5

Avant-propos

Ce travail a été réalisé au sein de l'Equipe Polysaccharides Pariétaux des Végétaux (EPPV), laboratoire de Recherche de l'Université de Lille Flandres-Artois, sous la direction de Monsieur MORVAN Henri, depuis 1988. Suite à la nomination au titre de Professeur de Monsieur MORVAN, la finition de ce travail est effectuée à Lille et à Limoges, sous la co-direction de Monsieur André VERBERT, Professeur à l'USTL F-A et Directeur du Laboratoire de Chimie Biologique.

En premier lieu, je tiens à remercier avec gratitude Monsieur Henri MORVAN, Professeur et Directeur du laboratoire de Biologie Cellulaire Végétale et Valorisation des Espèces Ligneuses (BCVEL) à l'Université des Sciences de Limoges, pour m'avoir confié ce travail sur la caractérisation des glucides végétaux et pour la confiance qu'il m'a témoignée. J'espère que ce travail ait été à la hauteur, aussi modeste soit-il. Sa qualité humaine, sa patience, son sens critique et son aide ont beaucoup contribué à la réalisation de cette Thèse.

J'exprime ma plus profonde gratitude à Monsieur Jean MONTREUIL, actuellement Professeur honoraire à l'USTL Flandres-Artois, qui a dirigé le Laboratoire de Chimie Biologique au début de ma thèse. Son importante contribution dans le développement des composantes technologiques et des personnels compétents dans le domaine des glucides à Lille, a permis la réalisation de ce travail. Je le remercie pour ses enseignements magistraux qui transmettent non seulement les connaissances, mais aussi la passion de la Recherche qu'il exprime avec enthousiasme et conviction. Sa bienveillance m'a permis de communiquer avec les membres de son laboratoire, tels ceux des Laboratoires de Messieurs Bernard FOURNET et Gérard STRECKER, que je remercie avec leur collègues Enseignants-Chercheurs, pour leurs enseignements et leur disponibilité.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur André VERBERT pour avoir accepté d'être Directeur de Thèse. Je suis très honoré par sa présence comme Président du Jury. Je profite de l'occasion pour remercier tout le personnel du Laboratoire de Chimie Biologique, qui m'a toujours réservé un excellent accueil lors de mes fréquents passages impromptus.

Cette Thèse fait partie du thème développé à Lille par Monsieur Henri MORVAN, concernant l'étude des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale et leur excrétion par une suspension cellulaire de silène. La présence au titre de Rapporteur, de Monsieur Jean-Paul JOSELEAU, Professeur à l'Université de Grenoble, réputé pour ses compétences dans le domaine des glucides végétaux, est pour moi un honneur. Je lui suis également reconnaissant de l'intérêt qu'il porte à mon travail, de ses conseils et ses critiques constructives.

Le chapitre III de cette Thèse a été réalisé avec une enzyme gracieusement fournie par Monsieur Philippe DEBEIRE, Directeur de Recherche à l'INRA, dont l'ouverture d'esprit et la spontanéité permanentes se manifestent par son accord d'être Rapporteur. Pour toutes ces raisons, je lui adresse mes plus vifs remerciements et ma reconnaissance.

Dès le début de ma formation en 3^{ème} Cycle, Monsieur Bernard FOURNET, Professeur à l'USTL F-A, s'est toujours intéressé à mon travail. Cet intérêt s'est concrétisé par des stages de formation et des concertations scientifiques pendant la durée de la Thèse. C'est grâce à son initiative que j'ai pu accéder à l'installation chromatographique du Laboratoire de Chimie biologique et disposer de la base de méthylation. Pour m'avoir fait confiance et pour avoir accepté de participer au Jury, je lui exprime ma profonde gratitude. De plus, mes remerciements s'adressent aussi bien à lui qu'à son équipe de Recherche dont les compétences ont contribué à la réalisation quotidienne de ce travail. Parmi ces personnes qui m'ont apporté leur aide:

- Madame Anne HONVEAU, technicienne, pour la réalisation, avec patience et efficacité, de la formation à la technique de méthylation et à l'utilisation de l'instrument d'analyse par chromatographie liquide gaz couplée au Spectromètre de masse.

- Thierry FONTAINE pour son aide scientifique au cours de nos discussions, pour sa promptitude à rendre service et pour son amitié. Qu'il soit assuré de la mienne.

- Messieurs Yves LEROY et Philippe TIMMERMANN pour leurs nombreux conseils et assistances techniques en matière d'analyse par chromatographie liquide gaz couplée ou non à une spectromètre de masse. La préparation de la base de méthylation est réalisée par TIMMERMAN. Et à tous les autres, je leur remercie de leur accueil chaleureux et amical.

Je présente mes remerciements à Monsieur Jean-François THIBAUT, Directeur de Recherche à l'INRA, pour ses arguments constructives, pour m'avoir reçu en stage d'initiation aux techniques de méthylation des polysaccharides pectiques, et pour m'avoir permis d'obtenir gracieusement de l'Arabinanase de la part de Monsieur A.G.J. VORAGEN, Professeur à l'Université de Wageningen (Les Pays Bas), que je remercie. Ces remerciements vont également au personnel du laboratoire de Technologie des Glucides de Nantes pour leur accueil chaleureux et particulièrement à Monsieur Xavier ROUAUX, Chargé de Recherche à l'INRA, en tant qu'animateur de ce stage.

Depuis le départ de Monsieur Henri MORVAN, Monsieur Yves LEMOINE, Professeur à l'USTL F-A, a accepté de m'accueillir au sein de son équipe, le Laboratoire de Cytophysologie Végétale et Phycologie. C'est pourquoi, je tiens à lui exprimer toute ma gratitude et mes remerciements pour sa gentillesse et sa compréhension qui m'ont permis de finir ce travail dans de bonnes conditions. J'adresse également mes remerciements à Monsieur Robert KLING, Maître de Conférences à Lille, pour ses multiples conseils et sa gentillesse.

J'ai intégré l'EPPV en même temps que Bernard PRIEM que je remercie infiniment pour son amitié sincère ainsi que pour les échanges scientifiques fructueux grâce à son esprit d'analyse critique, franc, constructif et précis. Son encouragement constant m'a été utile, même en étant aux Etats-Unis. Je lui témoigne ma reconnaissance pour m'avoir présenté à Monsieur Philippe DEBEIRE. Ils ont su me communiquer le goût du travail bien fait.

Mes remerciements s'adressent également à Yannis KARAMANOS, Maître de Conférences à Limoges, pour m'avoir formé pendant mon DEA et pour ses conseils permanents. A Mademoiselle Marie-Claire VERDUS, Chargée de Recherche CNRS, toute ma gratitude et mes remerciements pour ses multiples interventions en matière de Cytologie, de Biologie Végétale et de réalisation des affichages scientifiques. Enfin, pour son soutien amical et pour sa gentillesse qu'elle soit assurée de mon amitié sincère.

De même, à Jean-Claude MOLLET, sa complicité amicale et sa disponibilité à rendre service m'ont beaucoup aidé ; je lui en remercie infiniment. Je lui souhaite de trouver un agréable aboutissement à son travail de Thèse acharné. Je lui transmet mon encouragement avec mon amitié sincère. Par ailleurs, Rafic FEGHALI, compagnon du début, est toujours disponible pour partager ses connaissances et sa bibliographie. Je lui adresse mes remerciements et mon encouragement. Qu'il trouve en ma personne un ami fidèle. A Anne-Chantal DECLERCK, mes remerciements pour la préparation de la Pectinase Serva.

Toujours parmi le personnel de l'EPPV, je remercie Madame Michèle DELECOURT pour la dactylographie des publications et des affichages scientifiques. Je salue la participation efficace et sympathique de Madame DANNOOT et de Monsieur Jean DELVINQUIER dans l'entretien des locaux et du matériel. Et à Monsieur Robert MOREAU, Verrier de l'école de Chimie ENSCL, mes remerciements pour les services de réparation et de confection de matériels.

Au cours de la réalisation de ce travail, j'ai eu accès au laboratoire de Spectrométrie de Masse dirigé par Monsieur Guy RICART dont les conseils techniques et la disponibilité m'ont beaucoup aidé. C'est pourquoi je tiens à le remercier pour son aide efficace et amicale. Je lui souhaite d'obtenir les moyens nécessaires pour effectuer l'énorme travail demandé. Ces remerciements s'adressent également à Monsieur Albert DELANNOY pour son assistance en analyse par GLC-SM en mode ionisation chimique. De même, à Messieurs Bernard MOUCHEL et Jean-Michel WIERUSZESKI pour les analyses par Spectroscopie ¹³C-RMN qu'ils ont effectuées avec attention et efficacité. Je profite de l'occasion pour remercier La Région et Le Conseil Général du Nord / Pas-de-Calais, le Ministère de l'Education Nationale et l'Université des Sciences et Technologies de Lille Flandres-Artois, pour l'acquisition de ces matériels coûteux qui ont été nécessaires à la réalisation de ce travail.

J'adresse également mes remerciements au personnel du Laboratoire BCVEL de Limoges pour leur accueil chaleureux, pour l'apport scientifique et matériel indispensables à l'accomplissement de ce travail. Particulièrement à Sabine LHERNOULD, à Françoise MARGA et à Vincent GLOAGUEN, pour votre contribution spontanée et sans limite (correction linguistique et dactylographie) et pour votre amitié, croyez à ma gratitude et à mes sincères remerciements ainsi qu'à mon amitié. Je vous souhaite de rencontrer des personnes de votre qualité tout au moins au cours de votre thèse ; restez solidaires. Je n'oublie pas les autres membres auxquels j'adresse mes remerciements :

A Monsieur Michel CARLUE, Maître de Conférences, pour sa disponibilité scientifique lors de mes multiples questions inopinées et impromptues en matière de Biologie et Physiologie Végétales, tout comme à Monsieur Jean-Jacques FREDON, Maître de Conférences. A Madame Jacqueline COUILLOT, Maîtres de Conférences, à Claire CHEVALIER, à Jean-Marc FOURNIER et à Messieurs Askolds VILKS et Jean-Pierre VERGER, Maîtres de Conférences, je vous remercie de votre soutien moral et amical, de votre sympathie. Enfin, à Madame KOSAL, Secrétaire, et à Monsieur et Madame GOMOT, personnel technique, mes remerciements pour leur sympathie et leur compréhension des contraintes occasionnées par ma présence.

Aux Directeurs et Personnel des différents Laboratoires en Biologie Végétale de l'USTL F-A, mes remerciements pour leurs aides et leur sympathie.

Pour terminer, je dédie cette Thèse à Ma Famille et spécialement à Ma Chère soeur Gisèle DEVILLIER-KWAN. Grâce à leur amour, à leur sacrifice, à leur soutien moral et matériel, je suis arrivé à faire une étude supérieure. J'espère que ce travail, aussi humble soit-il, soit à la hauteur de leur confiance et de leur sentiment à mon égard. A mes Parents, Frères et Soeurs, je vous remercie pour votre aide. Soyez assurés de mon estime, de ma profonde gratitude et de mon dévouement.

Ma pensée va également aux Familles DEVILLIER ; à Monsieur et Madame Henri DEVILLIER, je leur témoigne toute ma gratitude pour m'avoir accueilli comme un fils. A mon Beau-frère Christian DEVILLIER, Instituteur à Quarouble (59) et à mon Neveu Géraud DEVILLIER, je leur remercie du fond du coeur pour m'avoir considéré comme un frère et pour m'avoir soutenu dès mon arrivée en France. Qu'ils trouvent en moi un frère et un ami dévoués.

Enfin, je remercie infiniment mon Beau-frère Dieudonné MAC HOI CHANG, Chirurgien-Dentiste à Dakar (Sénégal), et ma soeur Irène MAC-KWAN pour leur soutien permanent qui m'a permis d'accomplir ce travail.

A GISELE,

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p. 1
GENERALITES	p. 3
I - LES SUSPENSIONS CELLULAIRES ET LEURS EXCRETIONS	p. 4
A.- Comparaison entre les polysaccharides extracellulaires et pariétaux	p.4
B.- Signification physiologique des excréctions	p. 9
II - COMPOSITION CHIMIQUE ET STRUCTURE DES POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES VEGETAUX (CLASSIFICATION ET STRUCTURE DES PSP ET DES EPS)	p. 14
A.- La cellulose	p.14
B.- Les Hémicelluloses	p.16
1 - Xyloglucane	p. 16
2 - Xylanes	p. 19
3 - Les β -glucanes	p. 22
4 - Autres	p. 23
<i>a)- les $\beta(1,4)$-D-mannanes</i>	p. 23
<i>b)- les Glucuronomannanes</i>	p. 23
C.- Polysaccharides Pectiques	p. 26
1 - Homogalacturonanes	P.26
2 - Les rhamnogalacturonanes	P.29
3 - Arabinanes et Galactanes pectiques	p. 30
4 - Les arabinogalactanes pectiques (AGp) et protéiques (AGP)	p. 33
D.- Glycoprotéines et protéines végétales	p. 35
E.- Les liaisons croisées (Cross-links) = liaisons intermoléculaires ; Interconnections des polysaccharides	p. 37
1 - Liaisons non covalentes	p. 37
<i>a)- Liaison hydrogène</i>	p. 37
<i>b)- Liaisons ioniques</i>	p. 38
2 - Liaisons covalentes	p. 38
<i>a)- Liaisons directes</i>	p. 38

<i>b)- Liaisons indirectes</i>	p. 39
F.- Mucilages et exudats végétaux	p. 41
G.- Valorisation des polysaccharides végétaux	p. 41
III - METHODES D'ETUDE DES POLYSACCHARIDES VEGETAUX	p. 47
A.- Méthodes (bio)chimiques et physiques	p.47
1 - Obtention des fractions glucidiques homogènes et intactes	p.47
<i>a)- Sels, acides, bases, chélatants et substances organiques</i>	p. 48
<i>b)- Méthodes chromatographiques</i>	p. 50
<i>c)- Electrophorèse et Ultracentrifugationp.</i>	p. 51
2 - Analyse des fractions homogènes	p. 51
<i>a)- Méthodes spectrophotométriques</i>	p.51
<i>b) Méthodes analytiques</i>	p. 52
3 - Détermination partielle ou totale de la séquence structurale primaire	p.53
<i>a)- Méthylation, Spectrométrie de masse, Résonance magnétique nucléaire</i>	p. 53
α)- Méthylation	p. 53
β)- Spectrométrie de masse	p. 54
γ)- Résonance magnétique nucléaire	p. 56
<i>b)- Hydrolyse partielle</i>	p. 61
<i>c)- Oxydation périodique</i>	p. 61
α)- Oxydation périodique	p. 62
β)- Oxydation chromique	p. 62
<i>d)- Dégradation alcaline</i>	p. 62
<i>e)- Dégradations spécifiques au niveau des acides uroniques</i>	p. 63
α)- Dégradation catalysée par une base	p. 63
β)- Dégradation au lithium-éthylènediamine	p. 64
γ)- Coupure réductrice (Gray, 1987)	p. 64
<i>f)- Réduction des fonctions carboxyliques des polysaccharides acides</i>	p.64
B.- Méthodes biologiques et biotechnologiques	p. 65
1 - Méthodes enzymatiques	p. 65
2 - Méthodes d'affinité	p. 66

C.- Méthodes d'étude de liaisons particulières	p. 66
D.- Conclusions	p. 66

CHAPITRE I

I - INTRODUCTION	p.68
II - PRESENTATION DES METHODES	p.68
A.- Préparation des principales fractions	p.68
B.- Quantification des fractions polysaccharidiques	p.70
1 - Etablissement de la méthode de quantification	p. 70
2 - Mode d'identification des glucides	p.71
3 - Conditions expérimentales	p.73
C.- Etude des oligosaccharides et des monosaccharides	p.75
III - RESULTATS ET DISCUSSIONS	p.78
A.- Caractérisation des polysaccharides	p.79
1 - Quantification	p.79
2 - Identification des fractions	p.82
a)- <i>mannanes</i>	p.82
b)- <i>Xylanes</i>	p.85
c)- <i>Glucanes</i>	p.85
d)- <i>Polysaccharides pectiques</i>	p.85
e)- <i>Autres composés:</i>	p.86
B.- Composition des surnageants	p.86
1 - Caractérisation des molécules	p.86
a)- <i>Inositols endogènes</i>	p.86
b)- <i>Autres composés</i>	p.87
2 - Composition du surnageant $S_1S_6-S_H$	p.95
a)- <i>Composés nouveaux</i>	p.95
a)- Glycérol et glycéraldéhyde ou dihydroxyacétone	p.95
β)- Déoxypolyols et déoxy-aldoes ou -cétoses : G_2 , G_3 et X_4	p.97
γ)- 3,6-anhydrofructose triacétate (X_6)	p.98
b)- <i>Les polyols et les monosaccharides</i>	p.98
c) - <i>Monosaccharides conjugués et oligosaccharides</i>	p.99
3 - Composition du surnageant $S_1P_6S_3-S_H$	p.101
IV- CONCLUSIONS	p.102

CHAPITRE II

I - INTRODUCTION	p.105
II - PRESENTATION DES METHODES	p.105
A.- Extraction et Purification	p.105
1 - Précipitation éthanolique	p.105
2 - Méthodes chromatographiques	p.107
B.-Analyses	p.100
1 - Quantification	p.108
2 - Caractérisation par méthylation	p.108
3 - RMN du ^{13}C	p.109
III - RESULTATS ET DISCUSSIONS	p.109
A.- Fractionnement	p.110
1 - Analyse des profils d'élution	p.110
2 - Composition	p.113
B.- Caractérisation des contenus des fractions	p.116
1 - Etude des liaisons chimiques par méthylation	p.117
<i>a)- Fraction Snr-A :</i>	p.117
<i>b)- Fraction Pnr :</i>	p.120
<i>c)- fraction S01-A :</i>	p.120
<i>d)- fraction S03 :</i>	p.121
2 - Etude de la composition glucidique par spectroscopie RMN	p.122
<i>a)- Fraction Snr-A</i>	p.122
α - Acétates	p.122
β - Galactomannane	p.126
γ - T/5- α -Arabinane	p.128
δ - Glucanes	p. 130
<i>b)- Fraction Snr-B</i>	p.131
<i>c)- Fraction S01-B</i>	p.135
<i>d)- Fraction Pnr</i>	p.135
<i>e)- Fraction P01-B</i>	p.143
<i>f)- Fraction P03-B</i>	p.147

IV - CONCLUSION	p.152
CHAPITRE III	
I - INTRODUCTION	p. 154
II - PRESENTATION DES METHODES	p. 155
A.- Etude de la fraction pectique (Préparation d'arabino-galactanes II)	p. 155
1 - Action de la pectinase sur la fraction pectique F05-I	p. 155
2 - Isolement des produits de l'hydrolyse	p. 155
3 - Composition	p. 157
B.- Utilisation de l'endo-β(1,4)-xylanase "39" sur une fraction de xylanes	p. 157
1 - Etude de l'homogénéité de la fraction S01-A	p. 157
<i>a)- Chromatographie</i>	p. 157
<i>b)- Par précipitation au $BaCl_2$ (Taiz et Honigman, 1976)</i>	p. 159
2)- Hydrolyse par l'endoxylanase "39"	p. 159
III - RESULTATS ET DISCUSSIONS	p. 161
A.-Action de la pectinases "Serva" sur une fraction de polysaccharides pectiques	p. 161
1)- Les oligosaccharides produits par la "Pectinase Serva"	p. 162
<i>a)- Xylanes</i>	p. 162
<i>b)- Arabinogalactanes</i>	p. 167
2)- La fraction résistante à la "Pectinase Serva"(FR-P)	p.167
<i>a)- Composition</i>	p. 168
<i>b)- Caractérisation par spectroscopie ^{13}C-RMN</i>	p. 169
B.- Etude de la fraction xylanique (S01-A) : Mise en évidence de la relation structurale entre les polysaccharides pectiques et les xylanes	p. 172
1.- Purification de la fraction S01-A	p. 173
<i>a)- Par chromatographie CEM</i>	p. 173
<i>b)- Par précipitation au $BaCl_2$</i>	p. 176
<i>c)- Par chromatographie d'échange d'anions au Sphérosil LS DEA</i>	p. 176
2. - Action de l'endo-xylanase sur la fraction S01-A	p. 179
<i>a) - Etude de la fraction acide FH</i>	p. 179
<i>b) - Etude de la fraction neutre FN</i>	p. 183

<i>c) - Etude du précipité P₃</i>	p. 185
<i>α) - Analyse de l'action de l'enzyme</i>	p. 185
<i>β)- Caractérisation de la fraction résistante FR-X</i>	p. 185

IV - CONCLUSION	p. 192
------------------------	--------

CONCLUSION GENERALE	p. 195
-------------------------------	--------

BIBLIOGRAPHIE	p. 200
----------------------	--------

LISTE DES FIGURES

Figure 1	: Les deux voies de biosynthèse cellulosique et non cellulosique.	p. 5
Figure 2	: Modèle représentatif de la structure pariétale des cellules d'érable, proposé par Keegstra et al.(1973).	p. 7
Figure 3	: Modèle représentatif de la sécrétion racinaire de mucus.	p. 11
Figure 4	: Liste des principaux monosaccharides qui composent les polysaccharides végétaux selon les représentations de Haworth et Reeves.	p. 15
Figure 5	: Structure des oligosaccharides principaux des xyloglucanes.	p. 18
Figure 6	: Représentation structurale des Xylanes.	p. 20
Figure 7	: Structure développée des xylanes.	p. 21
Figure 8	: Structure des β -(1,4)Mannanes.	p. 24
Figure 9	: Structure d'une (Arabino)glucuronomannane : la gomme ghatti.	p. 25
Figure 10A	: Représentation structurale des pectines selon Jarvis (1984).	p. 28
Figure 10B	: Structure de la chaîne pectique principale avec les points de jonction des chaînes latérales.	p. 28
Figure 11	: Structure de deux heptasaccharides marqueurs du RG II.	p. 32
Figure 12	: Structure des arabinanes pectiques qui existent sous forme linéaire ou ramifiée.	p. 32
Figure 13	: Structure des arabinogalactanes.	p. 34
Figure 14A	: Structure proposée de la région glycosylée de l'extensine.	p. 36
Figure 14B	: Couplage oxydatif de deux tyrosines pour former le pont isodityrosine.	p. 36
Figure 14C	: Le réseau extensine-cellulose.	p. 36
Figure 15	: Mécanismes possibles des interconnexions covalentes organiques des polysaccharides végétaux.	p. 40
Figure 16	: Modèle représentatif des interconnexions des polysaccharides végétaux d'après Fry (1986).	p. 42
Figure 17	: Représentation schématique des associations interpolysaccharidiques possibles d'après les auteurs cités.	p. 43
Figure 18	: Structures de gomme (A) et de mucilages (B) de type acide.	p. 44
Figure 19	: Structure de gommes de type arabino-3,6-galactane.	p. 45
Figure 20	: Structure de type xylane complexe de mucilage de <i>Plantago ovata</i> Forsk.	p. 46
Figure 21	: Dégradation alcaline par le méthylsulphinyl carbanion sur le motif rhamnogalacturonane.	p. 55
Figure 22	: Présentation de la différence de mode d'ionisation en F.A.B.-M.S.	p. 57
Figure 23	: Spectres ^{13}C -RMN d'oligosaccharides portant des acides phénoliques isolés de parois cellulaires de bambou.	p. 60
Figure 24	: Représentation succincte des relations entre les étapes et les méthodologies de purification et de caractérisation des polysaccharides végétaux.	p. 67
Figure 25	: Protocole d'isolement des glucides extracellulaires du milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.	p. 69

Figure 26 : Protocole général d'analyse par CLG des fractions polysaccharidiques.	p. 74
Figure 27 : Protocole de purification par acidification des surnageants extracellulaires totaux du milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.	p. 76
Figure 28 : Protocole général d'analyse par CLG des surnageants.	p. 77
Figure 29 : Chromatogrammes d'analyses des acétates d'alditols des oses réducteurs (OR) ou des éventuels polyols liés (PL) contenu dans les précipités P1i, P1s et S1P6P3.	p. 83
Figure 30 : Chromatogrammes d'élution des polyols endogènes des surnageants $S_1S_6-S_H$ et $S_1P_6S_3-S_H$.	p. 88
Figure 31 : Chromatogrammes des préparations analytiques TMS des surnageants éthanoliques.	p. 89
Figure 32 : Chromatogrammes du surnageant $S_1S_6-S_H$ (D) deutérié analysé selon les préparations analytiques AAm, AAR et AAT.	p. 91
Figure 33 : Spectres de masse des composés G_1 , G_2 et G_3 obtenus par analyse CLG-SM en mode IE et IC de la préparation analytique AAm.	p. 92
Figure 34 : Spectres de masse des composés X_4 , X_6 et Fuc obtenus par analyse CLG-SM en mode IE et IC de la préparation analytique AAm de $S_1S_6-S_H$.	p. 93
Figure 35 : Protocole de fractionnement et de purification des exopolysaccharides solubles du milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.	p. 106
Figure 36 : Profils d'élution discontinue du surnageant S_1 par des concentrations croissantes de NaCl sur colonne de Séphadex DEAE/A50.	p. 111
Figure 37 : Profils d'élution discontinue du surnageant P_1 par des concentrations croissantes de NaCl sur colonne de Séphadex DEAE/A50.	p. 112
Figure 38 : Spectres ^{13}C -RMN de la fraction Snr-A.	p. 124-5
Figure 39 : Spectres ^{13}C -RMN de la fraction Snr-B.	p. 133-4
Figure 40 : Spectres ^{13}C -RMN de la fraction S01-B :	
A : Spectre total	p. 136
B : Détail des carbones anomériques C-1	p. 137
C : Spectre détaillé de la zone (60-90ppm).	p. 138
Figure 41 : Spectres ^{13}C -RMN de la fraction Pnr :	
A : Spectre total (10-190nm) avec en médaillon le détail de carbones anomériques C-1.	p. 141
B : Spectre détaillé de la zone (60-90 ppm).	p. 142
Figure 42 : Spectres ^{13}C -RMN de la fraction P01-B :	
A : Détail des carbones anomériques C-1	p. 145
B : Spectre total (10-200 ppm)	p. 145
C : Spectre détaillé de la zone (60-82,5 ppm).	p. 146
Figure 43 : Spectres ^{13}C -RMN de la fraction P03-B :	
A : Spectre total (10-200 ppm)	p. 149
B : Spectre détaillé de la zone (60-110 ppm).	p. 150
Figure 44 : Protocole d'étude des polysaccharides acides du surnageant S"1.	p. 156

Figure 45 : Protocole de purification de la fraction S01-A.	p. 158
Figure 46 : Protocole d'étude de l'hydrolyse de la fraction S01-A.	p. 160
Figure 47 : Profils d'élution du contenu du surnageant SII issu de l'hydrolyse de la fraction pectique F05-I par "la pectinase Serva".	
A : sur biogel P2 : F2-A et F2-B	p. 163
B : Analyse de la fraction F2-A sur Biogel P6 : F6-A et F6-B.	p. 163
Figure 48 : Chromatographie (CESM) sur Fractogel HW-40S	
A : de la fraction F2-A	p. 164
B : Etalonnage avec du dextran sulphaté 8000 (D8000), des oligogalacturonides de DP5 et DP4 et GalA.	p. 164
Figure 49 : Spectres ^{13}C -RMN de la fraction FR-P.	p. 170
Figure 50 : Profils d'élution de la fraction S01-A sur Séphacryl S200 (130 x 2,0 cm) équilibrée avec différents tampons:	p. 174
Figure 51 : Profil d'élution de la fraction S200-B sur Sphérosil <i>LS DEA (II)</i> .	p. 178
Figure 52 : Chromatogrammes des fractions d'oligosaccharides acides (FH et FH-A) issues de l'hydrolyse de S01-A.	p. 181
Figure 53 : Chromatogrammes des fractions neutres issues de l'hydrolyse de S01-A.	p. 184
Figure 54 : Détermination des oses réducteurs de la fraction FR-X.	p. 186
Figure 55 : Spectres ^{13}C -RMN de la fraction résistante FR-X	
A : Spectre total de 0 à 200 ppm.	p. 189
B : Région des carbones anomériques.	p. 190
C : Région des autres carbones.	p. 191

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	: Répartition du degré d'acétylation du motif nonasaccharide de la xyloglucane extracellulaire d'érable.	p. 19.
Tableau II	: Liste des structures totales et partielles des oligoglycosylalditols caractérisés provenant des chaînes latérales du rhamnogalacturonane I.	p. 31
Tableau III	: Liste des références RMN.	p. 58
Tableau IV	: Attribution des signaux des spectres obtenus en ^{13}C -RMN.	p. 59
Tableau V	: Caractéristiques des fractions isolées.	p. 78
Tableau VI	: Teneurs pondérales des monosaccharides mesurées par CLG et corrigées par leurs absorbances relatives au phénol-sulfurique à 480 nm par rapport au galactose.	p. 80
Tableau VII	: Compositions pondérales obtenues par dosages colorimétriques et par CLG, des trois fractions P_{1i} , P_{1s} et $\text{S}_1\text{P}_6\text{P}_3$.	p. 81
Tableau VIII	: Compositions en oses totaux (OT) et en oses réducteurs (OR) ou polyols liés des fractions glucidiques précipités P_{1i} , P_{1s} et $\text{S}_1\text{P}_6\text{P}_3$.	p. 84
Tableau IX	: Composition pondérale en inositols endogènes des surnageants glucidiques.	p. 87
Tableau X	: Composition pondérale de la fraction $\text{S}_1\text{S}_6\text{-S}_H$ en polyols et monosaccharides, calculée à partir de l'analyse des dérivés peracétylés correspondants.	p. 96
Tableau XI	: Composition pondérale des surnageants acides déterminée par triméthylsilylation.	p. 100
Tableau XII	: Répartition pondérale des glucides et des protéines des fractions principales S''_1 et P''_1 .	p. 110
Tableau XIII	: Composition glucidique et répartition pondérale des fractions S''_1 et P''_1 sur Séphadex DEAE A50.	p. 114
Tableau XIV	: Composition en monosaccharides des fractions S''_1 et P''_1 sur Séphadex DEAE A50.	p. 115
Tableau XV :	Temps de rétention relatif des dérivés AAPM deutériés analysés sur colonne CP-SIL 5CB.	p. 118
Tableau XVI	: Composition centésimale des dérivés AAPM de certaines fractions polysaccharidiques caractéristiques: Identification du type de substitution des oses constitutifs.	p. 119
Tableau XVII	: Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction Snr-A .	p. 123
Tableau XVIII	: Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction Snr-B .	p. 132
Tableau XIX	: Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction S01-B .	p. 139

Tableau XX	: Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction Pnr.	p. 140
Tableau XXI	: Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction P01-B.	p. 144
Tableau XXII	: Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction P03-B.	p. 148
Tableau XXIII	: Composition en monosaccharides des fractions chromatographiques SII et PII.	p. 165
Tableau XXIV	: Composition molaire des liaisons glycosidiques de la fraction FR-P.	p. 165
Tableau XXV	: Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction FR-P.	p. 171
Tableau XXVI	: Composition en monosaccharides des fractions chromatographiques issues de la S200, des LS-DEA (I) et (II), lors de l'étude de la fraction S01-A.	p. 175
Tableau XXVII	: Composition en monosaccharides du surnageant SBa et du précipité PBa, obtenus par précipitation au BaCl_2 de S01-A.	p. 175
Tableau XXVIII	: Composition en monosaccharides du surnageant S3, du précipité P3 et de FR-X obtenus par hydrolyse enzymatique de S01-A.	p. 180
Tableau XIX	: Composition en monosaccharides des fractions d'oligosaccharides neutres (FN et FN-A) et acides (FH-A et AX-1).	p. 180
Tableau XXX	: Composition centésimale des dérivés acétates d'alditol partiellement méthylés (AAPM) des fractions FR-X et FH-A.	p. 182
Tableau XXXI	: Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction FR-X.	p. 192

ABREVIATIONS

* - AA :	Acétates d'alditol
* - Ac ₂ O :	Anhydride acétique
* - AcOH :	Acide acétique
* - AcONa :	Acétate de sodium
* - ATFA :	Acide trifluoroacétique
* - AU:	Acides uroniques
* - BSTFA :	(N,O-Bis-Triméthylsilyl)-trifluoroacétamides) à 1% de TMCS (Triméthylchloro-silane) : Réactif de triméthylsilylation (Pierce): Réactif TMS
* - C3, C4, ..., :	molécules constituées par 3, 4, ..., atomes de carbone
* - C-1, C-2, ..., :	désignent la position conventionnelle de l'atome de carbone dans la structure d'une molécule carbonée. Elles sont beaucoup utilisées dans l'interprétation des analyses par RMN
* - CESM :	Chromatographie d'exclusion stérique de masse ; CLG :
	Chromatographie liquide gaz
* - CLG-SM / IC :	Analyse par couplage du CLG et du SM en mode IC
* - CLG-SM / IE :	idem en mode IE
* - CLHP :	Chromatographie liquide à haute performance ou pression
* - ¹³ C-RMN :	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du ¹³ C
* - DEAE :	Diéthylaminoéthyle ; DEA: Diéthylamine
* - DMSO :	Diméthylsulfoxyde
* - DP :	Degré de polymérisation
* - EtOH :	Ethanol
* - EPS :	Exopolysaccharides
* - IE :	Impact électronique ; IC: Ionisation chimique
* - MeOH :	Méthanol
* - Me ₄ Si :	Tétraméthylsilane

- * - **m-HDP** : *meta*-Hydroxydiphényl
- * - **ND** : Non déterminé (l'analyse correspondante n'a pas été effectuée)
- * - **nd** : non décelé (le composé n'est pas mesurable par l'analyse réalisée)
- * - **NI** : Non identifié (composé décelé mais inconnu)
- * - **O-1, O-2, ..., :** localisation de la position conventionnelle de l'atome d'oxygène dans la structure d'une molécule carbonée porteuse de groupes hydroxyles, comme les polyols et les glucides. Elles sont rencontrées lors de l'interprétation des dérivés ethers méthyliques et de la localisation de la substitution
- * - **ON** : Oses neutres
- * - **Osés et Polyols** : Les monosaccharides et des polyols correspondants sont respectivement désignés par un chiffre et le même avec un apostrophe ; par exemple 1 et 1' pour le rhamnose et le rhamnitol :
 - Rhamnose (Rha), 1 / 1' ; Ribose (Rib), 2 / 2' ; Fucose (Fuc), 3 / 3' ; Arabinose (Ara), 4 / 4' ; Xylose (Xyl), 5 / 5' ; Mannose (Man), 6 / 6' ; Glucose (Glc), 7 / 7' ; Galactose (Gal), 8 / 8' ; Acide galacturonique (GalA), 9 / ; Acide glucuronique (GlcA), 10 ; N-Acétyl-glucosamine (GlcNAc), 11 ; 4-O-Methyl-GlcA (4-OMeGlcA), 12.
- * - **Dans les préparation analytiques pour CLG** :
 - **AAm** : Acétates d'alditols des monosaccharides (**m**)
 - **AApl** : Acétates d'alditols des Polyols libres (**pl**)
 - **AApT** : Acétates d'alditols des Polyols totaux permettant l'obtention des Polyolsliés (**pL**)
 - **AAR** : Acétates d'alditols des Osés réducteurs (**OR**)
 - **AAT** : Acétates d'alditols des Osés totaux (**OT**) permettant l'obtention des Osés liés (**OL**)
- * - **PSP** : Polysaccharides pariétaux
- * - **SM** : Spectrométrie de masse
- * - **TMS** : Dérivés triméthylsilylés
- * - **Tosyle** : p-toluènesulfonyl
- * - **UHQ** : Qualité de l'eau obtenue par traitement de l'eau distillée sur l'appareil Elagast UHQ

PUBLICATIONS - COMMUNICATIONS

- *- SOLO KWAN J. and MORVAN H., 1991.- Extracellular branched xylans and acidic arabinogalactans from suspension cultured cells of white campion, *Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause. **Food Hydrocoll.**, **5** (1/2): 163-166.
- *- PRIEM B., SOLO KWAN J., WIERUSZESKI J.-M., STRECKER G., NAZIH H., and MORVAN H., 1990.- Isolation and characterization of free glycans of the oligomannoside type from the extracellular medium of a plant cell suspension. **Glycoconjugate J.**, **7**: 121-132.
- *- MORVAN H., PRIEM B., VERDUS M.-C., SOLO KWAN J., and MORVAN C., 1987.- Relations between the acidity of the pectic acid polymers from suspension cultured cells of white campion and the promoting effects of the growth. **Food Hydrocoll.**, **1**: 501-503.
- *- SOLO KWAN J. and MORVAN H., 1992. - Structural relationship between hemicellulose and pectic polysaccharides from medium of *Silene alba* suspension-cultured cells. Evidence of arabinogalactan II-bearing xylans. In : **Sixth Cell Wall Meeting**, August 25-28, Nijmegen, the Netherlands. Sassen M.M.A., Derksen J.W.M., Emons A.M.C. and Wolters-Arts (Eds) ; University Press, Nijmegen. **Book of Abstracts p.45.** (Affichage)
- *- LUPESCU N., SOLO KWAN J., CHRISTIAEN D., MORVAN H., GERESH S., and SHOSHANA (M.) A., 1990.- Glycosyl-sequence determination by means of glc-ms of oligosaccharides derived from *Porphyridium sp.* polysaccharides. In: The 5th International conference of the society of applied algology- **Recent advances in algal biotechnology: Jan 28-Feb 2 1990, Tiberias-Israel.** (Affichage).
- *- **XVII Forum de jeunes chercheurs**, Biochimie et Biologie moléculaire. Villeneuve d'Ascq, 3-6 juillet 1990. (Affichage).
- *- **3rd International workshop on plant polysaccharides - Structure and Function.** 19-21 September 1990, Le Croisic-France. (Affichage).

ABBREVIATIONS

* - AA :	Acétates d'alditol
* - Ac ₂ O :	Anhydride acétique
* - AcOH :	Acide acétique
* - AcONa :	Acétate de sodium
* - ATFA :	Acide trifluoroacétique
* - AU :	Acides uroniques
* - BSTFA :	(N,O-Bis-Triméthylsilyl)-trifluoroacétamides) à 1% de TMCS (Triméthylchloro-silane) : Réactif de triméthylsilylation (Pierce): Réactif TMS
* - C ₃ , C ₄ , ..., :	molécules constituées par 3, 4, ..., atomes de carbone
* - C-1, C-2, ..., :	désignent la position conventionnelle de l'atome de carbone dans la structure d'une molécule carbonée. Elles sont beaucoup utilisées dans l'interprétation des analyses par RMN
* - CESM :	Chromatographie d'exclusion stérique de masse ; CLG :
	Chromatographie liquide gaz
* - CLG-SM/IC :	Analyse par couplage du CLG et du SM en mode IC
* - CLG-SM/IE :	idem en mode IE
* - CLHP :	Chromatographie liquide à haute performance ou pression
* - ¹³ C-RMN :	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du ¹³ C
* - DEAE :	Diéthylaminoéthyle ; DEA: Diéthylamine
* - DMSO :	Diméthylsulfoxyde
* - DP :	Degré de polymérisation
* - EtOH :	Ethanol
* - EPS :	Exopolysaccharides
* - IE :	Impact électronique ; IC: Ionisation chimique
* - MeOH :	Méthanol
* - Me ₄ Si :	Tétraméthylsilane

Résumé

La suspension cellulaire de *Silène libère* dans le milieu de culture des composés glucidiques parmi lesquels des polysaccharides pariétaux. Pour étudier les molécules à l'état natif, celles-ci ont été séparées par des précipitations éthanoliques successives. Le contenu glucidique du milieu a été défini en s'appuyant sur la nature des oses réducteurs et sur la composition globale des fractions : - des fragments pariétaux, - des polymères solubles (glucanes, xylanes, mannanes, arabinogalactanes II, homo- et rhamnogalacturonanes, ...), - des oligosaccharides et des monosaccharides. Des N-glycannes, des polyols majoritairement liés, ainsi que des monosaccharides conjugués, ont également été décelés. Dans un deuxième temps, l'étude structurale de certains polysaccharides solubles a été réalisée par méthylation et par ^{13}C -RMN. Elle aboutit à la caractérisation de fragments comme les galacto(gluco)mannanes, les xylanes, les arabinogalactanes pectiques et protéiques. Une troisième étape a consisté à dégrader les fractions intermédiaires par voie enzymatique (pectinase et endoxylanase). L'analyse des oligosaccharides et des fractions résistantes a permis de préciser le mode de substitution des xylanes par des arabinogalactanes II. Les résultats permettent d'amorcer une discussion concernant l'origine de ces glucides extracellulaires, caractéristiques du milieu de culture d'une suspension cellulaire parvenue à la fin de son cycle.

INTRODUCTION

Les polysaccharides extracellulaires des suspensions cellulaires végétales ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche concernant leur identité structurale. Il en résulte que la nature et la composition de ces polymères sont en étroite relation avec celles des constituants polysaccharidiques des parois cellulaires végétales. L'hypothèse la plus fréquemment admise consiste à considérer que les polysaccharides extracellulaires sont d'origine pariétale. Ils proviendraient du turn-over des polysaccharides pariétaux aux cours de la croissance cellulaire, bien que les mécanismes fondamentaux mis en jeu soient peu ou mal connus. A ce titre, le terme de "polysaccharides extracellulaires" désigne aussi bien les polymères excrétés par les suspensions cellulaires que les exsudats racinaires ou les mucilages. De telles molécules représentent des produits d'un intérêt économique certain dans les domaines de l'agro-alimentaire et de la médecine, à cause de leurs propriétés physico-chimiques (épaississante, gélifiante, diététique) et biologiques (anti-tumorale, immunologique).

L'étude présentée concerne uniquement les polysaccharides extracellulaires de la suspension cellulaire de Silène. La connaissance de leur structure fournira des renseignements sur leur origine et leur évolution intra-pariétales. Il convient cependant de préciser que l'analyse entreprise est basée sur une classification et une nomenclature admises jusqu'à présent, à savoir que les trois grandes catégories de constituants polysaccharidiques pariétaux sont la cellulose, les pectines et les hémicelluloses. Cette répartition dépend à la fois des procédés d'extraction utilisés, de la composition globale en monosaccharides et des liaisons glycosidiques

Ce travail s'inscrit dans le cadre du programme général de notre équipe qui porte sur la connaissance et la compréhension de la structure et du métabolisme pariétal des polysaccharides végétaux. Il concerne la caractérisation biochimique des polysaccharides "natifs" libérés dans le milieu de culture et tente d'en dégager des arguments concernant les relations probables entre les diverses classes de polysaccharides. L'idée initiale a été d'aborder l'étude par une stratégie expérimentale originale articulée en deux étapes :

1)- L'isolement et la purification des polysaccharides natifs à l'aide des méthodes douces de séparation (précipitation sélective, techniques chromatographiques). Cette approche a l'intérêt de mieux conserver l'intégrité des macromolécules, à la différence des méthodes chimiques et enzymatiques qui sont pourtant nécessaires. Par la suite, elle permet de déceler des fractions "intermédiaires".

2)- La détermination des liaisons intramoléculaires et leur distinction par rapport aux relations intermoléculaires. Une telle approche nécessite la confirmation préalable de la régularité ou/et de l'homogénéité structurale des fractions "intermédiaires" par l'utilisation de méthodes appropriées (dégradations enzymatiques). Enfin, il faut démontrer l'existence d'associations par la présence de liaisons covalentes spécifiques.

Après avoir fait l'inventaire des composés glucidiques présents dans le milieu de culture de la suspension cellulaire, à la fin d'un cycle de culture de 14 jours, la stratégie d'étude qui vient d'être présentée sera exercée sur deux fractions prépondérantes appartenant aux deux grandes familles de polysaccharides matriciels: pectines et hémicelluloses. Finalement, les données recueillies permettront de discuter de la notion initialement présentée par Albersheim (1965) : "la paroi, une macromolécule gigantesque ou mégamolécule".



Silene alba

G E N E R A L I T E S

La cellule est définie comme l'entité fondamentale, morphologique et fonctionnelle de tous les organismes vivants. Les rapports qu'elle entretient avec le milieu environnant et avec d'autres cellules se traduisent par des échanges de substances dissoutes et par des contacts intercellulaires.

Depuis un demi-siècle, on s'intéresse aux cultures "in vitro" de cellules et de tissus végétaux pour deux raisons principales:

- D'une part, l'optimisation de la production de constituants végétaux (métabolites actifs, aliments, fibres, énergie) d'intérêts industriels (Misawa, 1980) et biotechnologiques (Barz et al., 1977).
- D'autre part, la compréhension et la connaissance des phénomènes qui régissent les relations intercellulaires (Albersheim et al., 1984 et Fry, 1988).

La culture "in vitro" des cellules ou des tissus est une technique qui présente certains avantages expérimentaux par rapport aux plantes entières et à leurs organes. Elle permet le contrôle des conditions de culture (les nutriments, la lumière et la température) et de l'asepsie (diminution du risque de contamination).

Toutefois, de tels modèles perdent partiellement leur pouvoir de différenciation et deviennent relativement uniformes. Dans des conditions données, le maintien de la totipotentialité des cultures permet la multiplication clonale des végétaux (Reynolds et Murashige, 1979). On obtient ainsi une simplification des systèmes biologiques qui est une étape nécessaire pour parvenir à la modélisation des structures et des fonctions étudiées sur un matériel biologique homogène. Malgré la diversité initiale des formes d'organisation, caractéristique qui rend impossible l'étude d'une seule cellule végétale type, l'utilisation de cellules de métaphytes cultivées "in vitro" est complémentaire des démarches entreprises sur des organismes unicellulaires (protophytes) pour en définir les caractères fondamentaux. Ainsi, les aspects du métabolisme cellulaire les plus étudiés concernent la nutrition (Dougall, 1980), notamment les mécanismes d'absorption des ions (Grignon, 1974 ; Pennarum, 1980 ; Thoiron, 1984) dans le but de définir des modèles fonctionnels des échanges cellulaires. De ce point de vue, plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'élucidation structurale et à l'étude physico-chimique des polysaccharides extracellulaires et pariétaux des suspensions cellulaires végétales (Bauer et

al., 1973 ; Burke et al., 1974).

Les travaux cités concernent principalement l'étude de la paroi primaire et les polysaccharides extracellulaires (PSE) des suspensions cellulaires. En second lieu, l'intérêt est porté aux polysaccharides constituant les parois primaires des tissus et des organes jeunes (tiges, feuilles, racines) des plantes, et à ceux contenus dans les mucilages et les exsudats végétaux. Ces dernières substances sont considérées comme des polysaccharides extracellulaires, appelés aussi exopolysaccharides.

I - LES SUSPENSIONS CELLULAIRES ET LEURS EXCRETIONS

A.- Comparaison entre les polysaccharides extracellulaires et pariétaux

L'étude des constituants polysaccharidiques des parois a été réalisée sur des cellules cultivées "in vitro". En effet, les cellules indifférenciées, cultivées en suspension fournissent une source de parois primaires homogènes. Cette homogénéité permet d'éviter les artefacts attribuables aux divers types cellulaires présents dans une plante entière (Mc Neil et al., 1979).

La paroi primaire est la structure qui se met en place immédiatement après la mitose, en se déposant de part et d'autre de la plaque cellulaire qui devient ainsi la lamelle moyenne. La lamelle moyenne assure la cohésion des cellules-filles durant la restructuration de leurs parois. Sa composition indique une forte teneur en polysaccharides pectiques. La paroi primaire se construit par le dépôt de matériels polysaccharidiques provenant de deux sources (Fig. 1):

- La cellulose, synthétisée au niveau du plasmalemme nouvellement formé par la fusion des membranes des vésicules golgiennes (Delmer, 1987 ; Hayashi, 1989).
- les polysaccharides non cellulotiques contenus dans ces vésicules formeront la matrice pariétale. D'autres composés non glucidiques (protéiques, lipidiques, aromatiques, minéraux, ...) sont libérés de la même façon à la frontière entre les deux cellules-filles (Fincher et al., 1981; Willison, 1981 ; Hayashi, 1989).

L'eau, qui représente 65% de la masse de la paroi primaire en croissance, est un composé structural important puisqu'il contribue à la formation des gels dans la matrice (Northcote, 1972 ; Fry, 1988). La paroi primaire dispose ainsi de la plasticité nécessaire pour permettre la déformation occasionnée par l'augmentation de volume cellulaire, lors de la croissance. Le maintien de l'épaisseur de la paroi primaire au cours du développement cellulaire est le résultat de la synthèse de nouveaux polysaccharides qui s'incorporent continuellement au sein de la

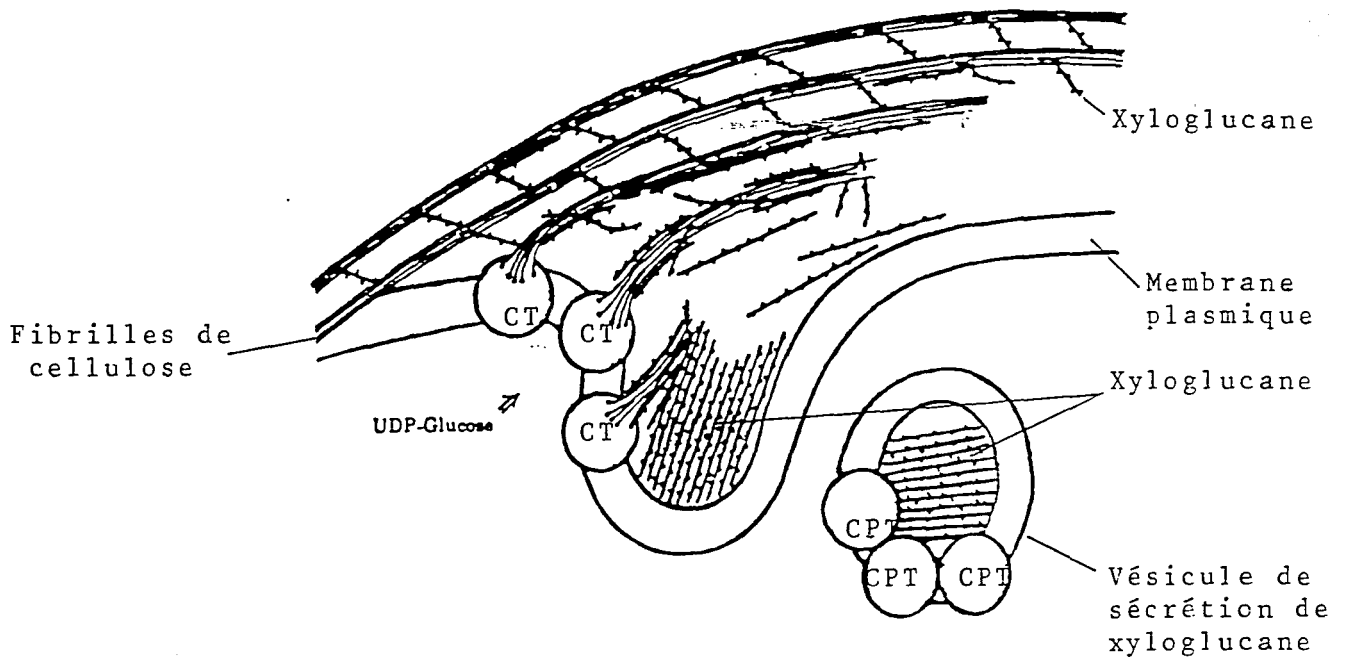


Figure 1 : Les deux voies de biosynthèse cellulosique et non cellulosique.

Modèle d'exocytose des xyloglucanes et de leur organisation intermoléculaire avec la cellulose.

Stade du transfert vers les sites périplasmiques de la xyloglucane, synthétisé dans le Golgi.

La cellulose synthase (complexe terminal) catalyse la synthèse de la cellulose et l'association de la cellulose avec la xyloglucane excrétée.

CT : complexe terminal

CPT : complexe pré-terminal.

paroi. Cependant, il n'y a pas de nécessité évidente pour que la taille moyenne des polymères pariétaux changent de façon significative durant le développement cellulaire (Mc Neil et al., 1984).

Les parois cellulaires primaires des végétaux supérieurs semblent être composées de polysaccharides communs à beaucoup d'espèces végétales (Mc Neil et al., 1984 ; Selvendran, 1985), bien qu'il y ait des différences significatives entre les monocotylédones et les dicotylédones (Burke et al., 1974 ; Bacic et al., 1988). Mc Neil et al. (1979) ont résumé les arguments favorables à la similitude entre les parois primaires de différentes cellules de dicotylédones, cultivées en suspension. Ces données indiquent également la ressemblance entre les parois primaires des tissus végétaux intacts et celles des suspensions cellulaires. Ainsi, il est possible d'élaborer un modèle général de la paroi primaire, en l'absence d'information structurale précise sur chaque catégorie de cellule. Le modèle auquel on se réfère souvent est celui de la paroi primaire des cellules d'érable cultivées en suspension, proposé par Keegstra et al. (1973) (Fig. 2). Des réserves sont émises par ses auteurs, suite aux travaux de Bailey et ses collaborateurs concernant l'association entre polysaccharides et les protéines (Dey et Brinson, 1984).

Ces auteurs mentionnent cependant les difficultés de comparaison avec les autres données de la littérature, en raison de la grande variété des procédés de préparation de paroi et d'extraction des polysaccharides pariétaux (milieux acides ou alcalins pouvant provoquer l'hydrolyse ou la β -élimination de certains résidus glycosylés).

Cependant, des distinctions peuvent exister entre les organes et les différents tissus individualisés d'une même plante. Récemment, Suzuki et al. (1990) illustrent la différence morphologique de deux lignées de suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* par celle de leur composition pariétale. Ces différences entre les formes cellulaires sphériques et cylindriques seraient en relation avec les variations du type de liaison et de la nature des résidus glycosyles des polysaccharides pariétaux (1→4-galactanes, 1→2/5-arabinanes ou 1→3/5-arabinanes).

Outre l'intérêt des suspensions cellulaires comme source principale de parois primaires homogènes, pour extraire et isoler des polysaccharides pariétaux, elles contiennent des polysaccharides excrétés dans leur milieu de culture. Ces derniers, appelés exopolysaccharides, sont considérés par plusieurs auteurs comme similaires à ceux trouvés dans la paroi primaire des cellules qui les sécrètent (Yamaoka et Sato, 1977 ; Chambat et al., 1981 ; Stevenson et al., 1986).

Parmi ces polysaccharides communs, sont cités les xyloglucanes, les arabinoxylanes, les arabinogalactanes et les polysaccharides riches en acide galacturonique.

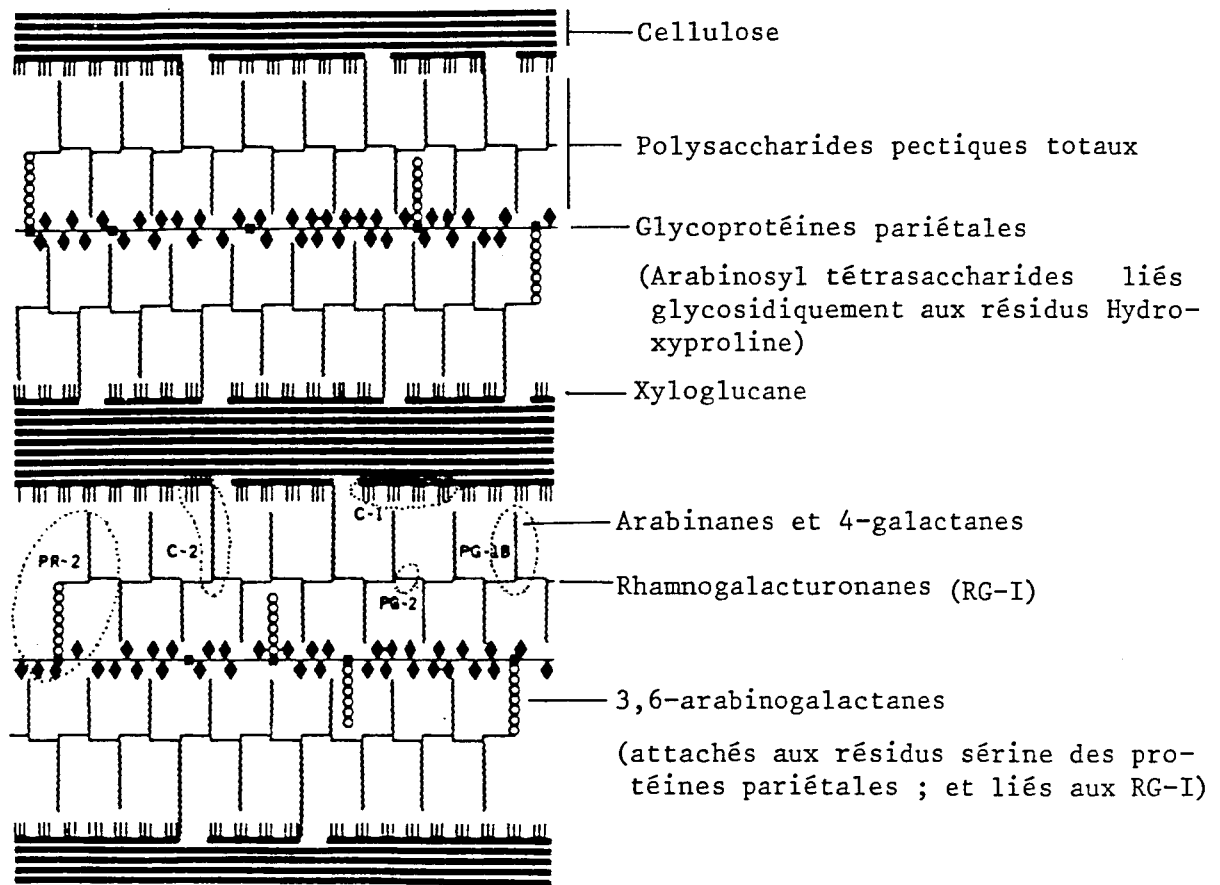


Figure 2 : Modèle représentatif de la structure pariétale des cellules d'érable, proposé par Keegstra et al. (1973).

Zones cerclées: C-1 et C-2, fractions libérées par l'action d'une endoglucanase
PG-1B et PG-2, fractions obtenues avec l'endopolygalacturonase.
PR-2, fraction libérée par la pronase.

D'autres exopolysaccharides sont similaires ou identiques aux polymères trouvés dans les parois primaires d'érable, incluant la glucuronoarabinoxylane, la rhamnogalacturonane II et probablement la rhamnogalacturonane I. Ainsi la découverte de ces derniers polysaccharides parmi les exopolysaccharides de la suspension cellulaire d'érable suggère l'importance des EPS des suspensions cellulaires pour confirmer la structure des polysaccharides non cellulotiques identifiés comme provenant des parois primaires (Mc Neil et al., 1984). De même, des travaux effectués sur la suspension cellulaire de tabac mentionnent l'existence de polymères tels que les homogalacturonanes (Yamaoka et Sato, 1977) et l'arabinoglucuronomannane (Kato et al., 1977 ; Mori et Kato, 1981) parmi les exopolysaccharides. Il reste à démontrer la présence de l'arabinoglucuronomannane dans les parois primaires des cellules de tabac et peut-être dans celles d'autres plantes.

Kooima (1960) a montré la présence de xyloglucanes dans les parois cellulaires des dicotylédones et de l'endosperme d'une grande variété de graines. La caractérisation structurale de ces polysaccharides extracellulaires aide l'étude des polysaccharides trouvés dans la paroi primaire (Keegstra et al., 1973). Des comparaisons entre la xyloglucane extracellulaire de la suspension cellulaire d'érable (*Acer pseudoplatanus*), celle d'une suspension cellulaire de haricot rouge (*Phaseolus vulgaris*) et l'"amyloïde" des graines (Wilder et Albersheim, 1973), montrent la ressemblance entre ces xyloglucanes, évoquant ainsi la conservation relative de la structure de la xyloglucane durant la divergence de l'évolution de l'érable et de l'haricot.

Par ailleurs, beaucoup de caractéristiques chimiques de la paroi cellulaire d'érable ont été trouvées dans les parois d'autres plantes. C'est le cas de certaines protéines riches en hydroxyproline et en oligoarabinosides, qui sont largement répandues dans le règne végétal (Lamport, 1970 ; Lamport et Miller, 1971).

Pour confirmer ces données, l'étude "in situ" de la topologie de la paroi s'avère nécessaire. La cytologie, particulièrement avec la microscopie électronique, et ses diverses méthodes de marquage constituent les moyens appropriés. Ce type de démarche a été entrepris principalement sur la xyloglucane, les xylanes et les polysaccharides pectiques en utilisant des enzymes spécifiques pures et des antisérums ou des anticorps monoclonaux dirigés contre les polymères étudiés. Ainsi, les xyloglucanes seraient réparties dans la paroi entière, y compris la lamelle moyenne (Moore et al. 1986), alors que les xylanes seraient absentes de la lamelle moyenne et des méats (Ruel et Joseleau 1984).

Récemment, l'étude de la distribution de la pectine estérifiée dans la paroi cellulaire d'apex racinaires (Knox et al., 1990) a été faite en utilisant des anticorps monoclonaux (JIM5 et JIM7) préparés à partir d'une suspension cellulaire de carotte (Knox et al. 1989, Vandenbosch et al. 1989, Bonfante-Fasolo et al., 1990). Ces anticorps reconnaissent respectivement les épitopes de

l'acide polygalacturonique de faible degré d'estérification ($DE \leq 50 \%$; LMP = Low MethoxyPectin) et du même polymère fortement méthyl-estérifié ($DE \geq 35 \%$; HMP = High Methoxypectin). Une telle approche immunocytochimique (associée au marquage à l'or en microscopie électronique) démontre la répartition des LMP (JIM5) au niveau de l'espace périplasmique, faiblement dans la lamelle moyenne et abondamment sur les bordures des espaces intercellulaires. Tandis que les HMP sont dispersés sur toute l'étendue de la paroi cellulaire.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus avec les cellules d'érable (Moore et al., 1986), et dans les feuilles et racines de trèfle (Moore et Staehelin, 1988) en utilisant un antisérum qui révèle à la fois le RGI et l'acide polygalacturonique dans la lamelle moyenne et dans les espaces intercellulaires. Par contre, ils sont en contradiction avec les résultats obtenus précédemment par des méthodes chimiques (Albersheim et al., 1960) et enzymatiques (Roland et Vian, 1981), associées à la microscopie électronique. En effet, la pectine fortement estérifiée (HMP) serait dans la lamelle moyenne et les espaces intercellulaires.

Vu ces données, la similitude des exopolysaccharides et des polysaccharides de la paroi cellulaire peut être admise, d'autant qu'ils ont la même origine biosynthétique endomembranaire.

B.- Signification physiologique des excréations

L'origine des exopolysaccharides demeure soumise à controverse : les EPS excrétés par les cellules végétales cultivées en suspension sont considérés comme étant, soient des fragments de dégradation de la paroi cellulaire (origine pariétale), soient des précurseurs surnuméraires de cette paroi (Becker et al., 1964 ; Wilder et Albersheim, 1973).

La plupart des auteurs (Franz, 1972 ; Mante et Boll, 1975 ; Takeuchi et Komamine, 1978, 1980a et 1980b, Nishitani et Masuda, 1979 ; Willison, 1981 ; McDougall et Fry, 1991) ont mis en évidence un renouvellement permanent de la fraction hémicellulosique de la paroi, lié à l'élongation cellulaire. McDougall et Fry (1991) démontrent que les octasaccharides de xyloglucane (XG9 et XG9 acétylés) proviennent de l'hydrolyse post-synthétique d'un polysaccharide extracellulaire plutôt qu'une synthèse *de novo* des oligomères. Ils relient ces données au "concept d'oligosaccharine" dont le principe repose sur le rôle de fragments solubles, issus de l'autolyse pariétale, comme signaux de transfert d'information de l'apoplaste vers le symplaste. Chez la suspension cellulaire du Silène, la libération des EPS acides est également dépendante du l'agrandissement cellulaire puisqu'ils ne se détachent de la paroi que lorsque les

cellules sont effectivement en cours d'élongation (Morvan, 1982).

Les sites cytoplasmiques de la biosynthèse des polysaccharides (PS) de la paroi cellulaire ont été le sujet de recherches dans les 25 dernières années et la preuve de l'implication des organites, tels que les dictyosomes, a été revue à plusieurs occasions (O'Brien, 1972 ; Morre et al., 1979 ; Thelen et Delmer, 1986 ; Hayashi, 1989a-b). Bien que toutes les approches cytologique, autoradiographique et biochimique aient des limites, prises ensemble, elles fournissent des arguments significatifs sur les événements cytoplasmiques de l'assemblage des polysaccharides non cellulotiques (Fincher et al., 1981).

La fusion des vésicules endomembranaires au plasmalemme est un processus dépendant du calcium (Morris et Northcote, 1977). La relation entre l'activité de l'appareil de Golgi et le dépôt de matériel pariétal nouveau dans la paroi cellulaire a été montrée (Fincher et al., 1981 ; Rougier, 1981 ; Willison, 1981 ; Hayashi, 1989a-b). On a alors admis que la synthèse des polysaccharides non cellulotiques, sauf la callose, se fait dans le cytoplasme, à la manière de la sécrétion racinaire (Fig. 3). Ils sont synthétisés au cours de leur transport par le flux membranaire et ensuite libérés par exocytose dans l'espace périplasmique où ils seront incorporés (ou non) dans la matrice pariétale (Morre et Mollenhauer, 1974 ; Fincher et al., 1981 ; Rougier, 1981 ; Willison, 1981 ; Fry, 1988).

C'est cette dernière étape qui demeure la plus sujette à discussion car il est difficile de faire la différence, parmi les exopolysaccharides, entre les précurseurs pariétaux et les polysaccharides issus de la paroi.

A ce propos, Becker et al. (1964) ont étudié la synthèse de polysaccharides extracellulaires (PSE) contenant de l'acide galacturonique à partir de précurseurs radioactifs (glucose- ^{14}C ; formaldéhyde- ^{14}C). En utilisant les techniques de "pulse-chasse", ils supposent que l'excès d'activité spécifique des résidus Gal(^{14}C) dans les PSE serait dû à la présence de précurseurs pariétaux surnuméraires. La baisse de l'activité spécifique totale au cours du temps, peut indiquer que la synthèse est continue sans ou avec dégradation corrélative. Le concept de "turnover" impliquant une synthèse et une dégradation continues, reste à valider (Fincher et al., 1981). Des polysaccharides non cellulotiques composés d'acides galacturoniques, rhamnose, xylose, et glucose ne sont pas dégradés après leur dépôt dans la paroi. Tandis que des résidus arabinosyles et galactosyles marqués, considérés comme issus d'une arabino-3,6-galactane (Takeuchi et Komamine, 1978), sont perdus durant l'étape de "chasse" sur des préparations pariétales.

Parallèlement, le passage de polysaccharides à travers la paroi correspondrait à une dégradation progressive de la paroi par des enzymes hydrolytiques, comme c'est le cas lors de la

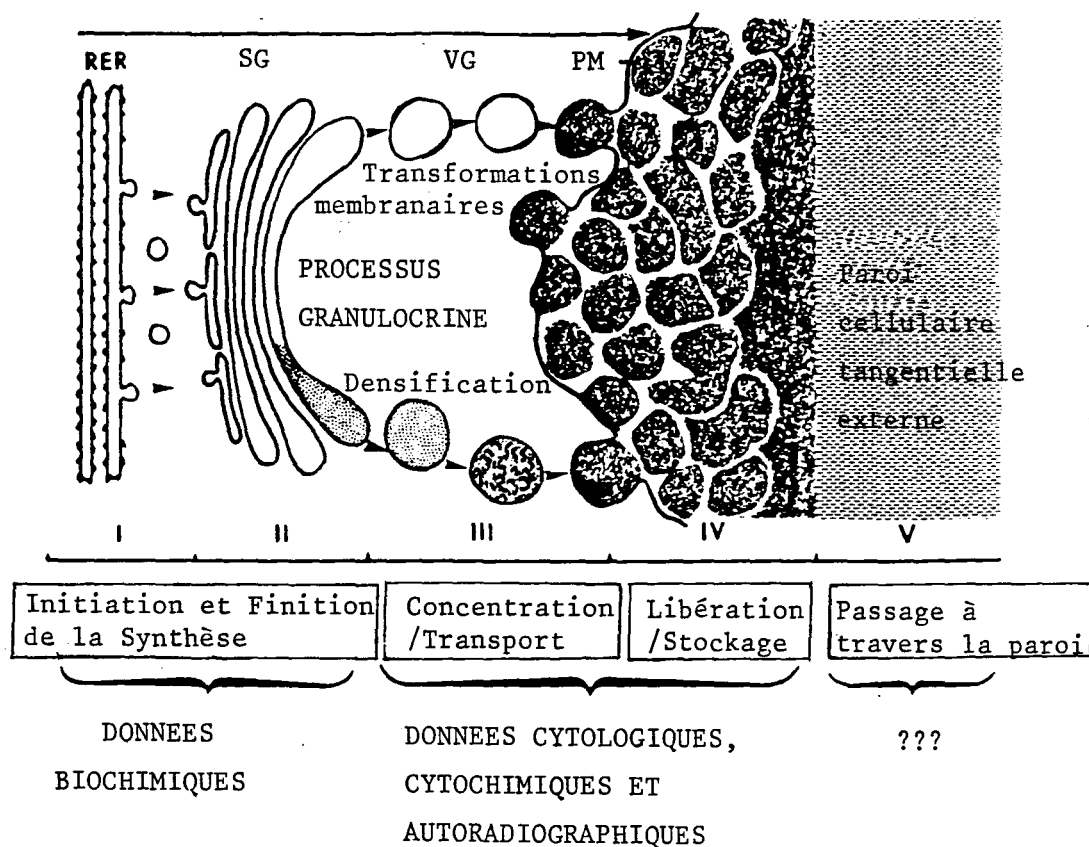


Figure 3: Modèle représentatif de la sécrétion racinaire de mucus:

Ce modèle général indique l'intervention du réticulum endoplasmique rugueux (RER) et des sacculaires de Golgi (SG) dans la synthèse du mucus. Il illustre le transport des précurseurs dans les processus granulocrine qui se présente par des modifications membranaires (dans le système du pois) et par la densification des contenus (dans le système du maïs). Le mucus est stocké préférentiellement contre la paroi cellulaire tangentielle externe. Le passage des produits de sécrétion à travers la paroi serait facilité par la dégradation progressive de celle-ci (Autolyse pariétale). D'après Rougier (1981).

sécrétion racinaire (Paul et Jones, 1976 ; Rougier, 1981). Ces faits sont interprétés comme une dégradation hydrolytique et une perte d'arabinogalactanes pariétales dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de la pervenche (*Vinca rosea*) (Takeuchi et al. 1980). Ils sont également à rapprocher de la sécrétion d'une arabinogalactane à travers la paroi cellulaire de l'endosperme de *Lolium multiflorum* (Anderson et al., 1977) et de cals d'*Acer pseudoplatanus* en culture de tissus (Pope, 1977).

Par ailleurs, les travaux portant sur les divers aspects du métabolisme cellulaire : privation en H_2O , en saccharose ou en sels ; action du calcium ; rôles de l'auxine (Mante et Boll, 1978 ; Masuda, 1984 et York et al., 1984) ; composition du milieu de culture (Moore, 1973) ; morphologie cellulaire (Suzuki et al., 1990) ; autolyse de la paroi cellulaire (Llamazares et al., 1987 ; Sasaki et Nagahashi, 1989), montrent que les EPS et les polyosides pariétaux subissent les modifications structurales identiques en rapport avec les changements métaboliques et morphologiques des cellules correspondantes. Ces observations témoignent des relations très étroites entre ces deux catégories de polysaccharides.

Effectivement, l'auxine provoque l'augmentation des exopolysaccharides acides et neutres dans les suspensions cellulaires de haricot (Mante et Boll, 1978). Des auteurs ont pu démontrer que la xyloglucane provenait spécialement des parois durant le traitement par l'auxine (Labavitch et al., 1974, 1981 ; Terry et al., 1981a-b ; Taiz, 1984). Ainsi, une hypothèse est émise selon laquelle, un mécanisme régulerait l'élongation cellulaire par le rôle inductif de l'auxine sur des enzymes spécifiques qui dégradent les polymères de xyloglucane. Cette action provoque alors la rupture des liaisons hydrogènes de ces polysaccharides avec les microfibrilles de cellulose. Par la suite, l'expansion se ferait par le glissement des microfibrilles de cellulose les unes par rapport aux autres et par l'incorporation de nouveaux précurseurs dans la paroi (Fincher et al., 1981 ; Hayashi et Maclachlan, 1984 ; Hayashi et al., 1984 et Taiz, 1984).

En outre, des oligosaccharides de xyloglucane inhibent l'action de l'auxine (York et al., 1984 ; Fry, 1989a et Mc Dougall et Fry, 1988-1989) et stimulent l'activité des endo-1,4- β -glucanases (actives sur la xyloglucane) dans des épicotyles de pois (Hayashi et al., 1984 ; Mc Dougall et Fry, 1989-1991). D'après Hayashi (1989a), l'inhibition par des oligoxyloglucanes de l'élongation de tiges de pois, induite par l'auxine, ne correspondrait pas à celle des activités endo-glucanases. Il s'agirait plutôt d'un phénomène physiologique d'antagonisme compétitif vis à vis de l'auxine, similaire à l'effet des oligogalacturonanes (Branca et al., 1988). En effet, Farkas et Maclachlan (1988) ont montré que les nonasaccharides et heptasaccharides de xyloglucane stimulent l'activité 1,4- β -glucanase de pois, résultats confirmés depuis par Mc Dougall et Fry (1990-1991) qui ont précisé les catégories d'oligoxyloglucanes actives et les bonnes concentrations à utiliser. Certains oligosaccharides de xyloglucane, les XG7, la XG9 et la XG9 acétylée issues de l'autolyse

pariétale, sont ainsi assimilées aux oligosaccharines, par Mc Dougall et Fry (1991) et Joseleau et al. (1992). Enfin, Smith et Fry (1991) ont montré l'endotransglycosylation des xyloglucanes dans sept suspensions cellulaires en étudiant le devenir des nonasaccharides (XG9) tritiés. Ces données sont complétées par les travaux de Joseleau et al. (1992), sur l'induction par les XG7 et les XG9 des activités des glycosidases liées à la paroi cellulaire. Le "processus de détachement" des xyloglucanes que subit la paroi est démontré par sa localisation immunochimique. Ces résultats vont au-delà de l'hypothèse émise par Albersheim (1976), Cleland (1981) et Taiz (1984), concernant la Transglycosylation.

Des démarches récentes sur l'autolyse pariétale découlent des hypothèses sur les modes d'intégration des précurseurs pariétaux dans la formation du plateau cellulaire (paroi primitive) et des parois primaires. L'intégration se ferait par voies enzymatiques et chimiques qui établissent à la fois des liaisons covalentes (ponts diféruliques, esters carboxyliques,...), ioniques (par des ions bivalents : le Ca^{++}) ou encore grâce à des liaisons hydrogènes (Fincher et al., 1981 ; Cleland, 1981 ; Hayashi, 1989a-b ; Mc Dougall et Fry, 1991 et Joseleau et al., 1992).

Outre, les liaisons glycosidiques entre les polysaccharides matriciels qui ne sont générées que par le système endomembranaire puisqu'elles nécessitent de l'énergie (Mc Neil et al., 1979), les autres liaisons se font par auto-aggrégation des précurseurs pariétaux dans l'apoplasme (Lamport et Catt, 1981 ; Reis et al., 1978). En effet, il a été suggéré l'existence des liaisons croisées obtenues par dimérisation des acides féruliques issue d'une oxydation par les peroxydases liées à la paroi (Lamport et Catt, 1981), de la même façon que s'installe la lignification dans les parois cellulaires.

A ces modes d'assemblage pariétal s'ajoute l'"hypothèse d'hydrolases", selon laquelle des glycosidases exogènes interviennent dans les remaniements des polysaccharides non cellulotiques (Lamport, 1970 ; Cleland, 1981 et Taiz, 1984), comme les xyloglucanes non associées aux celluloses. Ce que démontrent les résultats des travaux sur l'autolyse enzymatique (Llamazares et al., 1987 ; Mc Dougall et Fry, 1991 et Joseleau et al., 1992) et chimique (Sasaki et Nagahashi, 1989) de la paroi, qui appuient les arguments allant dans le sens d'une origine pariétale des EPS et du "turn-over" pariétal.

Récemment, la mise en évidence de vésicules d'endocytose dans les cellules épidermiques d'oignon a permis de montrer la possibilité d'utilisation ou de réutilisation des EPS (Oparka et al., 1990). Chez les cellules de la suspension cellulaire de Silène, on observe également la présence de vésicules extracytoplasmiques dans les lomasomes du périplasme et dans les espaces intercellulaires (Morvan, 1986). Les unes sont en contact avec la paroi primaire, tandis que les autres restent intactes.

L'explication serait l'existence probable d'enzymes exogènes dans des vésicules extracytoplasmiques (Taiz, 1984 ; Hayashi, 1989) et donc dans la paroi cellulaire (Mc Dougall et Fry, 1991 et Joseleau et al., 1992).

Par conséquent, les données concernant les variations simultanées des EPS et des polysaccharides pariétaux favorisent l'hypothèse de l'origine pariétale des EPS. Mais en aucun cas, ces arguments n'effacent l'idée d'une accumulation de précurseurs surnuméraires de la paroi dans la mesure où la biosynthèse est cytoplasmique et membranaire, à l'origine.

D'après l'ensemble des données, la troisième voie serait une coexistence des deux origines avec une prépondérance pour l'origine catabolique de la paroi (Fry, 1988).

II - COMPOSITION CHIMIQUE ET STRUCTURE DES POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES VEGETAUX

(CLASSIFICATION ET STRUCTURE DES PSP ET DES EPS)

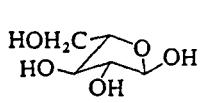
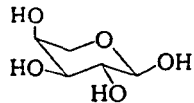
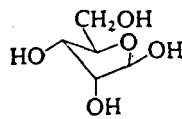
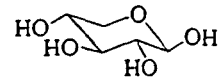
Notre démarche repose sur la classification selon les trois catégories classiquement admises que sont: les Polysaccharides cellulosiques, les Hémicelluloses et les Pectines. La classification est basée à la fois sur les méthodes d'extraction et sur la structure primaire de ces polymères pour lever toutes les ambiguïtés introduites par une extraction graduelle (Aspinall, 1983 ; Stephen, 1983 ; Fry, 1988).

Compte tenu de la similitude structurale et biosynthétique des polysaccharides extracellulaires, pariétaux et de sécrétion (cf., Partie I-B); il convient de les considérer globalement. Les polysaccharides sont les principaux constituants du monde végétal. Ce sont des homo- ou hétéropolymères formés par l'enchaînement linéaire ou ramifié des oses principaux suivants: pentoses, hexoses, déoxyhexoses, acides uroniques et leurs dérivés (Fig. 4). Pour de plus amples détails, il convient de consulter l'ouvrage de Monties et al. (1980).

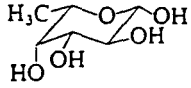
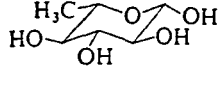
A.- La cellulose

La cellulose (α -cellulose) est la plus connue de tous les polysaccharides végétaux (McNeil et al., 1979 ; Barnoud, 1980 ; Marchessault et Sundararajan, 1983). Les polymères cellulosiques sont abondants dans les parois cellulaires primaires et secondaires. Constituant principal de l'architecture de la paroi végétale, ils représentent environ 20 % à 30 % de la matière sèche de la plupart des parois primaires. Mais il arrive qu'on rencontre quelques variations; plus de 45 % dans les parois de cals de tabac, et moins de 5 % dans les parois régénérées par les

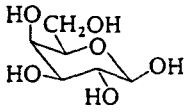
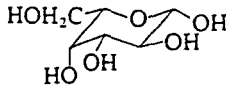
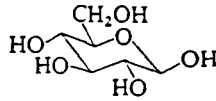
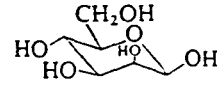
Pentoses

 α -L-Arabinofuranose- E_3  α -L-Arabinopyranose- 4C_1  β -D-Ribofuranose- 3E  β -D-Xylopyranose- 4C_1

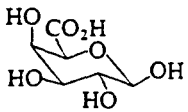
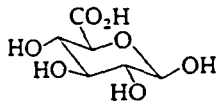
Deoxyhexoses

6-Deoxy- β -L-galactopyranose- 1C_4
(L-Fucopyranose)6-Deoxy- β -L-mannopyranose- 1C_4
(L-Rhamnopyranose)

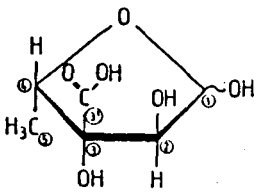
Aldohexoses

 β -D-Galactopyranose- 4C_1  β -L-Galactopyranose- 1C_4  β -D-Glucopyranose- 4C_1  β -D-Mannopyranose- 4C_1

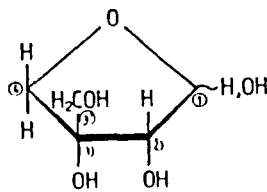
Hexuronic acids

 β -D-Galactopyranuronic acid- 4C_1  β -D-Glucopyranuronic acid- 4C_1

Oses particuliers



3-C-carboxy-5-deoxy-L-Xylose: Aceric acid.



D-Apiose

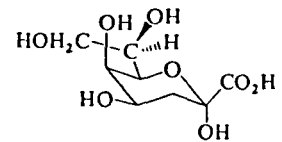
3-Deoxy- β -D-manno-octopyranulosonic acid (KDO)

Figure 4 : Liste des principaux monosaccharides qui composent les polysaccharides végétaux selon les représentations de Haworth et Reeves.

Les atomes d'hydrogène sont omis pour des raisons de clarté de présentation.

D'après Kennedy et White (1988)

protoplastes (Blaschek et al., 1981 ; McNeil et al., 1984). Insoluble dans les tampons aqueux, elle est généralement extraite au diméthylsulfoxyde et au 4-méthylmorpholine-N-oxyde (Joseleau et al., 1980 ; Chanzy et al., 1982 ; Chambat et al., 1984), et récemment solubilisée avec le système de solvant chlorure de lithium/N,N-diméthylacétamide (Lloyd et al., 1991).

La fraction cellulosique est traditionnellement considérée comme étant le résidu insoluble après l'extraction des autres polysaccharides de la paroi par des agents chélateurs et des bases minérales (Fry, 1988). Cependant, les exopolysaccharides et les polysaccharides de sécrétion en contiennent très peu ou pas du tout. C'est pourquoi on les qualifie de polysaccharides non cellulosiques.

La cellulose est constituée d'un motif, β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Glcp, appelé cellobiose qui est formé de deux résidus β -glucosyles orientés l'un par rapport à l'autre selon une rotation de 180° autour de l'axe de la molécule. Cette géométrie structurale induit l'établissement des liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaires au niveau des polymères pour former des microfibrilles cellulosiques élémentaires qui sont disposées parallèlement dans la cellulose native (Preston, 1974).

La biosynthèse de la cellulose serait en relation intime avec celle de la callose, (1 $\rightarrow$ 3)- β -glucane, une autre glucane habituellement synthétisée par les plantes comme une réponse à une blessure dans des conditions où la synthèse de la cellulose est inhibée (Delmer, 1987). L'orientation des microfibrilles de cellulose contrôlerait l'axe de la croissance, et déterminerait la morphologie de la cellule en croissance et éventuellement la morphologie de la plante (Preston, 1974 ; McNeil et al., 1984).

B.- Les Hémicelluloses

Elles regroupent tous les polysaccharides qui ne sont ni cellulosiques, ni pectiques. Ce sont les constituants principaux de la matrice pariétale qui représentent 17 % des parois isolées de la suspension cellulaire de *Rosa glauca* (Chambat et al., 1984). Ils ont servi à établir la similitude des exopolysaccharides (EPS) et des polysaccharides pariétaux (PSP) (Bauer et al. 1973 ; Wilder et Albersheim, 1973).

1 - Xyloglucane

C'est un polysaccharide très répandu dans le règne végétal; il représente 20 à 25 % (masse sèche) de la paroi primaire des Dicotylédones (McNeil et al., 1984), et un peu moins de 2 %

dans les Monocotylédones (Poaceae) (Darvill et al., 1980 ; Kato et Masuda, 1985b ; Fry 1989a). D'autres Monocotylédones comme le bulbe d'oignon en contiendraient 10 % (Mankarios et al., 1980 ; Redgwell et Selvendran, 1986). Les parois primaires de culture de cellules de sapin de Douglas contiennent environ 10 % de xyloglucane (Thomas et al., 1987). Par contre, le milieu extracellulaire des suspensions cellulaires (érable, soja) ne renferme qu'une petite proportion de xyloglucane (Aspinall et al., 1969 ; Bauer et al., 1973, Hayashi et al., 1980 ; Stevenson et al., 1986) de même que le liquide interstitiel provenant des plantes intactes (Terry et al., 1981). Les xyloglucanes les mieux étudiées sont celles des parois primaires des cellules d'érables (Bauer et al., 1973 ; York et al., 1988) et des jeunes tiges de légumineuses (Kato et Matsuda, 1980b).

La chaîne principale de la xyloglucane est chimiquement identique à celle de la cellulose: un polymère linéaire et rigide fait de résidus de β -glucopyranosyles liés entre eux par une liaison glycosidique en position O-4 (Kato et Matsuda, 1980a), sur lequel sont attachés des résidus D-xylosyle en O-6 du D-glucose. Il a été mis en évidence deux oligosaccharides, hepta- et nonasaccharides qui sont les sous unités de répétition (Fig. 5). Ils représentent environ la moitié de la masse initiale de la xyloglucane de la paroi (Valent et al., 1980). Leur distribution demeure encore discutée, les deux sous unités hepta- et nonasaccharides étant alternées le long de la chaîne polysaccharidique (Hayashi et al., 1984) ou bien réparties d'une façon aléatoire (Fry, 1988).

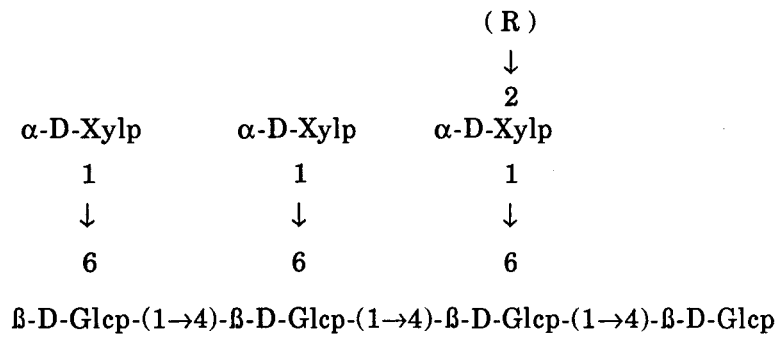
La diversité (Fig.5) des xyloglucanes provient de la fréquence et de la nature du substituant (R):

- Près de 60-75 % des résidus glucosyles sont ainsi substitués dans les Dicotylédones et les oignons (Bauer et al., 1973 ; Hayashi et al., 1980 ; Joseleau et Chambat, 1984a ; Redgwell et Selvendran, 1986), et environ 36 à 38 % dans les Poacées (Bauer et al. 1973 ; O'Neill et Selvendran, 1985).

- De plus, 30 à 50 % des résidus xylosyles sont aussi substitués en O-2 par du β -D-galactopyranose ou, rarement par du L-arabinose. Ces mêmes résidus galactosyles peuvent porter, en O-2 un résidu α -L-fucopyranosyle chez les Dicotylédones, et probablement chez les oignons et le sapin (Redgwell et Selvendran, 1986 ; Thomas et al., 1987).

- Dans les graines, la xyloglucane de stockage ne possède pas de α -L-fucose (Courtois et Le Dizet, 1974).

Ainsi, la variation du type et du degré de substitution des résidus D-xylosyles est dépendante à la fois des espèces végétales et du tissu d'origine (York et al., 1988). La structure de la xyloglucane dans les parois en croissance des cellules de tige de pois (Hayashi et MacLachlan, 1984) et dans les parois primaire de suspensions cellulaires de haricot et d'érable (Wilder et Albersheim, 1973) est constituée des mêmes oligosaccharides (Fig. 5).



Heptasaccharide

$(R) = \alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{2)}\text{-}\beta\text{-D-Galp(1} \Rightarrow \text{Nonasaccharide}$

$= \beta\text{-D-Galp-(1} \Rightarrow \text{Octasaccharide}$

$= ?\text{-L-Araf-(1} \Rightarrow //$

Figure 5 : Structure des oligosaccharides principaux des xyloglucanes.

Il en est de même des exopolysaccharides de ces suspensions cellulaires (Bauer et al., 1973 ; Wilder et Albersheim, 1973 et Fry, 1989). Seulement, ces xyloglucanes extracellulaires ont la particularité de porter des groupements acétyles en O-3, O-4 et O-6 sur le résidu D-galactosyle du nonasaccharide (York et al., 1988) et du décasaccharide (Kiefer et al., 1989), et 20 % ne le sont pas. Des résidus galactosyles mono- et di-O-acétylés sont détectés et leur distribution respective est de 50 % et 25 à 30 % des résidus D-galactosyles. (Tab. I). Cartier (1986) a recensé les divers xyloglucanes selon leurs différentes sources.

Tableau I Répartition du degré d'acétylation du motif nonasaccharide de la xyloglucane extracellulaire d'érable (York et al., 1988)

Substituant	Position			MONO-	DI-	SANS
du D-Galp	O-6	O-3	O-4	ACETYLE		
Acétyle	55-60	20-25	15-20	50	25-30	20

2 - Xylanes

Les xylanes constituent l'hémicellulose majeure (20%) dans les parois cellulaires des monocotylédones et des dicotylédones à l'exception de la paroi primaire des dicotylédones (5%) (Darvill et al., 1980 ; Dey et Brinson, 1984).

Ce sont des polysaccharides qui possèdent une chaîne principale de β -D-xylopyranoses liés en (1→4) substituée par des groupements (R) variables (Fig. 6). Cette structure confère une conformation en ruban torsadé à la chaîne principale (Fig. 7A). Les substituants les plus communs sont le α -L-arabinose attaché sur le O-3 ou le O-2 du xylose (arabinoxylanes) et l'acide α -D-glucuronique, portant ou non un groupement méthoxyle en O-4, sur le O-2 du xylose de la chaîne principale (xylanes acides). Des chaînes latérales (Fig. 6 et 7B) plus complexes comportant de l'arabinose, du xylose, du galactose et des acides organiques peuvent exister (Wilkie, 1979). Kennedy et al. (1988) signalent l'existence d'unités arabinosyles non terminales, di-substituées.

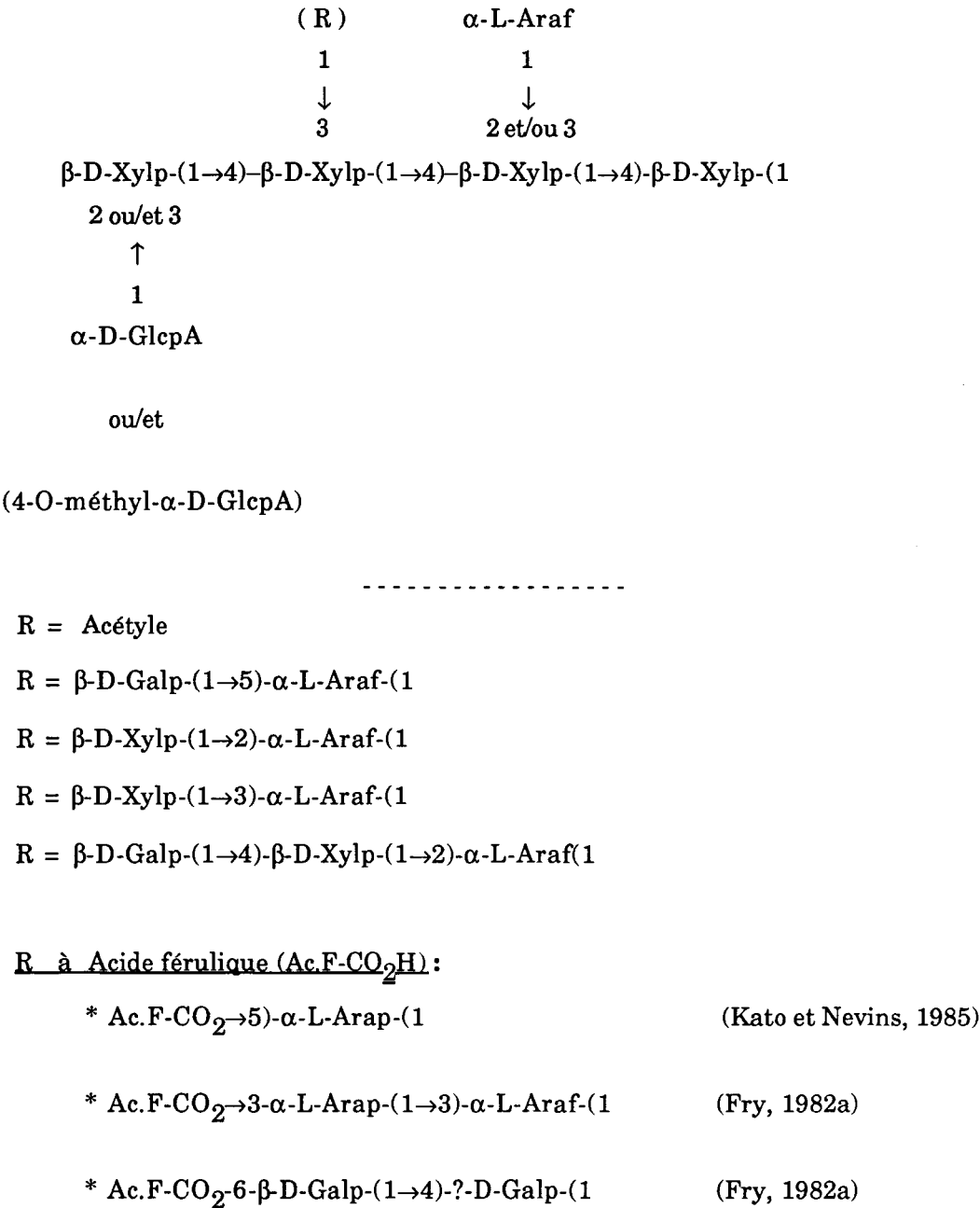


Figure 6 : Représentation structurale des Xylanes

R : chaînes latérales

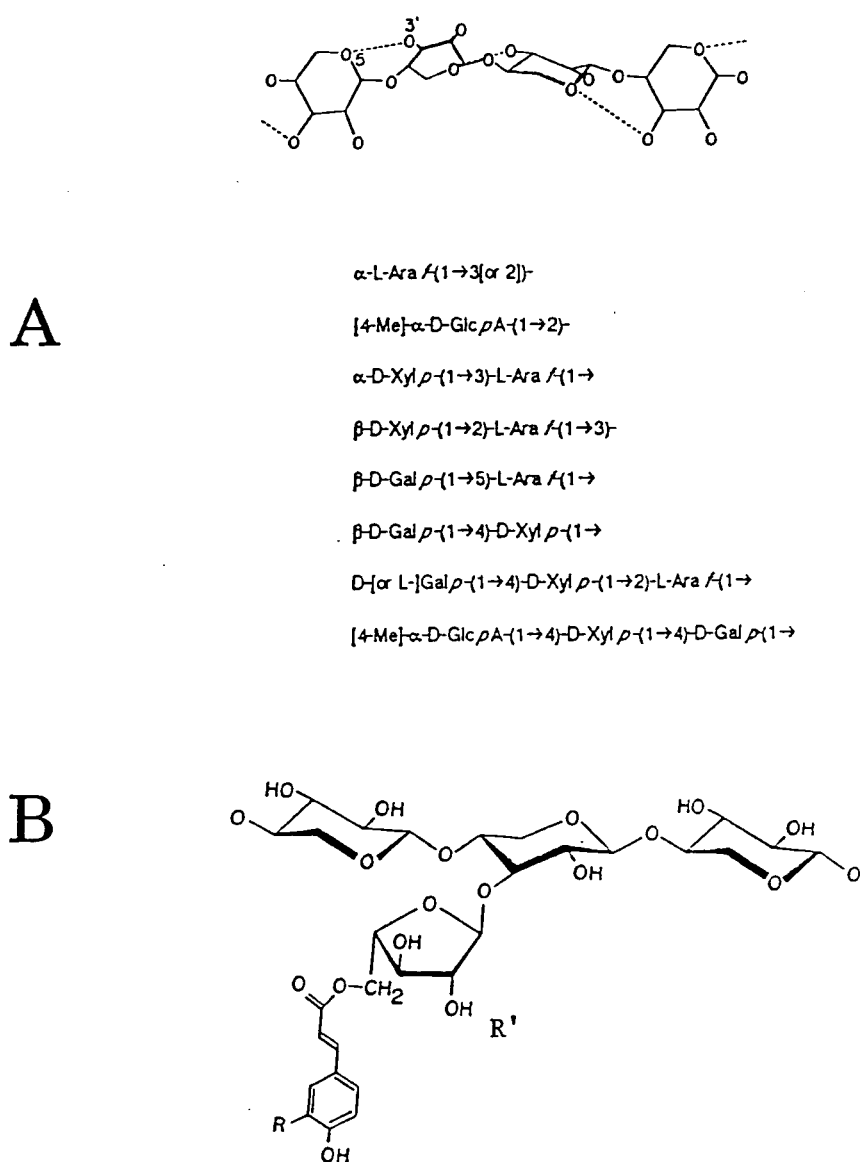


Figure 7 : Structure développée des xylanes (Bacic et al., 1988)

A: Tétrасaccharide représentant un pas de la conformation en ruban torsadé et les liaisons hydrogènes intramoléculaires qui lient les unités adjacentes. Des structures de chaînes latérales proposées par plusieurs auteurs sont représentées. (D'après Winterburn, 1974)

B: Arabinoxylotriose à acides organiques- Représentation de la jonction d'une chaîne latérale possédant des acides organiques (R= CH₃O⁻, acide férulique ; R= H, acide coumarique ; R'= acétyle, tétrasaccharide di-estérifié d'après Azuma et al. (1990).

Le degré de substitution de la chaîne principale détermine le degré de solubilité de la xylane et de ses capacités à se lier à la cellulose (McNeil et al., 1975). Tandis que la nature et l'agencement du substituant (R) définissent la diversité des xylanes et de leur origine (McNeil et al., 1984). Ainsi, on dénombre dans les parois primaires différents types de xylanes tels que l'arabinoxylane (Monocotylédones), la (4-O-méthyl)glucuronoxylane, et l'arabino-(4-O-méthyl)glucuronoxylane (Dicotylédones). Kato et Matsuda (1985a) montrent la présence d'une arabinoxylane acide parmi les polysaccharides extracellulaires de la suspension cellulaire de soja. Des polysaccharides plus complexes contenant des acides phénoliques (férulique et p-coumarique) et/ou des acétyles ont été mentionnés respectivement dans les Monocotylédones (Geissman et Neukom, 1973 ; Fry, 1982a) et les Dicotylédones (Reicher et al., 1989).

L'existence des acides féruliques portés par les résidus arabinosyles (ou galactosyles) des chaînes latérales (Fig. 6 et 7) rend possible des liaisons intermoléculaires par dimérisation oxydative (Fig. 15A) de ces acides phénoliques en créant des ponts diféruliques (Fry 1979 ; Kamisaka et al. 1990) . Ces xylanes complexes peuvent aussi se lier de cette façon avec d'autres polysaccharides, les arabinogalactanes pectiques, pourvus de ces acides organiques (Fry 1982, 1983 ; Stevens et Selvendran 1984a ; Selvendran et King 1989 ; Kamisaka et al. 1990).

3 - Les β -glucanes

Ce sont des polysaccharides neutres qui sont abondants dans les parois des Monocotylédones, et dont l'existence dans les Dicotylédones est controversée. Elles sont constituées de résidus β -D-glucopyranosyles assemblés par des liaisons (1 $\rightarrow$ 3) et/ou (1 $\rightarrow$ 4). Elles sont représentées par deux principales familles polysaccharidiques:

- la callose, uniquement composée de liaisons (1 $\rightarrow$ 3), existe principalement dans les cellules blessées ou agressées (Hayashi, 1989b), et secondairement, constitue la majorité des premiers polysaccharides générés par les protoplastes en culture (Takeuchi et Komamine, 1981 ; Hayashi et al., 1986).
- les β -(1,3),(1,4)-glucanes qui contiennent les deux types de liaison dans le rapport de 30 % de (1 $\rightarrow$ 3). La distribution de cette liaison se ferait tous les deux et/ou trois liaisons (1 $\rightarrow$ 4) (McNeil et al. 1984). L'endoglucanase spécifique (EC 3.2.1.73) coupe n'importe quelle liaison (1 $\rightarrow$ 4) qui est immédiatement précédée d'une liaison (1 $\rightarrow$ 3) (Fry 1988).

Ces polymères sont dans la paroi végétale au même titre que la cellulose avec laquelle ils seraient en relation biosynthétique et structurale (Delmer 1987).

4 - Autres

a)- les β -(1,4)-D-mannanes

Généralement, la structure de base de ces polysaccharides est de deux types:

- un polymère linéaire formé de résidus β -D-mannosyles liés en O-4, appelé β -(1,4)-D-mannane ou mannane (Fig 8A) ;
- et, un autre constitué par le remplacement de 20 à 50 % d'unités β -D-mannosyles par des résidus β -D-glucosyles liés en O-4, nommé β -D-glucomannane ou glucomannane (Fig. 8B).

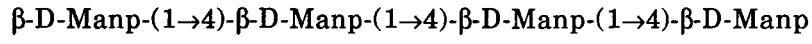
La substitution de chacune des chaînes principales par du α -D-galactose sur le O-6 des résidus mannosyles engendre respectivement, la galactomannane et la galactoglucomannane (Fig.8A-B). Dans le cas de la galactomannane, le pourcentage de substitution varie de 30 à près de 100 % (Fig.8) (Matheson, 1990).

D'autres caractéristiques structurales ont été proposées comme les liaisons (1→3) dans la chaîne principale et la présence de chaînes latérales de D-xylose ou D-galactose de plus d'un résidu, qui possèdent des liaisons en O-2 (Matheson, 1990). La galactoglucomannane a été isolée des exopolysaccharides de suspension cellulaire de tabac (*Nicotiana tabacum*) (Akiyama et al., 1983).

Les mannanes font parties des polysaccharides de réserves des graines, et interviennent dans l'imbibition et la dureté de celles-ci. La galactomannane favorise l'imbibition pour protéger l'embryon des graines de la dessiccation, tandis que la mannane est responsable de la résistance à la déformation mécanique (Reid, 1989).

b)- les Glucuronomannanes

Elles sont constituées par l'alternance des résidus β -D-mannopyrannosyles et α -D-glucuronopyrannosyles respectivement liés en O-2 et O-4, comme la gomme ghatti (Fig. 9). Cette chaîne principale est substituée en O-3 ou O-6 par des chaînes latérales de types arabino-(3,6)-galactane et arabinane (Redgwell et al., 1986a-b ; Aspinall et al., 1989). Une arabinoglucuronomannane a été isolée des polysaccharides extracellulaires et intracellulaires de la suspension cellulaire de tabac (Mori et Kato, 1981; Akiyama et al., 1984). Les résidus arabinofuranosyles portés en O-3 de la chaîne principale, sont d'anométrie β pour le mannose, et α pour l'acide glucuronique (Aspinall, 1989).



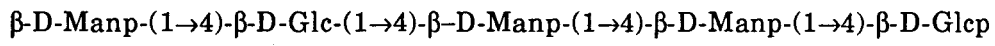
6

 $\uparrow$

1

 $(\alpha\text{-D-Galp})$

A : (Galacto) Mannane



6

 $\uparrow$

1

 $(\alpha\text{-D-Galp})$

B : (Galacto) Glucomannane

Figure 8 : Structure des β -(1,4)Mannanes

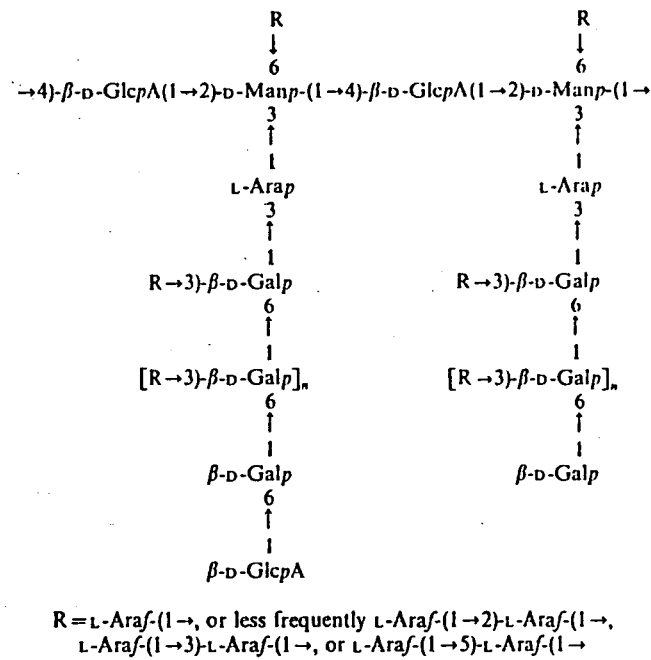


Figure 9 : Structure d'une (Arabino)glucuronomannane : la gomme ghatti. (D'après Kennedy et White, 1988)

Les glucuronomannanes sont bien connues pour faire partie des mucilages végétaux, mais aussi ont été isolés des parois cellulaires de tissus en culture (Mori et Kato, 1981) et des milieux de culture de cellules de tabac (Kato et al., 1977b ; Akiyama et al., 1984 ; Aspinall et al., 1989).

C.- Polysaccharides Pectiques

Ce sont des constituants importants qui représentent environ 30 % des parois primaires des dicotylédones (McNeil et al., 1980), sans être négligeables dans les monocotylédones. Les critères de classification de ces polysaccharides selon le mode d'extraction les définissent en tant que composés (de la paroi primaire) extractibles avec l'eau chaude, à l'acide dilué, à l'oxalate d'ammonium et par des agents chélatants des cations divalents (Northcote, 1963). De plus, les polysaccharides pectiques possèdent une structure polymérique dont la chaîne principale est formée majoritairement par la liaison (1→4) d'acides α -D-galacturoniques, et sur laquelle s'insèrent des résidus α -L-rhamnosyles liés en O-2 (Aspinall, 1983 ; Fry, 1988). La configuration de ces monosaccharides est principalement pyranique (Kennedy et White, 1988a).

Les polymères riches en acides galacturoniques sont désignés sous le nom de polysaccharides pectiques acides (P.P.A.) (Morvan, 1982). La majorité contient des proportions variées d'oses neutres, comprises entre 10 % et 25 % (Kennedy et White, 1988b). Des chaînes latérales de nature diverse, arabinanes, galactanes, et arabinogalactanes qui substituent cette structure, montrent la variété de ces polymères. On distingue ainsi, l'homogalacturonane, la rhamnogalacturonane I (RGI), la rhamnogalacturonane II (RGII), et les chaînes latérales (Fig.10) (Jarvis, 1984). Les études antérieures ont permis d'établir que les polysaccharides pectiques sont des macromolécules complexes hétérogènes qui ne correspondent pas à un mélange d'homopolysaccharides, qui seraient, la galacturonane, l'arabinane, et la galactane (Aspinall, 1980). Les arabinogalactanes seront classées avec les polysaccharides pectiques, contrairement à Stephen (1983) qui les inclut dans les hémicelluloses.

1- Homogalacturonanes

Les homogalacturonanes sont essentiellement des polymères d'acides galacturoniques dont l'estérification des fonctions carboxyliques par du méthanol (Fig. 10) permet de les classer en deux catégories en fonction de leur degré de méthylation (DE), (Thibault, 1980) :

- ceux qui sont méthyl-estérifiés, désignés généralement par pectines ou acides pectiniques ;
- et, ceux qui le sont moins, appelés les acides pectiques ou (homo)galacturonanes purs ($DM < 5$) (Kennedy et White, 1988b).

Selon leur degré d'estérification (DE ou DM), défini comme le pourcentage d'acides galacturoniques estérifiés rapporté à la totalité de ces acides, on trouve les pectines faiblement méthylées, FM, de $DM < 50$; et les hautement méthylées, HM, de $DE > 50$.

On considère généralement que les polysaccharides pectiques acides (P.P.A.) de la paroi cellulaire sont majoritairement méthyl-estérifiés (Aspinall et Cottrell, 1970 ; Redgwell et al., 1988), mais, en dépit de nombreuses études, la distribution des esters de méthyle reste peu connue (DeVries et al., 1986 ; O'Neill et al., 1990 ; Knox et al., 1990). Les polysaccharides pectiques, isolés par différentes méthodes à partir de diverses sources, ont un degré de méthylation varié (Bacic et al. 1988). En général, il est supérieur à 50 % bien que des DE de 25 % dans les ananas (Voragen et al., 1983) ou de 22 % dans les pectines de tabac (Sun et al., 1987), et de 30 % dans les exopolysaccharides pectiques de suspension cellulaire d'érable (Aspinall et al., 1969) aient été rapportés. Morvan (1986) démontre la diminution du degré d'estérification au cours du cycle de culture de cellules de silène ; les valeurs obtenues se répartissent entre 35 et 56 % pour les P.P.A. de 7 jours et entre 8 et 15% pour ceux de 14 jours.

De même, le degré d'acétylation en O-2 ou O-3 des résidus galacturonosyles (Fig. 10B), qui est en général faible (inférieur à 10) (McComb et McCready, 1957), peut être élevé dans les pectines de betterave (Rombouts et Thibault, 1986a), de poire ou de pomme de terre (Voragen et al., 1986a), et dans le jus de pomme près de 60% (Schols et al., 1990b). Komalavilas et Mort (1989) suggèrent que la méthylestérification est plus concentrée dans les régions homogalacturoniques, contrairement à l'acétylation dans les zones rhamnogalacturonanes. Il semble que les homogalacturonanes pures soient rarement rencontrées à l'exception peut être des graines de tournesol (Zitko et Bishop, 1966). Si de tels polymères ont pu être isolés (Zitko et Bishop, 1965/1966 ; Barrett et Northcote, 1965 ; Chambat et al., 1980), les méthodes d'extraction drastiques utilisées amènent plusieurs auteurs à penser qu'il s'agit de produits de la dégradation de polymères plus complexes (Barrett et Northcote, 1965 ; McNeil et al., 1984).

D'après des études de conformation entreprises sur les pectines de citron, les homogalacturonanes correspondraient à des motifs linéaires de 25 unités d'acides galacturoniques qui sont entrecoupés de résidus rhamnosyles (Rees, 1982 ; Powell et al., 1982). Cependant, Nothnagel et al., (1983) n'ont pas trouvé de preuve de l'existence de ces segments réguliers. Des régions homogalacturoniques ininterrompues de 70 résidus galacturonosyles (Fig. 7B) ont été trouvées parmi les fractions pectiques pariétales de suspensions cellulaires de

carotte (Konno et al., 1986). Les parois primaires des Dicotylédones en contiennent approximativement 15% et les Monocotylédones 5% environ (Fry, 1988).

2 - Les rhamnogalacturonanes

Les rhamnogalacturonanes ont été isolées des parois primaires de suspensions cellulaires d'érable (Ishii et al., 1989), de maïs et de riz (Thomas et al., 1989-a,b) par l'endo- α -1,4-polygalacturonase E.C. (English et al., 1972).

La rhamnogalacturonane I (RGI), de masse moléculaire environ 200.000 à 300 000, représente 7 % de la masse des parois isolées, et 23 % des polysaccharides pectiques pariétaux des cellules d'érable en suspension cellulaire. Elle est constituée d'une chaîne principale formée de l'alternance de résidus α -D-galactopyranosyles et α -L-rhamnopyranosyles liés respectivement en O-4 et O-2 (Fig. 10B) (Lau et al., 1985 et Thomas et al., 1989b).

La distribution de ces résidus rhamnosyles branchés le long de la chaîne principale n'apparaît pas régulière (Lau et al., 1985-1987b ; Ishii et al., 1989). Près de 50 % des L-rhamnose sont substitués en O-4 par des chaînes latérales variées d'arabinane, de galactane, ou d'arabinogalactane. Lau et al. (1987b) ont déterminé des courtes chaînes latérales homopolymériques d'arabinane et de galactane (tableau II). De plus, la variété des rhamnogalacturonanes I réside dans celle des chaînes latérales ; par exemple, celles du maïs n'ont pas de résidus fucosyles contrairement à celles du riz et de l'érable (Thomas et al., 1989-b).

Par ailleurs, une autre unité de répétition qui est faite de la juxtaposition de deux acides galacturoniques et de deux rhamnoses, D-GalAp- α -(1 $\rightarrow$ 4)-D-GalAp- α -(1 $\rightarrow$ 2)-L-Rhap- α -(1 $\rightarrow$ 2)-L-Rhap, a été proposée par Aspinall et al. (1967, 1968) dans le soja et la luzerne. Il semble donc que l'existence de ces deux structures soit possible. Enfin, ce serait une région pectique propice à l'acétylation des acides uroniques (Komalavilas et Mort, 1989).

Quant à la rhamnogalacturonane II, qui représente 4 % des parois cellulaires d'érable (Darvill et al., 1978), c'est un polymère pectique très ramifié qui comporte de nombreux oses rares. Il se fixe en O-3 de l'acide galacturonique de la chaîne pectique principale (Fig. 10B). Il a été caractérisé par l'équipe d'Albersheim à partir de parois de cellules d'érable et de riz en suspension cellulaire (Darvill et al., 1978 ; Spellman et al., 1983 ; Thomas et al., 1989-a). Le RG-II contient au moins 11 résidus différents glycosyles parmi lesquels des oses rares tels que l'acide acérique, l'apiose, le 2-O-méthylfucose, le 2-O-méthylxylose, l'acide 3-deoxy-D-manno-2-octulosonique (KDO), et l'acide 3-déoxy-D-lyxo-2-heptulosarique (DHA). Des monosaccharides particuliers avec des liaisons glycosidiques inhabituelles, fucose lié en O-3 et

O-4, acide glucuronique lié en O-2, et le rhamnose lié en O-3, caractérisent le RGII. La présence de deux disaccharides: α -Rha-(1→5)-KDO et α -Ara-(1→5)-DHA (York et al., 1985 ; Stevenson et al., 1988-a), de l'heptasaccharide (Spellman et al., 1983) et de l'octasaccharide (Stevenson et al., 1988-b) marque l'existence du RGII dans de parois végétales (Fig. 11).

3 - Arabinanes et Galactanes pectiques

Ce sont les polymères glucidiques qui composent les chaînes latérales (Fig. 10) des polysaccharides pectiques (Jarvis, 1984 et McNeil et al., 1984). De taille variable, elles se fixent sur la chaîne pectique principale en O-4 du rhamnose du RGI (Lau et al., 1987b).

Les arabinanes (α -5-arabinanes) sont formées principalement par la liaison (1→5) de résidus α -L-arabinofuranosyles qui sont souvent substitués en O-3 et parfois en O-2 par les mêmes résidus (Fig. 12). Il en existe cependant faits de liaison (1→3) (Aspinall et Fanous, 1984). Le degré de branchement et la présence des résidus arabinopyranosyles dépendent de l'origine du polysaccharide (Darvill et al., 1980). De plus, ces résidus arabinopyranosyles porteraient les acides phénoliques existant sur les polysaccharides pectiques (Fry, 1983 ; Rombouts et Thibault, 1986a).

La galactane (β -4-galactane) est une chaîne linéaire de résidus β -D-galactopyranosyles liés en (1→4). Substituée en O-3 par des arabinanes, elle forme l'arabinogalactane I (Fig. 13). Les homopolymères correspondant n'ont pu être isolés que grâce à l'utilisation des méthodes qui dégradent leurs liaisons covalentes avec le RGI (O'Neill et al., 1990). Ainsi, Lau et al. (1987-b) ont démontré ces liaisons covalentes au niveau du rhamnose par la caractérisation de nombreux oligosaccharides à rhamnoalditol (tableau II) de DP 2-5 pour les arabinanes, et de 2-12 pour les galactanes. Ceci semble renforcer l'opinion de la majorité des auteurs sur l'existence de chaînes latérales complexes selon laquelle les homopolysaccharides ne sont que des artéfacts d'extraction (cf. Jus de pomme O'Neill et al., 1990) qui proviendraient de la modification de ces substituants complexes (Aspinall et Fanous, 1984). Mais l'isolement et la détermination des oligosaccharides plus lourds (Lau et al., 1988-b) montrent la diversité de leur taille. Ces derniers auteurs mentionnent, par ailleurs, l'existence probable d'acide galacturonique dans les chaînes latérales.

Tableau II : Liste des structures totales et partielles des oligoglycosylalditols caractérisés provenant des chaînes latérales du rhamnogalacturonane I. (D'après Lau et al., 1987b)

Désignation numérique	Oligoglycosylalditols
1	β -D-Galp-(1→4)-L-Rhaol
2 ^a	Ara-(1→5)-Araol
3 ^a	Gal→Galol
4	Ara-(1→4)-Rhaol
5	α -L-Araf-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)-L-Rhaol
6	β -D-Galp-(1→6)- β -D-Galp-(1→4)-L-Rhaol
7	β -D-Galp-(1→4)- β -D-Galp-(1→4)-L-Rhaol
8 ^a	Ara→Ara→Araol
9 ^a	Gal→Gal→Galol
10	Ara→Ara→Rhaol
11	Fuc→Ara→Rhaol
12	α -L-Araf-(1→2)- α -L-Araf-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)-L-Rhaol
13	β -D-Galp-(1→6)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-Galp-(1→4)-L-Rhaol
14	α -L-Fucp(1→2)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-Galp-(1→4)-L-Rhaol
15 ^a	Ara→Ara→Ara→Araol
16 ^a	Gal→Gal→Gal→Galol
17 ^b	L-Araf-(1→5)-L-Araf-(1→2)-L-Araf-(1→3)-D-Galp-(1→4)-L-Rhaol
18	Gal→Gal→Gal→Gal→Rhaol
19	Ara→Ara→Ara→Ara→Araol

^a Chacun de ces oligoglycosylalditols per-O-méthylés est élué avec plus d'un temps de rétention, indiquant l'existence de configurations anomériques différentes ou de points de liaison).

^b La séquence glycosidique des arabinoses liés en O-2 et O-5, n'est pas déterminée pour cet oligoglycosylalditol ; la séquence montrée est uniquement une proposition.

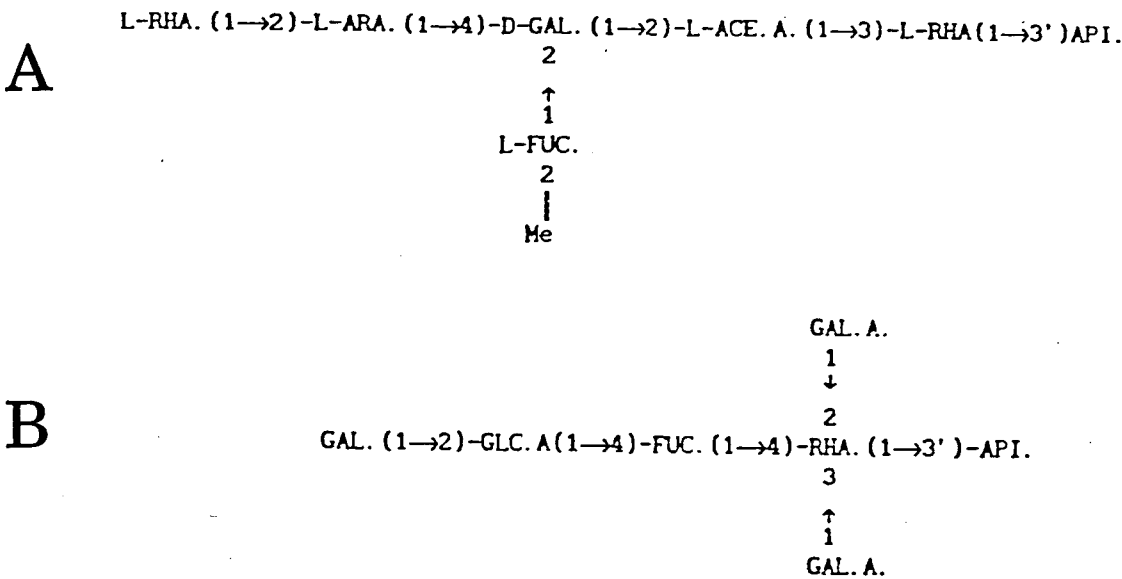


Figure 11: Structure de deux heptasaccharides marqueurs du RG II
(D'après Darvill et al., 1978)
(API : apiose ; ACE.A : acide acérique)

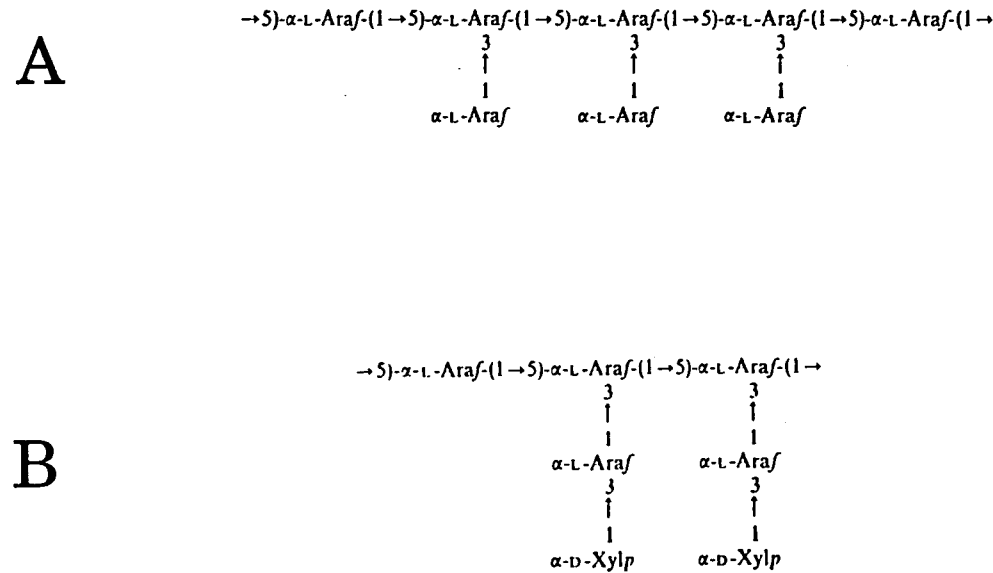


Figure 12: Structure des arabinanes pectiques qui existent sous forme linéaire ou ramifiée (D'après Kennedy et White, 1988).
A : Extrait de graines de moutarde.
B : Extrait de graines de cresson.

4 - Les arabinogalactanes pectiques (AGp) et protéiques (AGP)

Ce sont des polysaccharides particulièrement complexes, très ramifiés qui constituent les chaînes latérales des polysaccharides pectiques. Ils sont classés en deux types différents:

- le type I (AG I) est caractérisé par une chaîne principale de β -4-galactane substituée en O-3 par de la α -5-arabinane (Fig. 13A) ;
- le type II (AGII) est fait d'une chaîne principale de résidus β -D-galactosyles liés en O-3 qui peut être substituée en O-6 par du β -D-galactose. Des résidus L-arabinofuranosyles liés en O-3 viennent se brancher à la fois sur le O-6 libre de la β -3-D-galactane et sur la chaîne latérale β -6-D-galactane.(Fig. 13B). Des résidus glucuronosyles y sont décelés. On désigne généralement l'un par arabino-4-galactane, et l'autre, par arabino-3,6-galactane. Ce sont des composés suffisamment hydrosolubles pour être extraits à l'eau.

Par ailleurs, l'AGII n'est pas considérée comme un composant de la paroi primaire , dans la mesure où on l'a souvent trouvée dans le lumen des trachéides, des granules cytoplasmiques et des vésicules intercellulaires, et au niveau de l'interface cytoplasme-paroi cellulaire de diverses plantes (Clarke et al., 1979). Les cellules végétales en culture sont connues pour sécréter de l'AGII dans le milieu de culture (Aspinall et al., 1969 ; Keegstra et al., 1973 ; Burke et al., 1974 ; Kato et al., 1977a). Cependant, la mise en évidence des résidus galactosyles liés en O-3, O-6 et O-3,6, en petite quantité dans les parois primaires de suspensions cellulaires d'érable, et en quantité appréciable dans la paroi cellulaire de pin Douglas (Thomas et al., 1987), semble pourtant montrer leur présence dans la paroi végétale. Même si, il n'a pas été établi que ces résidus galactosyles proviennent du AG II ou des oligosaccharides du RGI.

Ainsi, O'Neill et al. (1990) supposent que l'arabinogalactane n'existe pas à l'état libre dans la paroi, mais plutôt sous forme de chaînes latérales longues attachées au RGI.

De plus, ils considéreraient que les arabinanes, les galactanes et les arabinogalactanes, sont de taille suffisante pour suggérer qu'elles aient une origine synthétique indépendante et seraient donc des polysaccharides reconnaissables à part entière, même si elles sont covalentement liées à la RGI.

En outre, l'arabinogalactane II se distingue de l'AG I par sa participation à des structures complexes telles que les protéoglycannes et les glycoprotéines qui diffèrent par les proportions et l'organisation des monosaccharides aussi bien que par la nature des liaisons glucides-protéines (Fincher et al., 1983). On a alors de l'arabino-3,6-galactanes protéiques (AGP) qui seraient, soit une zone de jonction entre les polysaccharides pectiques et les protéines pariétales, (Keegstra et al., 1973), soit un composant structural d'une glycoprotéine pariétale

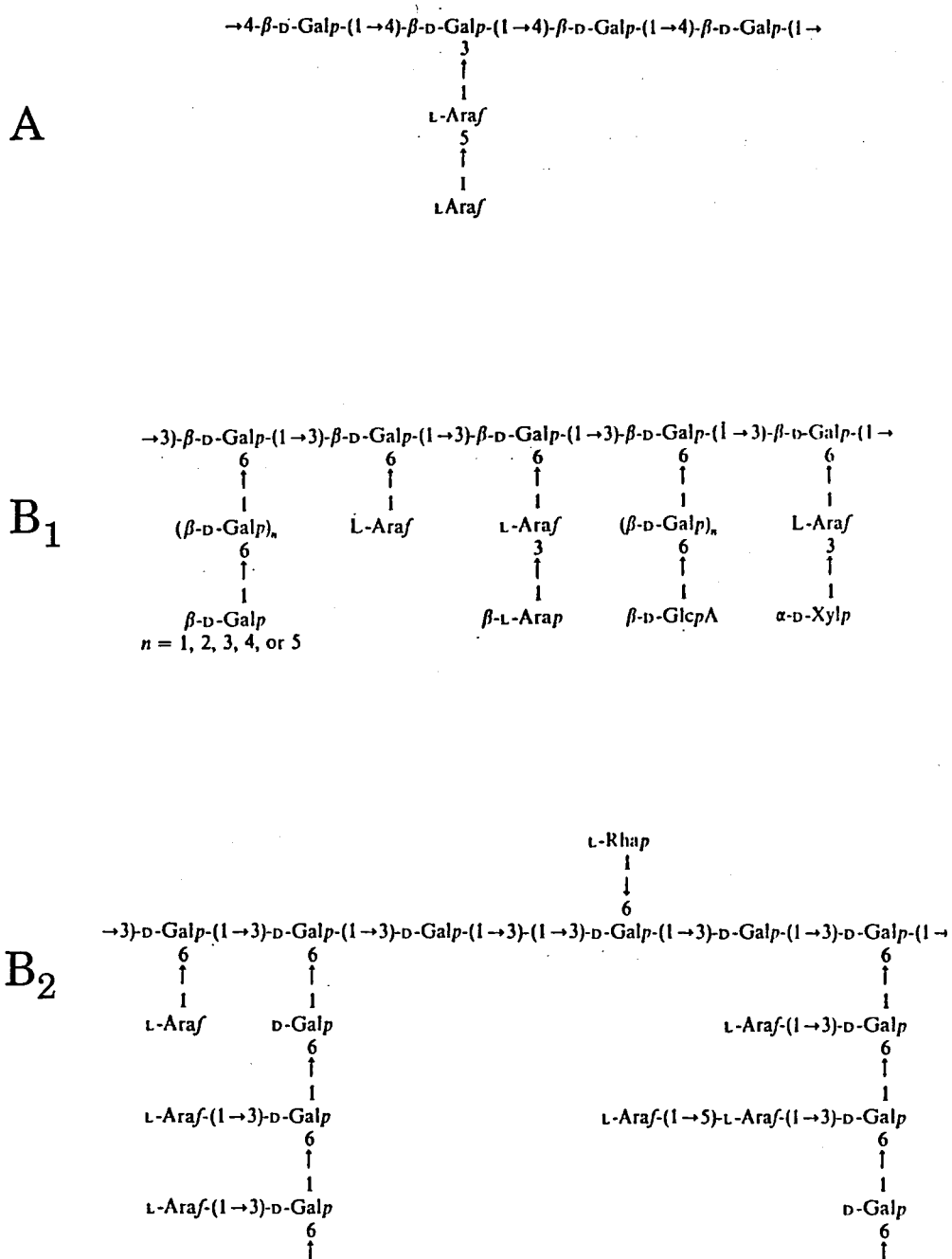


Figure 13 : Structure des arabinogalactanes

A : Arabinogalactane I de soja.

B₁ : Arabinogalactane II de pin maritime.

B₂ : Arabinogalactane II de paroi de suspension cellulaire de tabac

(Fincher et al., 1983). Mais Cartier (1989) montre le rôle mineur de ces chaînes latérales dans les connections entre le squelette rhamnogalacturonique et le système xyloglucanne/cellulose de la paroi isolée de pomme.

Les arabinogalactanes conjugués sont très répandus dans le règne végétal. On les trouve dans les exsudats et mucilages comme les gommés arabique, ghatti et tragacanth ; et dans les produits de sécrétion de cellules végétales en culture (Fincher et al., 1983 ; Buchala et al., 1987 ; Kennedy et White, 1988).

D.- Glycoprotéines et protéines végétales

L'association entre les pectines et les protéines a été signalée sur des polysaccharides extracellulaires de cellules de soja (Moore, 1973). Elles sont représentées par l'extensine qui est définie comme un composé glycoprotéique, basique, insoluble, riche en hydroxyproline, et portant des chaînes latérales osidiques courtes (Fig. 14A) (Lamport, 1967) ; Lamport et Miller, 1971). Les points de liaison caractéristiques sont: β -L-Araf $\rightarrow$ L-OHPro, α -D-Galp $\rightarrow$ L-Ser, D-Xylp $\rightarrow$ Thr, (Fry, 1988).

L'extensine serait sécrétée vers la paroi cellulaire sous forme de monomères qui sont ensuite liés par covalence dans une matrice rigide et inextensible (Cooper et Varner, 1984 ; Swords et Staehelin, 1989). Cette liaison se fait par dimérisation oxydative (Fig. 14B) des résidus tyrosyles des chaînes protéiques de l'extensine pour former des ponts isodityrosines sous l'action des peroxydases (Fry, 1982b ; Lamport, 1986). La matrice ainsi formée correspond au complexe extensine-cellulose qui est fait de l'enchevêtrement des monomères aux microfibrilles cellulosiques (Fig. 14C). (Lamport et Epstein, 1983)

Depuis, d'autres glycoprotéines riches en hydroxyproline qui possèdent des propriétés de types extensine, ont été isolées des tissus végétaux et des produits de sécrétion. Ces derniers qui regroupent les polysaccharides extracellulaires (Smith et al., 1984), les mucilages et les gommés exsudés, caractérisent les arabinogalactanes protéiques de type protéoglycane ayant un fort taux de glucides macromoléculaires (90-98 %) et très solubles dans l'eau (Fincher et al., 1983). A l'inverse, l'extensine, la seule glycoprotéine matricielle de la paroi cellulaire qui n'avait pas été trouvée dans les polysaccharides extracellulaires d'érable, représente les glycoprotéines pariétales. Ces dernières sont caractérisées par leur composition glucidique en oligosaccharides. Toutefois, une glycoprotéine qui semble contenir des hydroxyprolyl-tri- et -tétra-arabinosides, caractéristiques de l'extensine, a été isolée des polymères sécrétés par la suspension cellulaire de tabac (Yamaoka et Sato, 1977)

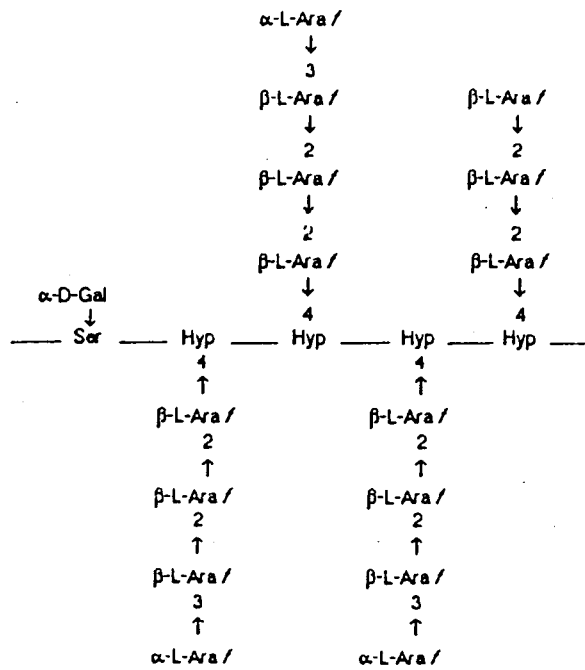


Figure 14A: Structure proposée de la région glycosylée de l'extensine
(D'après Lamport et Miller, 1971).

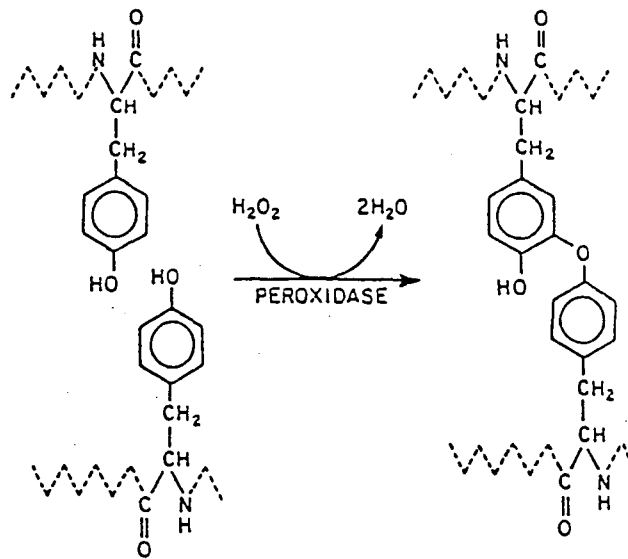


Figure 14B : Couplage oxydatif de deux tyrosines pour former
le pont isodityrosine. (D'après Lamport, 1986).

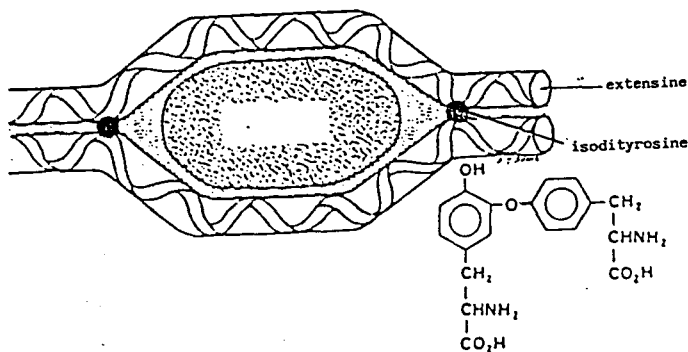


Figure 14C : Le réseau extensine-cellulose.
(D'après Lamport et Epstein, 1986)

Les complexes arabinogalactanes-protéines sont caractérisés par leur propriété de précipiter avec les antigènes artificiels de Yariv, qui sont des β -glycosides aromatiques (Clarke et al., 1979).

Enfin, les enzymes qui ont été isolées des parois cellulaires et des milieux extracellulaires, représentent d'autres protéines, dont les phosphatases, les glycosidases et les peroxydases. Certaines interviennent dans le métabolisme pariétal, comme les peroxydases qui induiraient l'établissement des ponts isodityrosine et diférulique. Tandis que les glycosidases participent au renouvellement et à l'évolution des polysides pariétaux ; comme l'autolyse pariétale lors de l'abscission foliaire (Lamport et Catt, 1981 ; Knee et Bartley, 1981 ; McNeil et al., 1984) et lors de la maturation des fruits (Brady, 1987).

E.- Les réticulations (Cross-links) = liaisons intermoléculaires :

Interconnections des polysaccharides

La connaissance de ces liaisons est importante pour la compréhension de la structure et de l'assemblage des constituants de la paroi végétale (Fry, 1989b). L'étude des polymères végétaux doit alors tenir compte de la diversité de ces liaisons. Elles peuvent être à la fois non covalentes et covalentes faisant intervenir d'autres molécules non glucidiques (protéique, organique et minérale).

1 - Liaisons non covalentes

En général, il en existe trois types dont les liaisons hydrogène, ionique et hydrophobe. Cette dernière concerne moins les polysaccharides végétaux, à l'inverse des deux autres qui sont très fréquentes.

a)- Liaison hydrogène

En effet, le complexe cellulose-xyloglucanne, ou hémicellulose en général, est établi par ces liaisons, car ils sont dissociables par des solvants chaotropiques (NaOH-NaBH_4 , Urée, Thiocyanate de guanidine, MMNO, DMSO) qui coupent les liaisons hydrogène. Chambat et al. (1984) ont démontré l'association de la cellulose aux xyloglucanes et ces dernières entre elles par l'utilisation du MMNO-DMSO. Cependant, d'autres liaisons peuvent être rompues par certains de ces réactifs (Fry, 1989b). Cette propriété est utilisée pour séparer les hémicelluloses sur colonne

chromatographique de cellulose (Hayashi et al., 1986 et Hayashi, 1989a-b).

b)- Liaisons ioniques

Ces liaisons peuvent être monovalente et divalente. Les premières s'établiraient entre les fonctions carboxyliques des polysaccharides acides et les fonctions amine primaire des protéines comme l'extensine (Smith et al., 1984) et quelques enzymes pariétales (Fry, 1989b). Ainsi, l'orientation du couplage des résidus tyrosine vers l'isodityrosine au lieu de dityrosine serait due à la présence des polysaccharides acides en liaison ionique (Fry, 1987a). Ce type de liaison est habituellement rompu par la force ionique de solutions de sels minéraux tels le chlorure de sodium et le chlorure de lithium.

Les liaisons divalentes se forment principalement par le biais des ions calcium qui réagissent avec les fonctions carboxyliques des acides uroniques de polysaccharides acides. Elles sont renforcées par les liaisons de coordination du calcium avec les atomes d'oxygène des résidus glycosyles voisins. La conséquence est l'arrangement en boîte à œufs, "egg-box", des homogalacturonanes (Rees, 1982 et Jarvis, 1984). Priem (1990) a montré la taille minimale des acides oligogalacturoniques susceptibles de former des ponts calcium. Par ailleurs, l'établissement des ponts calciques des polysaccharides acides nouvellement sécrétés, se ferait selon un processus non enzymatique. Cependant, la pectine méthyl-estérase, enzyme pariétale, catalyserait leur formation par désestérification des polymères pectiques méthyl-estérifiés, initialement déposés ou libérés dans la paroi (Fry, 1988-1989b).

Enfin, ces liaisons peuvent être, à la fois sous-estimées par l'action des agents chélateurs endogènes, comme le citrate ; ou, surestimées par la libération des ions calcium endogènes, cytosoliques (Fry, 1988-1989b).

2 - Liaisons covalentes

Elles sont classées selon que les polysaccharides se lient directement ou indirectement entre eux.

a)- Liaisons directes

Les polysaccharides peuvent se lier par des liaisons glycosidique et ester. La première

s'établit entre la fonction réductrice d'un polysaccharide et une fonction alcool d'un autre, à l'instar de l'association du xyloglucane et de la pectine, proposée par Bauer et al. (1973).

Tandis que la seconde se fait à partir d'une fonction alcool polysaccharidique et d'une fonction carboxylique d'acides uroniques. Ainsi, s'établit la relation entre la pectine et la cellulose ou la xyloglucane (Stevens et Selvendran, 1984a-b ; Massiot et Thibault, 1989 ; Selvendran et King, 1989).

Par ailleurs, la réaction d'estérification intracellulaire se ferait par l'utilisation de coenzyme A et d'ATP, ou spécialement le S-adenosylméthionine dans le cas de la méthylestérification. Alors que dans la paroi cellulaire, le mécanisme est la transestérification à partir des polysaccharides déjà méthylestérifiés (Fry, 1989b).

Enfin, on n'a pas prouvé de façon convaincante en faveur des liaisons esters (Fry, 1986). D'autant que ces liaisons sont labiles en milieu alcalin, et plusieurs estérases pariétales sont connues pour les hydrolyser (Gahan et Bellani, 1984).

b)- Liaisons indirectes

Elles font appel principalement à d'autres molécules non glucidiques, les dérivés phénoliques qui sont les résidus tyrosine de l'extensine, les hydroxycinnamates (férulate, p-coumarate) et le p-hydroxybenzoate, qui estérifient les groupes hydroxyle des polysaccharides (Fry, 1986 ; Kamisaka et al., 1990 ; Guillon et Thibault, 1990). Les différentes possibilités de couplage sont représentées dans la figure 15. Ainsi, les liaisons se font principalement par couplage oxydatif des dérivés phénoliques sous l'action des peroxydases (Whitmore, 1976 ; Lamport, 1986) ou par des agents oxydants, comme les ferricyanides (Taylor et Bettersby, 1967). Récemment, on a fait état de couplage photochimique des dérivés phénoliques (Eraso et Hartley, 1990).

Et plusieurs polymères glucidiques tels que les arabinoxylanes et les pectines portent des chaînes latérales phénoliques (Fry, 1988). Ils sont souvent isolés à partir des polymères pariétaux que des polysaccharides extracellulaires. Il apparaît que près de la moitié des résidus arabinopyrannosyles terminaux porte des acides féruliques (Fry, 1983). Ces derniers sont transférés sur le polysaccharide, probablement au cours de la synthèse intracellulaire de celui-ci (Fry, 1987b).

Par ailleurs, des polyols et des cyclitols, signalés dans la composition des polysaccharides, établiraient des liaisons covalentes intermoléculaires (Selvendran et King, 1989).

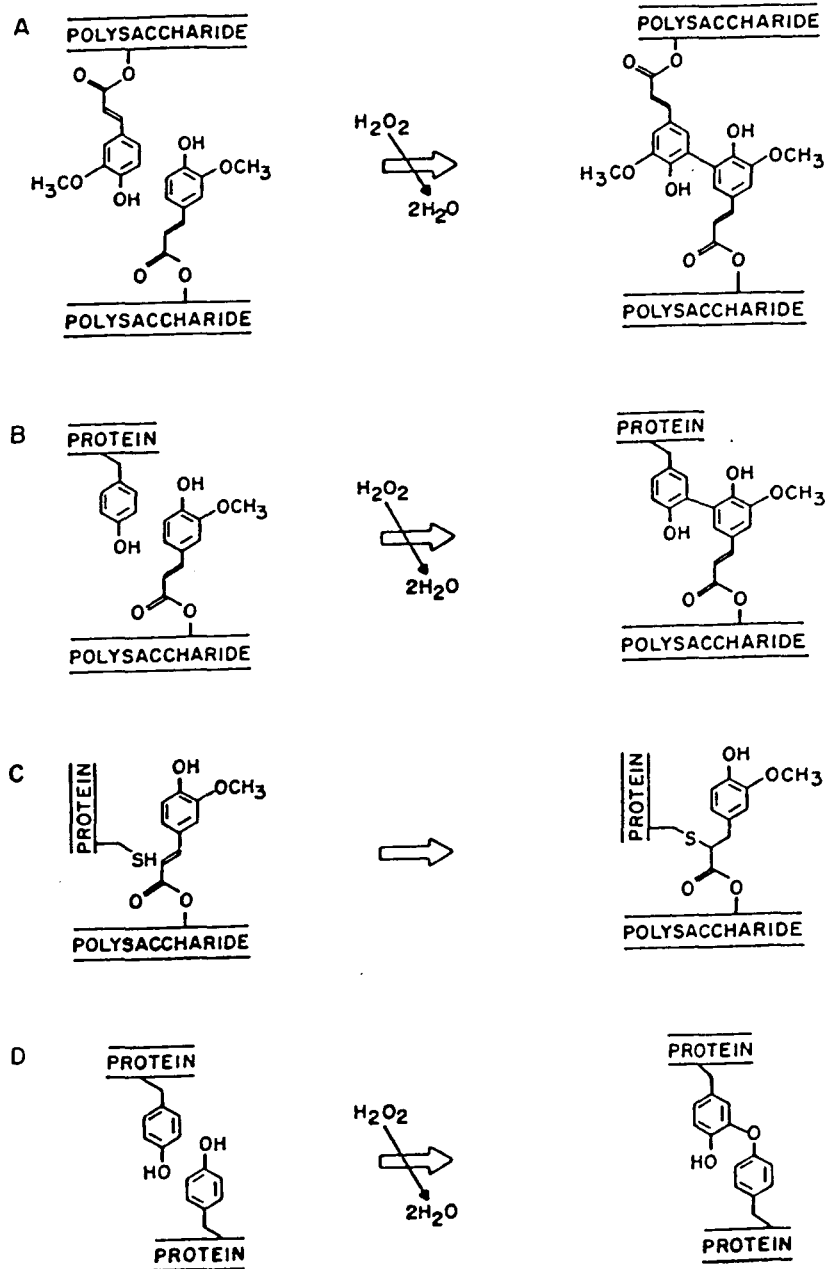


Figure 15 : Mécanismes possibles des interconnexions covalentes organiques des polysaccharides végétaux.

A: Liaison diférule, **B:** Liaison tyrosyl-férule, **C:** Liaison formée via la réduction de la fraction propényle de l'acide férulique par un groupe thiol de résidus cystéine, **D:** Liaison isodityrosine.

A, B et D sont formées par couplage oxydatif

Toutes les interconnexions possibles ont été résumées par Fry (1986) dans la figure 16. Récemment, des auteurs (Massiot et Thibault, 1989 ; Selvendran, 1989 ; Nishitani et Nevins, 1989) ont émis la possibilité de relation covalente entre les hémicelluloses de type xylane et les polysaccharides pectiques et de l'existence de liaison silanol (Fry, 1988). Mais, on n'a pas encore isolé de sites spécifiques, représentatifs de ces liaisons particulières. Les résultats de ces travaux sont résumés sur la figure 17.

F.- Mucilages et exsudats végétaux

Il convient de présenter ces quelques polymères glucidiques en raison de leur similitude structurale avec les polysaccharides extracellulaires des suspensions cellulaires (Kennedy et White, 1988b). En effet, on trouve des mucilages et des gommes dont la structure s'apparente à celle des chaînes principales et latérales des polysaccharides pectiques et hémicellulosiques.

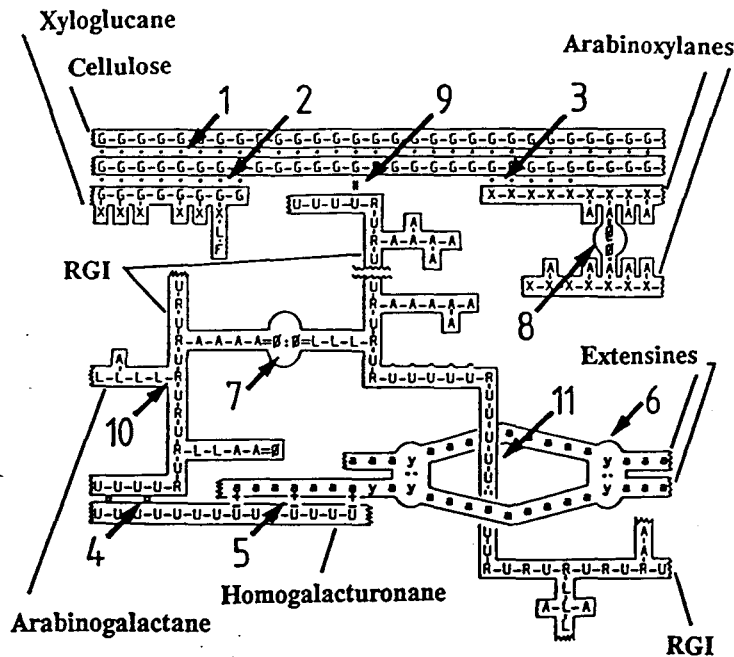
Ceux de type acide ont des chaînes principales homogalacturonique (Fig. 18A) et rhamnogalacturonique (Fig. 18B). Tandis que d'autres ressemblent à de l'arabinogalactane II (Fig. 16). Quant à la structure hémicellulosique de type xylane (Fig. 20), sa particularité réside dans le mélange de liaisons β -(1→4) et β -(1→3).

Enfin, ces polysaccharides végétaux sont d'intérêt industriel important pour leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (Griffiths et Kennedy, 1988 ; White et Kennedy, 1988c ; Tomoda et al., 1989 ; Srivastava et Kulshreshtha, 1989).

G.- Valorisation des polysaccharides végétaux

Les recherches entreprises sur ces polymères sont fondées, en majorité, sur des objectifs économiques.

Leur utilisation est marquée par celle de l'amidon et de la cellulose qui ont acquis une importance économique et sociale considérables en tant que sources alimentaire et énergétique. L'exploitation traditionnelle (aliments et matériaux de construction) compte encore pour la majorité de leur production. A celle-ci, s'ajoute la nécessité de les modifier afin de disposer de nouveaux produits compétitifs et originaux, tels la viscose en industrie textile et d'emballage, et les supports chromatographiques dans le domaine scientifique,(Sturgeon, 1988 ; Griffiths et Kennedy, 1988). Vient ensuite l'intérêt pour d'autres polysaccharides comme les pectines, les hémicelluloses, les gommes et les mucilages végétaux.



- | | |
|------------------------------|---|
| (●) liens hydrogène | 1 - cellulose-cellulose |
| (O) ponts calcium | 2 - xyloglucane-cellulose |
| (±) autres liaisons ioniques | 3 - xylane-cellulose |
| (:) association de phénols | 4 - homogalacturonane-homogalacturonane |
| (=) liaisons ester | 5 - extensine-pectine |
| (-) liaisons glycosidiques | 6 - extensine- extensine |
| (φ) enchevêtrements | 7 - pectine-pectine |
| | 8 - arabinoxylyane-arabinoxylyane |
| | 9 - pectine-cellulose |
| | 10 - arabinogalactane-rhamnogalacturonane |
| | 11 - pectine dans l'extensine |

Les abréviations utilisées dans les structures signifient :

A : Arabinose ; F = Fucose ; G = Glucose ; L = Galactose ; R = Rhamnose ;
 U = Acide galacturonique ; û = Galacturonate de méthyle ; a = acides aminés
 autres que la thyrosine ; y = Tyrosine ; yy = isodityrosine ; Ø = acide ferulique ;
 Ø:Ø = acide diferulique

Figure 16: Modèle représentatif des interconnexions des polysaccharides végétaux d'après Fry (1986).

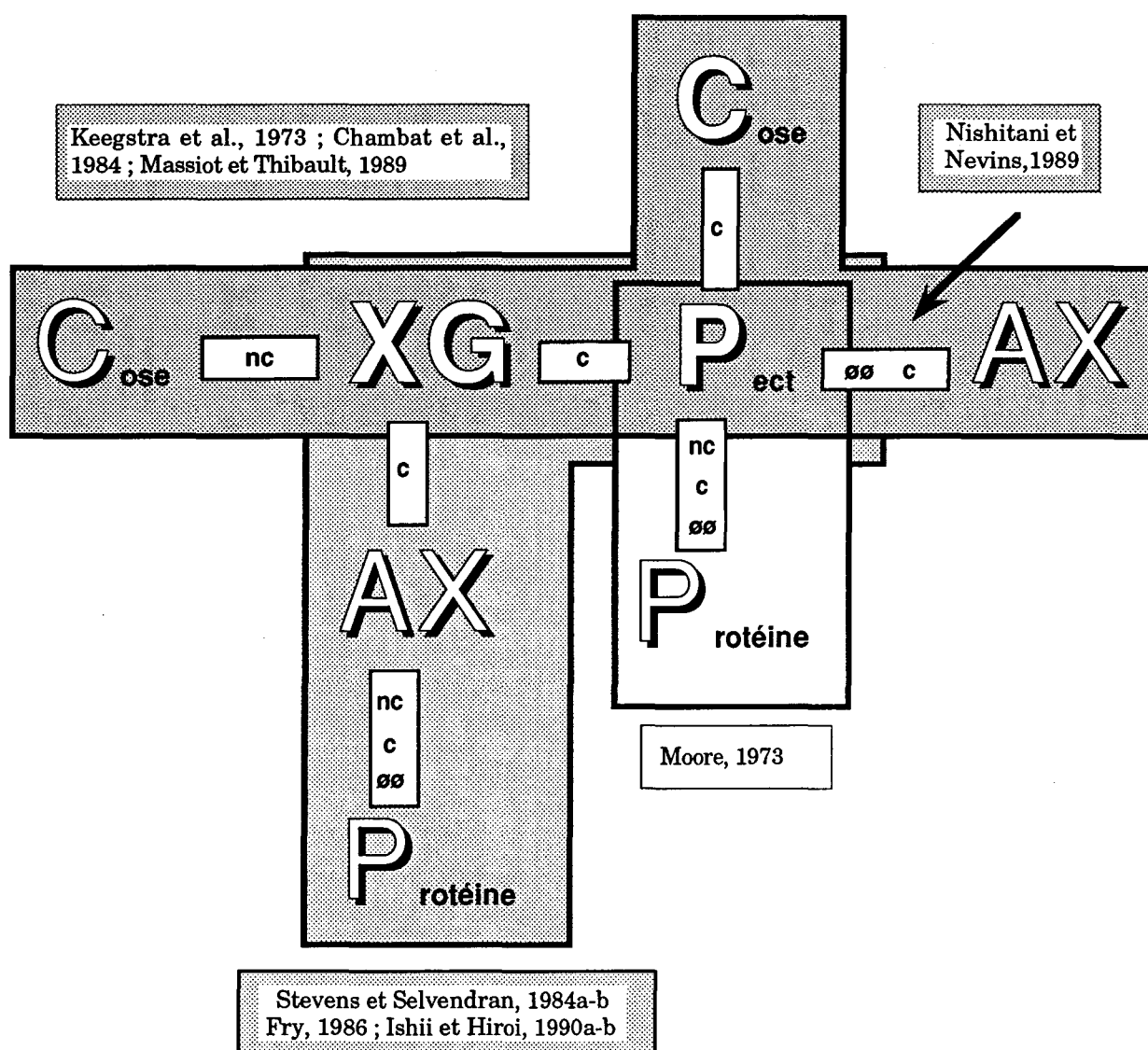


Figure 17 : Représentation schématique des associations interpolysaccharidiques possibles d'après les auteurs cités.

Cose : Cellulose

XG : Xyloglucane

Pect : Pectines

AX : Arabinoxylane ;

nc : Liaisons non covalentes (hydrogène, ionique, ...)

c : liaisons covalentes (Glycosidique, ester, éther)

øø : Couplage oxydatif (Diféruilique, Isodityrosine, ...)

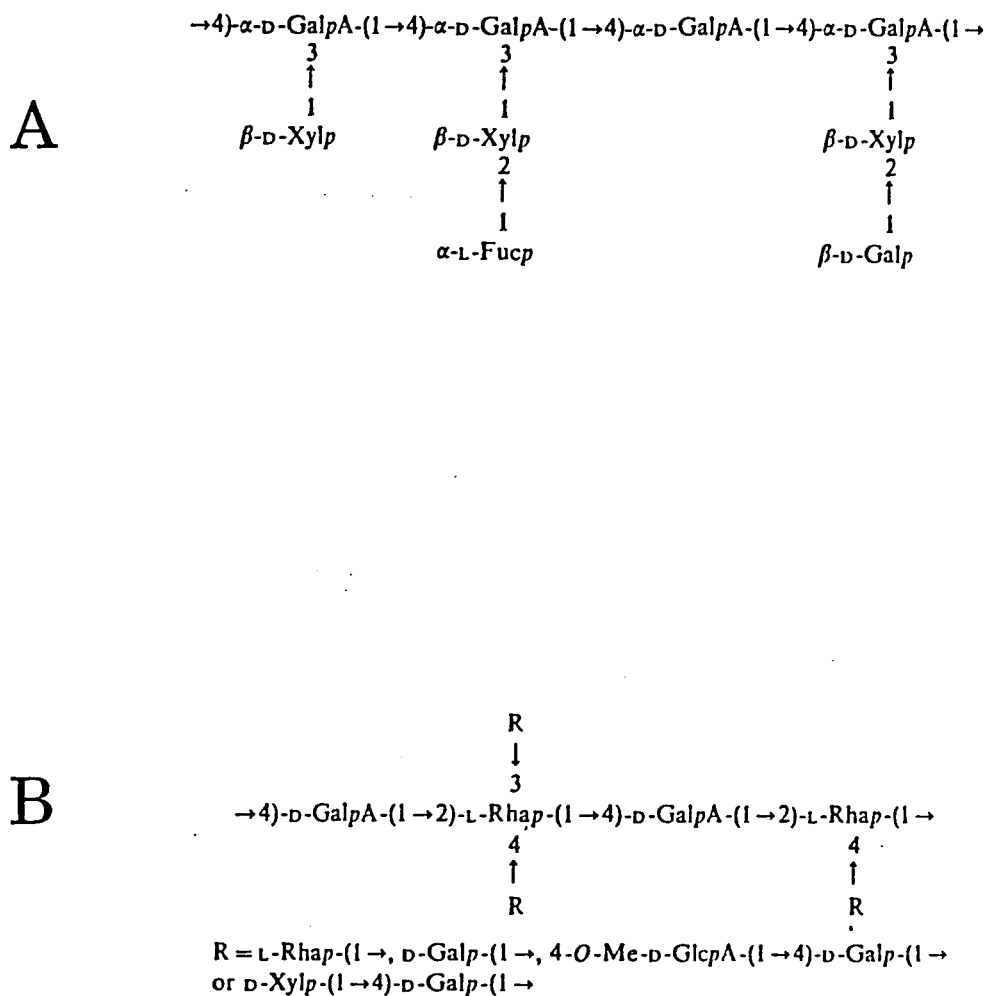


Figure 18 : Structures de gomme (A) et de mucilages (B) de type acide

A : Chaîne principale homogalacturonique (gomme tragacanth)

B : Chaîne principale rhamnogalacturonique (R : mucilage de graines de cresson) ;

R_1 : $\beta\text{-D-GlcpA}-(1 \rightarrow$, de racines d'*Abelmoschus mamilot*, Tomoda et al., 1979 ;

R_1 : $3\text{-O-Me-D-Galp}-(1 \rightarrow 4)\text{-D-Galp}-(1 \rightarrow$, d'écorce d'orme)

D'après Kennedy et White (1988b)

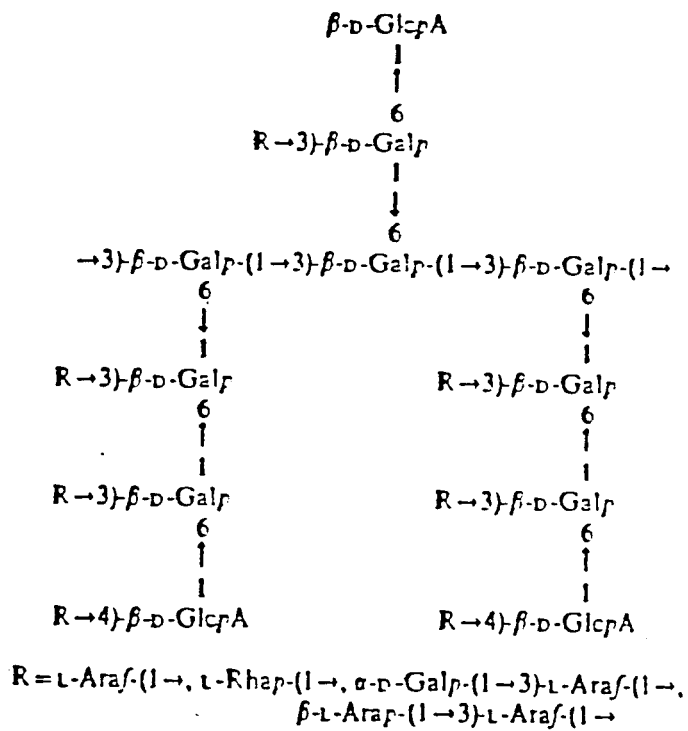
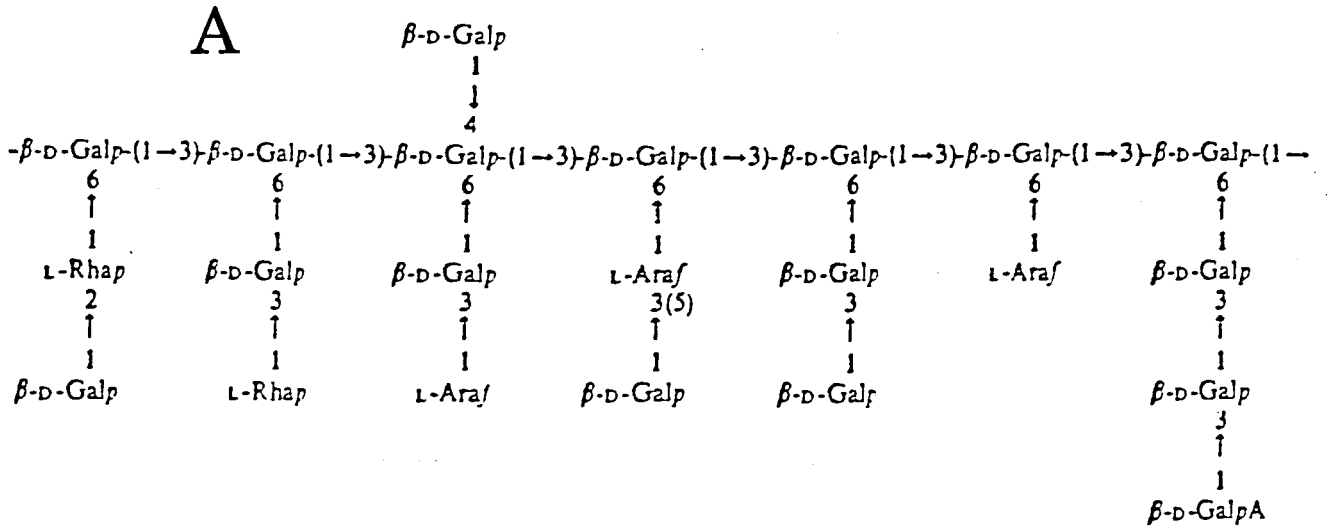


Figure 19: Structure de gommes de type arabino-3,6-galactane

A: d'*Aegle marmelos* (Roy et al., 1977)

B: Gomme arabique d'*Acacia*

D'après Kennedy et White (1988b)

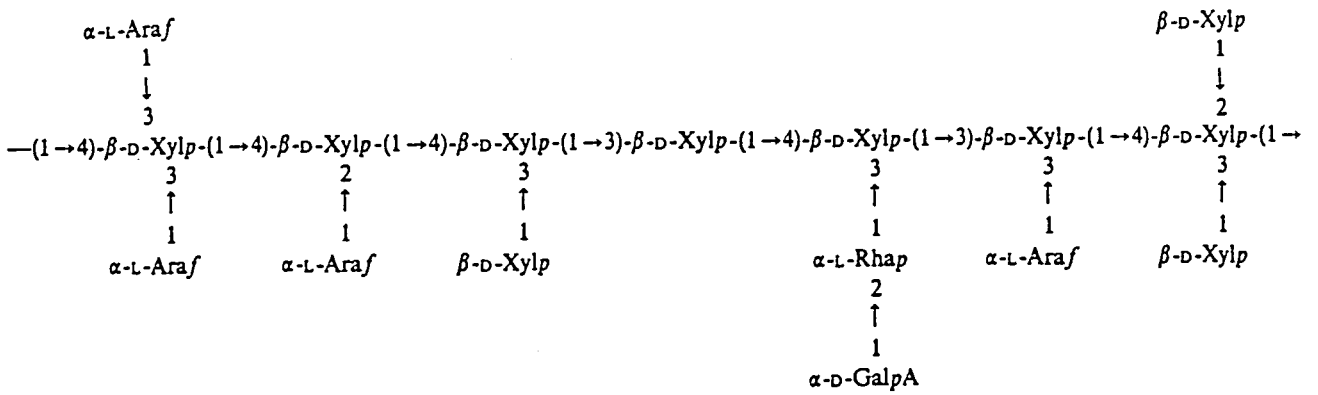


Figure 20 : Structure de type xylane complexe de mucilage de *Plantago ovata* Forsk

La chaîne principale est faite de mélange de liaisons $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)}$ et $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{3)}$

Présence de chaînes latérales mixtes dont une est le motif de la rhamnogalacturonane. D'après Kennedy et White (1988b).

Ils sont utilisés pour leurs propriétés physico-chimiques et biologiques en industries agro-alimentaire, pharmaceutique et scientifique, que l'on inclut actuellement dans le terme de "Biotechnologie". Cependant, ils sont fortement concurrencés par les exopolysaccharides bactériens tel la gomme xanthane en industrie alimentaire.

Il serait trop long d'énumérer toutes les applications possibles des polysaccharides végétaux et leurs dérivés (Sturgeon, 1988 ; White et Kennedy, 1988c). Toutefois, les quelques tendances actuelles et futures de la recherche sur leur fonction biologique, seront citées. Ainsi, ils sont étudiés pour leurs diverses activités: anti-tumorale, anticoagulante, immunologique, anti-complémentaire, anti-inflammatoire, hypoglycémique, anti-virale (Srivastava et Kulshreshtha, 1989) et activateur du système réticuloendothélial (Kanari et al., 1989).

III- METHODES D'ETUDE DES POLYSACCHARIDES VEGETAUX

L'étude des polysaccharides végétaux fait appel aux mêmes techniques que celles utilisées pour toutes les substances à composants glucidiques. Elles ne sont modifiées que pour les adapter à la nature du matériel et à la finalité de l'étude. Généralement, elles se répartissent en deux catégories: les méthodes (bio)chimiques et physiques, et les méthodes biologiques et biotechnologiques.

A.- Méthodes (bio)chimiques et physiques

1 - Obtention des fractions glucidiques

Les techniques employées ont pour but d'extraire et de purifier, au mieux de leur état natif, les polysaccharides. Cette étape tient une grande importance dans l'étude des polysaccharides végétaux car son choix définit la nature de la fraction glucidique. Elle est souvent soumise aux divergences entre méthodes drastiques, douces et conservatives.

Mais la plupart du temps, on ne peut éviter les moyens drastiques tout en limitant la modification des polymères pour les rendre solubles, condition *sine qua non* de toute purification basée sur la solubilité (Fry, 1988). De ce point de vue, les milieux de culture permettent l'utilisation de réactifs peu destructifs à température basse pour solubiliser ; l'extraction repose sur la solubilité ou la précipitation du composé vis-à-vis d'un réactif ajouté (sels, chélatants, solvants organiques).

a)- Sels, acides, bases, chélatants et substances organiques

Ces produits vont servir à extraire et à solubiliser les polysaccharides. Mais l'extractibilité (capacité ou sensibilité d'une molécule à l'extraction) d'un polymère ne signifie pas forcément qu'il soit hydrosoluble. Aucun réactif servant à l'extraction est parfait (Fry, 1988). Ainsi pour solubiliser, on doit employer diverses substances telles les sels (NaCl, LiCl₂, acétates, succinates,...), les acides et les bases (H₃BO₃, NaOH et KOH,...), les chélatants (CDTA,...), et les réactifs organiques (urée, DMSO, MMNO,...).

Actuellement, on utilise des systèmes de solvants aqueux, comme LiCl₂/2-méthoxyéthanol (Clarke, 1983) et LiCl₂/Diméthylacétamide (Lloyd et al., 1990). Ils constituent une alternative à l'extraction par des réactifs minéraux et par des enzymes (Fry, 1988 ; White et Kennedy, 1988).

Les sels et les tampons aqueux (NaCl, LiCl₂, Phosphates, Carbonates, Acétates, Succinates, HEPES, Tris/HCl, ...), en général, servent à maintenir la solubilité des polysaccharides pour qu'ils puissent être traités par les méthodes de fractionnement. L'utilisation du pouvoir tampon de certaines substances aqueuses est nécessaire, comme l'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine-éthanesulfonique) et le Tris/HCl, pour prévenir toutes modifications d'origine exogène et endogène. Des substances antimicrobiennes peuvent être ajoutées, comme l'azoture de sodium à 0,5%, le chlorbutol à 0,5%, ou le tymerosal 0,2%. Cependant, il faudra tenir compte de la compatibilité de ces réactifs avec les méthodes d'analyse utilisées. L'azoture de sodium interfère avec le dosage au m-hydroxydiphényl (Thibault, 1979).

Les acides tels que l'acide acétique ou l'acide borique, contribuent à l'extraction et à la solubilité des polysaccharides. En effet, l'acide borique est nécessaire à l'extraction des hémicelluloses à mannoses (mannanes) par la potasse (Thornber et Northcote, 1962).

Quant aux alcalis, soude et potasse en général, ils sont efficaces pour extraire les hémicelluloses et certains polysaccharides pectiques résistants aux chélatants. Il est possible de procéder à l'extraction graduelle avec ces réactifs (Carpita, 1984). Leur action est due à la fois à leurs effets chaotropique et destructif: coupure des liaisons esters, des liaisons O-glycopeptidiques, et β -élimination récurrente de certains polysaccharides réducteurs ou acides que l'on peut éviter en y ajoutant un agent réducteur, le NaBH₄.

Actuellement, on utilise le cadoxen, très basique et puissant, un mélange de 1,2-diaminoéthane et d'oxyde de cadmium, qui solubilise ou complexe la cellulose (Fry, 1988).

Par ailleurs, les agents chélatants (oxalates, EDTA(Na)₂, CDTA, ...) vont agir en complexant principalement les ions calcium. Le CDTA (acide 1,2-cyclohexylènedinitrilotétra-

acétique) est actuellement le plus utilisé (Jarvis, 1982). Ils servent à extraire et solubiliser graduellement les fractions pectiques. Les effets varient selon les types cellulaires: plus de 50 % d'extraction dans les tissus des fruits, de 20 à 50 % dans les tissus végétatifs des plantes entières, et moins de 10 % dans les cultures tissulaires (Fry, 1988). Il est improbable que des effets secondaires (modifications, dégradations) se produisent en utilisant ces réactifs à température ambiante. Mais les traitements prolongés dans ces conditions permettraient aux enzymes endogènes d'agir, provoquant des modifications qui ne sont pas en relation avec la chélation du calcium. Le formiate donne les mêmes résultats dans les conditions identiques (Fry, 1988). Cependant ils ne suffisent pas à extraire tous les polysaccharides acides.

De plus, les agents chaotropiques aqueux (urée, éthylèneglycol, thiocyanate de guanidine, DMSO, MMNO = [Méthylmorpholino-N-oxide], ...), sont des puissants agents d'extraction des polysaccharides neutres, et même de la cellulose. L'urée (8 M) solubilise et dénature les protéines, extrait peu de polysaccharides, et devient très basique à chaud. Le DMSO est un solvant général des polymères neutres (amidon, cellulose, hémicelluloses). Et le thiocyanate de guanidine (5,5 M) est efficace pour les polymères à mannose (mannanes). Tandis que le MMNO, le plus puissant, est habituellement utilisé pour extraire la cellulose (Joseleau et al., 1980 ; Chanzy et al., 1982 ; Chambat et al., 1984). Il est peu efficace pour les polymères acides. Utilisé entre 85°C et 120°C, il peut modifier la cellulose (Joseleau et al., 1980). Un exemple d'extraction séquentielle des polysaccharides de parois primaires est proposé par Fry (1988): DMSO, CDTA, Urée, Thiocyanate de guanidine, soude, soude/H₃BO₃ ; jusqu'à l'étape de la soude, la dégradation est minimale. Le résidu final correspondrait à la fraction cellulosique contenant quelques pectines résistantes et des hémicelluloses, et de l'extensine qui sont associées à la cellulose. (Selvendran et Ryden, 1990).

Enfin, l'utilisation des réactifs de précipitation, les alcools (éthanol), l'iode, le sel de cuivre et les ammonium quaternaires (CTAB), constitue le début du fractionnement. L'éthanol, sélectif sur la taille moléculaire et la charge, est souvent utilisé à raison de trois volumes ou à 70%. Par contre, le cuivre et le CTAB (= cetyltriméthylammoniumbromide) ne précipitent que les polymères anioniques, pectines et protéines. Et l'iode se complexe avec les hémicelluloses (Gaillard, 1965). Renard et al. (1990) montrent un exemple d'extraction chimique de pectines insolubles au CDTA.

Il convient de citer la dialyse qui est une technique indispensable pour changer aisément de tampon ou enlever les sels des fractions extraites. Son principe repose sur la différence de taille moléculaire, elle laisse passer les petites molécules vers le milieu de faible pression osmotique ou de force ionique. Mais certaines substances organiques, même de faible taille moléculaire, ne sont pas enlevées par dialyse.

b)- Méthodes chromatographiques

Elles constituent l'étape principale de fractionnement basée sur les différences de charges et de tailles moléculaires. Elles reposent sur deux modes: la chromatographie échangeuses d'ions et celle d'exclusion moléculaire ou stérique. Les polymères sont généralement séparés selon leur charge, et ensuite, selon leur masse moléculaire. Le fractionnement est amélioré par le bon choix de la matrice des gels chromatographiques qu'on doit utiliser dans les conditions physico-chimiques adaptées (molarité, force ionique et pH des tampons), mais aussi, par l'agencement judicieux des diverses techniques chromatographiques existantes, parmi lesquelles, la chromatographie liquide sur couche mince de silice (CCM), la chromatographie liquide sur papier, la chromatographie liquide sur colonne basse pression, la chromatographie liquide à haute pression (CLHP) et la CLHP préparative.

Le DEAE-trisacryl donne de bons résultats sur les extraits pectiques par le CDTA et le Na_2CO_3 (Redgwell et Selvendran, 1986). Il en est de même pour les gels tels que le DEAE-Sephadex A-25 et 50, le DEAE-Sephacel. L'arabinane pectique qui contamine la xyloglucane a été mieux séparée sur une colonne de cellulose, en application de l'affinité entre ces deux derniers polymères (O'Neill et Selvendran, 1985). Il existe aussi d'autres matrices, les résines qui sont des échangeuses d'ions relativement fortes.

Les gels de Sephadex (G10 à G200), de Bio-gel (P2, P4 et P6), de Séphacryl (S200, S300, S500), d'Agarose (Aca1.5m,...), de cellulose (CL2B, CL4B,...), ... vont être utilisés pour la chromatographie d'exclusion moléculaire. Des gels récents à base de polystyrène divinylbenzène, comme la série HW-40, 55, 65, 75, vont servir à séparer les polysaccharides selon leur taille moléculaire et leur interaction stérique avec cette matrice. Ces gels sont équilibrés dans un tampon aqueux. Cette technique chromatographique sert aussi à dessaler les fractions extraites. Les Séphadex LH-20 et LH-60 sont des gels hydrophobes qui servent à séparer les glucides conjugués à des dérivés organiques (phénoliques et précurseurs de lignine) (Azuma, 1989).

Enfin, le dosage des substituants méthyles et acétyles est fait par CLHP avec une colonne Aminex HPX-87H (Voragen et al., 1986). En outre, les techniques électrophorétiques complètent toutes ces méthodes.

c)- Electrophorèse et Ultracentrifugation

L'électrophorèse est basée sur la séparation en fonction des charges des oligosaccharides ou de certains polysaccharides fortement chargés, dans un champ électrique. Le support papier est préféré pour purifier des oligosaccharides tandis que les supports en agarose ou en polyacrylamide servent à déterminer les masses moléculaires des polymères glucidiques chargés et les protéines.

L'utilisation de la centrifugation isopicnique au chlorure de césium ou au trifluoroacétate de césium, permet de classer les polysaccharides en fonction de leur densité (Fry, 1988). Seymour et Harding (1987) utilisent la méthode de sédimentation à l'équilibre à faible vitesse pour analyser les tailles moléculaires des polyuronides de fruits de tomate qui les ont conduit à mettre en évidence une baisse moyenne de 50 000Da, jusqu'à la maturation.

2 - Analyse des fractions homogènes

a)- Méthodes spectrophotométriques

Le dosage dit colorimétrique est la principale utilisation de ces méthodes, employant des longueurs d'onde (λ du visible vers les ultraviolets (UV)). Le principe est basé sur l'absorption des molécules qui en sont capables. Pour les autres, elles doivent être préalablement converties en dérivés capables d'absorber dans ces domaines. C'est le cas des dosages de glucides pour lesquels, on doit obtenir par hydrolyse les dérivés furfurals capables de se conjuguer aux chromogènes (phénol, orcinol, m-hydroxydiphényle,...) pour former des chromophores de couleurs variables selon la nature de l'ose. On note alors plusieurs méthodes sensibles à la nature des oses (pentoses, hexoses, acides uroniques. En général, on utilise deux types, le dosage des oses totaux ou neutres (Phénol, Orcinol, Anthrone) et celui des acides uroniques (Carbazol et m-hydroxydiphényle). Actuellement, la méthode de Blumentkranz et Asboe (1973) (m-OHdiphényle ou MHDP) est la plus utilisée pour sa spécificité.

De plus, la pratique de correction des interférences entre les diverses méthodes, amène à choisir un couple de techniques, comme le Carbazol-Orcinol, sur lequel la méthode de correction a été établie par Montreuil et Spik (1963). Le même principe est adopté pour le MHDP-Orcinol. Les méthodes à l'antrone et au phénol sont pratiques par leur sensibilité générale et leur rapidité d'exécution, ce qui permet d'effectuer des tests et des profils d'élution chromatographique.

Par ailleurs, le pouvoir réducteur des glucides est déterminé par la méthode de Nelson-Somogyi

(1952) ou par celle à l'acide *p*-hydroxybenzoïque hydrazide (PAHBAH) de Lever (1972).

Enfin, l'absorption dans le domaine de l'ultraviolet est utilisée pour des polysaccharides natifs afin de déceler la présence de protéines (280 nm) et de dérivés phénoliques. Ces derniers sont détectés par leur effet bathochromique entre leur forme acide (325nm à pH 4,0) et basique (370nm à pH 10,0). L'analyse peut se faire directement sur des solutions aqueuses en utilisant des coefficients d'extinction molaire : 22900 à 325nm (Guillon et Thibault, 1989) ; 31600 à 370-375nm (Fry, 1982a). Un spectre total est généralement nécessaire pour obtenir les longueurs d'onde maximales. Les protéines sont dosées par des méthodes colorimétriques: méthode de Lowry (1951) et celle de Bradford (1976).

Toutes ces méthodes sont sensibles aux interférences des sels ou toutes autres réactifs (Thibault, 1979 ; Fry, 1988). L'azoture de sodium inhibe totalement le développement de la coloration dans la méthode au MHDP (Thibault, 1979).

b)- Méthodes analytiques

Cette étape a pour but d'analyser les compositions en monosaccharides, en acides aminés et en substances phénoliques, des fractions glucidiques obtenues par extraction et fractionnement. Pour cela, la coupure (hydrolyse et méthanolyse) totale et quantitative des polymères doit être obtenue. Les méthodes chromatographiques vont aussi permettre ces analyses: la chromatographie sur couche mince de silice, l'électrophorèse descendante sur papier, le CLHP, et la chromatographie liquide gaz (Albersheim et al., 1967 et McNeil et al., 1982). Pour obtenir des données quantitatives, les deux dernières techniques sont les plus adaptées ; car elles fournissent des valeurs reproductibles et constantes.

L'analyse par CLHP nécessite des colonnes capables de séparer les composants glucidiques, protéiques et organiques. Actuellement, les colonnes existantes (silice greffée C18, NH₂,...) satisfont ces besoins.

Quant à la CLG, son principe repose sur le partage des états liquide et gaz d'une substance entre la phase liquide, greffée dans une colonne capillaire de silice, et le gaz vecteur. Pour cela, il faut rendre volatiles les composants de l'hydrolysate ou du méthanolysate en leur greffant des radicaux acétyl (acétylation), triméthylsilyl (triméthylsilylation: TMS), trifluoroacétyl (trifluoroacétylation). Les méthodes les plus utilisées sont celles de Sawardeker et al. (1965) et de Jones et Albersheim (1972) pour la préparation des dérivés acétates d'alditol (AA), et celle de Sweeley (1966) pour les dérivés triméthylsilylés (TMS), bien que d'autres méthodes existent : les aldononitriles et les cetoximes peracétylés (Seymour et al., 1989), les trifluoroacétyles (Clamp et

al., 1971). Il convient généralement de procéder à l'étalonnage du dispositif chromatographique en établissant les coefficients de correction relatifs aux dérivés analysés (Clamp et al., 1971). Hämäläinen et al. (1990) ont récemment appliqué une technique de calibration dans la détermination des aldoses acétylés.

Jusque-là, on travaille sur le matériel intact afin de pouvoir vérifier son homogénéité et sa pureté, et de l'identifier pour le classer.

3 - Détermination partielle ou totale de la séquence structurale primaire

Beaucoup de procédés sont utilisés pour l'étude de la structure primaire des polysaccharides.

a)- Méthylation, Spectrométrie de masse, Résonance magnétique nucléaire

Ils permettent la connaissance des liaisons glycosidiques des oses constitutifs, et renseignent sur la forme et la conformation du polysaccharide.

α)- Méthylation

La méthylation consiste à substituer par des méthoxyles tous les groupes hydroxyles des polysaccharides et des composés organiques. La méthode de référence est celle de Hakomori (1964) qui utilise l'hydrure de sodium et le DMSO pour obtenir la base de méthylation, le méthylsulphinyll carbanion sodium ($\text{CH}_3\text{-SO-CH}_2^- \text{Na}^+$) qui catalyse l'ionisation des groupes hydroxyl nécessaire à la réaction de l'iodure de méthyl, l'agent de méthylation.

Depuis, d'autres procédés existent pour l'adapter aux molécules qui ne conviennent pas à celle de Hakomori. C'est le cas des méthodes de Paz Parente et al. (1985) et de Blakeney et Stone (1985) qui utilisent le carbanion lithium préparé à partir du butyllithium. Prhem (1980) utilise le méthyl trifluorométhane-sulfonate/triméthylphosphate, et Ciucanu et Kerek (1984) qui ajoute de la soude en poudre et l'iodure de méthyl aux polysaccharides dissous dans le DMSO. Cette dernière méthode donne un minimum de dégradation pour les polysaccharides à acides uroniques, si l'iodure de méthyl est ajouté avant la base (Ciucanu et Luca, 1990). Cependant, York et al.(1990b) démontrent une oxydation du cellobioitol et d'un oligosaccharide de xyloglucane par la méthode de Ciucanu et Kerek (1984).

L'adaptation aux micro-analyses des oligosaccharides et des polysaccharides a été faite (Akiyama et Kato, 1982 ; Waeghe et al., 1983 ; Harris et al. 1984). En règle générale, on obtient deux types de dérivés, les méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés (MGPM) et les acétates d'alditol partiellement méthylés (AAPM), respectivement obtenus après méthanolyse et hydrolyse, suivies d'acétylation. La nomenclature des dérivés obtenus se réfère à Kochetkov et Chizhov (1966). Cependant, des précautions doivent être prises pour éviter la β -élimination par le carbanion (Aspinall et Rosell, 1977 ; McNeil et al., 1980), et la méthylation incomplète. La première survient lors d'une réaction de méthylation prolongée de polysaccharides acides, en présence d'excès de carbanion, de DMSO, et d'acides uroniques liés en O-4 (Fig. 21). Ceci a pour conséquence, la perte des résidus rhamnosyles de la RG I qui ne sont pas observés en analyse (McNeil et al., 1980). Par contre, la prévention de la méthylation incomplète consiste à effectuer une deuxième ou troisième méthylation, identique à la précédente ou différente, tel le procédé à l'oxyde d'argent et d'iodure de méthyle.

Par ailleurs, on peut utiliser un autre alkylant, l'iodure d'éthyle ($I-C_2H_5$), pour mettre en évidence les oses méthylés natifs (ou méthoxy-oses, methylethers) (Sweet et al., 1975a) et les acides uroniques (McNeil et al., 1982). Ces mêmes auteurs (1975b) ont établi les facteurs de réponses E.C.R. (Effective Carbon Response) des différents dérivés acétates d'alditol partiellement méthylés ou éthylés.

Le couplage à un spectromètre de masse est indispensable pour déterminer la nature des dérivés et pouvoir les comparer à des références établies, comme celles de Jansson et al. (1976) dans le cas des AAPM ou de Hannessian (1971) pour la majorité de dérivés..

β - Spectrométrie de masse

Cette technique n'est possible que sur des molécules de masse moléculaire faible jusqu'à 1000-1500 D, selon le modèle de l'instrument. Il est indispensable de coupler la spectrométrie de masse à la CLG ou à la CLHP (McNeil et al., 1982) pour détecter les produits qui en sortent. L'ouvrage de Hannessian (1971) est indispensable comme référence en matière de détermination de nouvelles molécules.

Son principe repose sur la séparation des ions moléculaires par leur masse (m/z), à travers un champ électrique d'accélération et d'un champ magnétique de séparation. Ainsi, l'ionisation moléculaire préalable se fait avec ou sans fragmentation selon les informations recherchées. La fragmentation moléculaire, obtenue par impact électronique (IE), permet d'analyser la structure selon la sélectivité de la fragmentation.

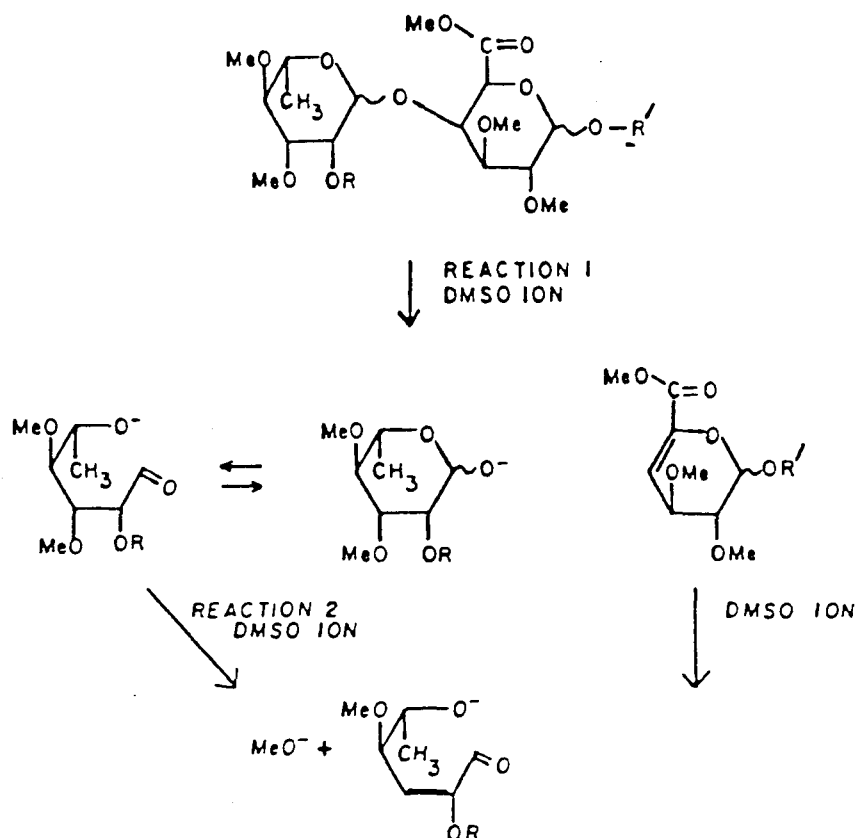


Figure 21 : Dégradation alcaline par le méthylsulphinyl carbanion sur le motif rhamnogalacturonane.

Séquence réactionnelle d'identification des résidus liés glycosidiquement en O-4 des résidus galacturonosyles. Le produit final n'est pas détecté par l'analyse en C.L.G. utilisée. Par conséquent, les résidu glycosyles attachés en O-4 des acides uroniques sont identifiés par leur disparition après le traitement au carbanion. R et R' sont des résidus glycosidiques non spécifiés. D'après McNeil et al. (1980).

En effet, dans l'analyse des dérivés (TMS, MGPM, AAPM ou acétates d'alditol d'oses méthylés natifs, ...), elle est préférentielle entre deux atomes de carbones visinaux portant des radicaux méthoxyl (Hannessian, 1971 ; Jansson et al., 1976).

L'ionisation sans fragmentation est obtenue par l'utilisation de gaz ou d'atomes. L'ionisation par un gaz (NH_3), l'ionisation chimique, donnent des masses ioniques (m/z) qui correspondent à $(M+\text{NH}_4)^+$ où M est la masse moléculaire de l'échantillon analysé, et coupent certaines liaisons très labiles (Horton et al., 1974).

Le bombardement par un atome (Argon, Xénon, Césium) accéléré (Fast atom bombardment : FAB), est utilisé en mode d'ionisation positive ou négative. La molécule sera chargée positivement ou négativement, et sa fragmentation sera différente. En effet, l'analyse d'un octasaccharide de xyloglucane (York et al., 1990a) montre que le mode négatif donne une fragmentation entre le carbone 4 (C-4) et l'oxygène 1 (O-1) qui se traduit par la stabilisation des ions (oxanion/oxonium) du côté du carbone terminal auquel est lié le O-1 (Fig. 22A). A l'inverse, le second mode d'ionisation montre une coupure de la liaison O-1→C-4 qui donne des ions stabilisés en O-1 (Fig. 22B). Les molécules acides, comme celles à acides uroniques, répondent mieux au mode négatif.

Enfin, la chromatographie liquide gaz à haute température (CLG-HT) permet d'étendre l'analyse aux oligosaccharides plus lourds après dérivation (réduction et perméthylation). Il en va de même de la chromatographie supercritique qui utilise le dioxyde de carbone liquide comme vecteur et de la pyrolyse.

γ)- Résonance magnétique nucléaire

Généralement, le spectre monodimensionnel de ^{13}C -RMN ne fournit que les informations relatives aux carbones anomériques des constituants glycosyles et par voie de conséquence, les carbones ($-\text{CH}_2\text{-OH}$), ($-\text{CH-OH}$) et ($-\text{C-OH}$) sur lesquels sont liés ces C-1. la faible résolution des spectres rend difficile l'attribution des signaux à l'exception de ceux cités ci-dessus.

Ceci est d'autant plus vrai que le polymère analysé est complexe. La résolution est, par ailleurs, dépendante de la puissance du champ de l'instrument de mesure. Toutefois, les performances actuelles des appareils de mesure permettent l'obtention de spectres de mieux en mieux résolus ce qui laisse espérer l'attribution des signaux ainsi distingués. Cette tentative s'appuie sur les données de la littérature (Tab.III) en tenant compte des différences de conditions de mesure qui dépendent des paramètres suivants:

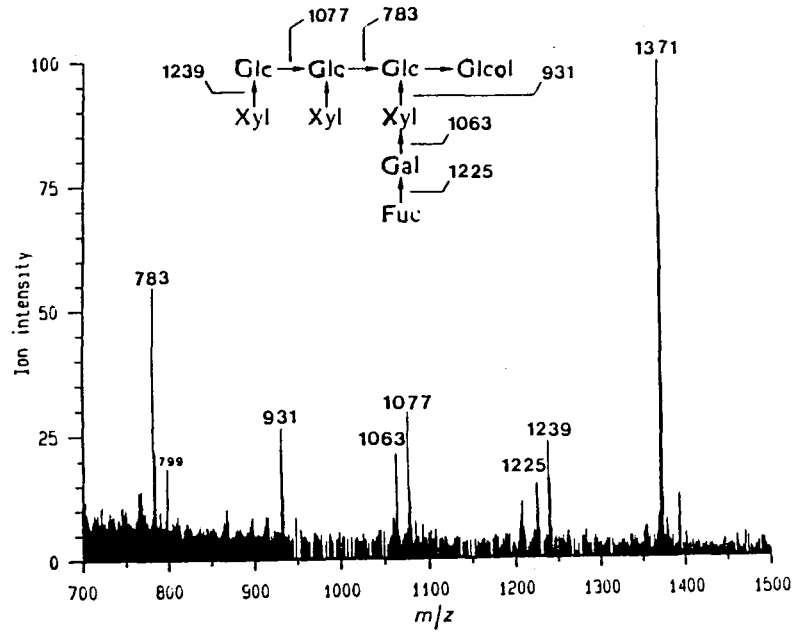
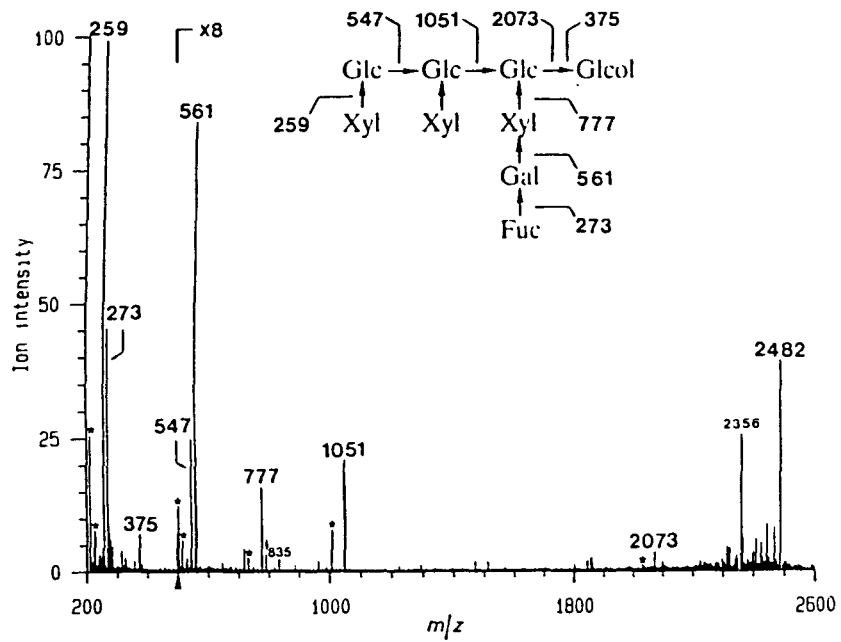
A**B**

Figure 22 : Présentation de la différence de mode d'ionisation en F.A.B.-MS

A: Fragmentation en mode d'ionisation négative

B: Fragmentation en mode d'ionisation positive

D'après York et al. (1990)

Tableau III : Listes des références RMN ^{13}C

Références	Echantillons	Conditions
Sen et al. (1992).	4-O-methyl-glucurono-arabinogalactanes	D ₂ O ; acétone; température ambiante.
Seymour et al. (1990)	(4-O-Me-Glc)AG II	D ₂ O ; acétone ; température: 55°C, temps d'aquisition 0,66s ; 100,4 MHz.
Valrjen et al. (1989)	Rhamnoarabino-galactanes II	D ₂ O ; 20,15 MHz
Saulnier (1987), Thèse.	Arabinogalactanes II pectique	D ₂ O ; température 80°C ; 25,18 MHz
Saulnier et al. (1992)	Arabinogalactanes II proteique	D ₂ O ; DMSO ; température 60°C; temps d'aquisition: 1,11s ; 100,57MHz
Cartier(1986), thèse; Cartier et al. (1987)	Arabinogalactanes II	DMSO, température 85°C, 75,46 MHz
De Pinto (1991)	Gomme accacia	D ₂ O ; 1,4 dioxane (relatif au tetraméthylsilane: Me ₄ Si); température: 36°C
Schols et al. (1990)	zone chevelu de polysaccharide pectiques de jus de pomme.	D ₂ O ; acétone (relatif au Me ₄ Si), température: 90°C, temps d'aquisition: 1,11s ; 100,4 MHz
Hervé Du Penhoat et al. (1987)	Arabinanes	D ₂ O ; DMSO ; température: 70°C, temps d'aquisition: 1,11s ;
Colquhoun et al. (1990)	Oligo RGI	D ₂ O ; acétone (relatif au Me ₄ Si), température: 24°C ; 100,4 MHz
Manzi A.E. et Cerezo A.S., 1984	Galactomannane	D ₂ O ; température: 25°C
Hoffmann et al. (1992)	Arabinoxylanes	D ₂ O ; température: 70°C ; 75 MHz
Joseleau et al., 1977	Arabinanes	D ₂ O ; Me ₄ Si ; température:90°C; 62,86 MHz

- la substance de calibrage du zéro de l'instrument est souvent le tétraméthylsilane (Me_4Si) ou le sodium 2,2',3,3'-tétradeutério-3 (triméthylsilyl) propionate (T.S.P.) dont la différence par rapport au Me_4Si est de + 1,55 ppm (Joseleau et al., 1977).

- le témoin interne ou externe (DMSO, acétone,...) sert à contrôler la stabilité du zéro.

- la température de l'analyse influence la qualité de résonance des carbones, c'est-à-dire le déplacement des signaux vers le bas champ en fonction de l'augmentation de la température.

- des paramètres d'acquisition, tels que le temps d'acquisition, la durée, l'angle des champs de force, etc...

- et enfin, le solvant, qui est généralement du D_2O ou du DMSO, sert à solubiliser le produit. Du fait de son interaction avec les molécules analysées, le solvant induit des variations du déplacement chimique.

Comme exemple, les spectres ^{13}C -RMN d'oligosaccharides substitués par des composés phénoliques comme le diféruloyl-hexasaccharide d'arabinoxylanes (Fig. 23A) et le féruloyldisaccharide de xyloglucane (Fig. 23B) montrent des signaux caractéristiques des dérivés phénoliques et des glucides qu'ils substituent. Ces spectres et les valeurs de déplacement chimique décrits dans le tableau IV servent de référence pour la détermination de tel motif structural.

TABLEAU IV : Attribution des signaux des spectres obtenus en ^{13}C -RMN^a

Composés	déplacement chimique (ppm) ^b									
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	OCH3
α -L-Arabinose	109,52	82,58	78,13	82,29	66,22					
β -D-Xylose	102,96	73,84	83,24	69,06	64,21					
α -D-Xylose	93,22	72,18 ^c	72,60 ^c	77,87	60,08					
β -D-Xylose	97,73	75,20 ^d	75,16 ^d	77,71	65,37					
Acide diférulique	127,26	109,52	148,36	148,89	125,36	126,36	146,60	116,65	169,78	56,95

^aDans D_2O à 27°. ^b Valeurs des déplacements chimiques relatifs au CD_3OD (49,30 ppm). ^{c,d} Les attributions sont peut-être inversées (Ishii et Hiroi, 1990 b).

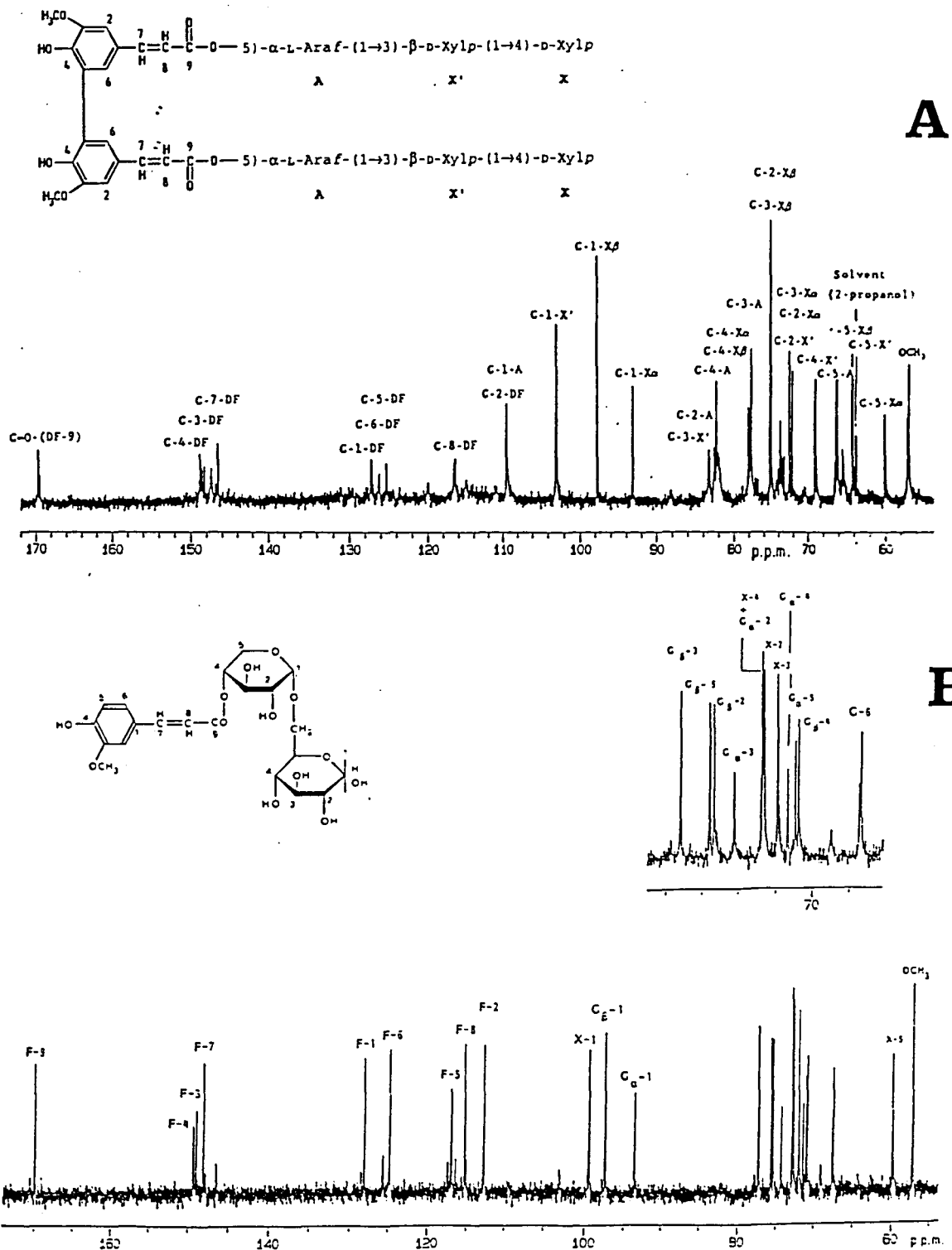


Figure 23 : Spectres ^{13}C -RMN d'oligosaccharides portant des acides phénoliques isolés de parois cellulaires de bambou.

A: Diféruloylhexasaccharide d'arabinoxylane (Ishii, 1991)

B: Féruloyldisaccharide de xyloglucane (Ishii et Hiroi, 1990).

b)-Hydrolyse

C'est le procédé qui est abordé d'emblée dans l'étude des polysaccharides car il permet de connaître les conditions optimales de l'hydrolyse totale nécessaire aux dosages. Il est basé sur la différence de sensibilité des liaisons glycosidiques existantes, aux conditions d'hydrolyse (Montreuil et Spik, 1968 ; Aspinall et Rosell, 1977). Généralement, la démarche consiste à effectuer des cinétiques d'hydrolyse en variant l'un des paramètres suivants: la nature et la concentration d'acide, la durée, et la température pour une même quantité de polysaccharide. Certains acides ont des effets quasi-spécifiques, l'acide oxalique est capable de couper uniquement les résidus arabinosyles latéraux des polysaccharides pectiques. En règle générale, la résistance à l'hydrolyse augmente des pentoses vers les acides uroniques, et selon le type de liaison (Montreuil et Spik, 1968). L'addition de 1,1,3,3-tétraméthylurée stabilise les hydrolysats et permet une production constante d'oligomères (Narui et al., 1987).

Un exemple de ce procédé est le travail de Redgwell et al. (1986a) sur la glucuronomannane de fruit de kiwi (*Actinidia deliciosa*). La même caractéristique structurale a été retrouvée sur un polysaccharide extracellulaire de suspension cellulaire de tabac (Aspinall et al., 1989).

De même, appliquée aux polymères pectiques de betterave, l'hydrolyse acide douce ou partielle donne des résultats satisfaisants sur la détermination structurale (Guillon et Thibault, 1989).

Actuellement, la technique de solvolysse au fluorure d'hydrogène HF liquide anhydre est exploitée pour étudier les polysaccharides végétaux (Mort et al., 1988). Sa spécificité de coupure des liaisons glycosidiques, à basse température (entre -40°C et -23°C ; voir -1°C), qui laisse intactes les liaisons esters, a permis d'étudier la substitution par les groupes acétyle, succinyle et pyruvyl existant dans les polysaccharides bactériens (Mort et Bauer, 1982 ; Kuo et Mort, 1986).

c)-Oxydations périodique et chromique

L'oxydation périodique permet de connaître les zones de substitution tandis que l'oxydation chromique (Angyal et James, 1970 ; Lindberg et Lönngren, 1978) met en évidence l'anomérisation (α / axial ou β / équatorial) des liaisons glycosidiques.

α)- Oxydation périodique

Elle coupe la liaison entre deux atomes de carbone porteurs de groupes hydroxyl vicinaux en formant de fonction aldéhyde sur chaque carbone. Lors de la dégradation de Smith, après la réduction des aldéhydes, les liaisons acétaliques sont hydrolysées dans des conditions douces. Ensuite, l'analyse des produits d'oxydation (oligosaccharides et polysaccharides résistants) permet de déterminer la liaison et la position des régions ramifiées. Ainsi, cette méthode a permis d'obtenir des polysaccharides fortement branchés (Cartier et al., 1987). De même, la position des groupes acétyles sur le résidu galactosyle de la xyloglucane a été déterminée en appliquant cette méthode avant et après dé-estérification (York et al., 1988).

β)- Oxydation chromique

Elle s'applique sur un oligosaccharide et un polysaccharide préalablement réduits et peracétylés. L'acétylation incomplète induit une oxydation non spécifique des liaisons anomériques. Cette réaction provoque alors l'oxydation de l'ose lié en β , en 5-aldulose. Lors de la méthylation des fractions résistantes, on peut avoir une dégradation alcaline, par le carbanion, du substituant en O-3 du 5-aldulose. De plus, la réduction (NaBH_4 , ...) touche aussi bien les groupes carbonyl que les liaisons estercarboxyliques, et l'on doit en tenir compte. Enfin, la détermination des anomères se fait par l'analyse parallèle des fractions résistantes et du polysaccharide non traité, sous forme d'acétates d'alditol partiellement méthylés (AAPM) ou tout autre méthode d'analyse (Lindberg et Lönnngren, 1978).

d)- Dégradation alcaline

Elle ne se produit que sur deux types de polysaccharides :

- les polysaccharides liés en O-3 dont l'ose réducteur intact est au moins substitué en O-3 ;
- les polymères glucidiques contenant des acides uroniques méthylestérifiés substitués en O-4.

La réaction de β -élimination est faite généralement par la soude à température élevée (0,1M, 100°C; 1h à 24h ;etc) tandis que celle des polymères acides est aussi produite par d'autres bases telles le carbanion méthylsulphinyl de sodium. Elle provoque alors la coupure des liaisons (1→3) et (1→4). Ce processus peut aller jusqu'à la dégradation récurrente ("peeling") de l'échantillon étudié. L'ajout d'agents réducteurs (NaBH_4 ou NaBD_4 , ...) dans le milieu réactionnel permet d'éviter ce phénomène (Lindberg et al., 1973 ; Aspinall et Rosell, 1977 ;

Lindberg et Lönngren, 1978).

L'application de la dégradation alcaline en milieu réducteur (présence de réducteur) sur des polysaccharides pectiques (Kiyohara et Yamada, 1989) a permis la détermination d'oligosaccharides dont les oses réducteurs sont les résidus galactosyles et rhamnosyles, caractéristiques des chaînes latérales pectiques. Ces auteurs ont procédé par une méthylestérification préalable au diazométhane éther (Inoue et al., 1987) du polysaccharide. Pour maintenir les esters, nécessaires à la réussite de la réaction de β -élimination, celle-ci doit se faire dans des conditions anhydres.

e)- Dégradations spécifiques au niveau des acides uroniques

Ces réactions spécifiques des acides uroniques permettent alors de déterminer leur position dans la structure.

α)- Dégradation catalysée par une base

Comme il est dit ci-dessus, un polysaccharide méthylestérifié, qu'il soit perméthylé ou non, est dégradé par une base selon la réaction de β -élimination. C'est la base de méthylation, le carbanion, qui est utilisée sur le polysaccharide acide perméthylé dissous dans le DMSO. Cette réaction nécessite des conditions anhydres de façon à éviter la saponification qui induirait une sous-estimation de l'efficacité de la réaction. Cette dernière transforme l'acide uronique en acide hexa-4-énopyranosyluronique qui sera en position terminale (Lindberg et al., 1973 ; Aspinall et Rosell, 1977).

β)- Dégradation au lithium-éthylènediamine

Il a été démontré que le lithium métallique dissous dans l'éthylènediamine est capable de couper spécifiquement un polysaccharide contenant de l'acide galacturonique lié en O-3. L'ose attaché à l'acide devient alors en position terminale (Mort et Bauer, 1982). L'acide serait détruit. Albersheim et ses collaborateurs ont appliqué cette méthode aux polysaccharides végétaux. Ils ont montré qu'elle réduit les aldoses, et coupe les méthylglycosides, les méthyléthers et les acétals pyruviques des résidus glycosyles (Lau et al., 1987a). De plus, ces mêmes auteurs ont étudié la régions rhamnogalacturonane I de la paroi primaire de la cellule d'érable par cette technique. Ils ont pu isoler plusieurs oligosaccharides dont l'ose réducteur est le rhamnose, caractéristique des chaînes latérales pectiques (Lau et al., 1987b).

γ)- Coupure réductive (Gray, 1987)

C'est une méthode qui permet de connaître la configuration cyclique (furannique et pyruvique) des résidus glycosyles en même temps que les liaisons. Elle s'applique sur des polysaccharides méthylés selon deux méthodes:

- en présence de triméthylsilane et de triméthylsilyltrifluorométhane sulfonate ;
- avec le triméthylsilane et un mélange de triméthylsilylméthane sulfonate et d'éthérate de trifluorure de bore.

Les résidus furanosyle et pyranosyle sont transformés respectivement en 1,4-anhydroalditol et en 1,5-anhydroalditol. Cependant, les glycofuranes substitués en O-5 donnent aussi des 1,5-anhydroalditols par isomérisation induite par le triméthylsilyltrifluorométhane sulfonate (Gruber et Gray, 1990).

Enfin, on peut procéder, in situ, à l'acétylation ou bien à la benzylation pour analyser les anhydroalditols en CLG. Elle constitue donc une alternative aux méthodes de méthylation conventionnelles (méthanolyse et hydrolyse).

f)- Réduction des fonctions carboxyliques des polysaccharides acides

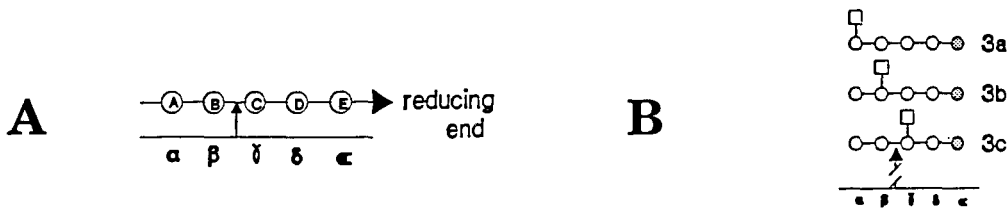
C'est une méthode non destructive qui permet de convertir les acides uroniques en leurs équivalents oses neutres, l'acide galacturonique en galactose et l'acide glucuronique en glucose. Il existe deux approches distinctes, celle de Taylor et Conrad (1972) sur les polysaccharides intacts et celle au LiAlH_4 ou LiBH_4 (Dutton, 1986) ou leurs dérivés deutériés, sur les polysaccharides méthylestérifiés ou perméthylés. La première utilise le couple carbodiimide/ NaBH_4 ou NaBD_4 à pH 7. Généralement, on procède en deux ou trois cycles pour arriver à 80-95 % de réduction.

La seconde dépend de la méthylestérification totale des acides uroniques que l'on peut obtenir de plusieurs façons sans dégradation majeure, à savoir la perméthylation directe sans β -élimination et la méthylestérification au méthanol-HCl dilué ou mieux au diazométhane (Fales et al, 1973).

B.- Méthodes biologiques et biotechnologiques

1 - Méthodes enzymatiques

Les glycosidases sont nécessaires pour étudier les polysaccharides végétaux. La structure rhamnogalacturomannane a été étudié à l'aide de l'endopolygalacturonase de *Colletotrichum lindemuthianum* (English et al., 1972) et récemment par la rhamnogalacturonase d'*Aspergillus aculeatus* (Schols et al., 1990). Ces enzymes ont permis de préciser la structure des chaînes latérales de RG I. Généralement les activités enzymatiques doivent être spécifiques. Debeire et al. (1990) ont isolés et caractérisés une endo- β -(1,4)xylanase de 39 Kd de *Clostridium thermolactrium* sur la 4-O-Me-glucuronoxylane de bois de Mélèze. Ils ont démontré que le site actif de l'enzyme nécessite un substrat minimal de cinq unités de xylose (pentaxyloside) correspondant aux cinq unités de liaison du site actif comme l'indique le schéma A suivant:



L'action de cette enzyme est bloquée lorsque l'un des xylosyles, situé en vis à vis des sous unités de l'enzyme α , β et γ , est substitué par du 4-O-méthylglucuronate. C'est pourquoi des oligosaccharides tels que 3 a-b-c (Schéma B) ne sont plus dégradés.

Par ailleurs, Nishitani et Nevins (1989) ont utilisé une enzyme de *Bacillus subtilis*, nommé "Feraxanase", sur des parois isolées de coléoptile de maïs. Ils ont obtenu des oligosaccharides d'arabinoxylanes acides non féruloylés et des polysaccharides de xylanes avec ou sans acide férulique. Le fait que ces derniers renferment du galactose (49,6 % moles), du rhamnose (8,6 %) et de l'acide galacturonique (12 %), leur a permis de suggérer la liaison des polysaccharides pectiques (homogalacturonannes et RG I) à des segments d'arabinoxylanes. Enfin, Buchala (1973) a utilisé un mélange d'enzyme de cytophage sur des parois isolées de feuilles d'orge. Ce qui lui a permis de préparer un polysaccharide qu'il nomme arabinogalacto(-4-O-méthylglucurono)xylane.

2 - Méthodes d'affinité

Principalement, elles se résument aux anticorps et aux lectines. Ils sont utilisés en test d'agglutination ou immobilisés sur support chromatographique. Ils permettent alors d'identifier et de purifier les polysaccharides. L'anticorps de Yariv et la concanavalin A immobilisés sont utilisés pour caractériser les arabino-3,6-galactanes qui ont une activité anti-complémentaire (Fincher et al. 1983).

C.- Méthodes d'étude de liaisons particulières

Elles concernent les liaisons des polysaccharides ou des oligosaccharides avec d'autres molécules comme les protéines et les composés phénoliques.

Pour les protéines, on utilise le dosage colorimétrique, l'UV, leur dégradation par hydrazinolyse, β -élimination, les protéases et l'analyse des acides aminés. Le meilleur extractant est le système Phénol: Acide acétique: Eau, (2:1:1 ; p:v:v). Ensuite, on utilise les méthodes qui les modifient, à savoir le système SDS/Mercaptoéthanol qui coupe les ponts disulfures, celui au chlorite de sodium qui rompt les ponts isodityrosines (O'Neill et Selvendran, 1980). Leur précipitation à l'acide trichloroacétique ou au sulfate d'ammonium constitue la première étape de fractionnement et de purification.

Quant aux substances phénoliques, on procède de la même façon avec des particularités dans les longueurs d'onde d'absorption maximale, dans l'obtention et le dosage des dérivés isolés, et les enzymes utilisées, comme la Driselase. Elles sont extraites par les réactifs (chlorite de sodium, soude, méthanolate de sodium) qui coupent les liaisons éther et ester (Fry 1988 et 1989b ; Selvendran et Ryden, 1990). Ils sont généralement purifiées par extraction à l'acétate d'éthyle.

L'utilisation du réactif 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzo-1,4-quinone (DDQ) permet d'identifier les oses sur lesquels se branchent les dérivés organiques (lignine) par liaison éther (Watanabe et al., 1986 ; Iiyama et al., 1990).

D.- Conclusions

Il s'avère que la combinaison de plusieurs méthodes soit nécessaire pour bien élucider la structure d'un polysaccharide. La figure (Fig. 24) résume les étapes pratiques d'étude structurale de polysaccharides végétaux ou de tout polysaccharide. Rombouts et Thibault (1986b) montrent l'efficacité de la combinaison des méthodes chimique et enzymatique sur la caractérisation structurale de pectines de betterave sucrière.

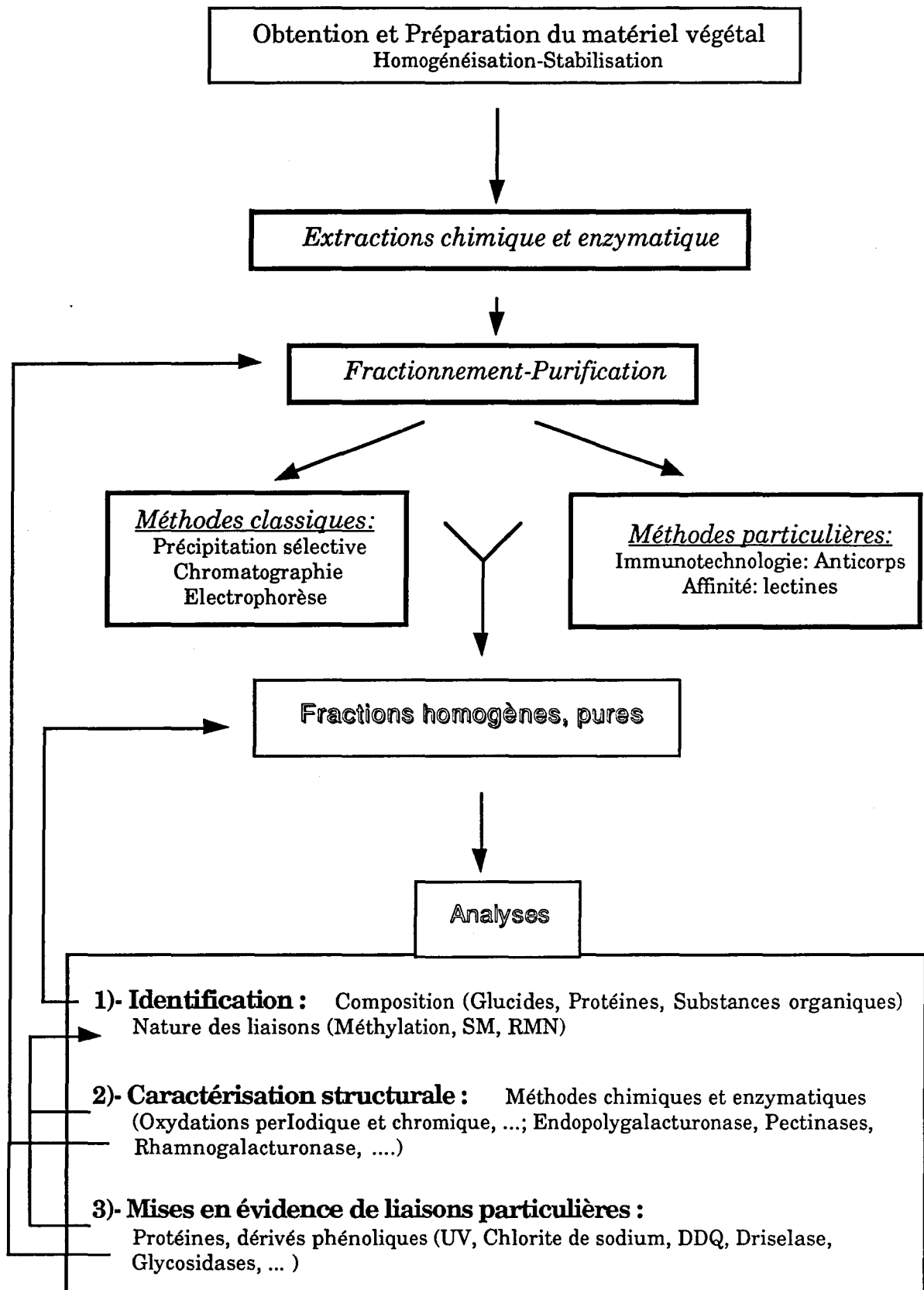


Figure 24 : Représentation succincte des relations entre les étapes et les méthodologies de purification et de caractérisation des polysaccharides végétaux

C H A P I T R E I

Composition glucidique du milieu de culture :

Monosaccharides,

Oligosaccharides,

Polysaccharides

“Une idée, tant qu’elle reste une vue de l’esprit, est toujours en balance avec une idée contraire ; seul le fait est probant et entraîne la conviction.” (E. DUCLAUX, 1840-1904)

I - INTRODUCTION

Les travaux réalisés sur la suspension cellulaire de silène ont permis de caractériser dans le milieu de culture du glucose et du fructose provenant de la dégradation du saccharose fourni comme source de carbone (Brassart et al., 1977), des polysaccharides extracellulaires d'origine pariétale (Morvan, 1982) et des oligosaccharides parmi lesquels des N-glycannes (Priem et al., 1991). Mais, ces données n'étaient que fragmentaires puisqu'elles ne prennent pas en compte la totalité des glucides présents dans la suspension cellulaire.

Par conséquent, le premier objectif de notre travail a été d'établir un bilan exhaustif des glucides natifs contenus dans le milieu de culture. Les méthodes utilisées pour fractionner, identifier et quantifier ces molécules ont été choisies à priori, pour garantir le maintien de leur intégrité structurale. Cette option a nécessité l'adaptation des protocoles d'isolement et des systèmes de quantification et d'identification déjà établis : précipitation éthanolique, solubilité différentielle en solution saline, dosages colorimétriques et chromatographiques. L'identification structurale des polysaccharides est fondée sur les définitions généralement admises (cf. Généralités).

En terme ultime, la connaissance de ces différentes catégories de glucides est destinée à fournir les informations de base, indispensables à la compréhension des relations entre les cellules cultivées sous forme de suspension cellulaire et leur milieu de culture. En effet, la diversité de ces molécules comme leur parenté chimique doivent permettre d'établir des hypothèses relatives à l'existence de filiations métaboliques entre elles.

II - PRESENTATION DES METHODES

A.- Préparation des principales fractions

Le protocole utilisé permet de séparer les différentes catégories glucidiques (monosaccharides, oligosaccharides et polysaccharides) à partir du milieu de culture de la suspension cellulaire. La séparation est obtenue par des précipitations successives, en présence de volumes variables d'éthanol absolu, entrecoupées par des centrifugations. Une extraction saline par du chlorure de sodium 0,5 M, est utilisée efficacement sur le précipité P₁ (Fig.25). En outre, l'acidification de certains surnageants par de l'acide chlorhydrique 1 M provoque une précipitation supplémentaire qui constitue la dernière étape du dispositif.

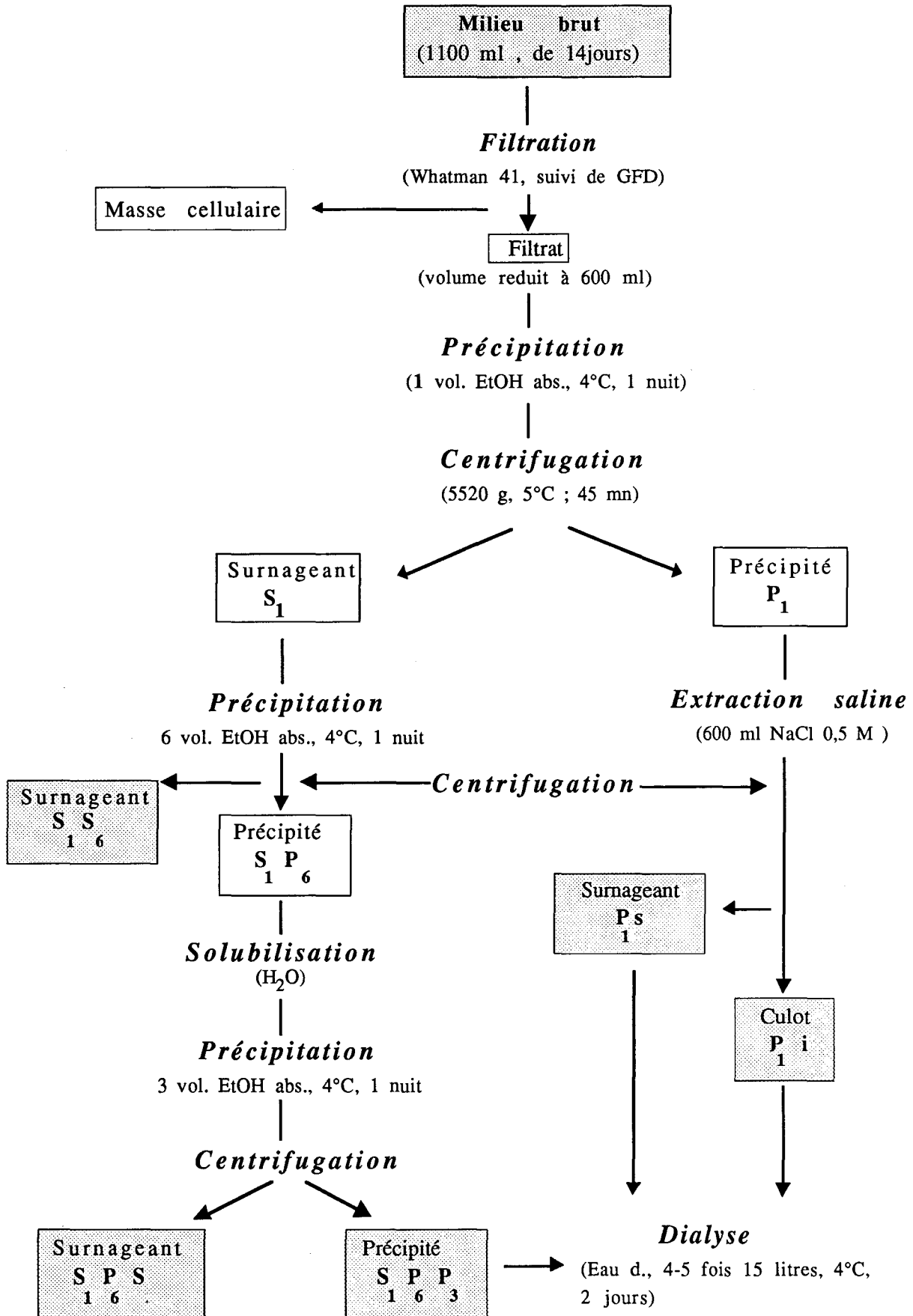


Figure 25 : Protocole d'isolement des glucides extracellulaires du milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.

Pour désigner les différentes fractions, un sigle composé de lettres et de chiffres est utilisé : les surnageants et les précipités sont désignés respectivement par les lettres S et P, les indices associés représentent la proportion d'éthanol (v:v) utilisée pour obtenir la fraction considérée. Les fractions S_1 et P_1 correspondent respectivement au surnageant et au précipité obtenus par le traitement de 1100 ml (7 fioles de 200 ml de milieu neuf) de milieu de culture non dialysé, par un volume égal d'éthanol. Par la suite, le volume de S_1 est réduit à 40 ml puis traité par six volumes d'éthanol. Cette étape sépare la fraction soluble S_1S_6 (60 ml) du précipité S_1P_6 . Ce dernier est dissous dans l'eau désionisée (86 ml), puis traité à nouveau par trois volumes d'alcool, fournissant le surnageant $S_1P_6S_3$ (20 ml) et le précipité $S_1P_6P_3$. Après chaque opération, l'éthanol est éliminé à l'évaporateur rotatif ou par dialyse.

Par ailleurs, le précipité P_1 est repris par 600 ml d'une solution de NaCl 0,5 M. Une partie de celui-ci est soluble (P_{1s}) et l'autre reste insoluble (P_{1i}). Ces dernières, ainsi que la fraction $S_1P_6P_3$ sont finalement dialysées contre de l'eau désionisée, congelées, lyophilisées puis pesées. La nature chimique des fractions est établie par deux méthodes d'identification des glucides: au phénol sulfurique (Dubois et al., 1956) et par révélation à l'orcinol sulfurique sur plaque de gel de silice (cf. Annexe 2).

B.- Quantification des fractions polysaccharidiques

En raison de la composition hétérogène des polysaccharides végétaux, des interférences apparaissent lors de la détermination des teneurs en oses neutres et acides uroniques. Il en résulte des difficultés dans l'expression des résultats des dosages colorimétriques par comparaison avec ceux obtenus par CLG (Montreuil et al., 1986). Différents modes d'expression et de présentation des résultats ont été éprouvés sur les fractions polymériques P_{1i} , P_{1s} et $S_1P_6P_3$, dans le but de parvenir à une quantification convenable de leur composition, en l'absence de témoins de composition équivalente.

1 - Etablissement de la méthode de quantification

Ayant constaté des différences dans l'intensité des réponses colorimétriques lors des dosages des glucides, Montreuil et Spik (1963) et Thibault (1979) ont établi un tableau des absorbances relatives (ar) des monosaccharides (cf. Annexe 2), par rapport au D-galactose. L'emploi d'un seul monosaccharide comme étalon pour les dosages colorimétriques des hétéropolymères, aboutit à une surestimation ou sous-estimation des valeurs mesurées, selon la

proportion des monosaccharides constitutifs, présentant des réponses plus ou moins intenses vis-à-vis des réactifs utilisés. Pour éviter ces inconvénients, les auteurs proposent d'utiliser comme étalon, un mélange témoin qui respecte les proportions des différents monomères glucidiques, déterminées préalablement par CLG ou CLHP.

Une telle démarche est évidemment convenable pour des polysaccharides de composition stable et régulière. Toutefois, elle est difficilement applicable aux polymères végétaux dont l'hétérogénéité structurale imposerait l'emploi d'un mélange témoin particulier pour chaque échantillon. Pour les polymères (oligosaccharides et polysaccharides), les molécules d'eau apportées par l'hydrolyse seront corrigées par le facteur de conversion en anhydrose de chaque ose, k , qui est égale au rapport $(M - 18)/M$; M étant la masse moléculaire de l'ose (Thibault, 1979). Ainsi, k est égale à 1 pour les monosaccharides libres et les polyols correspondants.

Par souci d'uniformisation et de simplification, il est possible de déterminer directement par CLG, les quantités (q') respectives de chaque monosaccharide contenu dans un échantillon. Il suffit d'introduire un étalon interne (myoinositol) et de corriger les quantités (q) par leurs coefficients de réponse respectifs (cr) et leurs facteurs (k) pour obtenir q' . La somme $Q_{q'}$ des valeurs corrigées (q') des oses neutres et des acides uroniques constitue la meilleure estimation du contenu glucidique de l'échantillon :

$$Q_{q'} = \sum (q \times cr^{-1} \times k) = \sum q'$$

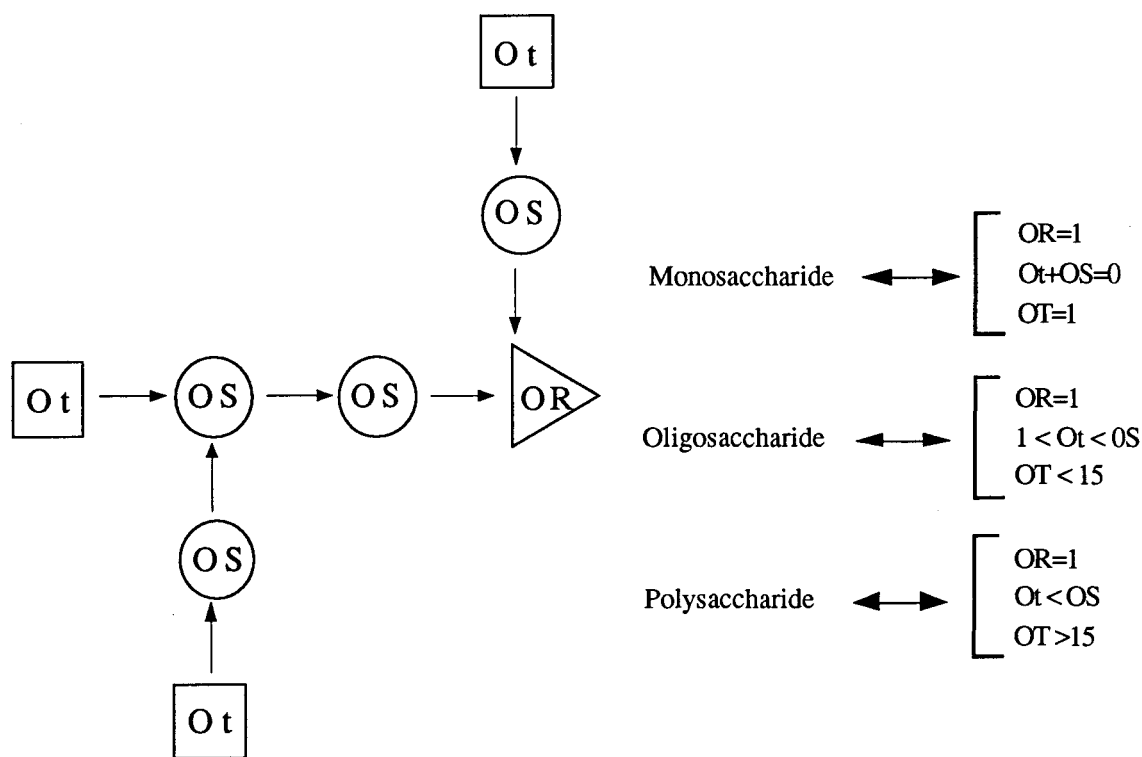
Il convient finalement de vérifier que les données acquises par cette méthode sont comparables aux valeurs obtenues par dosages colorimétriques. Pour ce faire, les valeurs q' sont multipliées par les absorbances relatives (ar), pour simuler les résultats colorimétriques influencés par ar :

$$Q_{q''} = \sum (q \times cr^{-1} \times k \times ar/100) = \sum (q' \times ar/100)$$

2 - Mode d'identification des glucides

Le principe adopté repose sur les acquis de la définition structurale et de la nomenclature des glucides selon lesquels ils sont caractérisés par deux extrémités dont l'une, dite "terminale", correspond à un ose terminal (O_t) non réducteur, et l'autre, nommée "réductrice", est définie par la présence d'un ose réducteur (O_R). Seul ce dernier permet

d'orienter ces polymères et d'identifier leurs classes d'appartenance. Les monosaccharides situés entre ces deux bornes constituent les oses substitués (OS) qui additionnés aux oses terminaux (Ot) forment les oses liés (OL). Enfin, le total (OR+OL) correspond aux oses totaux (OT). Ainsi, en fonction des valeurs respectives de ces paramètres (OR, Ot, OS et OT), le glucide sera un monosaccharide, un oligosaccharide ou un polysaccharide. Pour un glucide donné, l'ose réducteur est unique, tandis que les oses terminaux et substitués sont variables, comme le montre la simulation structurale suivante :



Par conséquent, la connaissance des oses réducteurs des polysaccharides contenus dans les fractions permet d'établir une identification "primaire" des composés.

L'étude des fractions est réalisée selon le protocole (Fig.26) qui permet la détermination des oses réducteurs (OR), des polyols liés (pL) et des oses liés (OL) par le biais des analyses des préparations analytiques AAR, AAT, TMSIT et TMSDT, en appliquant les équations suivantes :

- pour les acétates d'alditol, $AAR = pL + OR$ et $AAT = OT = AAR + OL$;
- pour les dérivés triméthylsilylés, $TMSIT$ ou $TMSDT = pL + OR + OL$, où pL et OR sont sous forme de polyols triméthylsilylés et les oses liés (OL) sous forme de méthyl-glycosides triméthylsilylés.

La détermination de la composition des polysaccharides consiste à combiner les valeurs des oses neutres obtenues en AAT et celles des acides uroniques issues de TMSIT ou de TMSDT. L'analyse de la préparation AAR fournit principalement la nature des oses réducteurs (OR) et

éventuellement, des polyols liés (pL). Comme ces derniers n'ont pas été déterminés, la valeur donnée par AAR est considérée égale à OR ; ce qui a permis d'établir les degrés de polymérisation (DP). Ainsi, on a défini deux types de DP, le DP brut (DPb) qui est égal au rapport de AAT sur AAR, et le DP relatif (DPr) à un ose réducteur égal au rapport OT/OR par type ou groupe de monosaccharides. Selon la composition structurale déduite de l'étude des autres critères (origine, définition, ...), la composition de OT s'y adapte. Par conséquent, plus les valeurs de DPb et de DPr se rapprochent, plus le rapport DPr/DPb ($DPb > DPr$) tendant vers 1 montre l'uniformité de la structure du contenu glucidique de la fraction étudiée. Dans ce cas, le DP ($DPb = DPr$) obtenu se rapproche du degré de polymérisation réel du polysaccharide qui est alors considéré comme uniforme ou pur. Ce dernier critère est d'autant plus crédible que la distribution chromatographique des poids moléculaires a l'allure d'une courbe de Gauss. Le DP réel est alors exprimé à partir des rapports molaires.

La connaissance de chaque ose réducteur, associée à celle des autres monosaccharides présents et à certains critères comme le degré de polymérisation (DP) constitue l'identification "secondaire" du contenu glucidique de chaque fraction.

3 - Conditions expérimentales

Cette étude a été faite sur des solutions aqueuses à 1 mg/ml (p:v) de trois fractions polysaccharidiques (P_{1i} , P_{1s} et $S_1P_6P_3$). Seul P_{1i} , qui se présente sous forme d'une suspension hétérogène insoluble, a été ajusté à 0,5 mg/ml suite à l'ajout de 3,5 ml de soude 0,5 M et de 10 mg d'EDTA(Na)₂ (q.s.p. 20 ml, pH 9) afin d'avoir une meilleure solubilisation du produit et d'obtenir une solution opaque, apparemment homogène.

Les techniques de dosages colorimétriques utilisées sont celles au phénol sulfurique et au *m*-hydroxydiphenyl, avec le D-galactose et l'acide D-galacturonique comme témoins (cf. Annexe 2). Chaque échantillon est dilué convenablement pour que la densité optique de la réaction colorée soit comprise entre 0,2 et 1,0. Les dosages sont effectués en triple sur 2 à 3 dilutions différentes. Finalement, les valeurs sont corrigées par la méthode de Montreuil et Spik (1963). Les analyses chromatographiques (cf. Annexe 3) sont faites parallèlement sur les dérivés peracétylés (AA) et triméthylsilylés (TMS) des monosaccharides constitutifs des fractions, selon un protocole (Fig.26) qui établit une relation directe entre les résultats provenant de chaque dérivation. En effet, l'utilisation d'un témoin interne unique pour toutes les sous-fractions analytiques du même échantillon, permet la combinaison des résultats. Dans ces conditions, les quantités d'acides uroniques et d'osamines, obtenues sous forme TMS, pourront être associées à

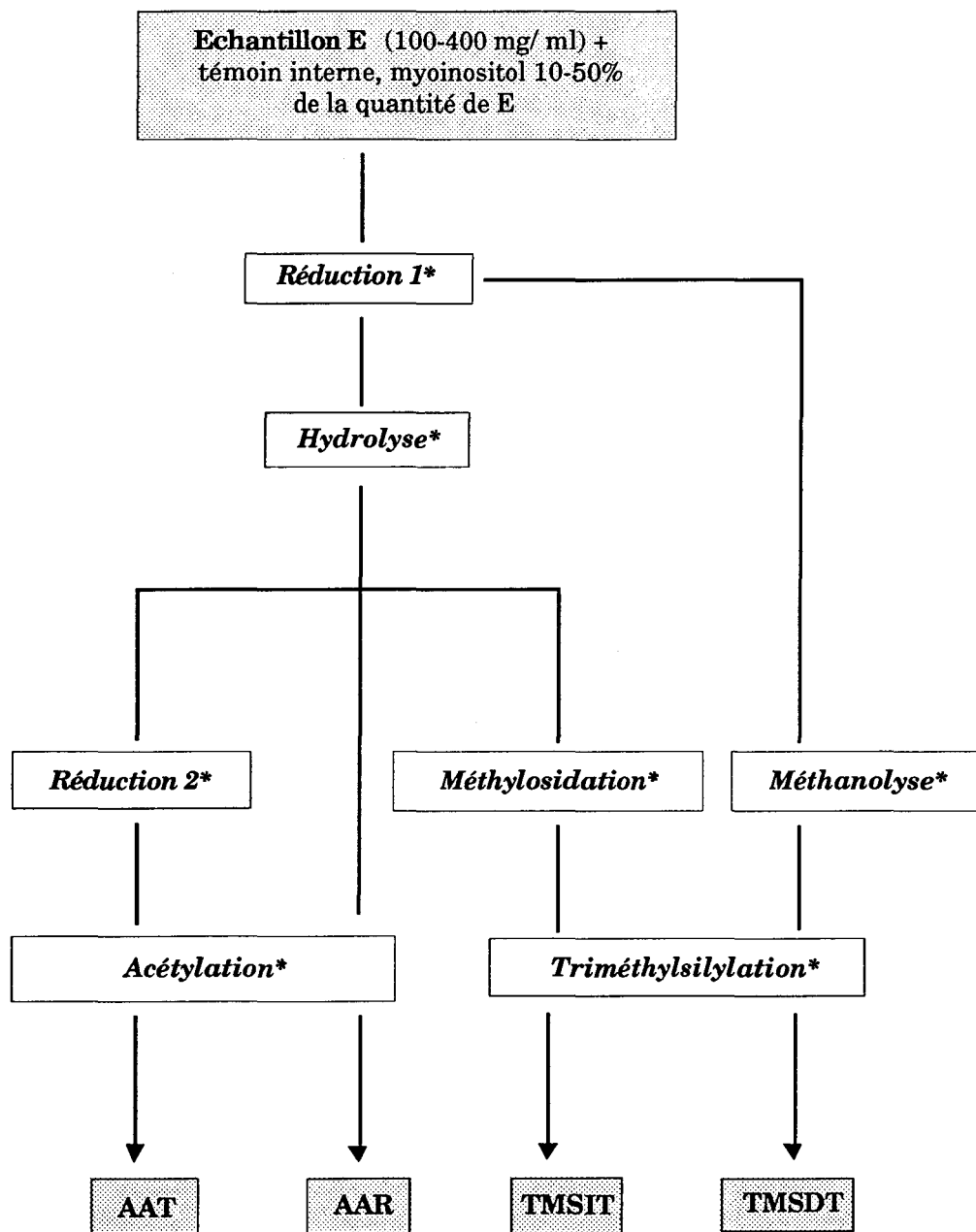


Figure 26 : Protocole général d'analyse par CLG des fractions polysaccharidiques

Analyse des acétates d'alditol:

AAT : Oses totaux

AAR : Oses réducteurs

Analyse par triméthylsilylation:

TMSIT : Indirecte, polyols et méthylglycosides totaux

TMSDT : Directe, polyols et méthylglycosides totaux

Réduction 1= au NaBD4 principalement ; Réduction 2= au NaBD4 ou NaBH4

(*) Les conditions expérimentales sont détaillées en annexes 3

celles des oses neutres, sous forme AA, pour former une composition glucidique unique.

Pour ces analyses, des échantillons réduits au NaBD_4 en présence de NaOH , sont utilisés à raison de 500 μl de P_{1i} , de 400 μl de P_{1s} et de $\text{S}_1\text{P}_6\text{P}_3$ auxquels sont ajoutés 40 μl de myoinositol comme témoin interne. Après hydrolyse, un quart de chaque hydrolysats est analysé par triméthylsilylation (TMSIT) ; le reste est destiné à la peracétylation précédée (AAT) ou non (AAR) d'une seconde réduction. Les hydrolyses sont généralement réalisées avec de l'ATFA 4 N, 4 h à 100 °C. L'hydrolyse complète de P_{1i} nécessite une pré-hydrolyse par l'ATFA 6 N, 1 h à 100 °C avant l'action de l'ATFA 4 N, 3 h à 100 °C. Enfin, la détermination des oses réducteurs (OR) est réalisée sur 200 μl de P_{1i} et sur 100 μl des deux autres, en présence de 10 μg de myoinositol.

C.- Etude des oligosaccharides et des monosaccharides

Après concentration à l'évaporateur, les fractions S_1S_6 (60 ml) et $\text{S}_1\text{P}_6\text{S}_3$ (20 ml) sont très basiques (pH 8,5). Leur acidification à pH 4,0 par l'HCl 1 M (Fig. 27), provoque la précipitation de composés blancs en donnant des surnageants (S_H) et des précipités (P_H). On obtient ainsi quatre fractions, $\text{S}_1\text{S}_6\text{-S}_H$, $\text{S}_1\text{P}_6\text{S}_3\text{-S}_H$, $\text{S}_1\text{S}_6\text{-P}_H$ et $\text{S}_1\text{P}_6\text{S}_3\text{-P}_H$. Avant leur conservation à -20°C, les surnageants sont amenés à pH 6,0 et les précipités à pH 7,5 avec de la soude 0,5 M. Les fractions $\text{S}_1\text{S}_6\text{-S}_H$, $\text{S}_1\text{P}_6\text{S}_3\text{-S}_H$ sont étudiées selon le protocole (Fig. 28) qui permet la détermination simultanée des polyols libres (pl) ou liés (pL), des monosaccharides (m), des oses réducteurs (OR) et des oses liés (OL) par le biais des analyses des préparations analytiques AApl, AApT, AAm, AAR, AAT, TMSIT, TMSDT, et TMSp, en appliquant les équations suivantes :

- pour les dérivés peracétylés : $\text{AApl} = \text{pl}$; $\text{AApT} = \text{pT} = \text{pl} + \text{pL}$; $\text{AAm} = \text{pl} + \text{m}$;

$\text{AAR} = \text{pl} + \text{pT} + \text{m} + \text{OR}$; $\text{AAT} = \text{OT} = \text{AAR} + \text{OL}$;

- pour les dérivés triméthylsilylés : $\text{TMSp} = \text{pl}$,

TMST ou $\text{TMSDT} = \text{pT} + \text{m} + \text{OR} + \text{OL} = \text{pl} + \text{pL} + \text{m} + \text{OR} + \text{OL}$,

où m, pT et OR sont sous forme de polyols triméthylsilylés et OL sous forme de méthyl-glycosides triméthylsilylés. Cette méthodologie permet d'effectuer l'identification de la composition monomérique et oligomérique des fractions, par référence à la classification et à la définition actuelles des polysaccharides végétaux. Elle repose sur le même procédé que celui utilisé pour les polymères, à la seule différence que l'on doit tenir compte des polyols libres (pl) ou liés (pL) et des monosaccharides (m). Ainsi, une fraction dont la composition molaire comporte 50% de glucose, 20 à 30% de xylose et dont le glucose est le seul ose réducteur, contient principalement de la xyloglucane.

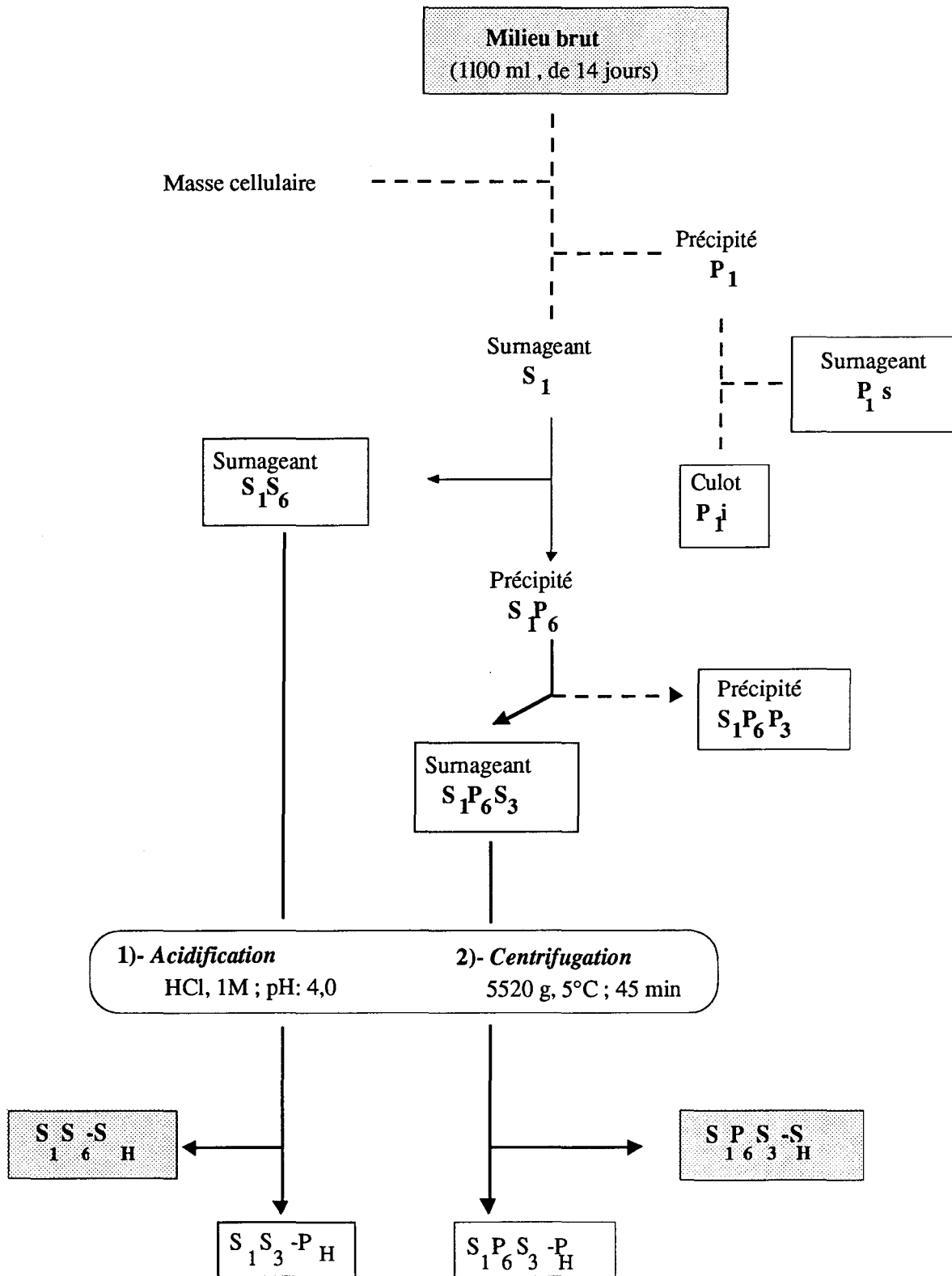


Figure 27 : Protocole de purification par acidification des surnageants extracellulaires totaux du milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.

--- : Protocole d'après la figure 26

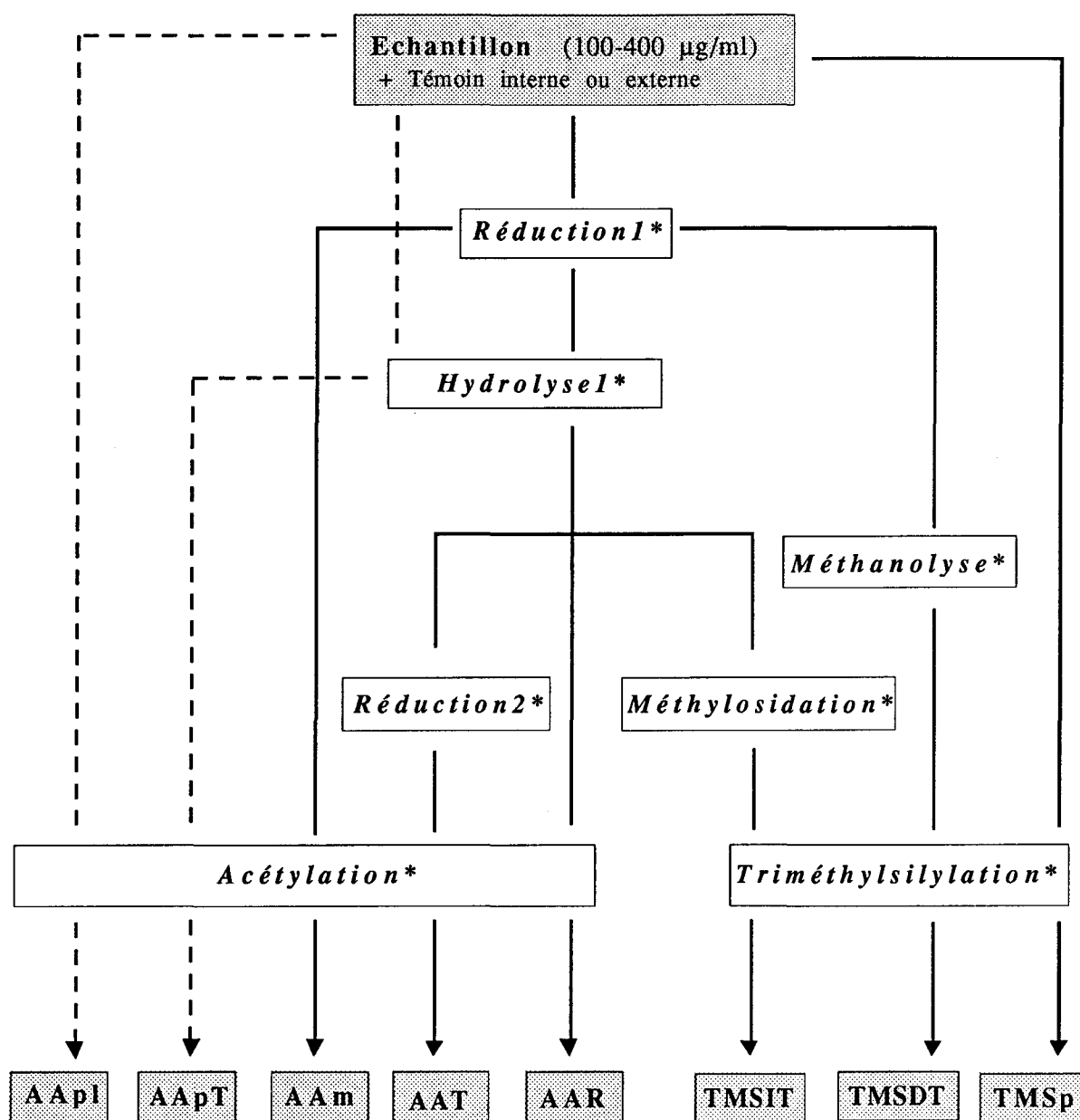


Figure 28 : Protocole général d'analyse par CLG des surnageants.

&. Les préparations analytiques :

- Analyse des acétates d'alditol :

AApl : Polyols libres (pl) ; AApT: Polyols totaux (pT) = pl + Polyols liés (pL) ;

AAm : Monosaccharides (m) + pl ; AAR: Oses réducteurs (OR) + m + pT ;

AAT : Oses totaux (OT) = Oses liés (OL) + OR + m + pT

- Analyse par triméthylsilylation :

TMSp : Dérivés TMS glycosides (pl, ...) ;

TMSIT : Triméthylsilylation indirecte (pT, Méthylglycosides) ;

TMSDT : Triméthylsilylation directe (pT, Méthylglycosides)

&. Réduction 1 : Principalement au NaBD_4 ; **Réduction 2 :** au NaBD_4 ou NaBH_4

&. (*) : Les conditions expérimentales sont détaillées en Annexe 3

Les polyols libres sont déterminés par acétylation directe, tandis que les polyols liés ont été préalablement libérés par hydrolyse (Fig. 28). Quant aux monosaccharides (m), ils ont été mesurés par peracétylation de l'échantillon préalablement réduit au NaBD_4 alors que les oses réducteurs (OR) sont ensuite obtenus après l'hydrolyse préalable d'une aliquote du même échantillon réduit. Enfin, les oses totaux (OT) sont mesurés par dérivation totale en acétates d'alditol de tous les constituants glucidiques, à l'exception des acides uroniques qui sont déterminés par triméthylsilylation.

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS

Le protocole de fractionnement des composés extracellulaires a permis d'obtenir sept fractions (Tab. V) dont deux ($\text{S}_1\text{P}_6\text{S}_3\text{-P}_\text{H}$ et $\text{S}_1\text{S}_6\text{-P}_\text{H}$) ne sont pas de nature glucidique puisqu'elles ne réagissent pas aux réactifs utilisés (Phénol et orcinol sulfuriques).

Tableau V :Caractéristiques des fractions isolées.

Fractions	Masse (mg)	Glucides ^(a)
P_1i	214,0	+
P_1s	335,0	+
$\text{S}_1\text{P}_6\text{P}_3$	390,0	+
$\text{S}_1\text{P}_6\text{S}_3\text{-P}_\text{H}$	ND	-
$\text{S}_1\text{S}_3\text{-P}_\text{H}$	ND	-
$\text{S}_1\text{P}_6\text{S}_3\text{-S}_\text{H}$	ND	+
$\text{S}_1\text{S}_3\text{-S}_\text{H}$	ND	+

La masse est obtenue par pesée pour les trois premières fractions

ND: Non déterminée, ; (a): Dosages colorimétriques au Phénol-sulfurique et au m-HDP ;
+ : Réaction positive ; - : Réaction négative

Les conditions d'obtention des cinq autres fractions permettent de déduire que trois d'entre elles (P_1i , P_1s et $\text{S}_1\text{P}_6\text{P}_3$) sont des polymères et les deux autres ($\text{S}_1\text{P}_6\text{S}_3\text{-S}_\text{H}$ et $\text{S}_1\text{S}_6\text{-S}_\text{H}$) des mélanges d'oligomères et de monomères.

A.- Caractérisation des polysaccharides

1 - Quantification

L'estimation pondérale des polysaccharides hétérogènes constitue une difficulté à laquelle sont confrontés les expérimentateurs. Pour tenter d'apporter une solution à ce problème, les teneurs pondérales obtenues par CLG (Q_q') sont comparées avec celles corrigées par les absorbances relatives des monosaccharides par rapport au D-galactose (Q_q'') et avec celles obtenues par colorimétrie (Q_c), en utilisant le D-galactose et l'acide D-galacturonique comme témoins.

Dans toutes les fractions, les valeurs corrigées (Q_c et Q_q'') des oses neutres excèdent les données obtenues par CLG (Tab. VI). Par contre, le même principe appliqué aux acides uroniques réduit de moitié leur concentration, ce qui a comme conséquence d'aboutir à une sous estimation de la teneur totale corrigée Q_q'' pour l'échantillon P_{1i} . Par comparaison de ces valeurs corrigées (Q_q'') ou non (Q_q') avec celles obtenues par colorimétrie (Q_c), il apparaît que les premières (Q_q'' , Tab.VI) et les dernières (Q_c , Tab.VII) sont celles qui s'écartent le plus d'une masse de référence de 1 mg déterminée par pesée (Tab.III). C'est ainsi que pour la fraction P_{1s} , les valeurs de Q_q'' (1272,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$; Tab.VI) et Q_c (1240,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$; Tab.VII) sont très voisines mais en excès par rapport à la masse de référence. Il en est de même pour la fraction $S_1P_6P_3$ ($Q_q'' = 1201,4 \mu\text{g}/\text{mg}$, et $Q_c = 1215,2 \mu\text{g}/\text{mg}$), ce qui démontre que la méthode colorimétrique est responsable des erreurs par excès, en raison de la différence de réactivité des monosaccharides et compte tenu du choix des témoins.

Par ailleurs, l'échantillon P_{1i} présente une estimation colorimétrique Q_c légèrement supérieure à la valeur obtenue par CLG, alors que la valeur corrigée Q_q'' est sensiblement inférieure ($Q_q' = 663,2 \mu\text{g}/\text{mg}$; $Q_c = 694,5 \mu\text{g}/\text{mg}$; $Q_q'' = 504,3 \mu\text{g}/\text{mg}$). Cette différence provient du fait que les acides uroniques sont majoritaires, comme en témoignent les valeurs concordantes AU_c (423,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$) et AU_q' (400 $\mu\text{g}/\text{mg}$) (Tab. VII). Dans ces conditions, la correction de AU_q' par le coefficient α aboutit à la baisse de AU_q'' (200 $\mu\text{g}/\text{mg}$) et de Q_q'' . Sans cette correction, la valeur de Q_q'' figurant dans le tableau VI (504,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$) deviendrait 704,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$, proche de la valeur de Q_c mentionnée dans le tableau VII.

L'ensemble de ces considérations démontre que l'utilisation de la méthode de correction (Montreuil et Spik, 1963) pour les dosages colorimétriques, ne s'applique avec un nombre réduit de monosaccharides témoins, que lorsque le polysaccharide lui-même est constitué d'un ou deux monosaccharides majoritaires. Comme le recommandent les auteurs, il convient d'utiliser un

Tableau VI : Teneurs pondérales des monosaccharides mesurées par CLG et corrigées par leurs absorbances relatives au phénol-sulfurique à 480 nm par rapport au galactose

Fractions		P _{1i} (µg/mg)		P _{1s} (µg/mg)		S ₁ P ₆ P ₃ (µg/mg)	
Composition	ar ₄₈₀	q'	q''	q'	q''	q'	q''
Rha	133	13,0	17,3	5,0	6,6	9,1	12,1
Fuc	55	trace	trace	nd	nd	nd	nd
Ara	111	123,7	137,3	24,3	27,0	127,1	141,1
Xyl	193	5,5	10,6	188,0	362,8	229,0	442,0
Man	122	15,0	18,3	130,0	158,6	126,9	154,8
Glc	128	53,0	67,8	390,0	499,2	180,4	230,3
Gal	100	53,0	53,0	212,7	212,7	216,4	216,4
GalA	50	400,0	200,0	10,5	5,2	2,4	1,2
GlcA	50	nd	nd	nd	nd	5,8	2,9
4-OMe-GlcA	50	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ON	-	263,2	304,3	950,0	1266,9	888,9	1197,3
AU	-	400,0	200,0	10,5	5,2	8,2	4,1
Q	-	663,2	504,3	960,5	1272,1	897,1	1201,4

- ar₄₈₀ : Absorbances relatives au phénol-sulfurique à 480 nm (Annexe 2)

- q' : quantité obtenue par analyse des acétates d'alditol, corrigée par les coefficients de réponse (cr) par rapport au myo-inositol, $q' = q \times cr^{-1}$ (Annexe 3)

- $q'' = q' \times ar_{480} / 100$: Valeur de q' corrigée par ar pour simuler la quantité dosée colorimétriquement

- ON : Oses neutres ; AU : Acides uroniques ; Q = ON + AU

- nd : non décelé

- Chiffres en gras représentent les valeurs significatives

Tableau VII : Compositions pondérales obtenues par dosages colorimétriques et par CLG, des trois fractions P_{1i} , P_{1s} et $S_1P_6P_3$

FRACTIONS	P_{1i}	P_{1s}	$S_1P_6P_3$
ON_c ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	271,3	1221,0	1171,2
AU_c ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	423,2	19,0	44,0
Q_c ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	694,5	1240,0	1215,2
$ON_{q'}$ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	263,2	950,0	888,9
$AU_{q'}$ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	400,0	10,5	8,2
$Q_{q'}$ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	663,2	960,5	897,1
Protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	132,0	36,0	32,0
Q total ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	795,2	996,5	929,1

- Les valeurs sont exprimées par rapport à 1 mg d'échantillon pesé pour la comparaison des deux méthodes de dosage (Annexes 2 et 3). Les corrections respectives ont été appliquées.

- $Q_c = ON_c + AU_c$ (valeurs obtenues par dosages colorimétriques)

- $Q_{q'} = ON_{q'} + AU_{q'}$ (valeurs obtenues par CLG)

- Les protéines sont mesurées par la méthode de Lowry (Annexe 2)

- Q total= $Q_{q'} + \text{Protéines}$

mélange de témoins représentatifs de la composition des échantillons lorsqu'elle est hétérogène.

Par contre, le choix d'une quantification par CLG selon le protocole décrit en Annexe 3, permet de s'affranchir des difficultés précitées et de parvenir de façon uniforme et reproductible à une estimation quantitative de chaque catégorie de monosaccharide.

2 - Identification des fractions

Les oses réducteurs des polysaccharides contenus dans les trois fractions précipitées (Fig. 29, Tab. VIII) sont au nombre de cinq, du mannose, du xylose, du glucose, de l'arabinose et du rhamnose. D'après la nomenclature structurale, ils représentent respectivement des mannanes, des xylanes, des glucanes, des arabinanes et des chaînes principales pectiques. Ne prenant en compte que les monosaccharides, les DP bruts des fractions P_{1i} , P_{1s} et $S_1P_6P_3$ sont respectivement de 105,3 ; 79,4 et 46,7. L'identification "secondaire" des contenus polysaccharidiques par rapport à chaque ose réducteur donne les résultats suivants:

a)- *mannanes*

La totalité du mannose réducteur des trois fractions est majoritaire par rapport à celle des autres oses réducteurs. A priori, les mannanes seraient les polysaccharides prépondérants parmi ces exopolysaccharides, puis viennent ensuite les xylanes, les glucanes et les polymères pectiques. Or, ce classement, qui exprime la diversité ou la variabilité structurale de chaque famille de polysaccharides, ne peut être que qualitatif. Car l'homogénéité des poids moléculaires obtenue par les précipitations éthanoliques n'est pas suffisante pour permettre un classement quantitatif de ces polysaccharides.

Néanmoins, la concentration du mannose réducteur passe de 3,3 dans P_{1s} à 8,9 dans $S_1P_6P_3$; ainsi le pouvoir réducteur des mannanes augmente proportionnellement avec le volume d'éthanol nécessaire à la précipitation. Et les DP relatifs (DPr) sont respectivement de 39,4 ($=130/3,3$) et de 14,2 ($=126,9/8,9$). Il semble donc que ces résultats soient en accord avec ceux attendus. En effet, un polysaccharide de grande taille moléculaire est précipité par un faible volume d'éthanol et possède un DP élevé avec un faible pouvoir réducteur.

Inversement, plus le polymère est de faible masse moléculaire, plus le DP est petit, plus le volume d'éthanol pour le précipiter sera élevé et plus son pouvoir réducteur est grand. Dans la fraction insoluble P_{1i} , le DPr de 8,3 semble contredire ce mode d'interprétation. Or, un tel DP ne peut être que celui d'un oligosaccharide sauf si ce dernier est lié ou complexé à d'autres molécules

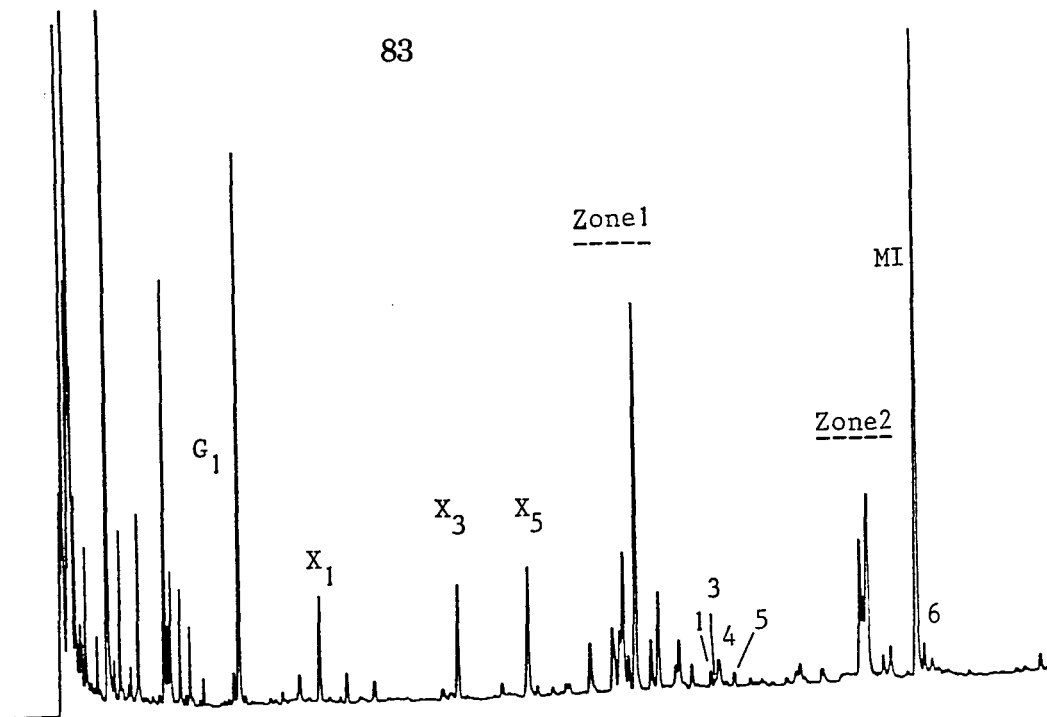
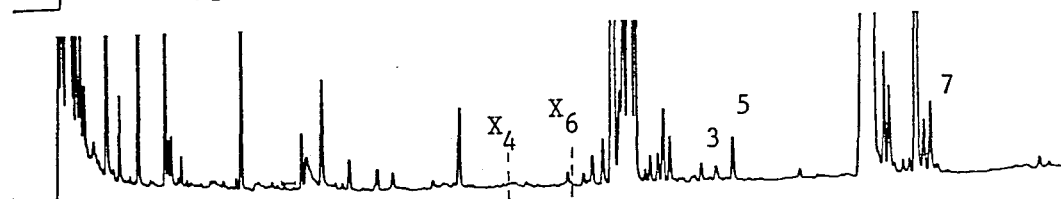
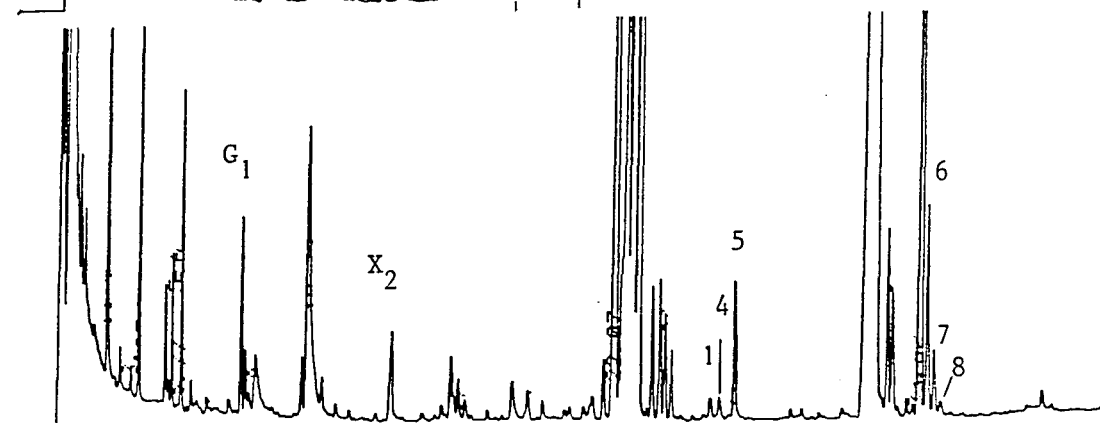
A**B****C**

Figure 29 : Chromatogrammes d'analyse des acétates d'alditols des oses réducteurs (OR) ou des éventuels polyols liés (PL) contenu dans les précipités P_{1i} , P_{1s} et $S_1P_6P_3$

- **A:** P_{1i} ; **B:** P_{1s} ; **C:** $S_1P_6P_3$. Préparations analytiques AAR (Fig.2)

- G_1 : Glycérol triacétyles ; la série X (X_1 , X_2 , ..., X_6) désignent des composés non identifiés ou connus (X_4 et X_6 représentent des pics déterminés dans la fraction $S_1S_6-S_H$, Fig. 29)

- Zone 1: Pentoses ou déoxyhexoses peracétyles ; Zone 2: Hexoses peracétyles

- Les chiffres désignent les oses correspondant à ces acétates d'alditols: 1, Rha ; 2, Rib ;

3, Fuc ; 4, Ara ; 5, Xyl ; 6, Man ; 7, Glc ; 8, Gal ; MI: myoinositol (témoin interne)

Tableau VIII: Composition en oses totaux (OT) et en oses réducteurs (OR) ou polyols liés[†] des fractions glucidiques précipitées P_{1i}, P_{1s} et S₁P₆P₃

Fractions	P _{1i} (µg/mg)		P _{1s} (µg/mg)		S ₁ P ₆ P ₃ (µg/mg)	
	OR+pL [†]	OT	OR+pL [†]	OT	OR+pL [†]	OT
G ₁	21,1	ND	6,6	ND	4,3	ND
X ₁	5,0	ND	5,1	ND	0,8	ND
X ₂	nd	ND	nd	ND	3,4	ND
X ₃	5,8	ND	3,9	ND	0,6	ND
X ₄	nd	ND	nd	ND	1,5	ND
X ₅	7,8	ND?	nd	ND	0,8	ND
X ₆	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Rha	1,0	13,0	nd	5,0	1,0	9,1
Rib	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fuc	nd	trace	0,9	trace	nd	nd
Ara	1,8	123,7	nd	24,3	0,7	127,1
Xyl	0,8	5,5	2,9	188,0	5,6	229,0
Man	1,8	15,0	3,3	130,0	8,9	126,9
Glc	0,9	53,0	5,0	390,0	3,0	180,4
Gal	nd	53,0	nd	212,7	nd	216,4
GalA	ND	400,0	ND	10,5	ND	2,4
GlcA	ND	nd	ND	nd	ND	5,8
4-OMe-GlcA	ND	nd	ND	nd	ND	nd

- Données obtenues par les préparations analytiques:

AAR = Oses réducteurs (OR) plus Polyols liés neutres =(OR+pL) et AAT = Oses totaux (OT) exprimés sous forme de teneurs pondérales des monosaccharides mesurées par CLG

- [†] : La présence des polyols liés est seulement supposée par le type d'analyse (AAR) car ils n'ont pas été déterminés directement

- G₁: Glycérol ou Glycéraldéhyde ; X₁, X₂ ; ... ; 6: Composés inconnus ; la détermination partielle est faite (voir Texte)

- nd: non décelé

- ND: non déterminé (la détermination n'a pas été faite)

qui augmentent ainsi son poids moléculaire apparent. Finalement, la diversité structurale des mannanes (cf. Généralités, p. 23), l'influence de la taille moléculaire et la présence d'autres monosaccharides (galactose et glucose) conduisent à considérer que les fractions étudiées contiennent une ou plusieurs des catégories de polymères suivantes : Mannane, Glucomannane ou Galacto(gluco)mannane.

b)- Xylanes

Le xylose réducteur évolue de la même façon que l'ose réducteur précédent. Compte tenu des autres oses (arabinose, glucose et acide glucuronique) présents dans la même fraction et de la structure des xylanes (cf. Généralités, p. 19), l'ensemble des fractions serait composé de Xylane, d' Arabinoxylane et de Glucuronoxylane. La coexistence du xylose avec du glucose réducteur , du galactose et du fucose suppose la présence de xyloglucanes (Tab.VIII).

c)- Glucanes

D'une manière générale, l'évolution de la concentration du glucose réducteur n'est pas régulière, elle passe de 5,0 dans P_{1s} à 3,0 dans $S_1P_6P_3$. Cette baisse, corrélative à celle du glucose total, donne un DP respectif de 78 et 60. Dans ce cas, l' influence de la précipitation éthanolique sur le DP des glucides végétaux, est conforme aux principes évoqués précédemment. D'après le contenu en glucose, la composition probable des fractions renferme des xyloglucanes, des glucanes (cellulose, amidon ou callose).Compte tenu du DPr de 59 (= 53/0,9), les glucanes de la fraction P_{1i} représenteraient de la cellulose difficilement soluble.

d)- Polysaccharides pectiques

Outre l'existence d'acide galacturonique dans leur composition, les polysaccharides pectiques peuvent être caractérisés par la présence de rhamnose réducteur. Ils peuvent également comporter des quantités variables de galactose et d'arabinose. Ainsi, les fractions P_{1i} et $S_1P_6P_3$ contiennent des polysaccharides pectiques et des arabinanes parce que du rhamnose et de l'arabinose réducteurs y sont détectés. L'absence de galactose réducteur inciterait à supposer qu'il n'y a pas de galactanes ou d'arabinogalactanes. Néanmoins, les galactanes peuvent être conjuguées à du rhamnose, de l'arabinose ou des protéines (cf. Généralités, p. 26). Par ailleurs, l'absence de rhamnose et d'arabinose réducteurs dans la fraction P_{1s} n'infirme pas la nature

pectique des polysaccharides puisque l'acide galacturonique y est présent. Dans cette fraction, la valeur du rapport GalA : Rha, égale à 2, indique la présence probable de rhamnogalacturonane I. Ce rapport est utilisé comme critère de distinction parmi les polysaccharides pectiques. Lorsque sa valeur est élevée (30), la fraction contient principalement de l'homogalacturonane (P_{1i}). Par contre, la fraction $S_1P_6P_3$, dont le rapport est plus faible (0,3), comprend probablement des zones enrichies en rhamnose dans la chaîne principale.

e)-Autres composés:

Ce sont les composés G_1 et la série des X (Tab. VIII) dont les temps de rétention précèdent ceux des pentoses (Fig.29). Dans l'ensemble, leur teneur décroît progressivement de P_{1i} à $S_1P_6P_3$. G_1 est déterminé comme étant du tétritol triacétate qui correspond au glycérol ou au glyceraldéhyde provenant des contenus lipidiques ou glucidiques des fractions. Compte tenu des méthodes d'isolement (précipitation éthanolique, dialyse), il est peu probable que les oligomères ou les monomères soient restés dans les fractions ; à moins qu'ils ne fassent partie d'un complexe macromoléculaire. Enfin, l'identification par CLG des composés de la série X n'a pas été faite. Toutefois, l'hypothèse de leur participation dans la structure de certains glucides, comme dans P_{1i} , peut être envisagée. De ce point de vue, ces molécules contribueraient à expliquer que les DP des mannanes (8,3) et des xylanes (6,8) soient aussi faibles.

B.- Composition des surnageants

1 - Caractérisation des molécules

a)-Inositols endogènes

Des tentatives pour quantifier les inositols endogènes à l'aide du québrachitol (2-0-méthyl-inositol) comme étalon interne, se sont avérées infructueuses à cause de sa tendance à se transformer en myoinositol hexa-acétate (Posternak, 1962). A défaut de témoin interne convenable, un étalonnage externe a été réalisé avec du myoinositol commercial. Par la suite, les valeurs des inositols endogènes, I_l et I_T (Tab. IX), ont servi de témoin interne.

Le pic, ayant le même temps de rétention (t_r) que le myoinositol (MI) hexa-acétate (Fig. 30), est identifié par couplage CLG-SM comme étant de l'inositol (I). Il peut représenter un mélange d'isomères non séparés sous forme peracétylée sur la colonne capillaire utilisée

(BP1,30m), d'autant que l'analyse des dérivés pertriméthylsilylés correspondants montre des pics (I_1 , I_2 et I_3 ; Fig. 31) qui possèdent des tr identiques à ceux de certains isomères, chiro-, epi- ou cis-, scyllo-inositol (Niwa et al., 1984). Toutefois, ces pics correspondent aussi à du myoinositol incomplètement triméthylsilylé (Fig. 31) puisqu'ils diminuent par excès de réactif de dérivation, tandis que le pic du myoinositol augmente en conséquence. Ainsi, la majorité des inositols endogènes est constituée de myoinositol. Ce myoinositol, détecté dans le milieu après 14 jours de culture, est effectivement d'origine endogène puisque la solution nutritive n'en contient pas initialement.

Les inositols, principalement liés, sont abondants dans le surnageant $S_1P_6S_3-S_H$ et représentent 68,3 mg/l de milieu de culture brut (Tab. IX). La nature et l'origine des formes conjuguées sont diverses : des inositol glycosides (galactinol) aux phosphatidyl-inositols en passant par la série des myoinositols phosphatés.(Posternak, 1962 et Loewus,1990).Par contre, une association avec l'auxine (Ueda et Bandurski, 1969) est peu probable à cause de la fragilité de la liaison ester.

Par ailleurs, les précipités acide P_H (Fig. 27) des surnageants semblent posséder le caractère des acides phytiques, même s'ils ne réagissent pas aux tests des glucides mais répondent à la méthode de Lowry.

Tableau IX : Composition pondérale en inositols endogènes des surnageants glucidiques

Inositols (mg/l)	$S_1S_6-S_H$	$S_1S_6-P_H$	$S_1P_6S_3-S_H$	$S_1P_6S_3-P_H$	Milieu brut
libre (IL)	5,8	ND	2,9	ND	8,7
lié (IL)	12,1	ND	47,5	ND	59,6
I total (IT)	17,9	ND	50,4	ND	68,3

ND: Non déterminé

b)-Autres composés

Quant aux autres composés "polyols" décelés dans $S_1S_6-S_H$ (Fig. 30B et 32), ils sont de deux catégories ; les uns sont des polyols de monosaccharides tandis que les autres correspondent

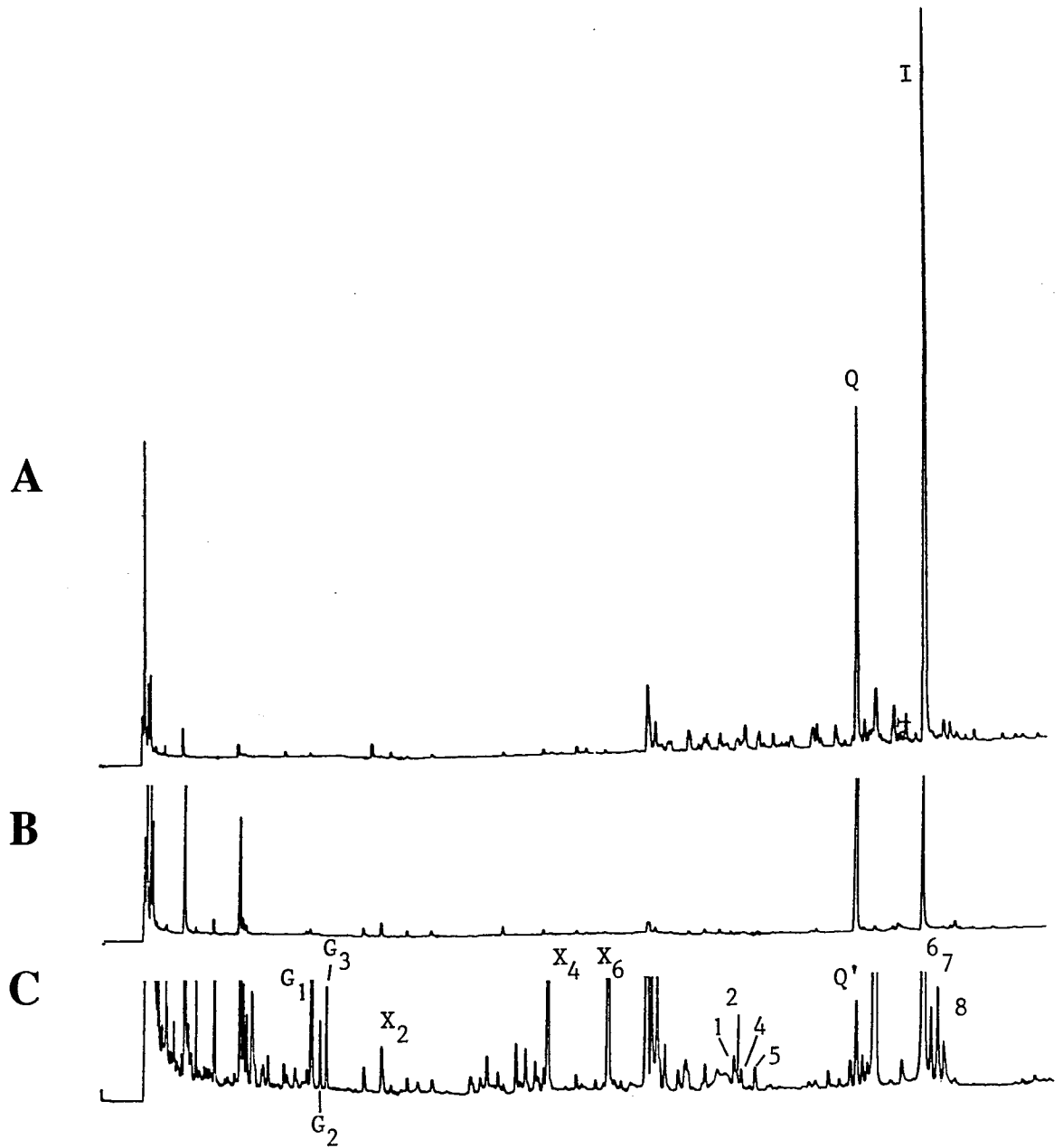
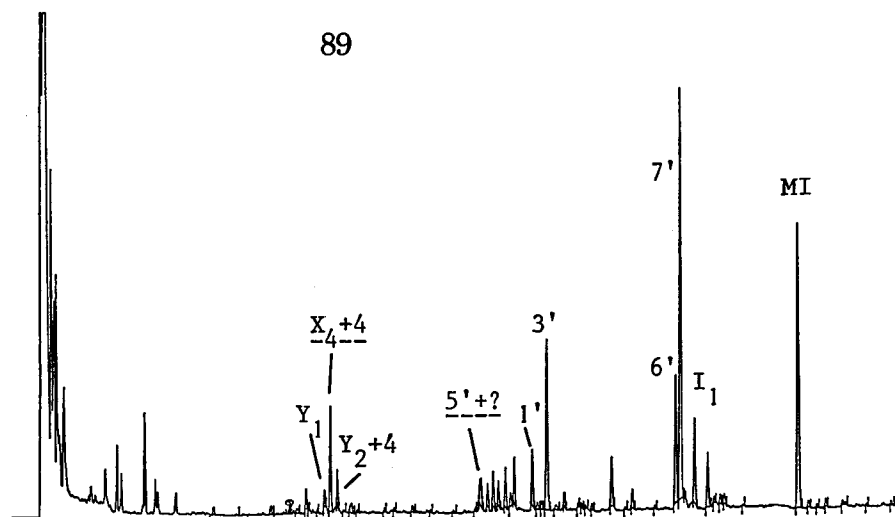


Figure 30 : Chromatogrammes d'élution des polyols endogènes
des surnageants $S_1S_6-S_H$ et $S_1P_6S_3-S_H$

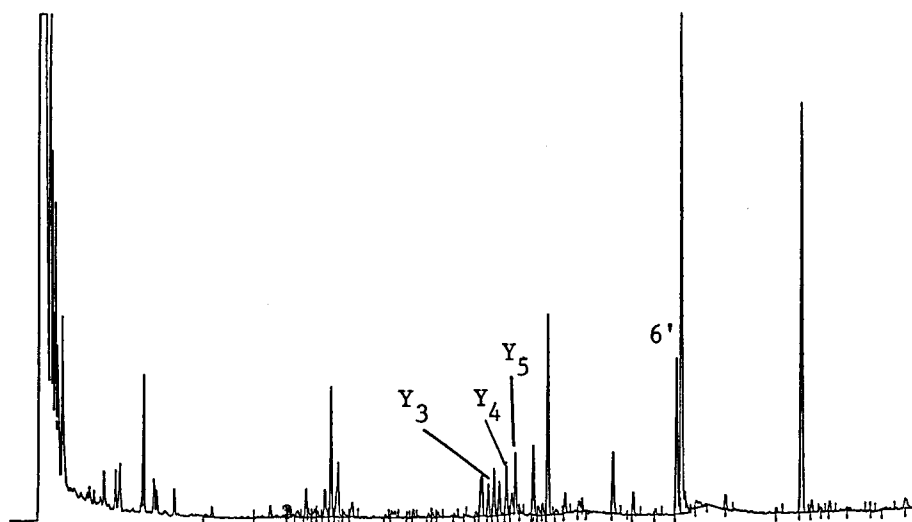
Analyse des dérivés peracétylés:

- **A** = $S_1P_6S_3-S_H$: Préparation analytique AApT (Sans Réduction1 , Hydrolyse et Acétylation)
- **B** = $S_1P_6S_3-S_H$: AApI (Sans Réduction1 et Acétylation directe sans hydrolyse)
- **C** = $S_1S_6-S_H$: AApI (Sans Réduction1 et Acétylation directe sans hydrolyse) ;
Q' = Pic endogène de même tr que le Québrachitol (Q)
- Les annotations conservent la même signification

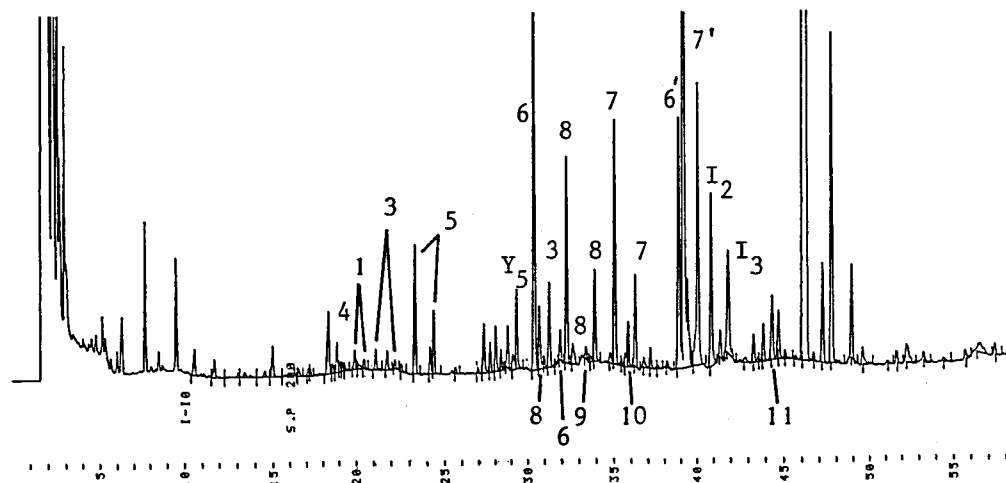
A



B



C



**Figure 31 : Chromatogrammes des préparations analytiques
TMS des surnageants éthanoliques**

- A: S_1S_6-SH -TMSIT ; B: S_1S_6-SH -TMSDT + Excès de réactif BSTFA à 1% de TMCS C: $S_1P_6S_3-SH$ - TMSIT
- Les légendes respectent les définitions précédentes comme X_4 qui désigne le même composé trouvé par acétylation. La série Y sont des dérivés nouvellement révélés par triméthylsilylation
- Les pics indiqués par la série I (I_1 , I_2 , I_3) désignent des dérivés qui correspondent aux isomères d'inositol ou/et à du myoinositol mal dérivé
- Les chiffres à apostrophe correspondent aux polyols des monosaccharides désignés par les mêmes chiffres : $1'$, Rhamnitol ; $3'$, Fucitol ; ...

aux dérivés des précédents (glycérol, G₁ ; déoxy-tétritols, G₂ et G₃ ; déoxy-pentitol, X₄ ; et un dérivé instable à l'hydrolyse, X₆). Les premiers ont été simplement vérifiés par CLG-SM/IE en se référant aux données de Jansson et al. (1976). Dans l'étude détaillée des derniers, la masse moléculaire obtenue par CLG-SM/IC a été représentée par la lettre M.

Les composés G₁, G₂ et G₃ (Fig. 32) sont respectivement identifiés comme étant du triitol triacétate (M=232), du 2-déoxytétritrol triacétate (M=232) et du 1-déoxytétritrol triacétate (M=232). En mode IC (Fig. 33 et 34), un décalage des masses ioniques de +1 m/z est régulièrement observé sur tous les dérivés peracétylés, comme l'indique l'exemple du fucitol hexaacétate deutérié (Fig. 34). G₂ se distingue de G₃ par la faible intensité de la masse ionique 145 par rapport à 84 (Fig. 33) démontrant que les fragments 103 et 145 ne proviennent respectivement que des ions diacétyloxonium et triacétyloxonium (Schéma 1). En outre, dans G₃, ces ions sont en plus issus de fragmentation et de réarrangement au niveau des liaisons carbone-carbone (Schéma 2).

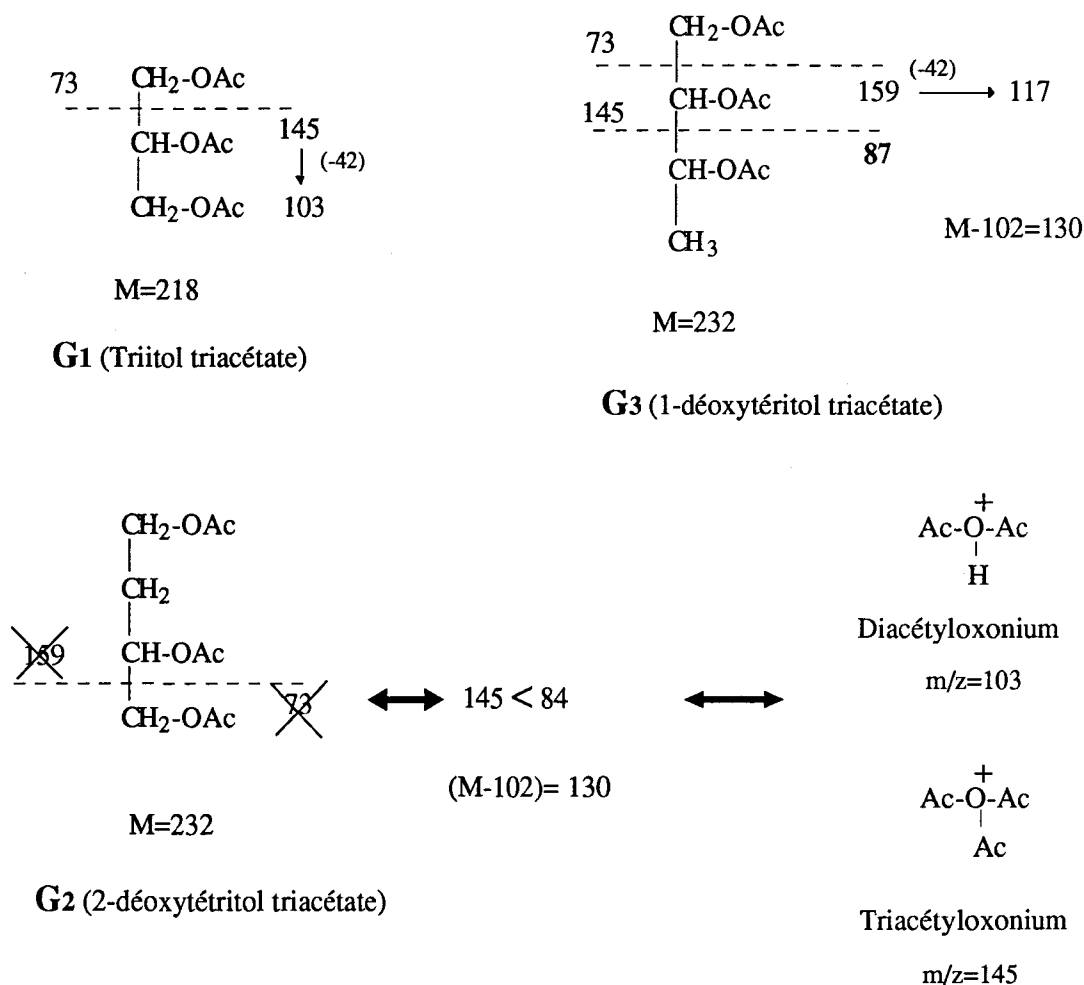


Schéma 1

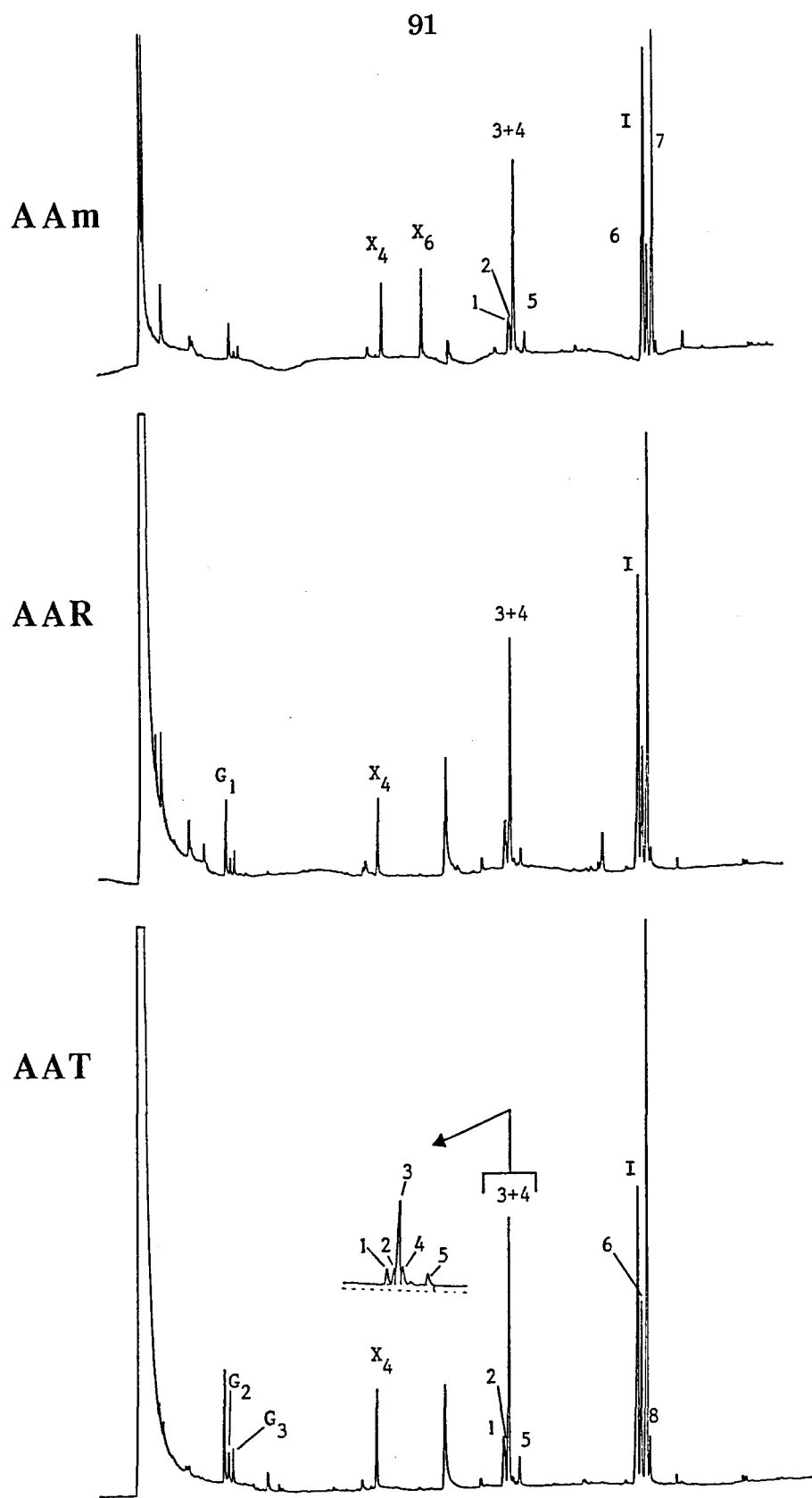


Figure 32 : Chromatogrammes du surnageant $S_1S_6S_H$ (D) deutérié analysé selon les préparations analytiques AAm, AAR et AAT

En médaillon, le chromatogramme de AAT qui montre la coélution des composés 3 et 4 (analyse du même échantillon réalisée sur une colonne CPSil5CB de 60m)

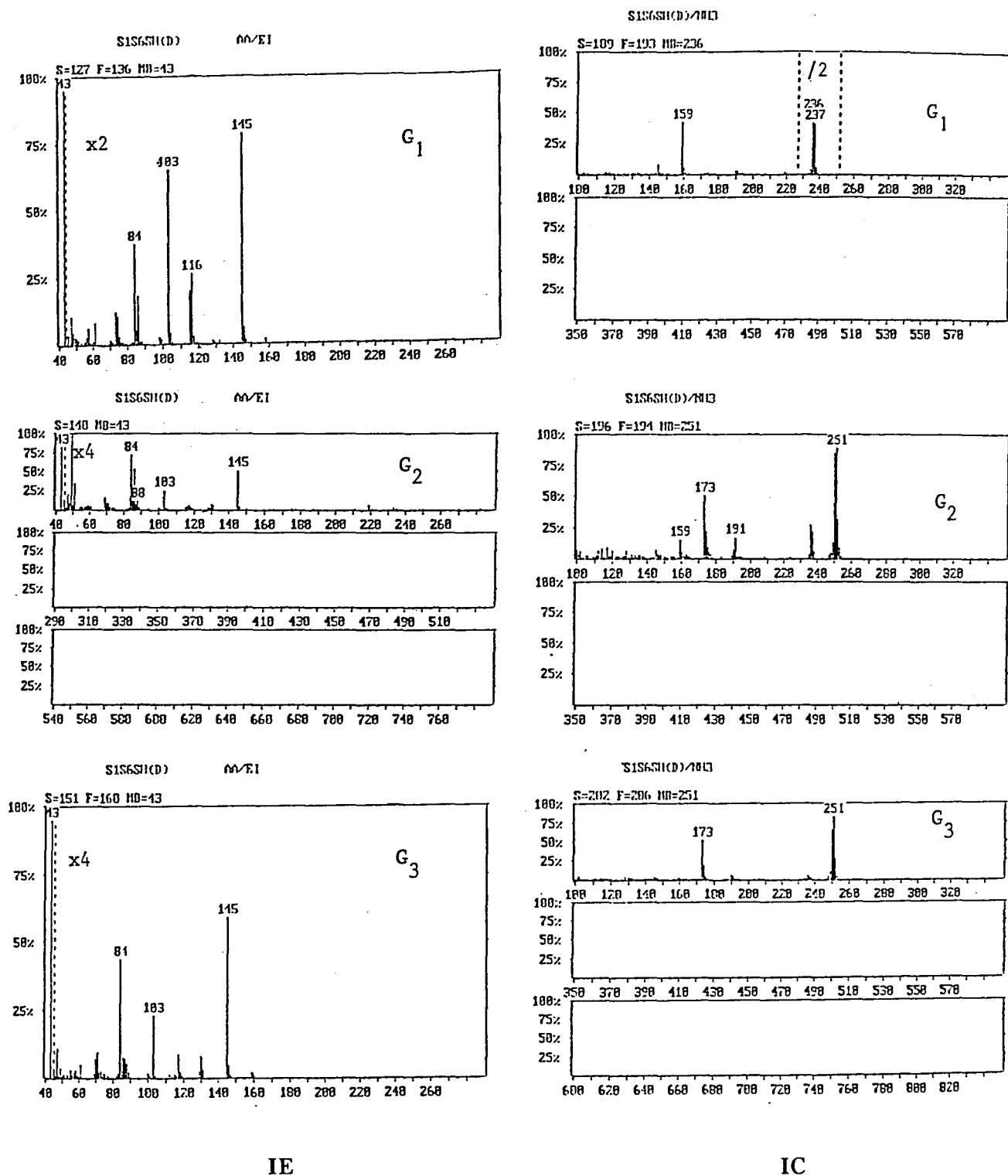


Figure 33 : Spectres de masse des composés G₁, G₂ et G₃ obtenus par analyse CLG-SM en mode IE et IC de la préparation analytique AAm (Fig. 32)

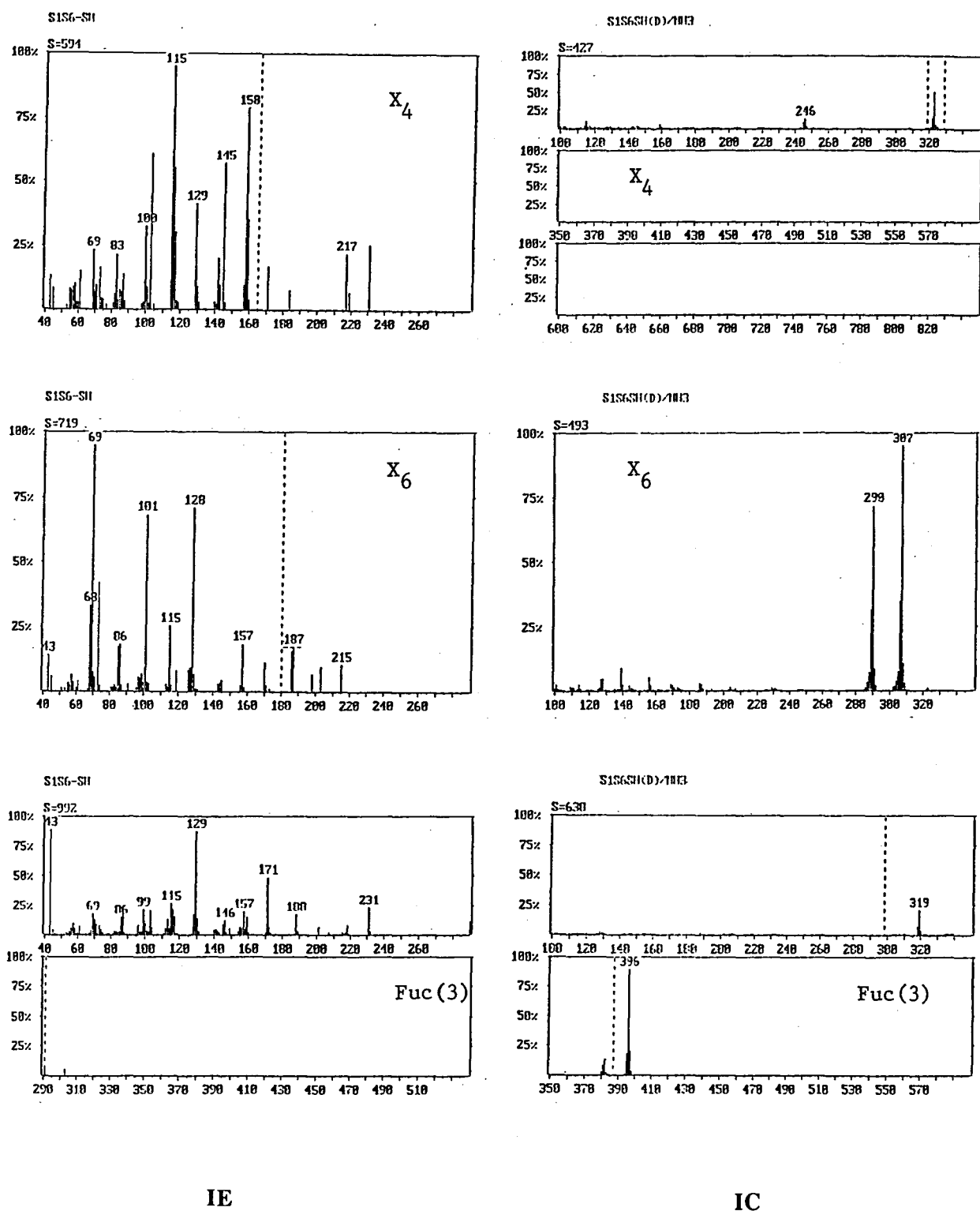
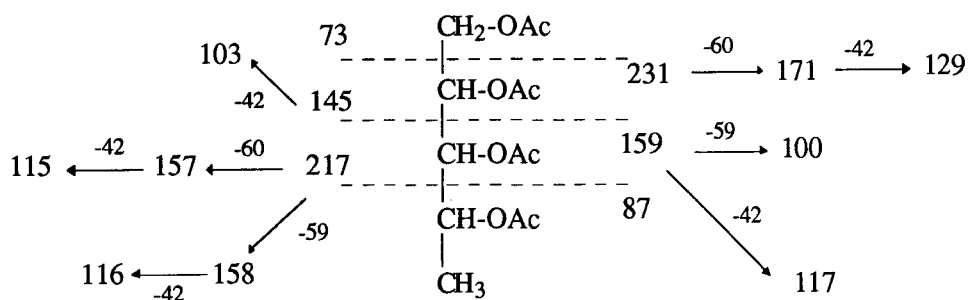
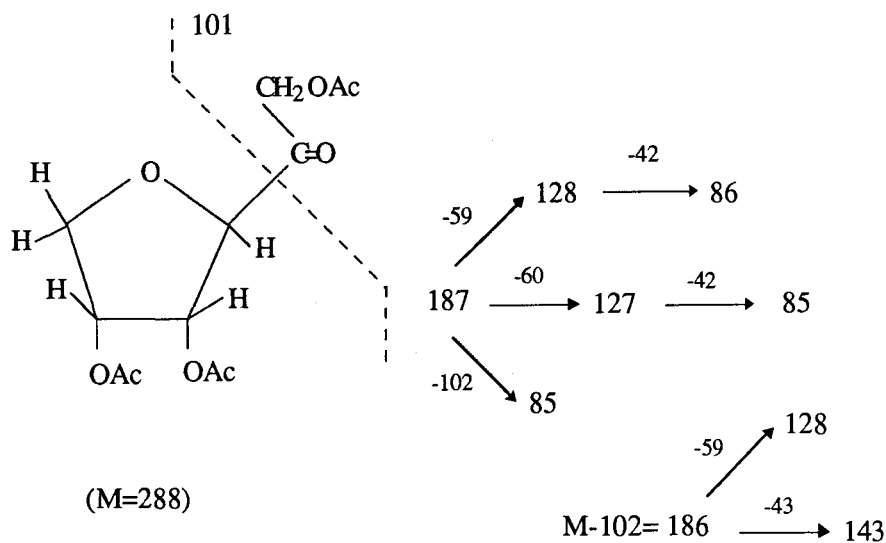


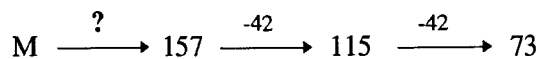
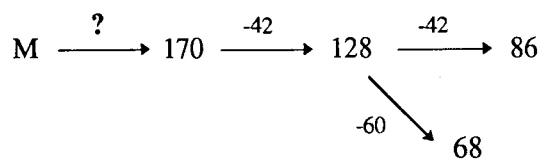
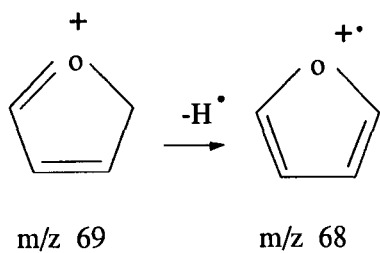
Figure 34 : Spectres de masse des composés X₄, X₆ et Fuc obtenus par analyse CLG-SM en mode IE et IC de la préparation AAm de S₁S₆-S_H (Fig. 32)



(M=304)

X4 (1-Déoxypentitol tétraacétate)

(M=288)

X6 (1,4,5-tri-O-acétyl-3,6-anhydro-2-hexanone)**Schéma 2**

Par ailleurs, la masse ionique 103 ($=M-102$) correspond à la perte d'une molécule d'anhydride acétique formée à partir par deux acétyles vicinaux dont la position et la fréquence déterminent l'intensité de cet ion (Biemann et al., 1963 ; Dejongh, 1965). D'où la présence marquée des masses 116 ($=M-102$) et 130 qui sont respectivement observées dans les spectres de G_1 et G_3 , contrairement à G_2 où 130 est faible.

Quant aux composés X_4 et X_6 (Fig. 32), leurs spectres de masse IE et IC (Fig. 34) figurent avec ceux du fucitol hexaacétate deutérié qui sert de référence pour la reconstitution structurale et pour montrer le décalage de masse ionique. En effet, la masse moléculaire de ce dernier est de 377, soit $M+18=395$ mais non pas 396 qui correspond à $(M+18)+1$. Ainsi, X_4 possède une masse de 304 ($=323-18-1=M$) qui correspond à un 1-déoxypentitol tétraacétate non réduit au deutérium (Fig. 34) dont le mécanisme de fragmentation est détaillé dans le Schéma 2. De même, X_6 est identifié comme étant le 1,4,5-O-triacétyl-3,6-anhydro-2-hexanone d'après les masses ioniques principales 186/187, 85/86 et surtout par 101, en s'appuyant sur les données des travaux de Biemann et al. (1963), de Dejongh (1965) et Chizhov et al. (1971) ; même si certains mécanismes de fragmentation restent inconnus. Par analogie, cette molécule pourrait correspond à un dérivé de fructose, le 1,4,5-tri-O-acétyl-3,6-anhydrofructose (3,6-anhydrofructose triacétate).

De plus, son instabilité à l'hydrolyse (Fig. 32) renforce cette identification car les structures anhydro-hexoses ou -pentoses sont connues pour être acido-labiles en formant des dérivés furanne. Parmi ces derniers, les 2-(2-hydroxyacétyl)furanne ou 2-acétyl-3-hydroxyfuranne, obtenus par traitement acide du D-glucose ou du D-fructose (Feather et Harris, 1973), possèdent une analogie structurale avec X_6 . Pourtant, la stabilité vis à vis la réduction de la fonction carbonyle réductrice (cétone) vicinale d'un hydroxyle est surprenante. Toutefois, deux hypothèses sont possibles, la stabilité en milieu basique de la structure de base qui serait le 3,6-anhydrofructose d'une part ; et d'autre part, le blocage de la fonction carbonyle par acétylation de l'hydroxyle voisin en donnant le 1-acétyl-3,6-anhydrofructose.

2 - Composition du surnageant $S_1S_6-S_H$

a)- Composés nouveaux

α)- Glycérol et glycéraldéhyde ou dihydroxyacétone

Le glycérol principalement lié ($G1= 35,1 \mu\text{g/ml}$; Tab. X) provient de métabolites lipidiques tels que les glycérophospholipides et les galactolipides (Elbein, 1980) ou/et des

Tableau X : Composition pondérale de la fraction S₁S₆-S_H en polyols et monosaccharides, calculée à partir de l'analyse des dérivés peracétylés correspondants

Composition		Préparations analytiques (µg/ml)								
Cr		AApl	{D}AAm	(m)	AApT	(pL)	{D}AAR	(OR)	{D}AAT	(OL)
ND	G1	15,4	13,5		50,5	(35,1)	50,2		66,3	(16,1)
ND	G2	2,3	2,0		10,8	(8,5)	12,0		16,8	(4,8)
ND	G3	3,6	3,5		17,5	(13,9)	16,7		20,4	(3,7)
ND	X ₄	25,4	24,7		80,0	(54,6)	61,3		78,6	
ND	X ₆	39,1	27,5		nd		nd		nd	
0,76	Rha	5,5	16,2	(10,7)	17,1	(11,6)	55,6	(27,8)	57,7	(2,1)
0,80	Rib	2,1	11,3	(9,2)	8,1	(6,0)	28,0	(10,7)	37,8	(9,8)
0,85	Fuc	nd	74,1	(74,1)	nd		245,6	(171,5)	247,0	
0,83	Ara	3,0	15,3	(12,3)	12,4	(9,4)	35,1	(10,4)	58,7	(23,6)
0,78	Xyl	4,1	9,3	(5,2)	13,3	(9,2)	20,8	(2,3)	35,5	(14,7)
0,83	Man	8,6	49,5	(40,9)	30,1	(21,5)	182,8	(111,8)	181,5	
0,80	Glc	13,5	165,0	(151,5)	43,3	(29,8)	616,0	(421,2)	678,1	(62,1)
0,81	Gal	6,1	5,9		trace (<6,1)		18,7	(12,6)	47,8	(29,1)
0,41	GalA	nd	nd		nd		nd		nd	
0,45	GlcA	nd	nd		nd		nd		nd	
0,45	4-OMe-GlcA	nd	nd		nd		nd		nd	
1,00	Inositols	106,5	106,5		328,7	(222,2)	328,7		328,7	(222,2)
	Total	235,2	524,3	(303,9)	617,9	(421,8)	1671,5	(990,5)	1854,9	(389,6)

- (a): AApl, AAm, AApT, AAR et AAT correspondent aux préparations analytiques selon la figure 28:

AApl {Acétylation}, AAm {Red1+Acétylation}, AApT {Hydrolyse (H⁺)+Acétylation}, AAR {Red1+H⁺+Acétylation}, AAT {Red1+H⁺+Red2+Acétylation}. Les valeurs sont exprimées par rapport au volume de l'échantillon

- {D}: Dérivés deutériés, les polyols ont été décelés sur l'échantillon non réduit

- Equations de calcul des composés dans les parenthèses: Polyols libres, (pl)= AApl ; Monosaccharides, (m) = AAm-AApl ; Polyols liés, (pL)= AApT-AApl ; Oses réducteurs, (OR)= AAR-(AApT+m) ; Oses liés, (OL)= AAT-AAR ; les chiffres en italique correspondent à leurs valeurs respectives

- nd: non décelé ; ND: Non déterminé, le Cr est considéré égal à 1

intermédiaires métaboliques comme les 2- ou 3-phosphoglycérol. En effet, la présence de digalactosyldiacylglycérol (DGDG) dans le milieu étudié a été établie par Priem (1990). De plus, Alban et al. (1989) a démontré, sur des cellules d'Erable (*Acer pseudoplatanus*), que la formation des glycérolipides est une propriété générale de tous les plastes, y compris des chloroplastes.

Par ailleurs, l'absence de G_1 réducteur (OR= 0) et sa présence sous forme liée (OL= 16,1 ; Tab. X) s'explique par la formation d'acétal ou de cétal provoquée par l'extraction par l'HCl (Ferrier, 1988), à partir du glycéraldéhyde ou du dihydroxyacétone. En effet, les acétals et les cétales sont les produits de condensation, en milieu acide, de deux groupes hydroxyles avec une fonction carbonyle d'une aldéhyde ou d'une cétone. La forme intramoléculaire se fait sur deux hydroxyles cis-viscinaux, tandis que la condensation intermoléculaire a lieu sur deux hydroxyles portés par deux molécules distinctes.

Leur hydrolyse (AAR et AAT, Tab. X) libère les molécules carbonylées comme le glycéraldéhyde ou le dihydroxyacétone. La réduction après l'hydrolyse (AAT) a permis de déceler ces composés qui n'étaient réduits pas dans les fractions AAR (Tab. X). Ce type de liaison se réalise avec des molécules hydroxylées comme les polyols et les glucides qui peuvent ainsi être chimiquement associés.

Un tel phénomène explique partiellement la présence massive de fucose réducteur (OR=171,5, Tab. X), ou tout autre composé lié (pL, OR et OL) qui présente les mêmes caractéristiques. Finalement, l'absence de ce type de trioses phosphates est surprenante si l'on considère la présence des autres molécules phosphatées, comme le glycérol phosphate (voir ci-dessous), le glucose phosphate et le fructose phosphate (voir ci-après), auxquelles ils sont métaboliquement reliés.

β - Déoxypolyols et déoxy-aldoes ou -cétoes : G_2 , G_3 et X_4

Ces composés non introduits dans le milieu de culture, sont donc produits par la suspension cellulaire. Le cas de G_1 se retrouve pour G_2 , et G_3 , dont les formes liées (OL respectifs, 4,8 et 3,7 $\mu\text{g/ml}$; Tab.X) correspondent donc aux dérivés carbonylés (déoxy-aldoes ou-cétoes) qui entrent dans la structure acétalique. La même interprétation reste donc valable. Par conséquent, l'ensemble des composés G liés (OL= 24,6 $\mu\text{g/ml}$), toujours inférieurs aux molécules hydroxylées, est considéré comme des monomères carbonylés libres avant l'extraction acide du surnageant $S_1S_6-S_H$.

Leurs équivalents polyols, majoritaires, sont principalement impliqués dans des liaisons (G_2 = 8,5 et G_3 = 13,9 ; Tab. X). Quant à X_4 , il est un déoxypentitol dont les 2/3 sont liés (pL=54,6 $\mu\text{g/ml}$, Tab.X) à d'autres constituants du surnageant. Ainsi, l'ensemble de ces polyols

liés n'est pas négligeable. Leur présence est rarement ou pas du tout citée ; il serait donc important de les identifier afin de connaître leur mode d'interaction structurale et leur rôle dans le métabolisme cellulaire. Il est concevable que ces polyols soient phosphorylés.

γ - 3,6-anhydrofructose triacétate (X_6)

C'est un composé qui n'est décelé qu'à l'état libre ($pI = 39,1 \mu g/ml$), comme le montre le tableau VI. L'origine probable de cette molécule est à rapprocher de la formation des anhydrohexoses par déshydratation en milieu acide (Ferrier, 1988), à l'occasion de l'acidification des surnageants. Cependant, les 3,6-anhydrohexoses ne se forment en milieu alcalin qu'à partir d'un hexopyranose activé par un groupe labile, comme le tosyl ou le sulfuryle (sulfate) en O-6. De plus, X_6 existe déjà dans le surnageant S_1S_6 avant l'acidification. Par conséquent, il est fort probable qu'il s'agisse d'un métabolite natif, à la différence d'un composé nouvellement formé par voie chimique comme les acétals décrits ci-dessus.

En conclusion, la présence marquée de ces composés (G_1 , G_2 , G_3 , X_4 et X_6) serait, à première vue, significative des dégradations chimiques qui sont en général de deux types: les dégradations en milieu acide et en milieu alcalin. Cependant, d'après la connaissance actuelle (Feather et Harris, 1973 et Ferrier, 1988) des réactions régissant ces processus, aucun de ceux-ci ne semble donner naissance à ces dérivés. En effet, la formation des dérivés déoxypolyols s'accompagne de celle d'une fonction carboxylique en donnant les acides sacchariniques (Feather et Harris, 1973) lors de la dégradation alcaline, comme en milieu ammoniacal (Kort, 1970). De plus, X_6 ne semble pas provenir de la dégradation alcaline du fructose comme l'indiquent les résultats de Shaw et al. (1968) concernant le brunissement non enzymatique. Par conséquent, d'autres mécanismes réactionnels encore ignorés, plus probablement enzymatiques que chimiques, sont à l'origine de ces composés.

b)- Les polyols et les monosaccharides

Les polyols concernés sont ceux qui correspondent aux monosaccharides et qui ont été précédemment analysés dans les préparations AApl et AApL (voir légendes du tableau X) qui comprennent respectivement les formes libres (pI) et liées (pL). Ces dernières sont en général présentes en quantité double par rapport aux précédentes (Tab. X). A l'exception du fucitol, tous les autres polyols sont décelés avec une prépondérance du glucitol ($43,3 \mu g/ml$) et du mannitol ($30,1 \mu g/ml$). Représentant plus du tiers des oses principaux ($m = 303,9 \mu g/ml$), les polyols totaux correspondants ($pT = 124,3 \mu g/ml$, Tab.X) sont loin d'être négligeables pondéralement, ce qui pose

la question de leur rôle structural et métabolique, compte tenu de la prépondérance des polyols liés.

Quant aux monosaccharides, ce sont le glucose, le fucose et le mannose qui sont majoritaires. Ce dernier a pour origine probable le fructose présent dans le milieu de culture. Effectivement, la méthode d'analyse qui procède à la réduction (Fig. 28) préalable de l'échantillon (AAM, AAR et AAT), aboutit à la formation de mannitol et de glucitol à partir du fructose. Cette réaction apporte alors une quantité équimolaire de glucitol, doublant ainsi la valeur du glucose dosé (151,5 µg/ml).



c) - Monosaccharides conjugués et oligosaccharides

L'analyse de la composition glucidique de $S_1S_6-S_H$ repose sur l'identité des oses réducteurs (OR) et des oses liés (OL) qui y sont associés.

Les monosaccharides conjugués correspondent aux monosaccharides substitués par d'autres molécules que les glucides, par exemple les phosphates. Ils sont évalués à partir des oses réducteurs en excès. Parmi ces derniers, le fucose (OR= 171,5 µg/ml, Tab. X) et le mannose (OR= 111,8 µg/ml) sont notamment concernés, compte tenu de l'absence de leurs formes liées (Tab. X). Cette considération est corroborée par les analyses des dérivés triméthylsilylés (Tab. XI) qui ne révèlent pas de méthylfucoside ni de méthylmannoside. Il est important de remarquer que ce dernier possède le même temps de rétention que le rhamnitol (Niwa et al., 1984), comme le confirme l'analyse CLG-MS de la fraction $S_1S_6-S_H$. Le fait que ces deux oses existent exclusivement en position réductrice (OR=171,5 µg/ml), suggère qu'ils constituent des intermédiaires métaboliques phosphatés. L'importance du fucose laisse peu de place à un artefact d'autant plus qu'il est observé avec une série régulière de déoxypolyols (G2, G3 et X_4). En outre, l'absence de mannose lié tend à faire admettre que le mannose réducteur (OR= 111,8 µg/ml) provient du mannose 6-phosphate ou du fructose 6-phosphate, comme pour les monosaccharides. Dans ce cas, une quantité équivalente est comprise dans la valeur du glucose réducteur (421,2 µg/ml). Enfin, le ribose semble se limiter aux métabolites de transfert (dérivés phosphatés pour les oses réducteurs, et nucléotides de transfert pour les oses liés).

Quant à l'estimation de la nature des oligosaccharides contenus dans le surnageant $S_1S_6-S_H$, elle est réalisée en considérant les oses réducteurs corrélativement aux oses liés (OL). Le rhamnose appartient à des fragments pectiques, notamment des motifs de la chaîne principale (-Rha-Rha, GalA-Rha, ou -Rha-GalA) et/ou des oligomères des chaînes latérales (Ara-Rha, Gal-Rha, Ara-Gal-Rha, Gal-Gal-Rha, ...). La présence éventuelle d'acide D-galacturoniques n'est pas à négliger, même s'il n'est pas directement mesurable.

Tableau XI : Composition pondérale des surnageants déterminée par triméthylsilylation (Fig. 31)

- Les abréviations des monosaccharides (Ara, Rha, ...) représentent leurs dérivés Méthyl-glycosides respectifs qui désignent leurs formes liés (OL).

- Les polyols (Xylitol, Arabinitol, ...) incluent à la fois les polyols endogènes libres (pl) et liés (pL), les monosaccharides (m) et les oses réducteurs (OR). Leurs coefficients de réponse $Cr^{(1)}$ sont ceux établis par Bradbury et al. (1981).

- La série Y représente des composés non identifiés dans les chromatogrammes des dérivés triméthylsilylés. X_4 désigne le même composé révélé lors de l'analyse des acétates d'alditol.

- (*) : Extrapolation de la valeur calculée en acétates d'alditol de l'arabinose lié (OL=23,6) en tenant compte du rapport (1/3) entre les aires des deux pics anomériques du Méthyl-arabinoside, soient environ 15,7 et 7,9. Ces dernières sont multipliées par le Cr du Méthyl-arabinoside pour estimer leur influence respective sur X_4 et Y_2 , d'où les valeurs de 11,3 et 5,7.

- **nd**: non décelé

- **ND**: Non déterminé. Les Cr non déterminés prennent la valeur 1.

Compositon	Fractions (µg/ml)		
	Cr	$S_1S_6-S_H$	$S_1P_6S_3-S_H$
Y_1	ND	26,5	nd
X_4 +Ara	ND	81,1+11,3*	nd
Y_2 +Ara	ND	53,2+5,7*	nd
Ara	0,72	(23,0)*	119,2
Rha	0,88	nd	16,6
Rib	0,88	nd	nd
Fuc	0,98	nd	24,2
Xyl	0,89	12,3	165,0
Xylitol	0,79 ⁽¹⁾	40,3	56,8
Y_3	ND	25,9	12,2
Arabinitol	0,79 ⁽¹⁾	42,8	49,6
Ribitol	0,79 ⁽¹⁾	30,3	27,0
Y_4	ND	39,3	18,5
Y_5	ND	50,4	32,6
Rhamnitol (+ Man)	0,75 ⁽¹⁾	59,2	nd
Man	0,86	nd	462,3
Fucitol	0,75 ⁽¹⁾	253,0	115,8
Gal	0,95	36,5	373,2
Glc	0,92	68,4	331,4
GalA	0,41	nd	16,2
GlcA	0,45	nd	47,3
4-OMe-GlcA	0,45	nd	nd
Mannitol	1,00	167,2	271,8
Glucitol	1,00 ⁽¹⁾	527,1	1031,8
Galactitol	1,00 ⁽¹⁾	10,0	49,4
GlcNAc	0,65	nd	97,9
Inositols	1,00	328,7	2772,2
Total (µg/ml)		1869,2	6091,0

En effet, le méthylrhamnoside triméthylsilylé (Tab. XI) qui correspond à la forme liée (OL=2,1 ; Tab.X) obtenue par acétylation n'est pas décelé en même temps que l'acide D-galacturonique. Ce fait n'est pas étonnant puisque les aldobiouronides résistent très bien aux conditions d'hydrolyse employées. De plus, une étude précédente (Nazih, 1988) avait déjà mentionné une fraction dont le rapport GalA/Rha égal à 2,2 était considéré comme représentatif d'un di- ou trisaccharide. Les oligoarabinosides de DPr 3,3 peuvent correspondre à des trisaccharides (Ara-Ara-Ara) comme à d'autres chaînes latérales pectiques (Ara-Rha, Ara-Ara-Rha, Ara-Gal-Rha, ...) compte tenu du taux élevé du rhamnose réducteur. Il en est de même des oligogalactosides dont le DPr vaut également 3,3.

En ce qui concerne les oligoxylosides, la quantité de xylose réducteurs (OR=2,3) aboutit à un DPr égal à 7,4. Cette valeur est relativement élevée pour des oligosaccharides présents dans le surnageant 6 volumes d'éthanol absolu. Par conséquent, certains xyloses liés appartiennent à d'autres oligosaccharides comme les arabinoxylosides ou les xyloglucosides. Ces derniers définis par la présence simultanée de glucoses réducteurs et liés, peuvent être en mélange avec des oligoglucanes homogènes (maltose, cellobiose, ...) ou hétérogènes (glucomannane). De plus, la forte teneur en glucose et mannose réducteurs (OR) par rapport à celle du glucose lié (OL) est à relier à la présence du fructose 6-phosphate, comme cela a été précédemment discuté.

Enfin, l'analyse par triméthylsilylation (Tab.XI) de cette fraction confirme les interprétations précédentes. La valeur du xylitol triméthylsilylé (40,3 µg/ml) qui correspond à la somme du xylitol total et du xylose réducteur (AAR, Tab.X), est le double de celle-ci, à cause d'une coélution d'un pic inconnu (5'+?, Fig. 31A et 31B). De plus, les composés de la série Y ne sont pas identifiés malgré l'analyse par CLG-SM, car nous ne disposons pas de témoins adéquats. Par ailleurs, l'estimation respective des composés X_4 et Y_2 qui sont coélus avec les anomères du méthylarabinoside est faite par extrapolation de la valeur de l'arabinose lié, calculée par acétylation (OL=23,6 µg/ml, Tab. X). Dans l'ensemble, les résultats des deux types d'analyse sont similaires et montrent que ce surnageant contient principalement des polyols, des monosaccharides, des oligosaccharides (DP 2 et 3) et des intermédiaires métaboliques.

3 - Composition du surnageant $S_1P_6S_3-S_H$

A cause de la forte teneur en inositols endogènes qui empêche l'analyse par acétylation, seule la triméthylsilylation a pu être réalisée grâce à l'étalonnage externe de ces inositols. La similitude des résultats d'analyse de $S_1S_6-S_H$ par les deux méthodes analytiques (acétylation et triméthylsilylation) valide l'étude de la composition de $S_1P_6S_3-S_H$ établie uniquement par triméthylsilylation.

Celle-ci fournit, d'une part, l'ensemble des polyols totaux, des monosaccharides et des oses réducteurs, sous forme de polyols ; et de l'autre, les oses liés sous forme de méthylglycosides. Ainsi, on retrouve pratiquement la même composition que $S_1S_6-S_H$ avec l'augmentation du degré de polymérisation. En effet, la valeur du DPr varie de 3,4 ($= (119,2+49,6)/49,6$) pour les oligoarabinanes à 8,5 (Tab. XI) pour les oligogalactanes. Le fucitol (115,8 $\mu\text{g/ml}$) représente le fucose réducteur alors que le méthylfucoside (Fuc= 24,2) provient de fragments de RGII. Des particularités sont observées, telle la mise en évidence de glucosamine N-acétylée, du fucose, du mannose et du xylose qui signale la présence des N-glycannes (Priem et al., 1990). Le rapport molaire entre le fucose et le GlcNAc (1: 2,7) est conforme aux glycannes antérieurement identifiés, le (Xyl)Man₃-GlcNAc(Fuc)GlcNAc, le Man₅GlcNAc (Priem et al., 1990) et le GlcNAc(Xyl)Man₃-GlcNAc(Fuc)GlcNAc (Lhernould et al., 1992).

En plus des oligoxyloglucanes de DPr 7 (Priem,1990), l'excédent de xylose peut être attribué à des oligoxylosides, compte tenu de la présence de xylose réducteur et d'acide glucuronique. Ces derniers auraient des degrés de polymérisation compris entre 3 et 4 (GlcA-Xyl-Xyl, GlcA-Xyl-Xyl-Xyl, Xyl-(GlcA)-Xyl-Xyl). En outre, l'existence d' oligoarabinoxylsides n'est pas exclue. Par ailleurs, l'équimolarité du rhamnose et de l'acide galacturonique est l'empreinte du motif rhamnogalacturonique. Par ailleurs, les oligogalactosides et les arabinosides ont respectivement un DPr de 8,6 et 3,4.

En conclusion, grâce au protocole analytique utilisé, une meilleure estimation du contenu des surnageants a été obtenue. Celui-ci est principalement constitué d'intermédiaires métaboliques des glucides, d'oligosaccharides pectiques (motifs RGI et RGII et chaînes latérales), d'oligo(arabino)xylosides, d'oligo(xylo)glucosides et d'oligo(galacto)glucosides.

IV- CONCLUSIONS

- Grâce au protocole analytique utilisé, l'association de méthodes de fractionnement, de quantification et de caractérisation structurale, s'est avérée efficace dans l'identification primaire de la composition glucidique du milieu de culture.

- L'identification des polysaccharides contenus dans un échantillon est affinée au cours de purifications successives, en permettant d'isoler une seule catégorie de polysaccharide, caractérisé par un ose réducteur unique. De plus, l'obtention d'une courbe de Gauss lors de l'étalonnage des masses moléculaires par chromatographie, fournira une meilleure estimation du degré de polymérisation du polysaccharide étudié. Les données de l'analyse par méthylation compléteront ces résultats.

- L'étude de la composition des fractions montre les avantages du protocole mis au point qui permet le ciblage de constituants intéressants et l'orientation des méthodes d'étude en fonction de la nature des composés étudiés.

- Composition de P_{1i} : Il s'agit d'un complexe de polysaccharides pectiques (chaîne principale RGI, arabinanes ou arabinogalactanes), de glucanes (cellulose) et de galactomannanes qui rappelle à la fois les modèles pariétaux proposés par Keegstra et al. (1973), et les interconnexions structurales de Fry (1986). L'insolubilité de cette fraction corrobore le fait qu'elle correspond probablement à des fragments arrachés à la paroi.

- Composition de P_{1s} : Cette fraction apparaît comme un mélange de glucanes (xyloglucanes et cellulose), d'hémicelluloses (xylanes, mannanes, galacto(gluco)mannanes, glucomannanes) et de RGI fortement ramifié par des (arabino)galactanes.

- Composition de $S_1P_6P_3$: Les polymères qui s'y trouvent correspondent au mélange des contenus des fractions précédentes mais ils sont de plus faible taille.

- Contrairement aux précipités, les surnageants renferment du galactose réducteur, ce qui indique l'existence probable de galactosidases. Dans ce cas, celles-ci ne pourraient être que des endogalactosidases qui n'agissent pas sur les galactanes ramifiés ou sur les hétérogalactanes comme les arabinogalactanes. Ainsi, la présence de ces dernières dans les précipités provenant du premier surnageant, se trouverait validée.

- Par ailleurs, l'existence de polyols en quantité conséquente, dominée par les formes liées (phosphatées), démontre que les cellules de Silène les produisent et suggère qu'elles peuvent les utiliser comme source ou réserve de carbone, dans des conditions extrêmes, afin de suppléer au manque de saccharose. Toutefois, Dubois (1980) démontre que la suspension cellulaire de silène n'utilise pas le mannitol comme source de carbone. Il peut aussi s'agir d'une forme de stockage de substances issues probablement du contenu des vacuoles qui occupent près de 90 % du volume cellulaire (Boller et Wiemken, 1986 et Morvan, 1986). La composition et le rôle régulateur de la vacuole orientent vers cette hypothèse (Boller et Wiemken, 1986). En se référant aux travaux cités par ces auteurs, il est concevable que des polyols phosphatés ou non puissent servir à la régulation du cytoplasme par les vacuoles. Il en serait de même pour les myo-inositols endogènes.

- La composition globale est conforme au métabolisme cellulaire en considérant les intermédiaires métaboliques (monosaccharides phosphatés). Cependant, l'absence du glycérol-3-phosphate ou du dihydroxyacétone-phosphate et la présence des composés suivants: les fragments et les polysaccharides pariétaux, le digalactosyl(diacyl)glycérol, les N-glycannes et des oligosaccharides relatifs à la dégradation des glucides pariétaux, seraient la manifestation d'un métabolisme intense marqué par le stade catabolique.

L'hypothèse de la lyse cellulaire devrait aboutir à la détection du glycéraldéhyde phosphate ou/et dihydroxyacétone phosphate dans la mesure où ils se trouvent dans le cytoplasme et dans les organites tels que les mitochondries, les vacuoles et les plastes. L'explication de cette absence serait la mobilisation intensive de ces molécules pendant l'étape de la respiration cellulaire en accaparant la totalité disponible, lorsque les cellules sont dans un environnement défavorable. Cette explication est probable puisqu'au stade de 14 jours de culture, le milieu est pratiquement épuisé en saccharose (Morvan, 1986). Les cellules sont pratiquement considérées comme en état de privation en saccharose.

L'étude de la composition glucidique des fractions brutes incite à poser la question sur la nature des enzymes impliquées. Ainsi, l'absence de galactose réducteur semble indiquer celle des endogalactosidases, tandis que les activités rhamnogalacturonosidases, endopolygalacturonosidases, endoarabinosidases, endomannosidases, endo- β -xylanases et endo- β -glucanases sont respectivement signalées par les oses réducteurs suivants: GalA, Ara, Man, Xyl et Glc. La présence du rhamnose réducteur est surprenante puisqu'il correspondrait à une coupure de la liaison ($\rightarrow 2\text{-Rha} \rightarrow 4\text{-GalA} \rightarrow$). Par conséquent, on peut évaluer la nature et l'évolution des activités enzymatiques par le biais des glucides extracellulaires, afin d'identifier les enzymes. A l'inverse, la connaissance de l'activité enzymatique contribue à l'identification des glucides. Dans ces conditions, il resterait à démontrer la présence de réactions enzymatiques susceptibles de justifier l'origine des glucides extracellulaires, selon une approche similaire à celle empruntée par Cartier (1986). Sans oublier la possibilité d'une activité enzymatique fugace, il serait nécessaire d'effectuer parallèlement une cinétique de la production des oses réducteurs puisqu'une enzyme pourrait bien agir en début de culture mais pas à la fin.

C H A P I T R E I I

Les polysaccharides

extracellulaires solubles

"Etudier sans réfléchir est vain ; méditer sans étudier est périlleux"

(Koung Fou-tseu, 551-479 av. J.C.)

I - INTRODUCTION

Après une première étude de la composition des glucides du milieu de culture, il est possible de dresser un bilan des polysaccharides mis en évidence: composés pectiques portant des arabinogalactanes (homogalacturonanes, rhamnogalacturonanes I et II), glucanes (cellulose et xyloglucanes), mannanes (galacto/gluco/mannanes), xylanes. Cette liste présente d'elle-même ses limites, à savoir qu'une identification des polysaccharides uniquement basée sur leur composition et sur la nature des oses réducteurs est insuffisante, à partir du moment où la fraction analysée contient des polymères hétérogènes et différents. C'est la raison pour laquelle la séparation des polysaccharides a été accentuée par l'adjonction de méthodes chromatographiques en vue d'obtenir des fractions suffisamment isolées, dont l'homogénéité des contenus est certifiée par la distribution des pics d'élution. L'identification précise des fractions peut alors être entreprise par une caractérisation des liaisons par méthylation ou encore par des méthodes non destructives comme la RMN.

Pour parvenir à cet objectif de tri moléculaire des polysaccharides du milieu de culture, il était indispensable de modifier dès le départ la stratégie préparative en introduisant des filtrations et dialyses pour se débarrasser des insolubles d'une part, des ions, des monosaccharides et de certains oligosaccharides, d'autre part.

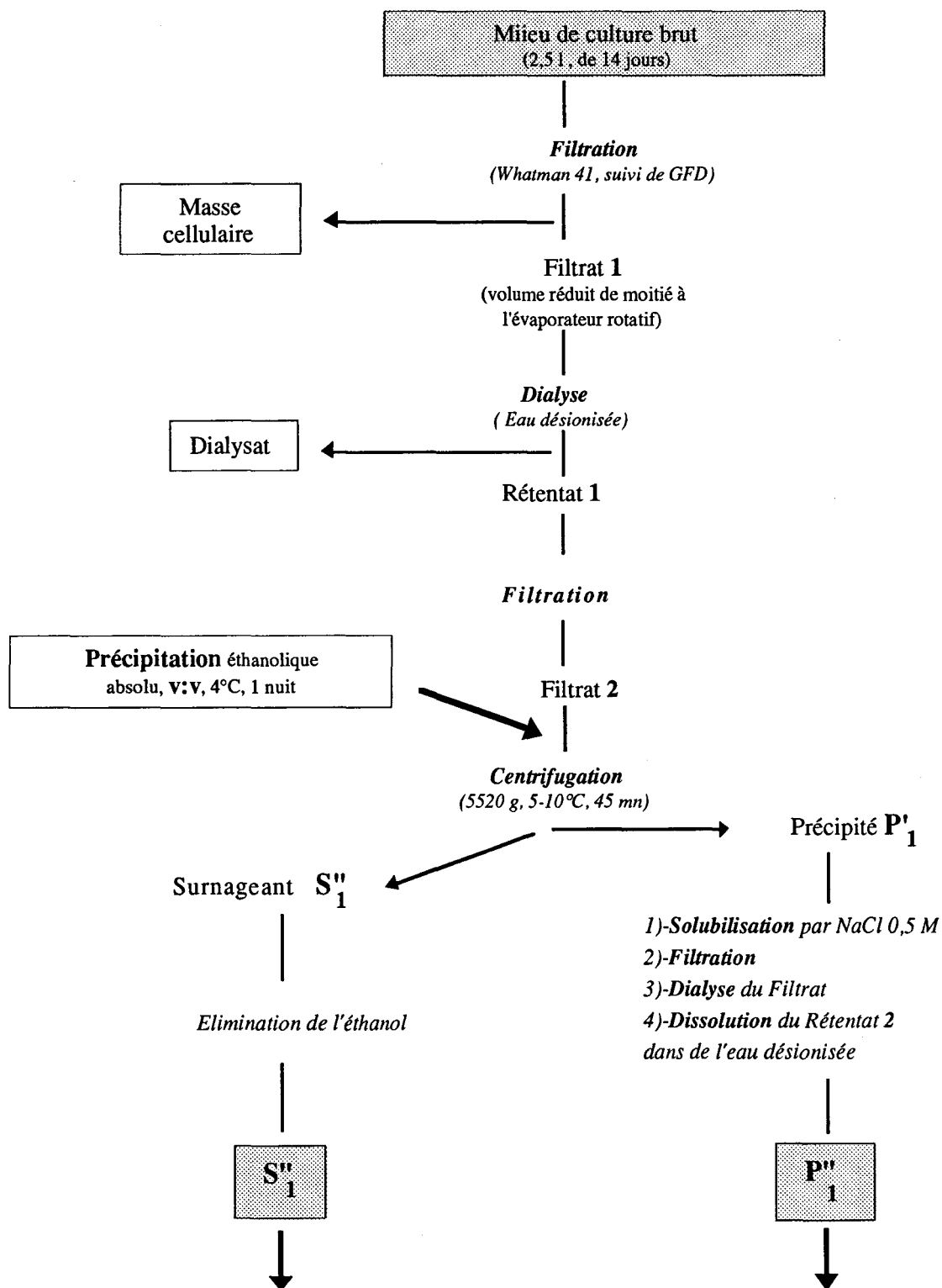
II - PRESENTATION DES METHODES

A.- Extraction et Purification

1 - Précipitation éthanolique

Le protocole utilisé (Fig. 35) ne prend en compte que les polysaccharides extracellulaires solubles dans le milieu de culture.

Pour cette étude, 2,5 litres de milieu de culture ont subi une série de fractionnements. Après filtration et concentration, ils sont dialysés contre de l'eau désionisée, et de nouveau concentrés pour être ensuite précipités par 1 vol. d'éthanol absolu pendant une nuit à 4°C. Une fois séparés par centrifugation, le surnageant (S_1'') et le précipité (P_1') sont ensuite traités séparément. S_1'' est débarrassé de l'éthanol à l'évaporateur rotatif avant de subir la chromatographie d'échange d'anions. Quant à P_1' , il est repris par du NaCl 0,5 M, filtré puis dialysé contre de l'eau désionisée, donnant la fraction P_1'' qui sera traitée par la chromatographie d'échange d'anions.



A)- Chromatographie d'échange d'ions DEAE Séphadex A 50/ Cl⁻ :

Elution discontinue suivie à l'UV206 nm, au Phénol et au mHDP
Eluants: Eau désionisée, NaCl (0,1M ; 0,3M ; 0,5M ; 1M) et 0,5M NaOH

B)- Chromatographie d'exclusion de masse :

Gels: Séphacryl S200, ...; Biogel P2, P6; Séphadex G-10; ...
Eluants: Eau et divers tampons

Figure 35 : Protocole de fractionnement et de purification des exopolysaccharides solubles du milieu de culture de la suspension cellulaire de silène

2 - Méthodes chromatographiques

S1, débarrassé de l'alcool et concentré à 196 ml, est fractionné sur une colonne (20 x 2,7 cm) d'échangeuse d'anions (Séphadex DEAE A-50, forme Cl^- ; Pharmacia) équilibrée dans l'eau désionisée. Le précipité P1" est concentré à 375 ml avant d'être chromatographié sur une colonne (30 x 3 cm) de Séphadex A-50, sous forme Cl^- (Fig. 35).

L'élution par un gradient discontinu de solutions de NaCl (0,1 M ; 0,3 M ; 0,5 M et 1 M) est précédée du rinçage à l'eau pour se terminer par une élution avec une solution de NaOH 0,5 M. Le volume respectif des éluants correspond au plus à 2 fois le volume du gel. Ensuite, des fractions sont analysées par chromatographie d'exclusion (CESM) sur divers gels: Sephacryl S-500 et S-200, Séphadex G-10 (Pharmacia) ; Biogel P-6 et P-2 (Bio-Rad) ; et Fractogel TSK HW-40S (Merck). L'élution chromatographique est généralement suivie à la lumière ultra-violet 206 nm, et le profil d'élution est réalisé par dosages des oses totaux et des acides uroniques. Par ailleurs, on a utilisé des résines échangeuses d'ions telles que la Dowex 50x8 (H^+), 20-50 mesh et la Dowex 1x2 (HCO_2^-), 200-400 mesh (Fluka). L'éluant, de nature diverse selon le type de matrice, comprend de l'eau désionisée, des solutions salines (acétate de sodium, formiate d'ammonium), et de l'acide acétique à 0,1 % et 0,5 %.

La chromatographie sur couche mince est faite dans un solvant de migration composé de n-butanol: acide acétique: eau (2:1:1) pendant 6 h à 8 h, le temps nécessaire pour que le front de migration du solvant soit à 1 cm environ du bord supérieur de la plaque de silice 60 (Merck). Ces derniers supports chromatographiques servent aussi à repérer la présence des fractions glucidiques au sortir d'une élution chromatographique sur colonne. Pour cela, ils doivent être traités par une pulvérisation de solution d'orcinol à 0,1 % (p:v) dans de l'acide sulfurique 20 % (v:v) et chauffés dans un four à 120°C pendant 5 à 10 mn, pour révéler les glucides.

B.-Analyses

1 - Quantification

Les diverses fractions obtenues sont analysées qualitativement et quantitativement par pesée, par dosages colorimétriques (Annexe 1), et par CLG. Les dosages des sucres sont effectués avec les méthodes citées en annexe 2. Une meilleure détermination des oses est faite en

effectuant une comparaison avec les valeurs obtenues en CLG (cf., Chapitre 1). Les protéines sont déterminées par la méthode de Lowry et al., (1951).

2 - Caractérisation par méthylation

Elle est réalisée selon les méthodes de Paz Parente et al. (1985) et de Blakeney et Stone (1985) pour l'utilisation de la base de méthylation (butyl lithium) et de Jansson et al. (1976) pour les conditions d'hydrolyse et la détermination des Alditols Acétates Partiellement Méthylés (AAPM). Le protocole est détaillé dans l'annexe 3. L'identification des divers AAPM a été faite à partir des polysaccharides témoins purs tels que les (galacto/gluco)mannanes (Silène), la glucuronoxylane (Bouleau) et de l'arabino-3,6-galactane (Pin) en effectuant des recoupements entre les données de ces différents échantillons. Les valeurs ont été corrigées en utilisant les facteurs de réponse molaire établis par Sweet et al. (1975).

La comparaison des procédés de méthylation des polysaccharides par le hydrure de sodium (Hakomori, 1964), par le ter-butoxyde de potassium (Finne-Krusius et Rauvala, 1980) ou par la soude (Ciucanu et Kerek, 1984), a conduit à sélectionner finalement celui de Paz Parente et al. (1985) qui utilise le butyl lithium pour générer la base, le lithium méthylsulfinyl carbanion. Cette méthode fournit des résultats relativement reproductibles et quantitatifs.

Le but de la méthylation des polymères glucidiques (oligosaccharides et polysaccharides) est de déterminer les points de liaison ou de substitution des monosaccharides qui entrent dans leur composition. Son principe consiste à méthyler tous les groupements hydroxyles libres du polymère avant de procéder à la coupure des liaisons glycosidiques par hydrolyse ou méthanolyse. Lorsque ces liaisons sont rompues par hydrolyse, la fonction réductrice hémiacétalique des monosaccharides libérés est réduite avant d'effectuer l'acétylation des fonctions hydroxyles générées à la fois par la rupture des liaisons et par la réduction. On obtient ainsi des dérivés uniques, les acétates d'alditols partiellement méthylés (AAPM). Ce procédé a été choisi car il permet une analyse simple et pratique des échantillons qui présentent une grande diversité de monosaccharides (cinq en moyenne) et de liaisons. Réalisée convenablement, cette méthode qualitative donne des résultats semi-quantitatifs (Lindberg et Lönngrén, 1978 ; Harris et al., 1984 et Selvendran et Ryden, 1990). C'est la raison de son choix par rapport à celle qui utilise des dérivés méthylglycosides partiellement acétylés et méthylés, obtenus après méthanolyse.

3 - RMN du ^{13}C

Les analyses sont effectuées selon le protocole décrit en annexe 4. Le choix des échantillons analysés repose sur leurs compositions typiques et intermédiaires. Les différentes concentrations analytiques des fractions sont les suivantes:

- Snr-A: 69 mg/ml de D_2O
- Snr-B: 10,5 mg/0,5ml
- S01-B: 15 mg/0,6ml
- Pnr: 108 mg/ml
- P01-B: 26 mg/0,6ml
- P03-B: 21 mg/0,6ml

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'intérêt de bien séparer et purifier les exopolysaccharides avant de les analyser est de permettre plus aisément leur caractérisation ultérieure. L'estimation quantitative des différentes catégories de composés permet d'évaluer la composition globale des polymères du milieu de culture. D'après la répartition des oses dans l'ensemble S_1'' et P_1'' , les exopolysaccharides solubles isolés apparaissent principalement neutres. La comparaison de ces derniers entre eux (Tableau XII) montre que le premier est 2 fois moins riche en oses neutres et en acides uroniques mais contient autant de protéines (3 et 3,6 %).

L'ensemble des contenus glucidiques et protéiques de ces deux fractions principales représente 798,1 mg par litre de milieu de culture, soit une moyenne de 130,8 mg/fiole pour une culture de 14 jours. Comparativement aux résultats de Morvan (1986) exprimés en masse de précipité éthanolique 6 volumes qui donnaient 293 mg / fiole, ces valeurs sont très inférieures. La différence provient probablement du fait que les grandeurs ne sont pas tout à fait du même ordre. En effet, la pesée du précipité 6 vol.d'éthanol ne mesure pas uniquement les glucides et les protéines solubles ; elle tient aussi compte des lipides, de certains débris cellulaires et des sels entraînés par la précipitation éthanolique.

Par contre, la valeur de 130,8 mg reflète uniquement les glucides et les protéines solubles. Cette valeur se rapproche de celle des polymères totaux, obtenue au chapitre I, qui est de 134,14 mg / fiole.

**Tableau XII : Répartition pondérale des glucides et des protéines
des fractions principales S₁" et P₁"**

FRACTION	Surnageant S₁"		Précipité P₁"	
	mg	% total	mg	% total
Oses neutres	710,4	36,2	958,1	48,8
Acides uroniques	59,3	3	103,3	5,3
Glucides totaux	769,7	39,2	1061,4	54,1
Protéines	60,9	3,1	71,1	3,6
TOTAL	830,6	42,3	1164,7	57,7

Les protéines par la méthode de Lowry (Annexe 2) et les glucides sont quantifiés par CLG (Annexe 3)

Le contenu glucidique de celle-ci est estimé à 123,8 mg / fiole en tenant compte des pourcentages des glucides mesurés par CLG (Tab. V, VI et VII ; cf. Chapitre I) et représente 92,3 % de la masse totale pesée, ce qui correspond au taux de glucides de l'ensemble S₁" et P₁" (93,3 %).

A.- Fractionnement

1 - Analyse des profils d'élution

Pour les deux fractions principales S₁" et P₁", les profils d'élution caractéristiques sont regroupés sur les figures 36 et 37. Résultant des estimations colorimétriques des contenus en oses neutres et acides uroniques, les courbes de distribution présentent généralement une allure gaussienne ; c'est le cas des fractions non retenues et de certaines fractions éluées (S01-A, P05-A et B). Elles peuvent également révéler des épaulements, indiquant à priori qu'il s'agit de fractions insuffisamment résolues. Dans le cas des fractions non retenues, la courbe de réponse colorimétrique au m-HDP n'est pas significative de la présence des acides uroniques car la coloration obtenue, brune, ne correspond pas à celle qui est caractéristique de ce type de composés. Pour les autres éluions, la coloration rose obtenue indique bien que la courbe m-HDP caractérise la présence des uronides. L'utilisation de la détection en UV 206 nm (Fig. 37) permet d'observer les nuances des contenus des fractions par rapport aux glucides représentés par le tracé "Phénol".

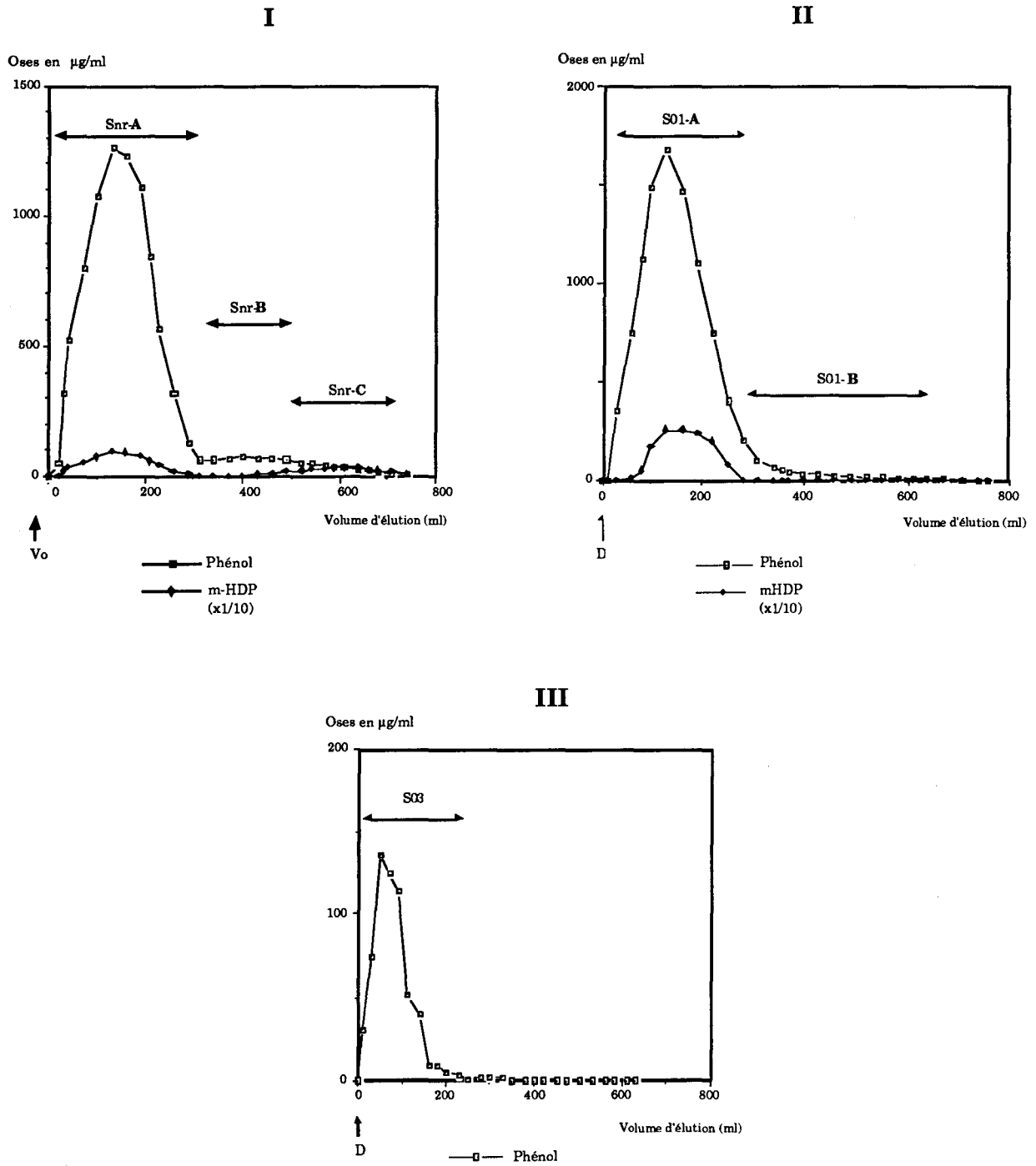


Figure 36 : Profils d'élution discontinue du surnageant S_1 par des concentrations croissantes de NaCl sur colonne de Séphadex DEAE/A50:

Eau UHQ (I), 0,1M (II), 0,3M (III)

Vo: Volume d'exclusion des fractions non retenues ; D: Changement de l'éluant

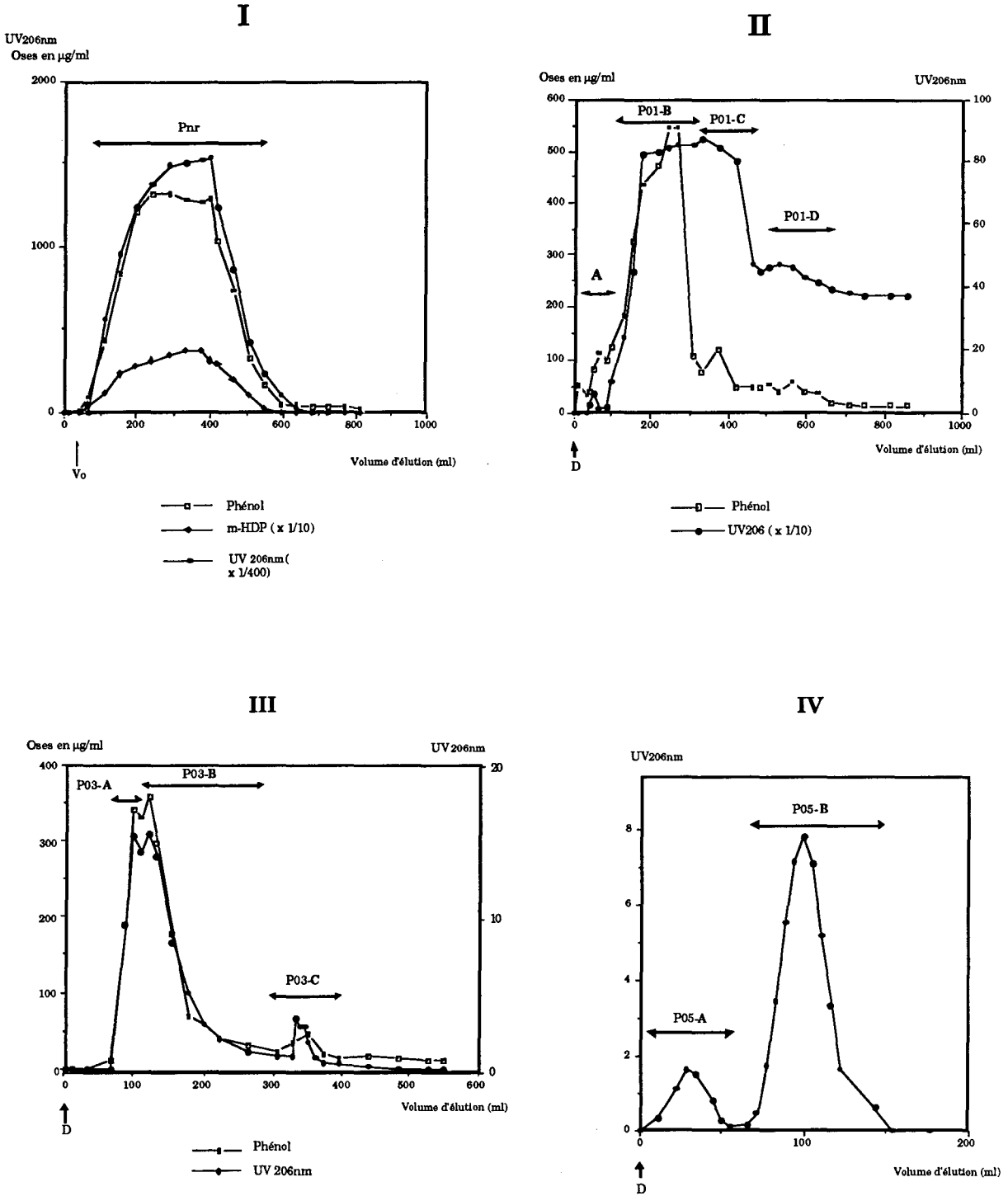


Figure 37 : Profils d'élution discontinue du précipité P''_1 par des concentrations croissantes de NaCl sur colonne de Séphadex DEAE/A50:

Eau UHQ (I), 0,1M (II), 0,3M (III), 0,5M (IV)

Vo: Volume d'exclusion des fractions non retenues ; D: Changement de l'éluant

Il en va de même pour le tracé "m-HDP". Le chromatogramme II de la figure 37 présente des zones où les courbes du "Phénol" et de l'"UV206" n'ont plus les mêmes allures (P01-A et P01-C). Ces différences ont servi pour délimiter les fractions.

2 - Composition

La méthode de fractionnement par échange d'ions est très efficace (Tableau XIII) puisqu'elle permet d'isoler de 10 à 12 fractions à partir de S''_1 et de P''_1 . Les raisons de cette bonne discrimination se trouvent sans doute dans la précipitation éthanolique, dans le rôle de la matrice du gel A-50, mais également dans la diversité des polymères, comme le montreront les analyses plus fines. Pondéralement, la distribution est très inégale et il en résulte que certaines fractions sont très largement majoritaires, aussi bien en provenance de S''_1 que de P''_1 . Pnr et l'ensemble Snr-A et S01-A représentent respectivement 38 et 30 % des glucides totaux. Généralement, l'importance pondérale est inversement proportionnelle à la concentration de l'éluant NaCl. Quant à la répartition des charges dans les fractions, elle est graduellement proportionnelle à l'augmentation de la force ionique de l'éluant NaCl. En effet, les contenus en acides uroniques, exprimés sous forme de pourcentage par rapport aux oses totaux, ont tendance à augmenter au fur et à mesure que la force ionique de la solution d'élution augmente, à l'exception de certaines fractions. Parmi celles-ci, les fractions S01-A et B, P03-A et P05-A contiennent moins d'acides uroniques que celles qui les précèdent. Lorsqu'un éluat a été arbitrairement séparé en plusieurs fractions (A,B,C...), c'est généralement la dernière qui est la plus riche en acides uroniques.

Les résultats figurant dans le tableau XIV, sous forme de compositions molaires déterminées par des analyses CLG, montrent qu'un repérage des constituants majoritaires, associé à la présence de monosaccharides marqueurs, permet une première prédiction à propos des contenus des sous fractions séparées par chromatographie d'échange d'ions. En limitant le commentaire aux sous fractions de masse supérieure à 10 mg, il apparaît que :

- Snr-A peut contenir une mannane, une glucucomannane, une galactoglucomannane ou un mélange de glucane et de mannane, contaminé par une arabinogalactane.
- S01-A renferme probablement une xylane, comportant des arabinogalactanes acides.
- S03 est une arabinogalactane acide présentant des analogies avec la précédente mais liée à une fraction pectique minoritaire et dont le taux protéique (9,6 %) est relativement élevé, ce qui permet de la considérer comme une arabinogalactane protéique.
- Pnr présente toutes les indications d'une xyloglucane, bien que son pourcentage de fucose semble faible.

Tableau XIII : Composition glucidique et répartition pondérale des fractions S''_1 et P''_1 sur Séphadex DEAE A50

<u>FRACTIONS</u>	<u>COMPOSITION</u>			
	Oses totaux ^b (mg)	% pondéral ^c total	% pondéral ^d acide par fraction	Protéines (mg)
S''_1 ^a	707,20	41,65	7,70	55,93
Snr-A	249,50	14,70	nd	ND
Snr-B	19,60	1,15	nd	ND
Snr-C	14,00	0,82	22,10	ND
S01-A	270,50	15,93	8,20	0,00
S01-B	29,10	1,71	13,40	ND
S03	60,30	3,55	21,90	9,60
S05-A	0,90	0,05	24,00	nd
S05-B	0,80	0,05	7,70	nd
S1	1,30	0,08	16,60	ND
S05-NaOH	3,70	0,22	7,80	ND
P''_1 ^a	990,70	58,35	9,70	66,40
Pnr	649,20	38,23	nd	ND
P01-A	3,10	0,18	nd	ND
P01-B	82,00	4,83	2,00	ND
P01-C	14,60	0,86	6,80	ND
P01-D	7,20	0,42	29,00	ND
P03-A	16,10	0,95	18,00	ND
P03-B	96,20	5,66	44,90	ND
P03-C	15,90	0,94	56,60	ND
P05-A	4,40	0,26	18,20	ND
P05-B	23,80	1,40	53,80	ND
P1	2,80	0,16	10,70	ND
P05-NaOH	13,80	0,81	9,40	ND

(a) : S''_1 et P''_1 correspondent aux fractions traitées ; (b) : Valeurs obtenues par CLG ; (c) : Pourcentage pondérale par rapport à ($S''_1 + P''_1$) ; (d) : Pourcentage des acides uroniques obtenus par CLG, exprimé par fraction ; ND : Non déterminé ; nd : non décelé

Tableau XIV : Composition en monosaccharides des fractions de S''₁ et P''₁ sur Séphadex DEAE A50

FRACTIONS	Composition molaire ^b									
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-OMeGlcA
S'' ₁ ^a	1,6	nd	13,6	28,9	13,4	16,3	19,6	1,4	5,2	nd
Snr-A	0,3	nd	9,7	4,4	28,6	35,0	22,0	nd	nd	nd
Snr-B	1,3	nd	17,7	29,8	17,0	15,8	18,4	nd	nd	nd
Snr-C	10,4	nd	17,6	20,0	5,6	6,7	20,3	1,4	16,2	1,8
S01-A	1,1	0,2	11,3	62,4	2,1	1,9	14,6	nd	1,6	4,8
S01-B	3,4	0,5	15,5	35,8	3,9	5,7	24,1	nd	6,0	5,1
S03	7,7	0,5	27,0	1,0	2,9	4,0	37,5	6,2	12,1	1,1
S05-A	4,1	4,7	13,0	2,8	9,7	33,1	10,7	17,1	4,8	nd
S05-B	10,3	6,8	14,5	9,6	8,2	32,9	11,0	0,8	5,0	0,9
S1	3,0	1,5	7,9	10,6	10,9	40,1	10,8	6,5	8,7	nd
S05-NaOH	16,0	8,3	11,8	2,5	7,9	38,0	8,5	2,2	4,5	0,3
P'' ₁ ^a	1,3	0,4	5,3	31,8	5,8	30,6	16,3	8,5	nd	nd
Pnr	0,4	0,3	1,5	39,9	5,4	35,5	17,0	nd	nd	nd
P01-A	nd	nd	1,2	32,4	11,0	38,3	17,1	nd	nd	nd
P01-B	0,5	nd	1,1	40,6	10,7	29,0	16,4	nd	nd	1,7
P01-C	0,7	nd	1,6	49,5	12,3	14,4	15,7	0,9	1,0	3,9
P01-D	1,7	nd	3,2	38,0	7,0	9,9	14,4	19,8	1,5	4,5
P03-A	8,1	nd	21,5	6,5	3,9	5,2	38,8	6,8	9,2	nd
P03-B	6,3	0,4	24,2	3,6	2,3	3,3	19,0	35,7	5,1	nd
P03-C	2,9	0,2	22,2	3,3	4,8	4,4	9,7	50,8	1,7	nd
P05-A	4,0	nd	29,5	6,7	17,1	8,7	18,7	8,8	6,5	nd
P05-B	3,7	nd	27,4	3,1	2,2	2,9	11,5	47,1	1,7	0,4
P1	3,9	nd	37,3	9,1	9,7	13,9	17,7	7,0	1,4	nd
P05-NaOH	4,0	nd	32,8	6,0	19,2	7,9	22,0	7,1	1,0	nd

(a) : S''₁ et P''₁ correspondent aux fractions traitées ; (b) : Valeurs obtenues par CLG selon la méthode décrite en Annexe 3

- P01-B et P01-C, de compositions très voisines à celle de la fraction précédente, constituent des fractions intermédiaires entre les xylanes et les polysaccharides pectiques du fait de la présence du rhamnose et des acides uroniques.

- P03-B est un fragment pectique dont la moitié de la masse est constituée de chaînes latérales d'arabinogalactanes.

Certaines sous-fractions moins importantes en masse sont néanmoins très intéressantes car elles constituent souvent des formes intermédiaires ou complémentaires des précédentes, qui aident à valider cette première série de commentaires. C'est ainsi que la richesse en rhamnose et en acides uroniques des sous-fractions Snr-C, S05-B, S1 et S05-S n'est pas sans rappeler la distribution observée dans S03 ; il peut s'agir de segments de jonction entre pectines et hémicelluloses.

De la même façon, la fraction P01-D peut être considérée comme une zone intermédiaire entre pectines et hémicelluloses (xylanes) puisque les monosaccharides principaux sont le xylose, le galactose et l'acide galacturonique et qu'on note la présence d'acide glucuronique, notamment 4-O-méthylé. Enfin, P03-C et P05-B sont des sous-fractions pectiques dont la composition rappelle celle de P03-B commentée précédemment.

Ainsi, les compositions molaires en monosaccharides des 22 sous-fractions issues de S₁" et P₁", mentionnées dans le tableau XIV, confirment les données globales présentées antérieurement dans le tableau XIII, à savoir que les polysaccharides extracellulaires solubles sont formés d'un ensemble multimoléculaire complexe dont le fractionnement n'est pas forcément achevé, comme le montreront les analyses détaillées qui suivent.

B.- Caractérisation des contenus des fractions

La présentation des résultats est ordonnée selon la similitude des familles glucidiques contenues dans les fractions. Afin de simplifier l'écriture, un carbone est désigné par un chiffre positionné en suffixe de l'abréviation du monosaccharide, et la substitution ou la liaison en préfixe. Ainsi, 4-Man-5 désigne le C-5 du mannosyle lié en O-4 et 3,5-Ara-1 signifie le C-1 de l'arabinosyle substitué en O-3 et O-5 tandis que 3/5-Ara-1 correspond aux 3-Ara-1 et 5-Ara-1. Les résidus terminaux et réducteurs sont respectivement représentés par des préfixes T- et R-, comme T-Gal-2 pour le C-2 du galactosyle terminal et R-GalA-1 pour le C-1 de l'acide galacturonique en extrémité réductrice. L'abréviation du monosaccharide peut être précédée de sa configuration anomérique α ou β .

1 - Etude des liaisons chimiques par méthylation

La détermination des liaisons glycosidiques intramoléculaires est une étape indispensable de la caractérisation des polysaccharides. La préparation d'acétates d'alditols partiellement méthylés (AAPM) a été réalisée après méthylation des polysaccharides selon Paz Parente et al. (1985). Les AAPM ont été séparés par CLG (cf. Annexe 4) et identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux de dérivés témoins provenant de polysaccharides définis ce qui a permis l'étalonnage de la colonne CPSIL5CB résumé dans le tableau XV.

Parmi les 22 fractions isolées, quatre d'entre elles ont été sélectionnées (Snr-A, Pnr, S01-A et S03) pour subir les traitements par méthylation, essentiellement parce qu'elles sont représentatives de l'ensemble des fractions isolées. La composition centésimale de leurs dérivés AAPM est présentée dans le tableau XVI. La position des groupes O-Me (1ère colonne) permet de déduire directement la localisation des liaisons et substitutions possibles (2ème colonne).

a)- Fraction Snr-A :

Le dérivé principal de cette fraction, le 2,3,6 tri-O-Me-Glc, qui représente à lui seul 33 % des AAPM et 83,5 % du Glc, est donc principalement lié en O-4, ce qui est caractéristique d'une chaîne glucanique non substituée. Le mannose se présente sous forme de 2 dérivés principaux, le 2,3,6 tri-O-Me-Man (21,2 %) et le 2,3 di-O-Me-Man (11,4 %), ce qui indique que les mannoses sont également assemblés par des liaisons 1→4 mais que 1/3 d'entre eux portent une substitution sur leur O-6. D'ailleurs, leur proportion molaire dans la fraction (11,4 %), correspond avec celle du T-Galp (11,2 %) qui est le dernier dérivé présent en quantité importante et qui semble donc être le candidat tout désigné pour être le substituant de certains mannoses. Il faut néanmoins noter la présence d'autres substituants potentiels tels que T-Glcp (2,1 %), T-Manp (2,2 %), T-Xylp (2,2 %) et surtout T-Araf (3,3 %).

Ainsi, se dégagent deux certitudes et une question : il est évident que cette fraction comprend trois constituants principaux que sont Glc, Man et Gal, conformément aux résultats antérieurs (Tab. XIV). Les chaînes ne sont substituées que par l'intermédiaire du Man, porteur d'un galactose terminal. La question concerne les positions possibles pour les glucoses, tous liés uniquement sur leur O-4. Trois solutions sont envisageables : les β -glycosyles ne peuvent provenir que de fragments celluloseux. Par contre, les α -glycosyles, uniquement liés entre eux, forment une chaîne linéaire identifiable à de l'amylose.

Tableau XV : Temps de rétention relatif des dérivés AAPM deutériés analysés sur colonne CP-SIL 5CB.

Position des groupes O-Me	T _r ^a	Fragmentation principale ^b m/z
2,3,4-Rhap	0,582	84≈86 ; 102>101 ; 118 >115 ; 131 ; 162
3,4-Rhap	0,654	131 ; 130 ; 190
3-Rha	0,786	130 ; 143 ; 190 ; 203
2,3,5-Araf	0,529	118 ; 129 ; 102>101 ; 161.
3,5-Araf	0,634	117 ; 161 ; 190 ; 130 .
2,5-Araf	0,637	118 ; 87 ; 113 ; 233.
2,3-Ara	0,675	118>129 ; 87 ; 189 ; 102.
2-Ara	0,776	118 ; 261.
2,3,4-Arap	0,573	118>117 ; 101>102 ; 161>162.
2,4-Arap	0,671	117≈118 ; 233.
2,3,4-Xylp	0,574	118≈117 ; 101≈102 ; 162≈161.
2,3-Xyl	0,680	118≈129 ; 87 ; 102 ; 189 ; 162.
3,4-Xylp	0,680	117 ; 130 ; 88 ; 190 161.
2-Xyl	0,808	118 ; 127 ; 187 ; 261 .
3-Xylp	0,830	129≈130 ; 87≈8 ; 190≈189.
2,3,4,6-Manp	0,732	102>87 ; 118≈129≈162 ; 205.
2,3,6-Man	0,835	118 ; 233 ; 102 ; 162.
2,3,4-Manp	0,868	118≈102 ; 129 ; 99 ; 162 ; 189 ; 233.
2,3-Man	0,955	118 ; 102>99 ; 162 ; 261.
3,6-Man	0,929	130 ; 113≈190≈233 ; 99 ; 149.
2,3,4,6-Glcp	0,730	88 ; 102 ; 118≈129≈145≈162>161 ; 205.
2,3,6-Glc	0,844	118 ; 233 ; 113 ; 99 ; 131.
2,3,4-Glcp	0,868	118≈102 ; 129 ; 99 ; 162 ; 189 ; 233.
2,3-Glcp	0,962	118 ; 127≈85 ; 102≈99 ; 261.
2,3,5,6-Galf	0,740	101>102 ; 118≈89 ; 129 ; 205 ; 278.
2,3,4,6-Galp	0,755	102≈118≈129≈145 ; 161≈162 ; 205.
2,4,6-Galp	0,852	118 ; 129≈102≈99 ; 162 ; 189 ; 233.
2,3,4-Galp	0,901	118 ; 129 ; 189 ; 139 ; 234.
2,4-Galp	1,000	118 ; 129 ; 87 ; 143 ; 185 ; 232.
2,6-Gal	0,913	118 ; 127≈102≈85 ; 99 ; 142 ; 261.
2,3-Gal	0,971	118 ; 127≈185 ; 102 ; 261.

a : Temps de rétention relatif (Tr) par rapport au 2,4-di-O-Me-galactose (2,4-Galp) **b** : Masses ioniques obtenues par CLG-SM /IE, classées selon leur importance dans l'ordre décroissant des intensités relatives. ≈ et > signifient respectivement intensité équivalente, et supérieure.

Tableau XVI : Composition centésimale des dérivés AAPM de certaines frations polysaccharidiques caractéristiques: Identification du type de substitution des oses constitutifs

Position des groupes O-Me	Nature des liaisons ^a	Fractions analysées (%molaire) ^b			
		<u>Snr-A</u>	<u>Pnr</u>	<u>S01-A</u>	<u>S03</u>
2, 3, 4-Rha	1- (T- Rhap)	trace	-	0,5	5,7
3, 4-Rhap	1, 2-	-	-	-	0,5
3-Rhap	1, 2, 4-	-	-	-	1,0
2, 3, 5- Araf	1- (T-Araf)	3,3	0,6	2,9	10,0
3,5- Araf	1, 2-	-	-	-	1,2
2,5-Araf	1, 3-	-	-	-	1,1
2, 3-Ara	1,4- ou 5-	0,5	trace	1,5	8,4
2-Ara	1,3,4- ou 5-	-	0,3	-	0,5
2, 3, 4-Arap	1- (T-Arap)	0,7	-	trace	trace
2, 4-Arap	1, 3-	-	0,8	-	-
2, 3, 4-Xylp	1- (T-Xylp)	2,2	16,5	6,3	0,9
2,3-Xyl	1,4- ou 5-	-	-	55,0	2,4
3,4-Xylp	1, 2-	0,5	9,1	-	-
2-Xyl	1,3,4- ou 5-	-	0,3	0,9	-
3-Xyl	1,2,4- ou 5-	-	0,3	11	-
2, 3, 4, 6-Manp	1- (T-Manp)	2,2	trace	-	-
2,3,6-Man	1,4- ou 5-	21,2	3,7	1,8	3,7
2,3,4-Manp	1, 6-	0,9	-	-	-
2,3-Man	1, 4 ou 5, 6-	11,4	2,1	0,9	0,8
3,6-Man	1, 2, 4- ou 5-	1,5	0,6	-	-
2, 3, 4, 6-Glcp	1- (T-Glcp)	2,1	0,5	-	1,0
2,3,6-Glc	1, 4- ou 5-	33	20,8	1,8	2,3
2,3,4-Glcp	1, 6-	1,1	1,4	-	-
2,3-Glc	1, 4 ou 5, 6-	3,3	28,2	0,3	2,7
2, 3, 5, 6 -Galf	1- (T-Galf)	0,5	0,7	-	-
2, 3, 4, 6-Galp	1- (T-Galp)	11,2	10,3	3,2	13,2
2,4,6-Galp	1,3-	1,2	1,5	3,1	6,6
2,3,4-Galp	1,6-	1,4	1,2	4	13,8
2,4-Galp	1, 3, 6-	1,0	0,3	5,4	23,6
2,6-Gal	1, 3, 4- ou 5-	0,5	0,7	-	0,6

a : Les chiffres soulignés représentent les sites principaux de la liaisons des dérivés glycoyles.

b : Les pourcentages molaires relatifs ont été calculés à partir des aires des pics corrigées par les facteurs de reponse établis par Sweet et al. (1975).

Les chiffres indiqués en gras représentent les valeurs caractéristiques des molécules.

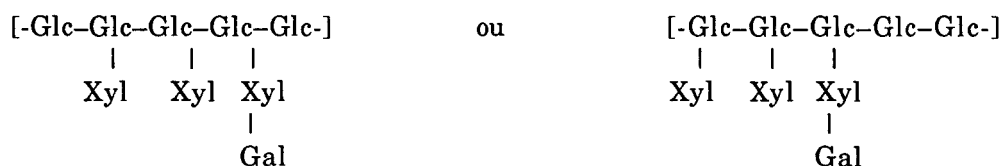
En outre, la présence d'autres α -glycosyles liés en O-6 (1,1 %) ou disubstitués en O-4 et O-6, pourraient correspondre à des amorces d'amylopectine. Si les glucosyles sont liés aux Man, ils peuvent l'être au sein d'une chaîne principale de glucomannane selon des séquences qui devront être ultérieurement précisées.

b)- Fraction Pnr :

Cinq dérivés AAPM provenant de trois monosaccharides (Glc, Xyl et Gal) représentent ensemble 85 % de cette fraction ce qui confirme les résultats précédents (Tab. XIV) qui prévoyaient une nature xyloglucanique, pour cette fraction.

Les glucosyles se présentent sous forme de deux dérivés di- et tri O-méthylés, dans des proportions qui indiquent que tous sont assemblés par des liaisons 1→4 et que 60 % d'entre eux sont substitués O-6. De plus, les xylosyles sont principalement situés en position terminal (T-Xyl=16,5 %) et substitués en O-2 (9,1 %). Le galactose, représenté par un dérivé T-Galp, n'est lié que par son carbone anomérique et constitue donc une extrémité de chaîne latérale. L'ensemble des données confirme bien celles de la littérature qui présentent les xyloglucanes comme des chaînes de β -glucanes 1→4 liés, substitués par de simples Xyl ou par des courtes chaînes de Xyl-Xyl-, Gal-Xyl-, Gal-Xyl-Xyl- ou Fuc-Gal-Xyl-. Parmi, les dérivés mineurs du Gal, aucun n'apparaît substitué en O-2, ce qui correspond à l'absence du fucose, et qui élimine la dernière des propositions présentées ci-dessus, comme modèle structural des substitutions de xyloglucanes.

L'étude des liaisons de cette fraction Pnr apporte la confirmation que les polymères qui la constituent appartiennent à la famille des xyloglucanes et qu'ils sont non fucosylés. Il reste à préciser les séquences de substitution qui caractérisent ces molécules. Le rapport molaire des dérivés méthylés fournit les motifs suivants :



c)- fraction S01-A :

En se basant sur le même raisonnement que précédemment, cette fraction est majoritairement constituée d'une xylane puisque les dérivés du xylose représentent 73 % des

AAPM. La plupart des xyloses sont liés en 1→4, mais parmi ceux-ci 1/6 sont aussi substitués en O-2, qui peuvent constituer des points d'attache des arabinosyles et principalement des acides glucuroniques non pris en compte par cette méthode d'analyse. Ces acides sont majoritairement sous forme 4-O Méthyl-éther qui est connue pour se lier en O-2 du 4-β xylosyle, contrairement à l'arabinose lié en O-3. Par conséquent, cette xylane est une 4-O méthylglucuronoxylane probablement substitué en O-2 par des arabinoses puisque les dérivés liés 3,4-xylosyles sont mineurs.

En outre, les 15 % de dérivés AAPM du galactose sont répartis entre terminaux, monosubstitués en 3 ou 6 et disubstitués en 3 et 6, ce qui est caractéristique d'une structure de galactanes très branchées pouvant accueillir également des substituants de T-Araf. Il faut noter que comme pour les fractions précédentes, les pourcentages des dérivés de l'arabinose ne représentent que la moitié de ceux déterminés par l'analyse globale (voir tableau XIV). La méthode de méthylation peut fragiliser l'arabinose qui est un composé déjà connu comme étant relativement sensible aux hydrolyses acides.

d)- fraction S03 :

Il apparaît dès la première lecture que la distribution des principaux constituants de cette fraction présente des points communs avec celle des arabinogalactanes minoritaires de la fraction précédente. En effet, on retrouve la répartition des AAPM du galactose, avec le dérivé disubstitué en O-3 et O-6 majoritaire (23,6 %) et une forte proportion (13,2 %) de T-Galp. Pour les AAPM de l'arabinose, c'est également le T-Araf qui est le plus fréquent (10,0 %) mais la proportion d'arabinosyles monosubstitués O-5 (8,4 %) est relativement importante. Si la position des acides uroniques (6,0 % de GalA et 12,1 % de GlcA) n'est pas révélée, on ne peut ignorer que les AAPM du Rha sont essentiellement des T-Rha (5,7 %) même si subsistent 1 % de dérivés disubstitués en O-2 et O-4, qui sont les points de branchement bien connus des chaînes latérales des arabinogalactanes sur les rhamnogalacturonanes I. Cette fraction semble donc contenir une arabinogalactane pectique typique qui constitue les ramifications pectiques. Le GlcA est connu pour se situer en position terminale des galactanes comme pour le rhamnose. On ne peut cependant pas ignorer les AAPM minoritaires proviennent de quelques polysaccharides contaminants non totalement séparés, en dépit de l'efficacité des méthodes de tri moléculaire utilisées. Enfin, la présence des protéines (9,6 %, cf Tab XIII, p114) suggère la présence d'arabinogalactanes protéiques dans cette fraction.

2 - Etude de la composition glucidique par spectroscopie RMN

La méthode d'analyse par ^{13}C -RMN apporte des renseignements complémentaires aux résultats précédents. En effet, étant non destructive, elle confirme, complète ou infirme la détermination des liaisons grâce aux données qui tiennent compte des liens natifs entre les différents monosaccharides et des interactions moléculaires (anomérie, conformation, influence stérique). Elle permet ainsi de trancher sur la nature des polysaccharides de compositions analogues (ose et substitution identiques) obtenues par les méthodes précédentes ; par exemple, entre la cellulose liée en β -(1,4) et l'amylose liée en α -(1,4).

α -Fraction Snr-A

Les résultats des analyses par CLG montrent que cette fraction est présumée contenir des arabinanes et des mannanes telles que les homomannanes et les galacto(gluco)mannanes. Les signaux (Tab.XVII) obtenus par RMN indiquent un mélange de galactomannanes, d'arabinane et de cellulose (Fig. 38):

α - Acétates

Des déplacements chimiques marqueurs de méthyle (21,01 et 20,73 ppm) et de fonction carboxylique (173,78, 173,47 et 172,52 ppm) sont inhabituels dans ces polysaccharides et ne sont attribuables qu'à des groupes acétyles qui seraient liés sur deux ou trois hydroxyles des monosaccharides impliqués. En effet, ce phénomène est observé dans les xylandes O-acétylées en O-2, O-3 et O-2,3 des xylosyles (Reicher et al., 1984), dans la xanthane en O-6 du mannosyle (Gamini et al., 1991), dans la glucomannane de Wozniowski et al. (1990) et dans des éthers de cellulose acétylés (Tezuka et al., 1990). Les auteurs ont défini la position de l'acétylation par les signaux des carbones de l'acétyle (CH_3 - et -COOH) qui signalent l'acétyle en O-6 du mannosyle de la xanthane par 22,84 et 176,64 ppm. Les dérivés cellulosiques acétylés sont indiqués par deux valeurs du δ du méthyl (23,5 et 23,8 ppm) puis par trois δ de carboxyle (172,2 ppm en O-2, 172,6 ppm en O-3 et 173,4 ppm en O-6). Dans ce contexte, il apparaît que les δ observés pour Snr-A correspondent probablement aux acétates substituant l'un ou l'autre des trois polysaccharides présents dans cet échantillon. Récemment, Wozniowski et al. (1990) ont isolé une glucomannane acétylée sur le mannosyle en mettant en évidence quatre dérivés acétylés, 2,3,6-OAc-Man, 3,6-OAc-Man, 2,3-OAc-Man et 6-OAc-Man. Le spectre ^{13}C -RMN de ce polysaccharide mentionne trois couples de δ des groupes acétyles (20,72 et 174,11 ppm), (20,45 et 174,02 ppm), (20,22 et 173,54

Tableau XVII : Déplacement chimique δ du spectre ¹³C-RMN de la fraction Snr-A

Composition en résidus liés	Déplacement chimique δ (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
<i>D-Mannosyle</i>						
β-Man _p -	100,49		72,00 (B)	79,14 (A)	(75,20) (A)	61,57
4-β-Man-	100,45	70,60 (B)	72,12 (A)	79,44 (B)	75,35 (C)	61,06
		70,68 (A)	72,21 (C)	79,54 (C)	75,38 (B)	
4,6-β-Man-	---	---	---	---	73,60	67,05 (II) 66,97 (III)
<i>D-Galactosyle</i>						
α-Gal _p -	99,38	69,10	69,90	70,10	71,56	61,70
Acétyl-		20,73/21,01 (CH ₃)		172,52/173,47/173,78 (=C=O)		
<i>L-Arabinosyle</i>						
α-Ara _f -	108,96	82,07	77,25	84,75	62,00	
5-α-Ara-	109,01	82,00	77,19	(83,00)	67,41	
<i>D-Glucosyle</i>						
4-β-Glc _p -	102,94	74,15	75,20	(79,14)	(77,00-77,25)	60,94
	102,90		74,68	79,44	75,91/75,74	

- (A, B et C) et (I, II et III) représentent respectivement les diades et les triades définies dans le texte

Figure 38 : Spectres ¹³C-R.M.N.de la fraction Snr-A

A: Spectre total (10-190 ppm) avec en médaillon les carbones anomériques C-1

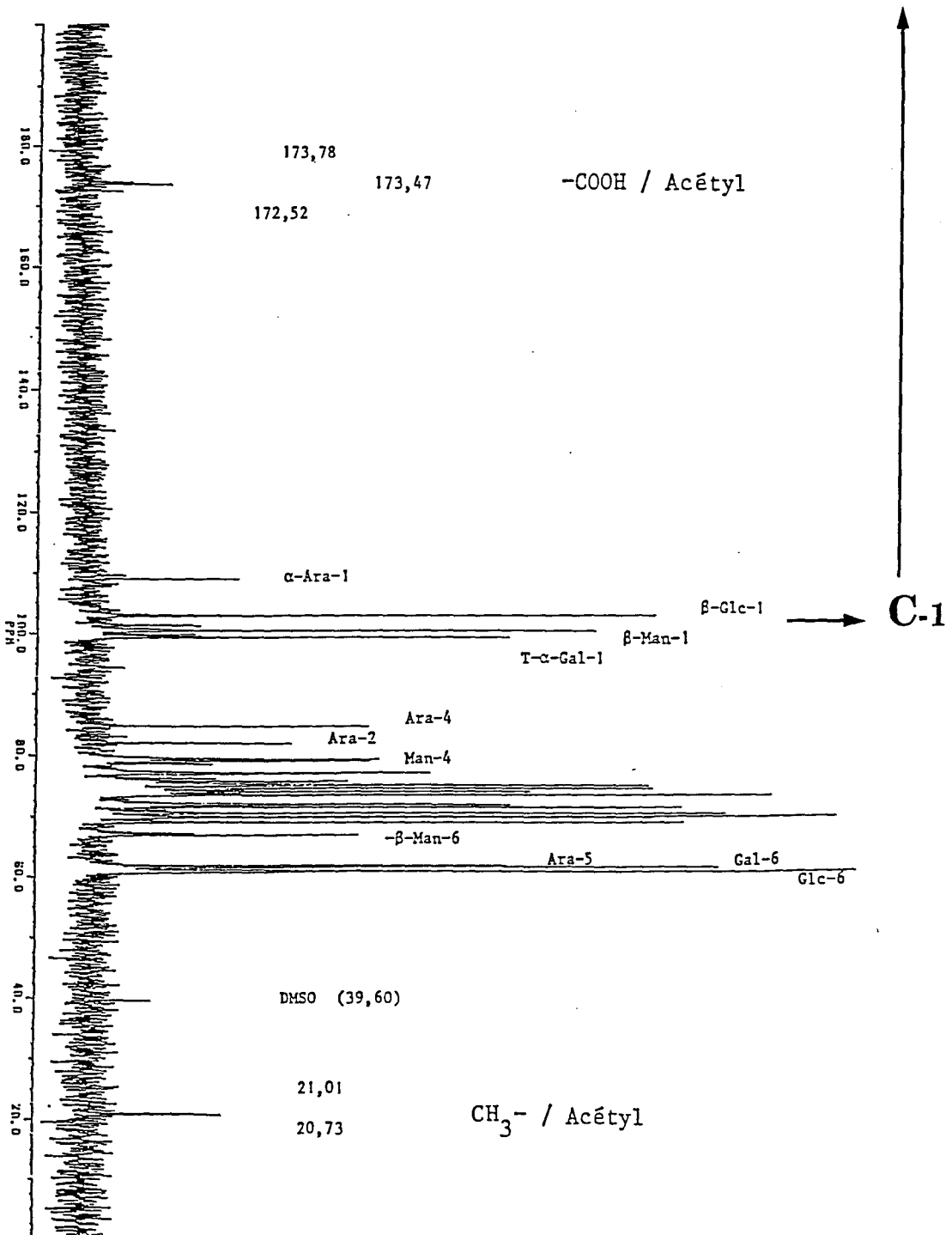
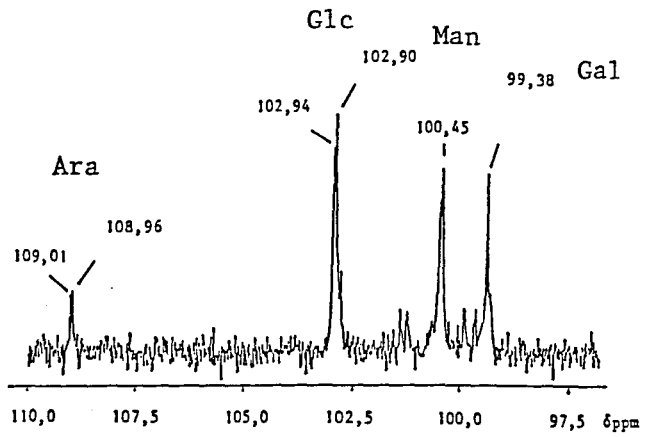
B: Spectre détaillé de la zone (60-90 ppm)

Légendes:

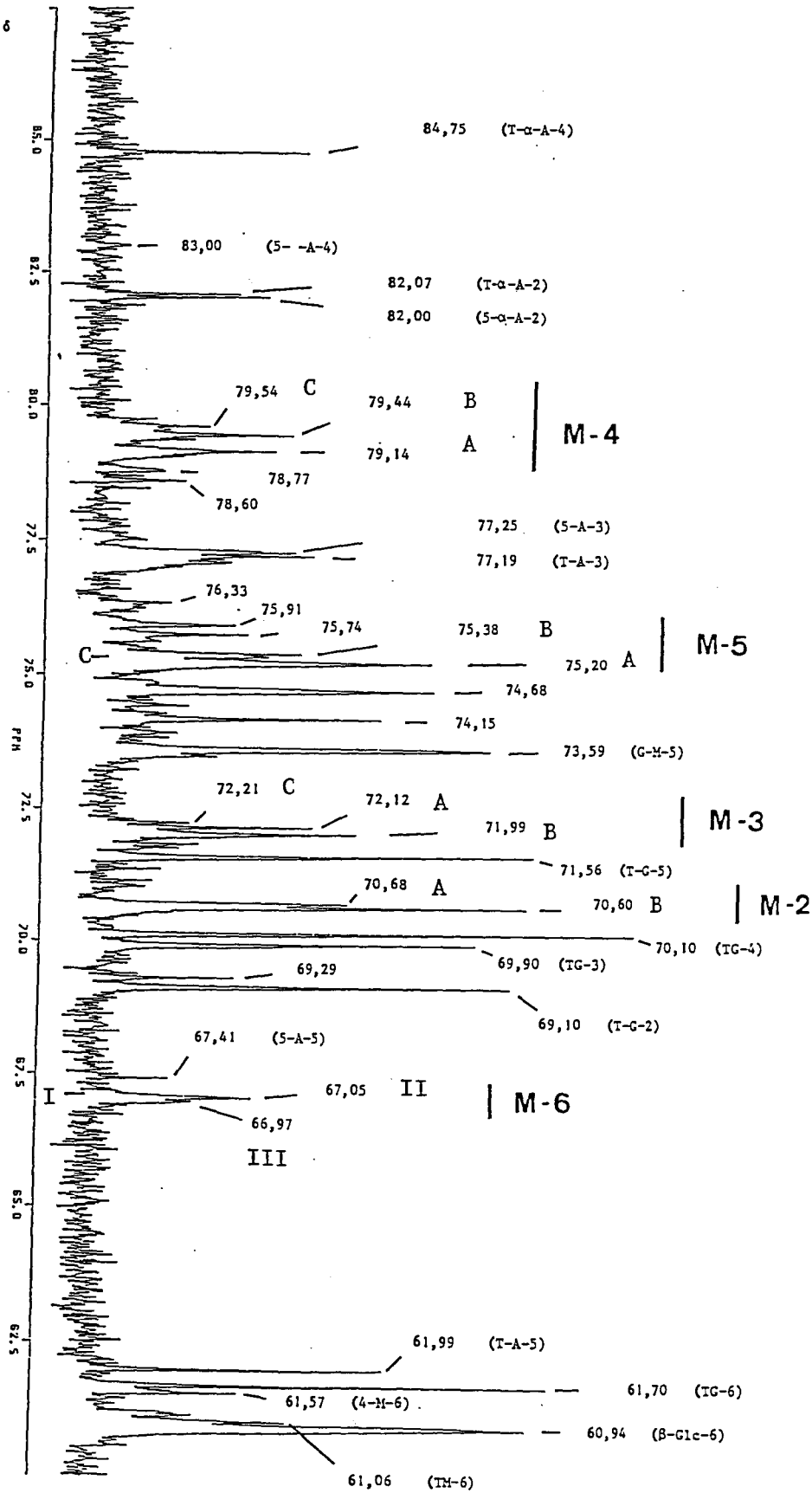
- C-1, -2, ... du mannosyle (M-1, -2, ... ou Man-1, -2, ...), et en position terminale (T- β-Man-1, T-M-1 ou TM-1). Il en est de même pour les autres monosaccharides.
- Diades: A, B et C
- Triades: I, II et III
- Les valeurs indiquées en gras représentent les signaux caractéristiques des molécules.

Snr-A

A



Snr-A

B

ppm). Par conséquent, les acétates de Snr-A substitueraient les galactomannanes selon deux ou trois des quatre possibilités ci-dessus.

β - Galactomannane

Elle est définie par les signaux du C-1, 100,49 (4- β -Man), 100,45 ppm (4,6- β -Man) pour le résidu mannosyle et 99,38 ppm (T- α -Gal) pour les galactoses qui substituent en O-6 certains mannosyles de la chaîne principale (Grasdalen et Painter, 1980 ; Manzi et Cerezo, 1984 ; Manzi et al., 1986 et Gupta et BeMiller, 1990). A ceux-ci s'ajoutent les signaux des autres carbones (C-2, C-3, C-4, C-5 et C-6) caractéristiques de ce polysaccharide (Tab. XVI), en particulier, ceux du résidu galactosyle. Ces derniers donnent des signaux plus élevés qui seraient en accord avec la position latérale du galactosyle libre, permettant ainsi une bonne résonance. De même, en considérant que la résonance du C-6 du mannosyle substitué par le galactosyle est identique dans les diades et les triades, on peut procéder à une estimation quasi quantitative de celles-ci, malgré l'absence de conditions d'analyse nécessaires. Ces auteurs ont établi une méthode d'identification par ^{13}C -RMN de galactomannanes de graines, en se basant sur la notion de diades et de triades qui correspondent à des motifs mannobioses et mannotrioses plus ou moins substitués par du galactosyle. Elles sont symbolisées par :

- Diades: A: -M - m - ; B: -M-(Gal) m - et -(G) M - m - ; C: - (G) M - (G) m - .

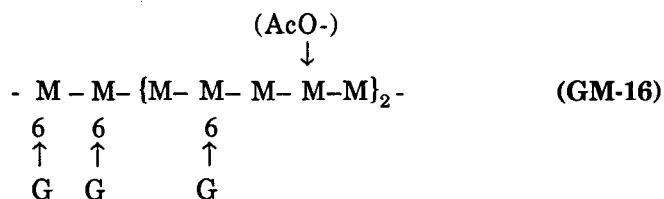
- Triades: I: -(G)M-(G)m-(G)M- ; II: -(G)M-(G)m-M- et -M-(G)m-(G)M- ;

III: -M-(G)m-M- .

La lettre minuscule représente le mannosyle de référence et celle entre les parenthèses correspond aux substituants galactosyles. Ainsi, la répartition des diades est déterminée en fonction des signaux des C-2 et C-4 et celle des triades par les C-6. L'interprétation du spectre de Snr-A (Fig. 38 et Tab. XVII) selon cette méthode montre deux couples de structures prépondérantes représentés par (B, II) et (A, III). Ce dernier est moins fréquent que le premier, contrairement aux résultats de Manzi et al. (1986). Il en découle la proposition de l'identification des diades A et B par les C-3 et C-5 du mannosyle.

La comparaison aux résultats de ces auteurs indique le décalage du δ de tous les carbones sauf les C-4 du mannosyle ($\delta = 79,xx$) vers le haut champ. En effet, les C-1 principaux sont habituellement à 103,0 ppm pour les résidus de mannose et à 101,8 ppm pour le galactosyle contrairement à nos résultats. Cependant, tous les signaux sont identifiés malgré ce décalage du

δ vers le haut champ qui serait en rapport avec la présence d'acétyle. En outre, l'intensité de la diade A des Man-4 (79,14 ppm) et Man-5 (75,20 ppm) est amplifiée par la contribution des signaux provenant respectivement du Glc-4 et du Glc-3 dont l'attribution a été faite d'après les données de Bock et al. (1984). Ainsi, la cohérence des signaux des C-5, C-4, C-3 et C-2 du mannosyle indique bien l'importance de la diade B par rapport à A. Le Man-6 substitué est le seul à fournir des indications sur les triades, à savoir la prépondérance de la II sur la III. Par conséquent, la structure probable du motif issue de cette étude et de l'analyse des liaisons est le GM-16:



Un tel motif est établi en accord avec le rapport Gal-: 6,4-Man-: 4-Man- (1:1:2) obtenu par méthylation (Tab.XVI).

Cependant, on constate une certaine contradiction au niveau des triades concernant l'importance de la II (67,05 ppm) par rapport à la III (66,97 ppm). Cette dernière devrait l'emporter pour satisfaire le motif GM-16, car celui-ci correspond à deux III contre une II. On devrait avoir le couple (B, III) plus important que (A, II). L'explication serait une inversion des δ du C-6 des deux triades provoquée par la présence des acétyles. La contribution de ces derniers pourrait être à l'origine de certains signaux non attribués (76,33, 78,60, 78,77 ppm). Ou bien simplement un mélange de motifs légèrement différents et de répartition différente. Par conséquent, le spectre de l'ensemble reflète la résultante des deux structures.

Par ailleurs, ce spectre est comparable à celui de la galactoglucomannane de *Rubus fruticosus* définie par Cartier (1986), bien que celle-ci ait été obtenue par traitements alcalins (NaOH 1,25 N, 2 fois et Ba(OH)₂), susceptibles d'enlever les acétyles. De ce fait, tous les signaux communs aux deux spectres ne sont pas en rapport avec l'hypothèse du décalage des δ par rapport au Man-4 provoqué par l'acétylation.

Il semble donc que deux approches contradictoires convenablement argumentées aboutissent à la proposition d'une galactomannane ou d'une galactoglucomannane. Il est alors difficile de trancher sans information complémentaire telle que la preuve évidente des effets de l'acétylation (Wozniowski et al., 1990). A ce sujet, l'hypothèse de galactoglucomannane amène à l'acétylation d'un autre composé présent dans la fraction analysée, à savoir l'arabinosyle. Cependant, aucuns δ relatifs à la chaîne principale de la glucomannane (Goldberg et al., 1991), ne sont signalés dans ce spectre, comme le δ à 69,4 ppm que Cartier (1986) considère comme étant

le 4- β -Glc-6 de la glucomannane. Or, un tel signal qui serait à 69,00 ppm et précédent 69,10 ppm (T-Gal-2), n'existe pas dans le spectre de Snr-A (Fig. 38).

Pour conclure, les faits semblent orienter vers l'hypothèse d'une galactomannane acétylée qui doit être confirmée afin de statuer par rapport aux résultats de ces auteurs. Le manque de données complémentaires limite notre interprétation structurale au modèle GM-16. Par exemple, la comparaison avec le spectre ^{13}C -RMN de la fraction après désacétylation par la soude 0,1 N pendant 1h à température ambiante, répondra partiellement à ces questions, au même titre que la localisation de la substitution par les acétyles par CLG. Enfin, l'utilisation d'une cellulase pure permettra de savoir si des 4- β -glucosyles correspondent effectivement à de la cellulose.

γ - T/5- α -Arabinane

Elle est signalée par les carbones anomériques à 109,01 ppm (5- α -Ara) et 108,96 ppm (T- α -Ara) ainsi que les δ suivants: 82,07 (T-Ara-2), 82,00 (5?-Ara-2), 77,25 (5?-Ara-3), 77,19 (T-Ara-3), 84,75 ppm (T-Ara-4), 83,05 (5-Ara-4), 67,41 (5-Ara-5) et 62,00 (T-Ara-5). L'attribution des signaux a été faite selon les données des travaux réalisés sur les arabinanes (Joseleau et al., 1977 ; Joseleau et Chambat, 1984b ; Hervé Du Penhoat et al., 1987 ; Swamy et Salimath, 1991). La présence de cette arabinane dans la fraction non retenue montre qu'elle n'est pas liée aux polysaccharides pectiques, en l'occurrence à la rhamnogalacturonane I.

Par ailleurs, les différences d'amplitude au niveau des C-4 et des C-5 entre le T-Ara et le 5-Ara sont difficilement explicables au vue des équivalences des autres carbones, C-1, C-2 et C-3 qui apparaissent dédoublés. En règle générale, on doit avoir la même amplitude pour tous les carbones d'une catégorie de dérivés (Hervé de Penhoat et al., 1987). Ainsi, les carbones du résidu arabinose terminal doivent avoir la même amplitude, ceux du 5-Ara aussi. Les données de l'analyse des liaisons par méthylation (Tab. XVI) montrent la prépondérance de l'arabinosyle terminal (T-Ara=3,3%) par rapport au 5-Ara (0,5%) ; ce qui expliquerait les différences observées sur les C-4 et les C-5 en RMN. La comparaison des rapports T-Ara/5-Ara (T:5) par carbone (C-4 et C-5) entre la méthylation (% mol) et la RMN (hauteur), donne les résultats suivants :

- pour le C-4, $T:5 = 3,3/0,5 = 6,6$ par méthylation et $T:5 = 3,9/0,6 = 6,6$ par RMN.
- pour le C-5, $T:5 = (3,3+0,7)/(0,5+0,7) = 3,33$ par méthylation et $T:5 = 5,5/1,5 = 3,66$ par RMN.

Il semble bien évident que la cohérence des résultats de la méthylation avec ceux de la RMN, se trouve au niveau des C-4 et C-5. Par conséquent, il y a plus de résidus arabinose terminaux que liés en O-5.

Toutefois, l'explication à donner au dédoublement des C-1, C-2 et C-3 n'est pas évidente, d'autant plus que les C-3 correspondent à un ensemble de signaux mal résolus. L'hypothèse d'une arabinane ramifiée n'étant pas confirmée par méthylation, il reste alors celle de la contribution des autres composés présents dans cette fraction, comme les galactomannanes ou les acétyles. D'une part, des arabinosyles terminaux peuvent bien exister sur ces galactomannanes en se liant au niveau du α -Gal ou du 4- β -Man et de l'autre, des acétyles substituent certains arabinosyles terminaux au niveau des C-2 ou C-3. De plus, ces hypothèses semblent aussi expliquer la présence de certains signaux non attribués (76,33, 75,91, 75,74, et 74,15) et répondre partiellement à la précédente question sur la présence des acétyles. Elles contribuent aussi à élucider le décalage du δ des mannosyles, et indirectement le dilemme entre la galactomannane et la galactoglucomannane en faveur de la première.

On constate alors, que la meilleure adéquation des données est obtenue dans les références qui traitent aussi bien des arabinanes liées (Seymour et al., 1990 et Schols et al., 1990b) que libres (Hervé du Penhoat et al., 1987 et Swamy et Salimath, 1991). Dans ce cas, il n'y a pas de différence de δ pour la même arabinane qu'elle soit libre ou liée. Alors que dans d'autres arabinanes conjuguées avec les AGII (Schols et al., 1990b, Saulnier, 1987 et Saulnier et al., 1992) ou la RGI (Schols et al., 1990b, Odonmazig et al., 1992), on observe des C-1 différents qui sont caractérisés par quatre signaux distincts (de 110 à 107 ppm, en général) comme dans la fraction P03-B (voir plus loin).

L'explication cohérente réside dans les arguments suivants:

*- Différencier la forme libre de la forme liée d'un polysaccharide dans un mélange

En effet, Odonmazig et al. (1992) le démontrent concernant la fraction éthanolique AP qui contient la 5-arabinane libre en mélange. Car le précipité Cetavlon AP-I de cette fraction est dépourvu de la 5-arabinane qui est neutre; il ne reste que les C-1 (108,1 et 107,3 ppm) des arabinanes latérales de la RGI acide qui diffèrent des C-1 de l'arabinane contenue dans la fraction AP. De même, Hervé du Penhoat et al. (1987) ont démontré que les 5-arabinanes libres étaient en mélange avec des 4- β -galactanes en se basant sur le fait que chaque famille avait conservé les mêmes δ qu'elle ait été pure ou en mélange.

On peut penser qu'il en est de même pour la fraction MHR de Schols et al. (1990b) qui n'a pas subi une purification par différence de charge (précipitation par le Cetavlon ou chromatographie d'échange d'anions) permettant de lever les doutes.

*- l'arabinane liée, de taille importante a les mêmes signaux qu'une arabinane libre.

Seuls, les points de liaison fournissent des signaux caractéristiques de la nature du résidu substitué.

De tels cas ressemblent aux travaux de Schols et al. (1990b), hormis la remarque précédente, dans la mesure où leur test d'homogénéité de la fraction MHR par chromatographie d'exclusion de taille, donne une distribution régulière de l'arabinosyle dans les trois fractions A, B, et C. Ces auteurs attribuent alors les signaux des arabinosyles à des arabinanes liées aux polysaccharides pectiques, comme le montre leur modèle. Alors que ces signaux définissent les arabinanes libres comme celle contenue dans cette fraction Snr-A.

En outre, Seymour et al. (1990) démontrent rigoureusement cette hypothèse sur une 5-arabinane contenue dans une fraction retenue sur DEAE-Trisacryl. Et les assignements de cette arabinane liée, riche en 5-arabinosyle, correspondent exactement aux données de Hervé du Penhoat et al. (1987) et de Swamy et Salimath (1991) qui caractérisent les arabinanes libres.

Aussi, ces deux arguments se complètent au vue des travaux de Hervé du Penhoat et al. (1987) et de Seymour et al. (1990), en ce qui concerne la 5- α -arabinane. Conjuguée ou libre, elle a le même spectre. Toutefois, la question reste posée pour les autres arabinanes, comme la 3-arabinane et les arabinanes branchées.

En conclusion, compte tenu de nos résultats et de ces arguments; l'arabinosyle caractérisé dans cette fraction indique effectivement une trace de 5- α -arabinane et une majorité de T-arabinofuranosyl liés probablement à quelques résidus de la galactomannane, comme le galactosyle. Certains arabinosyles peuvent être acétylés. Et les C-1 des arabinanes conjuguées sont définis par leur liaisons et aussi par la nature du substitué.

δ)- Glucanes:

Elles sont identifiées par les C-1 à 102,94 et 102,90 ppm et aussi par les C-6 à 60,94 ppm (Tab. XVII). Le signal du Glc-4 masqué par les Man-4, aux environs de 79,14-79,44 ppm (Joseleau et Chambat, 1984b), expliquerait la mauvaise résolution de cette zone. L'absence du δ du Glc-6 substitué, à environ 69,00 ppm, et celle du dérivé AAPM (2,3-O-MeGlc, Tab. XVI) correspondant, indiquent la cellulose plutôt que la glucomannane (Goldberg et al., 1991) ou la xyloglucane dont le spectre est représenté par celui de la fraction Pnr suivante. Ainsi, les δ à 74,68 ppm, et à 75,91-75,74 ppm correspondraient respectivement aux (4- β Glc-3 ou -2) et (4- β Glc-5 ?) d'après les données de Bock et al. (1984) sur l'hexasaccharide qui n'indiquent pas précisément le 74,68, mais le 74,3 qui correspondrait plutôt à 74,15 ppm. Des données récentes sur la cellulose éclaireront cette interprétation.

En conclusion, le contenu glucidique de la fraction Snr-A est composé de cellulose et de galactomannane. La présence d'arabinosyle et d'acétyle semble se situer sur le second polysaccharide.

b)- Fraction Snr-B

L'aspect général du spectre des carbones anomériques (Fig. 39A/C-1, Tab. XVIII) montre la présence du contenu de la précédente fraction (α -Gal-: 99,39 ppm; 4- β -Man-: 100,46 ppm; α -Ara-: 108,97/109,01 ppm; et 4- β -Glc-: 102,94 ppm) et celle d'une arabinoxylane (4- β -Xyl-: 102,17/102,23 ppm; - α -Ara-: 108,13/109,63 ppm) et d'une 6- β -galactane (- β -Gal-1:103,77/104,25 ppm).

Les signaux à 101,24 et 20,65 ppm (Fig. 39B) semblent respectivement indiquer le rhamnosyle terminal et le méthyle. Le premier n'est pas corroboré par le Rha-6 à 17,15 ppm qui caractérise ce résidu. Tandis que le second, qui définit habituellement l'acétyle, devrait alors être confirmé par le signal du carbonyle à 170-175 ppm, comme dans la fraction Snr-A. Toutefois, la rigidité de cette fonction atténue sa résonance jusqu'à ne pas déceler le δ (C=O).

La légère différence de la galactomannane avec celle de Snr-A repose sur la diminution de l'amplitude de la diade B (70,60 ppm; Fig. 39B) du Man-2 et la faible augmentation de la triade III du Man-6 substitué. Elle semble indiquer une baisse de la substitution par le galactosyle. Par ailleurs, les signaux du résidu d'arabinose observés également dans Snr-A sont présents, ce qui semble confirmer l'interprétation faite à ce propos. Il en est de même en ce qui concerne la cellulose et surtout du signal à 74,67 ppm qui coexiste tout autant.

Quant à l'arabinoxylane, elle est définie par les signaux du xylosyle, particulièrement celui du 2,3,4-Xyl à 100,72 ppm qui caractérise le résidu de xylose substitué par deux arabinosyles (Hoffmann et al., 1992). Ces derniers sont identifiés par leurs carbones anomériques à 108,13 et 109,63 ppm qui sont respectivement spécifiques de leurs liaisons en O-3 et O-2 du xylosyle. La présence de 5-arabinane branchée est caractérisée par les signaux propres des résidus 5-Ara- et 3,5-Ara- (Tab. XVIII).

Enfin, l'existence de signaux à 104,25 et 103,77 ppm sont respectivement attribués à des β -galactosyles terminaux et liés en O-6 qui témoignent de la présence de 6- β -galactane.

En conclusion, cette fraction contient les mêmes polysaccharides identifiés dans Snr-A (galactomannane à arabinose et la cellulose) et de l'arabinoxylane avec une 6- β -galactane particulière. Ceci n'est pas étonnant dans la mesure où elle correspond à une fin de pic d'élution de Snr-A (Fig. 36-I, p. 111).

Tableau XVIII : Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction Snr-B

Composition en résidus liés	Déplacement chimique δ (ppm)					
	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-4</u>	<u>C-5</u>	<u>C-6</u>
<i>D-Mannosyle</i>						
$\beta\text{-Man}_p$ -	100,46				75,22 (A)	61,57
4- $\beta\text{-Man}$ -	---	70,60 (B)	72,00 (B)	79,15 (A)	75,35 (C)	61,06
		70,68 (A)	72,13 (A)	79,45 (B)	75,39 (B)	
4,6- $\beta\text{-Man}$ -	---	---	---	---	73,60	67,06 (II) 66,98 (III)
$\alpha\text{-Galp}$ -	99,39	69,10	69,91	70,10	71,57	61,70
<i>L-Arabinosyle</i>						
$\alpha\text{-Ara}_f$ -	108,97	82,07	(77,25)	84,76	62,00	
5- $\alpha\text{-Ara}$ -	109,01	82,00	77,20	(83,03)	67,41	
<i>D-Glucosyle</i>						
4- $\beta\text{-Glc}_p$ -	102,94	74,16	75,22-74,67 (79,15-79,45) (77,00-77,20)			60,95
<i>D-Xylosyle</i>						
$\beta\text{-Xyl}_p$ -	102,23	73,26	76,09	-	65,71	
4- $\beta\text{-Xyl}$ -	102,17	---	74,27	77,00	63,58	
2,4- $\beta\text{-Xyl}$ -	---	---	77,54	---	63,40	
2,3,4- $\beta\text{-Xyl}$ -	100,72	74,30	77,00	77,00	63,09	
<i>L-Arabinosyle</i>						
$\alpha\text{-Ara}_f$ -	108,13 (A_3X)	81,03	77,54	84,64	62,00	
	109,63 (A_2X)	81,85	---	---	---	
5- $\alpha\text{-Ara}$ -	108,13	---	77,31	83,03	67,56	
3,5- $\alpha\text{-Ara}$ -	108,13	---	79,85	82,80	---	
<i>D-Galactosyle</i>						
$\beta\text{-Gal}$ -	104,25	71,42	81,56	69,49	76,90	61,70
6- $\beta\text{-Gal}$ -	103,77	70,49	80,67	69,30/69,02	-	69,83
<i>Autres</i>						
$\alpha\text{-Rha}$ -	101,24	-	-	-		n.d.
Acétyl-		20,65 (CH_3 -)				

- (A, B et C) et (I, II et III) représentent respectivement les diades et les triades définies dans le texte.

- Les valeurs indiquées en gras représentent les signaux caractéristiques des molécules.

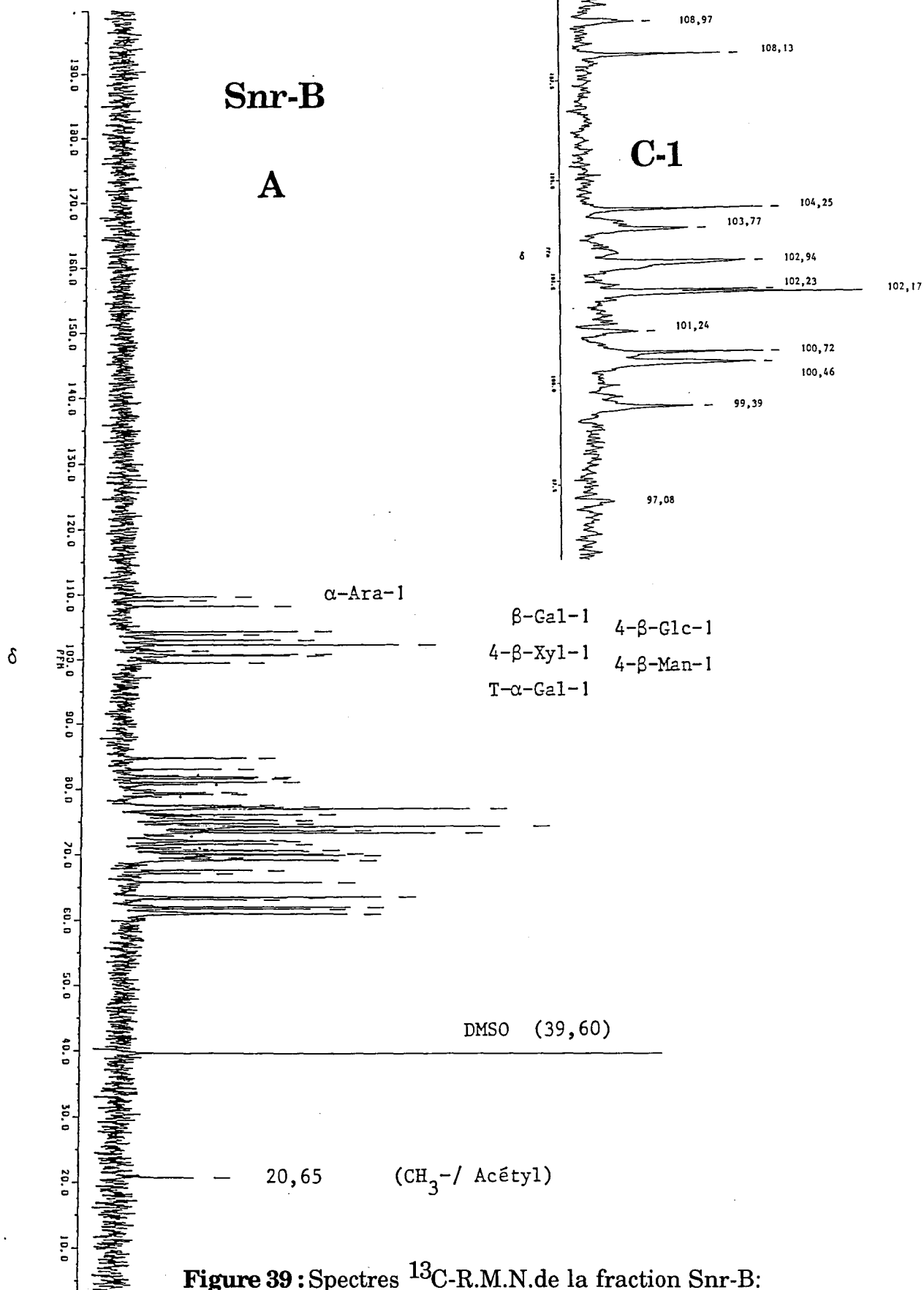


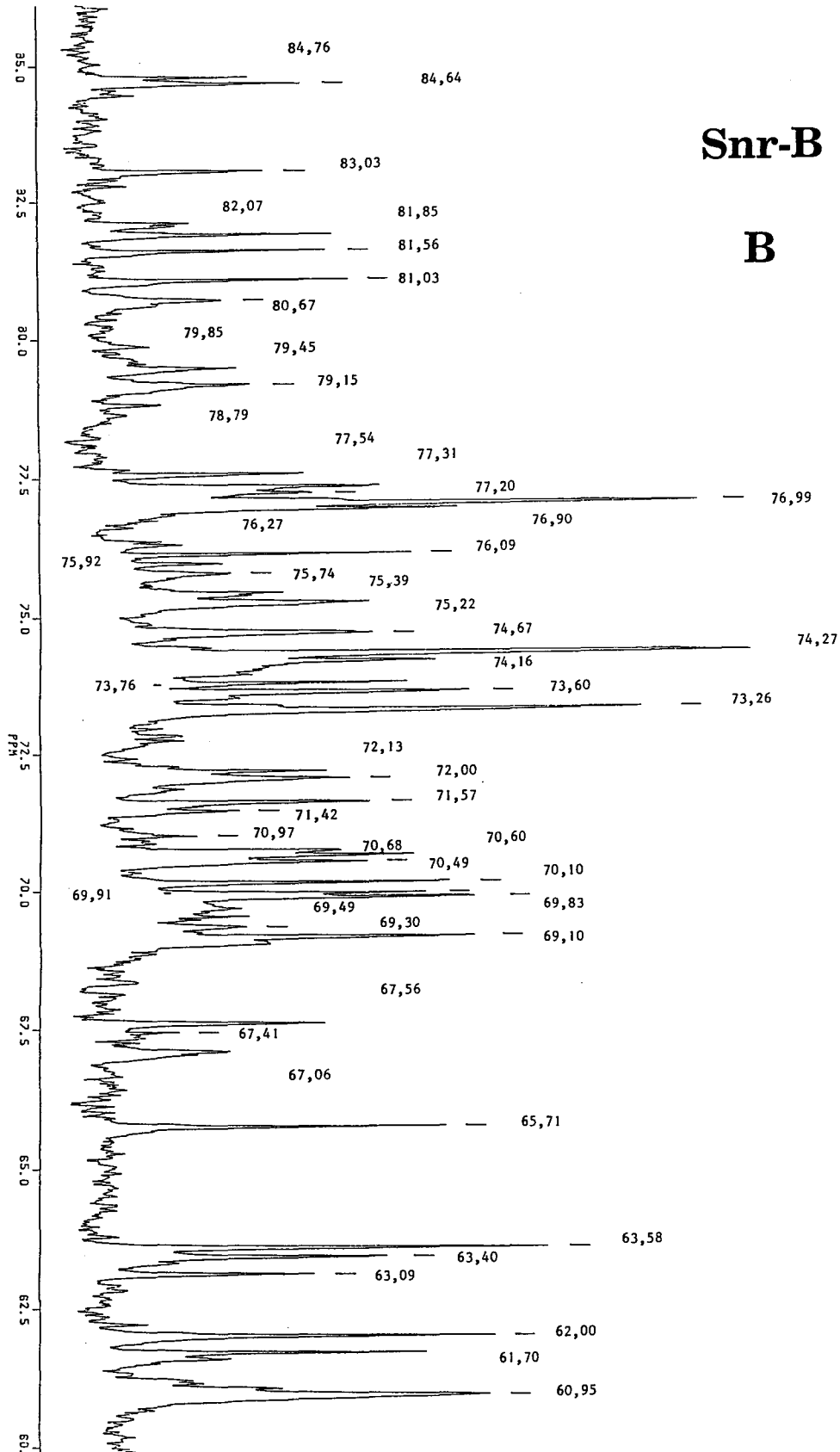
Figure 39 : Spectres ^{13}C -R.M.N. de la fraction Snr-B:

A: Spectre total (10-190 ppm) avec en médaillon le détail des carbones anomériques C-1

B: Spectre détaillé de la zone (60-90), voir page suivante

Légendes: identiques à celles de la figure 38.

8



c)- Fraction S01-B

Cette fraction vient à la suite de la fraction S01-A (Fig. 36-II, p. 111) qui est principalement une xylane. Les carbones anomériques (Tab. XIX, Fig. 40B) indiquent principalement une xylane (102,18 ppm, 101,64 ppm, 100,72 ppm) substituée par des arabinosyles (109,64 ppm et 108,13 ppm) dont certains porteraient des acides phénoliques (Fig. 40A) tels que les acides coumarique, AC (127,44 ppm) ; férulique, AF (128,16 ppm) et diférulique, DF (127,26 ppm), d'après les données de Ishii et Hiroi (1990a-b) et Ishii (1991). Ces composés sont confirmés à la fois par le δ (CH₃-) à 56,94 ppm (Fig. 40A et 40C) et par le δ à 101,64 ppm correspondant au 4 α -Xyl- de la chaîne principale, adjacent au xylosyl substitué par l'arabinosyle féruloylé (Ishii et Hiroi, 1990-b). D'autres signaux mineurs, présents dans les spectres des figures 40A et 40C, contribuent à la mise en évidence de telles structures.

Par ailleurs, l'existence de l'arabino-3,6-galactane II est marquée par les δ anomériques (Tab. XIX) du β -Gal (104,11 ; 103,95 ; 103,77 et 103,21 ppm) et du α -Ara (109,64, 108,13 ppm). Ces valeurs sont conformes à la plupart des travaux portant sur ces polysaccharides (Joseleau et Chambat, 1984b ; Saulnier, 1987 ; Colquhoun et al., 1990 ; Léon de Pinto, 1991 et Saulnier et al., 1992). En outre, on retrouve le signal à 103,77 ppm observé dans Snr-B ; il semble bien que ce déplacement chimique accompagne la 6- β -Galactane-. De plus, le résidu de rhamnose signalé à 101,24 et 17,15 ppm (Fig. 40A et 40B), est en position terminale. De même, le (4-OMe)-GlcA et l'acétyle sont respectivement indiqués par le C-1 à 98,13 ppm et par le groupe méthyle à 21,50 ppm. Seul, le premier a été déterminé par CLG sous forme triméthylsilylée (Tab. XIV).

Par conséquent, cette fraction S01-B renferme principalement de l'arabinoxylane à acides phénoliques et de l'arabinogalactane II (AGII) avec quelques liaisons nouvelles. Les dérivés phénoliques sont en quantité si faible qu'ils sont difficilement décelables. La présence de rhamnosyle et de (4-O-Me)-GlcA terminaux est à relier au rhamnoarabinogalactane de Varljen et al. (1989) et au AGII portant du GlcA en O-6 ou O-4 (82,58 ppm) selon le modèle de Léon de Pinto (1991) concernant des gommages d'Acacia.

d)- Fraction Pnr

Le spectre de cette fraction, bien résolu, permet d'identifier les principaux signaux anomériques (Tab. XX, Fig. 41A) à 104,83 ppm (T- β -Galp-), 102,91 - 102,73 ppm (4- β -Glc-) et à 99,43 - 99,29 ppm (α -Xyl-) qui sont caractéristiques des xyloglucanes (Joseleau et Chambat, 1984a-b ; Cartier, 1986 ; York et al., 1990a). Dans certains cas, ces polymères sont signalés comme étant fucosylés ; toutefois, la fraction Pnr ne présente pas de signal à 101,4 ppm, attribuable au C-1 du

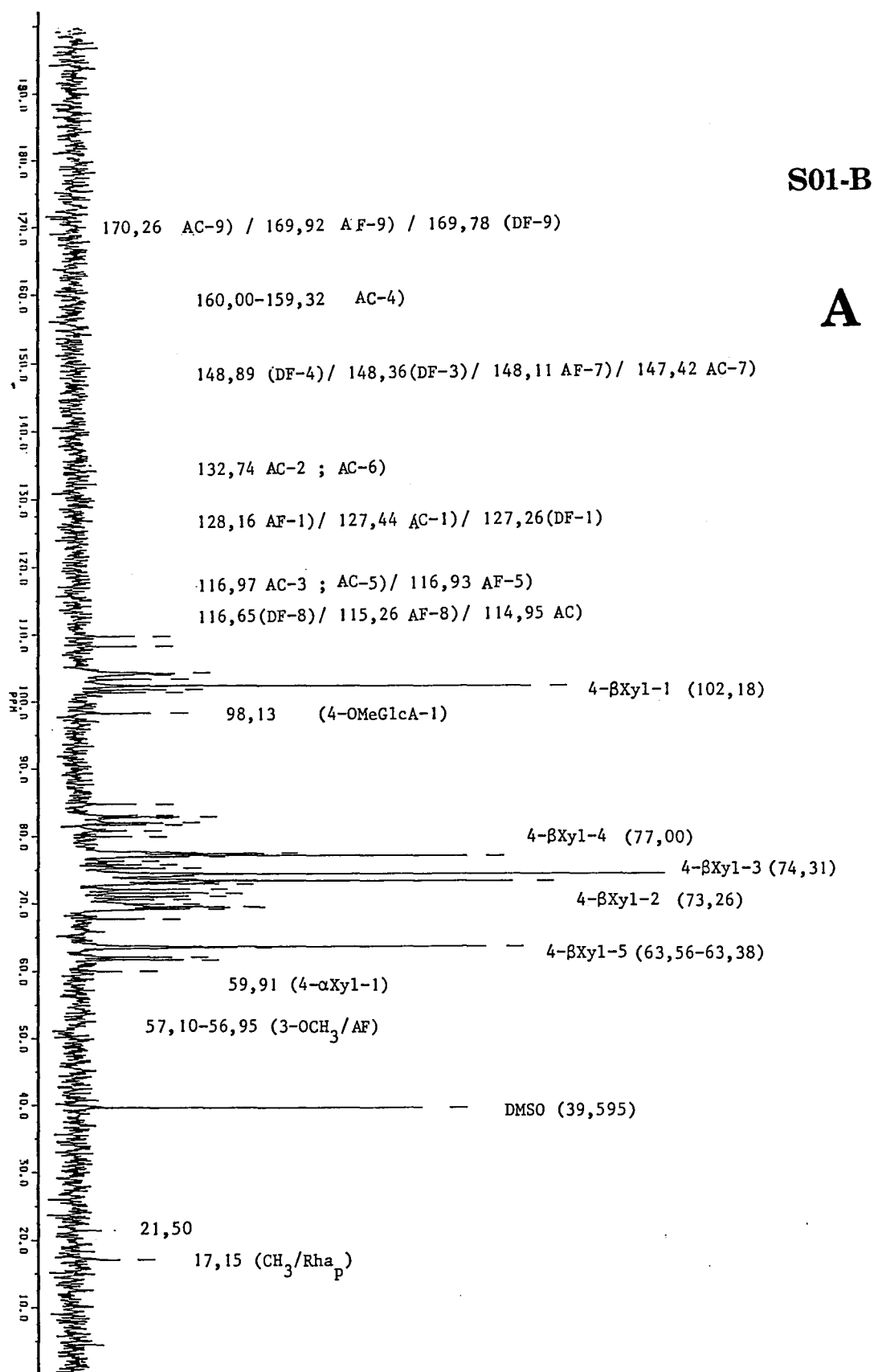
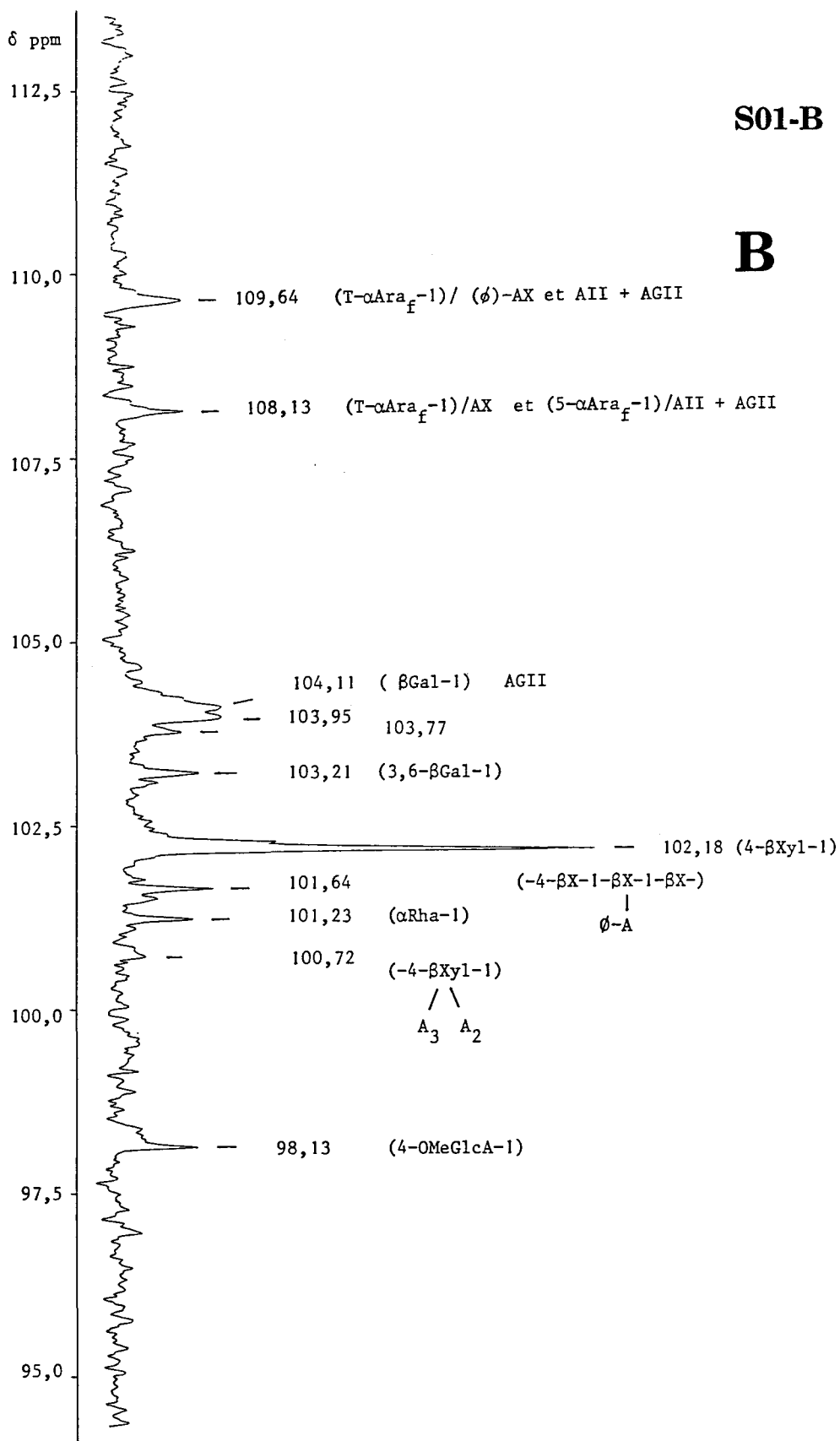


Figure 40 : Spectres ¹³C-R.M.N.de la fraction S01-B:

A: Spectre total (10-190 ppm)

Légendes: AC= Acide coumarique, AF= Acide férulique,
DF= Acide diférulique.



B: Détail des carbones anomériques C-1

Légendes: ϕ = Dérivés phénoliques (AC ,AFou DF) ; AX= Arabinoxylane ;

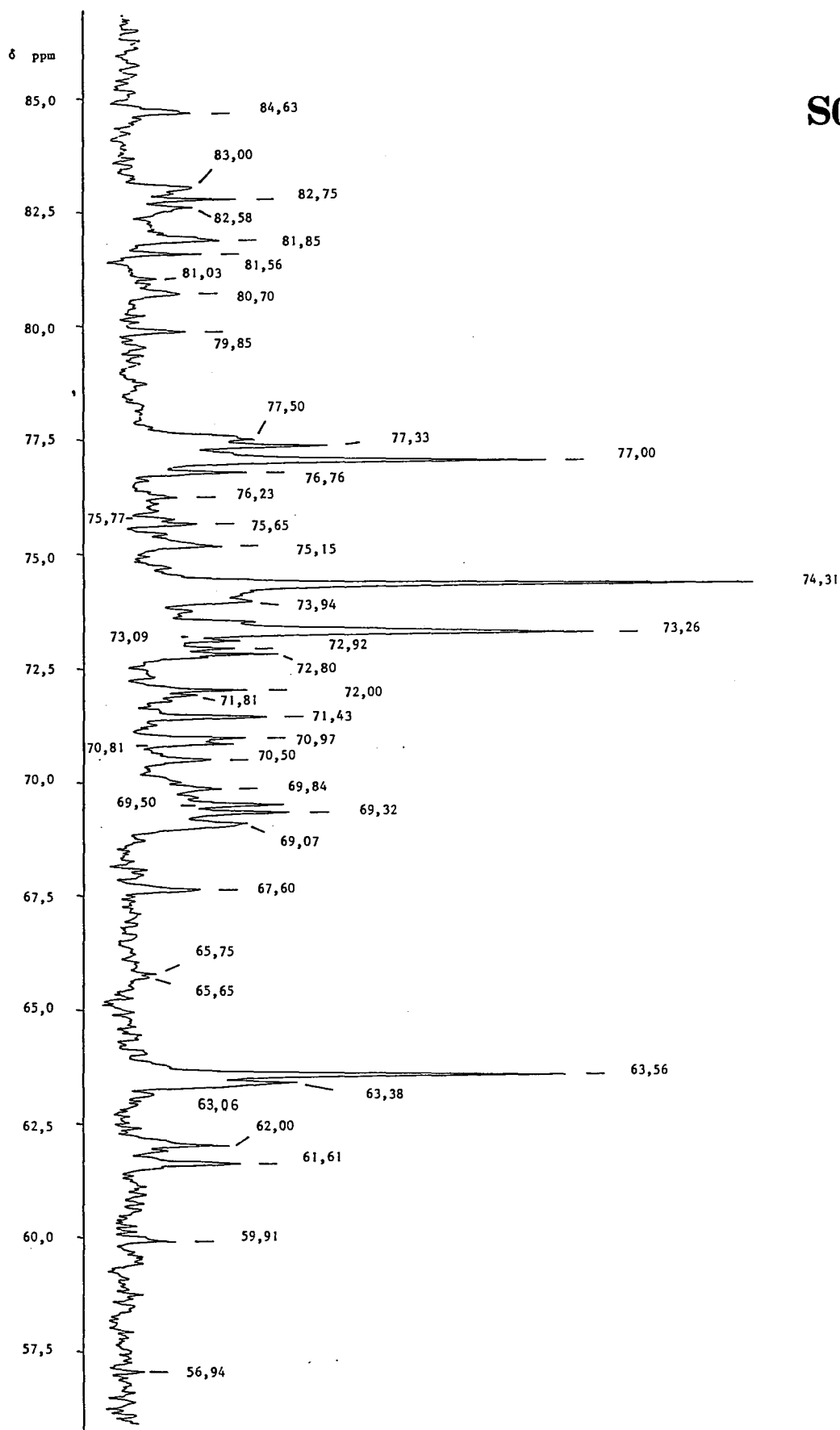
(ϕ)-AX= conjugués de ϕ , AX ; AII= Arabinanes ;

AGII= ArabinogalactaneII ; A₃= Arabinosyle lié en O-3 du xylosyle ;

A₂= Arabinosyle lié en O-2 du xylosyle.

S01-B

C



C: Spectre détaillé de la zone (60-90)

Tableau XIX : Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction S01-B

Composition en résidus liés	Déplacement chimique δ (ppm)					
	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-4</u>	<u>C-5</u>	<u>C-6</u>
<i>D-Xylosyle</i>						
β -Xyl _p -	102,22	73,26	-	-	65,75	
4- β -Xyl-	102,18	---	74,31	77,00	63,56	
2,4- β -Xyl-	---	---	77,50	---	63,38	
2,3,4- β -Xyl-	100,72	74,31	77,00	77,00	63,06	
<i>L-Arabinosyle</i>						
α -Ara _f -	108,13 (A₃X)	81,85	77,50	84,63	62,00	
	109,64 (A₂X)	---	---	---	---	
5- α -Ara-	108,13	---	77,33	83,01	67,60	
3,5- α -Ara-	108,13	---	79,85	82,75	---	
<i>D-Galactosyle</i>						
β -Gal _p -	104,11	71,43	73,56	69,49	75,65	61,61
3- β -Gal-	103,95	70,81/70,97	81,56	69,07	76,76	---
6- β -Gal-	103,77	70,49	80,70	---	---	69,84
3,6- β -Gal-	103,21	71,81/72,01	81,56 (GG₃/AG₃)	69,32	73,95 (GG ₃)	---
		70,49 (AG₆)	79,85 (AG₆)		75,15 (AG ₆)	
<i>Autres</i>						
α -Rha-	101,24	71,43	70,81	73,36	69,49	17,15
(4-OMe)-GlcA-	98,13	-	-		-	-
Acétyl-	21,50					
C/F/DF-	127,26-128,16				56,94 (CH ₃ O-)	
AF-A-3- β -Xyl-	101,64					
AF- α -Xyl-1-	59,91		72,01			

- (---): Signifie le report de la valeur située au-dessus

- (A₃X) et (A₂X), correspondent respectivement aux motifs suivants: Ara(1→3)Xyl et Ara(1→2)Xyl

- GG₃: Gal→6(3 Galactane): Galactose lié en O-3 substitué par un galactosyle en O-6.

- AG₆: Gal→3(6 Galactane): Galactose lié en O-6 substitué par un arabinose en O-3.

- AG₃: Gal→6(3 Galactane): Galactose lié en O-3 substitué par un arabinose en O-6.

Les valeurs en gras représentent les signaux caractéristiques des molécules.

résidu fucosyl (Bradbury et Jenkins, 1984), ce qui est en accord avec les très faibles proportions (0,3 %) constatées par analyse chimique (Tab. XIV).

D'autres signaux qui définissent habituellement cette catégorie de polysaccharides sont également présents (Tab. XX, Fig. 41B) (Joseleau et Chambat, 1984 ; Cartier, 1986 ; Ryden et Selvendran, 1990). Les signaux de résidus xylose contribuent à cette caractérisation du xyloglucane. Ainsi, les $\delta(\alpha\text{-Xyl-2})$ substitué à 80,55 ppm, 80,92 et 79,96 correspondent respectivement aux unités $\beta\text{-Gal}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Xyl-}$ (Joseleau et Chambat, 1984), $\alpha\text{-Xyl}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Xyl-}$ et $\text{Ara}(1\rightarrow2)\alpha\text{-Xyl-}$ (Ryden et Selvendran, 1990). Ces deux derniers ne sont qu'à l'état d'hypothèse. Le $\delta(\text{Xyl-2})$ du xylosyl terminal est signalé à 71,79 (Ryden et Selvendran, 1990).

Tableau XX : Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction Pnr

Composition en résidus liés	Déplacement chimique δ (ppm)					
	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-4</u>	<u>C-5</u>	<u>C-6</u>
<i>D-Glucosyle</i>						
$\beta\text{-Glc}_p\text{-}$	102,91					60,89
4- $\beta\text{-Glc-}$	102,79	72,69	74,69	79,36/79,60	74,82	69,24
4,6- $\beta\text{-Glc-}$	102,73	C-2/(73,58/73,45/73,39)/C-5				67,00
<i>D-Xylosyle</i>						
$\alpha\text{-Xyl}_p\text{-}$	99,43	71,79	(73,58/73,45/73,39)		61,84/61,59	
2- $\alpha\text{-Xyl-}$	99,29	80,55 (GX) 80,92 (XX) 79,96 (AX)	---		64,27	
<i>D-Galactosyle</i>						
$\beta\text{-Gal}_p\text{-}$	104,83	72,13	73,80	70,07	75,61 61,84/61,59	62,20
Acétyl-		20,82 ($\text{CH}_3\text{-}$)		175 ($=\text{C=O}$)		

- (XX, GX et AX) représentent respectivement les motifs suivants: $\alpha\text{-Xyl-}\alpha\text{-Xyl-}$, $\text{Gal-}\alpha\text{-Xyl-}$ et $\text{Ara-}\alpha\text{-Xyl-}$

- Les valeurs indiquées en gras représentent les signaux caractéristiques de molécules.

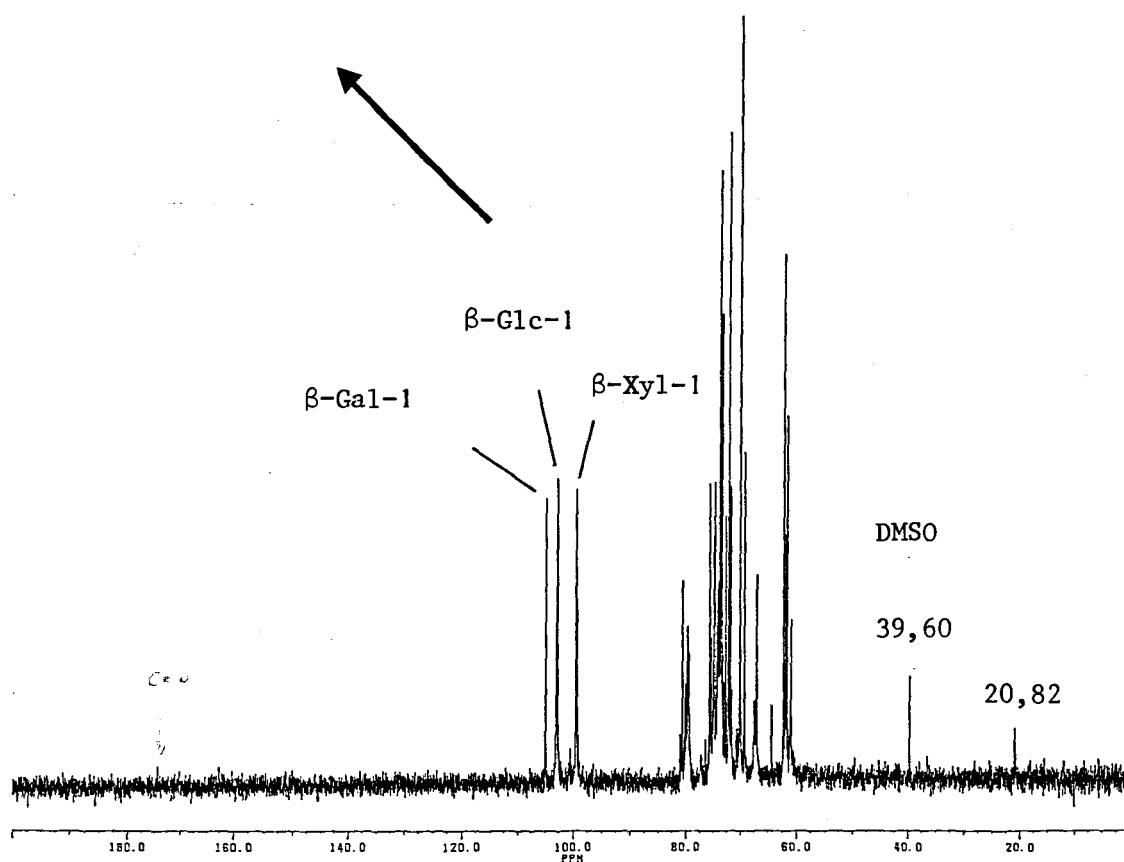
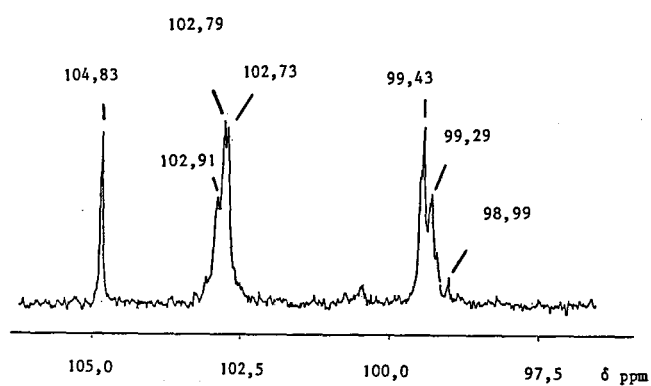
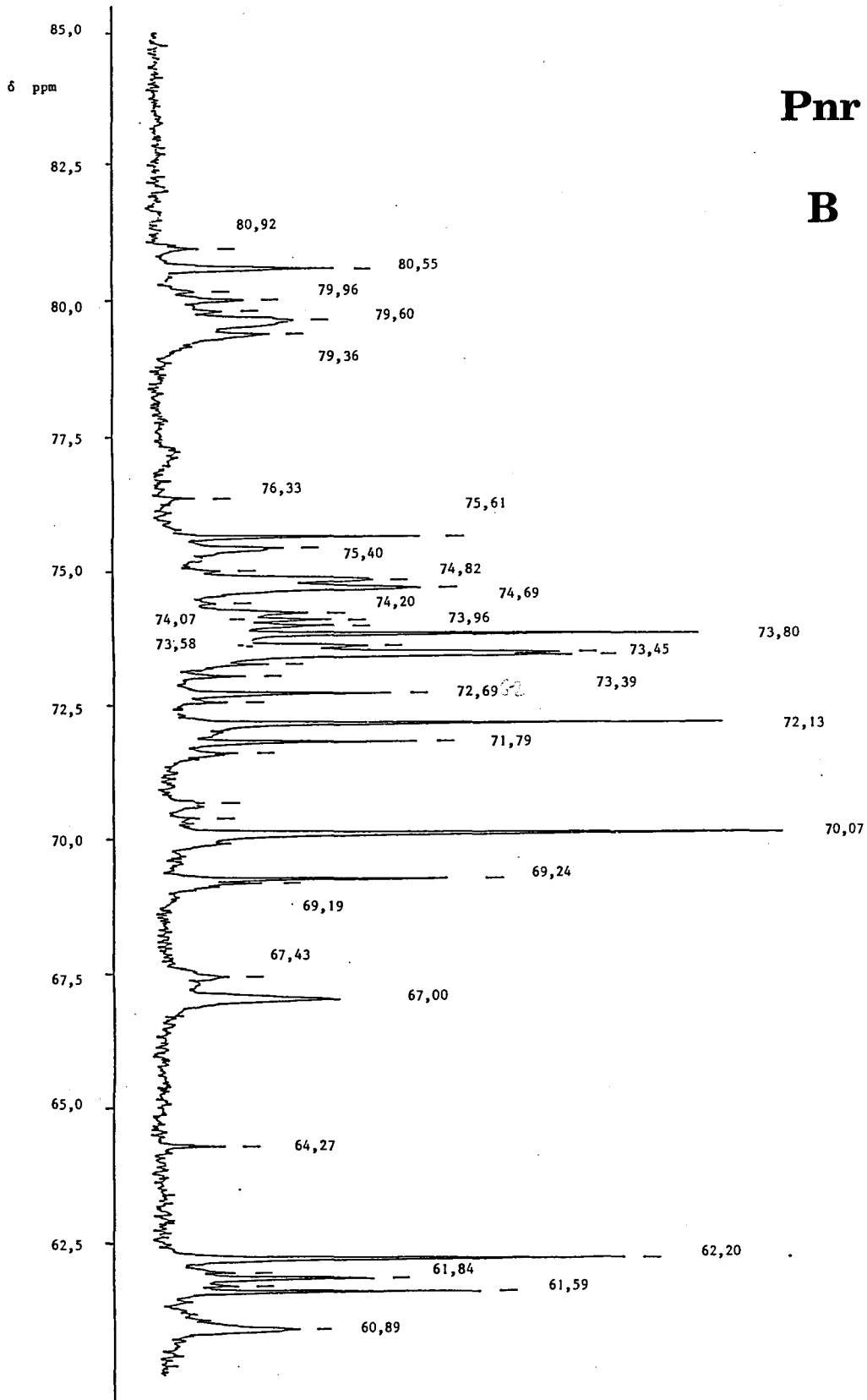
Pnr**A**

Figure 41 : Spectres ^{13}C -R.M.N. de la fraction Pnr :

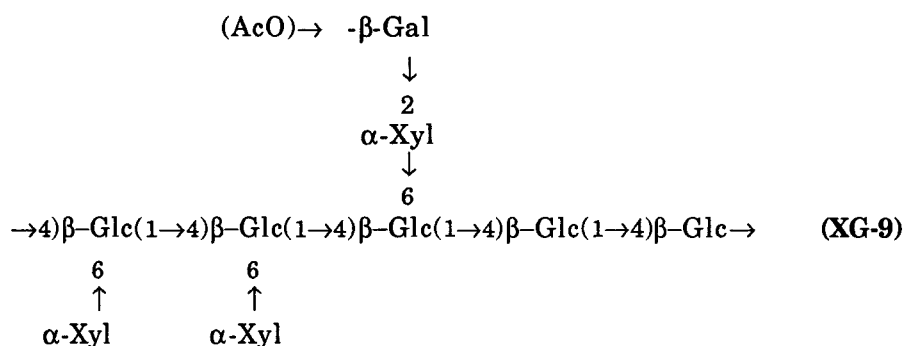
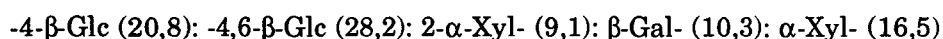
A: Spectre total (10-190 ppm) avec en médaillon le détail des carbones anomériques C-1

B: Spectre détaillé de la zone (60-90), voir page suivante

Légende: DMSO = Dimethylsulfoxyde

Pnr**B**

Enfin, l'analyse des liaisons par méthylation (Tab.IV) est généralement en accord avec ce spectre, en donnant le motif octasaccharide (XG-8) dont la composition est:



Cette structure est représentative du motif structural des xyloglucanes acétylées (York et al., 1988 et Fanutti et al., 1991). Cette sous-unité est conforme aux structures II et III de l'oligosaccharide B définies par Fanutti et al. (1991). Le xylosyle substitué est confirmé par le signal de son C-5 à 64,27 ppm. La présence d'acétyle lié au galactosyle (York et al., 1988) est indiquée par les signaux à 20,82 et à 175 ppm environ. Toutefois, l'attribution des signaux particuliers (73,39, 73,45 et 73,58) n'est que provisoire, faute de données référentielles. Aussi, les deux derniers correspondraient respectivement aux Glc-5 et Glc-2. De même, les δ à 61,84 et 61,59 ppm sont attribuables aux Xyl-5 terminal ou au Gal-6 acétylé. Finalement, dans cette fraction relativement homogène, la coexistence de la cellulose résiduelle avec les xyloglucanes est probable.

e)- Fraction P01-B

Cette fraction qui est éluée après la précédente (Fig. 37-II, p. 112) contient principalement des xyloglucanes acétylées (Tab. XXI, Fig.42-A, B et C) quelques traces de xylane (C-1: 102,17 ppm et 100,72 ppm) et de galactomannanes (C-1: 104,49 ppm). La présence de 104,25 ppm précédemment citée dans Snr-B comme étant un β -galactosyle terminal particulier, supposerait une liaison sur la xylane bien que le second signal à 103,77 ppm n'est pas décelé. Inversement, le signal 103,77 ppm est observé dans S01-B sans le 104,25 ppm (Fig. 40B). Aussi, ces deux valeurs seraient indépendantes, à priori. Toutefois, l'hypothèse de galactoxylane s'appuie sur la coexistence de ces signaux avec ceux des xylanes dans des fractions différentes (surnageant et précipité).

Tableau XXI : Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction P01-B

Composition en résidus liés	Déplacement chimique δ (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
<i>D-Glucosyle</i>						
$\beta\text{-Glc}_p\text{-}$	(102,91)					60,90
4- $\beta\text{-Glc-}$	102,81	72,70	74,67	79,36/79,60	74,81	69,26
4,6- $\beta\text{-Glc-}$	102,75	C-2/(73,59/73,46/73,40)/C-5				67,00
<i>D-Xylosyle</i>						
$\alpha\text{-Xyl}_p\text{-}$	99,45	71,80	(73,59/73,46/73,40)		61,85/61,60	
2- $\alpha\text{-Xyl-}$	99,30	80,56 (GX) 81,05 (XX) 80,00 (AX)	---		64,26	
<i>D-Galactosyle</i>						
$\beta\text{-Gal}_p\text{-}$	104,85	72,14	73,81	70,08	75,63	62,21
Acétyl-		20,82 ($\text{CH}_3\text{-}$)			175? ($=\text{C=O}$)	
<i>Xylosyle</i>						
$\beta\text{-Xyl}_p\text{-}$	(102,22)	73,25	-	-	65,71	
4- $\beta\text{-Xyl-}$	102,17	---	74,27	77,00	63,56	
2,4- $\beta\text{-Xyl-}$	---	---	77,50	---	63,40	
2,3,4- $\beta\text{-Xyl-}$	100,72	74,30	(77,00)	(---)	63,08	
$\beta\text{-Galp-}$	104,25	(70,60)		69,52	76,90	(61,60)
3,6- $\beta\text{-Gal}_p\text{-}$						69,83
<i>Autres</i>						
4- $\beta\text{-Man}_p\text{-}$	104,49	70,60 (B)	72,04	79,36/79,60	75,43	(60,90)
4,6- $\beta\text{-Man-}$					73,59	
$\alpha\text{-Gal}_p\text{-}$	(99,30)	(69,19)	69,90	(70,08)	71,60	61,70

- XX, GX et AX représentent respectivement les motifs suivants: $\alpha\text{-Xyl-2-O-}\alpha\text{-Xyl-}$, $\beta\text{-Gal-2-O-}\alpha\text{-Xyl-}$, et Ara 2-O- $\alpha\text{-Xyl-}$

- Les chiffres entre parenthèses désignent des valeurs masquées, insignifiantes ou mal résolues

- Les valeurs indiquées en gras représentent les signaux caractéristiques des molécules

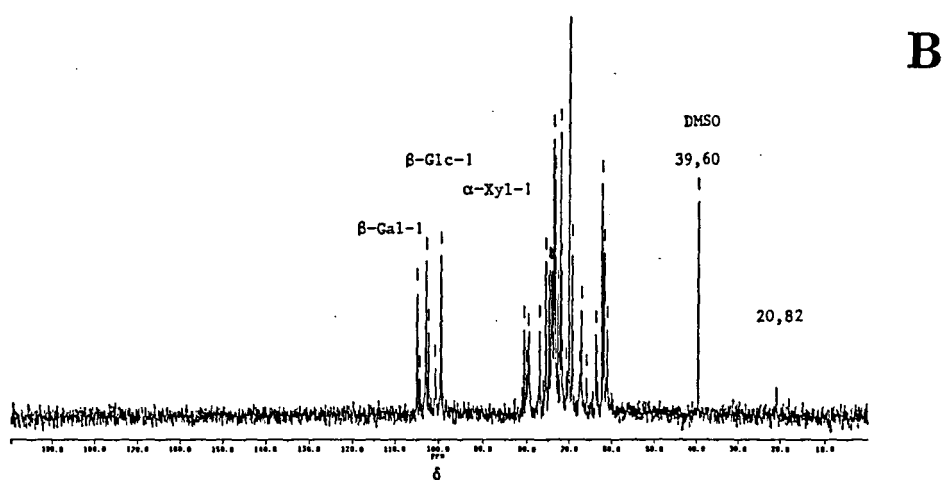
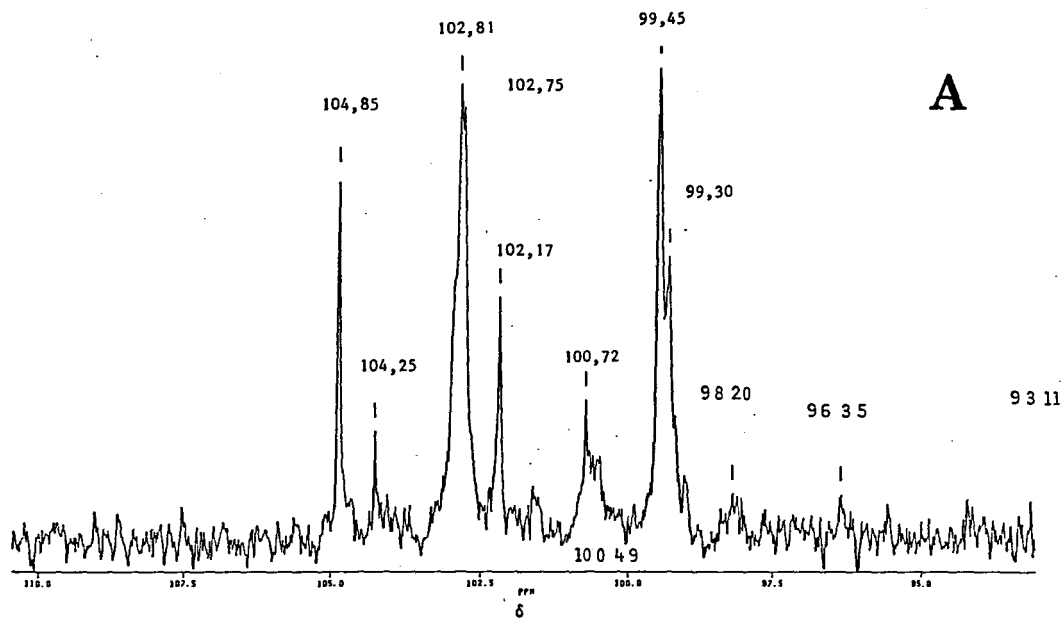
P01-B

Figure 42 : Spectres ^{13}C -R.M.N.de la fraction P01-B :

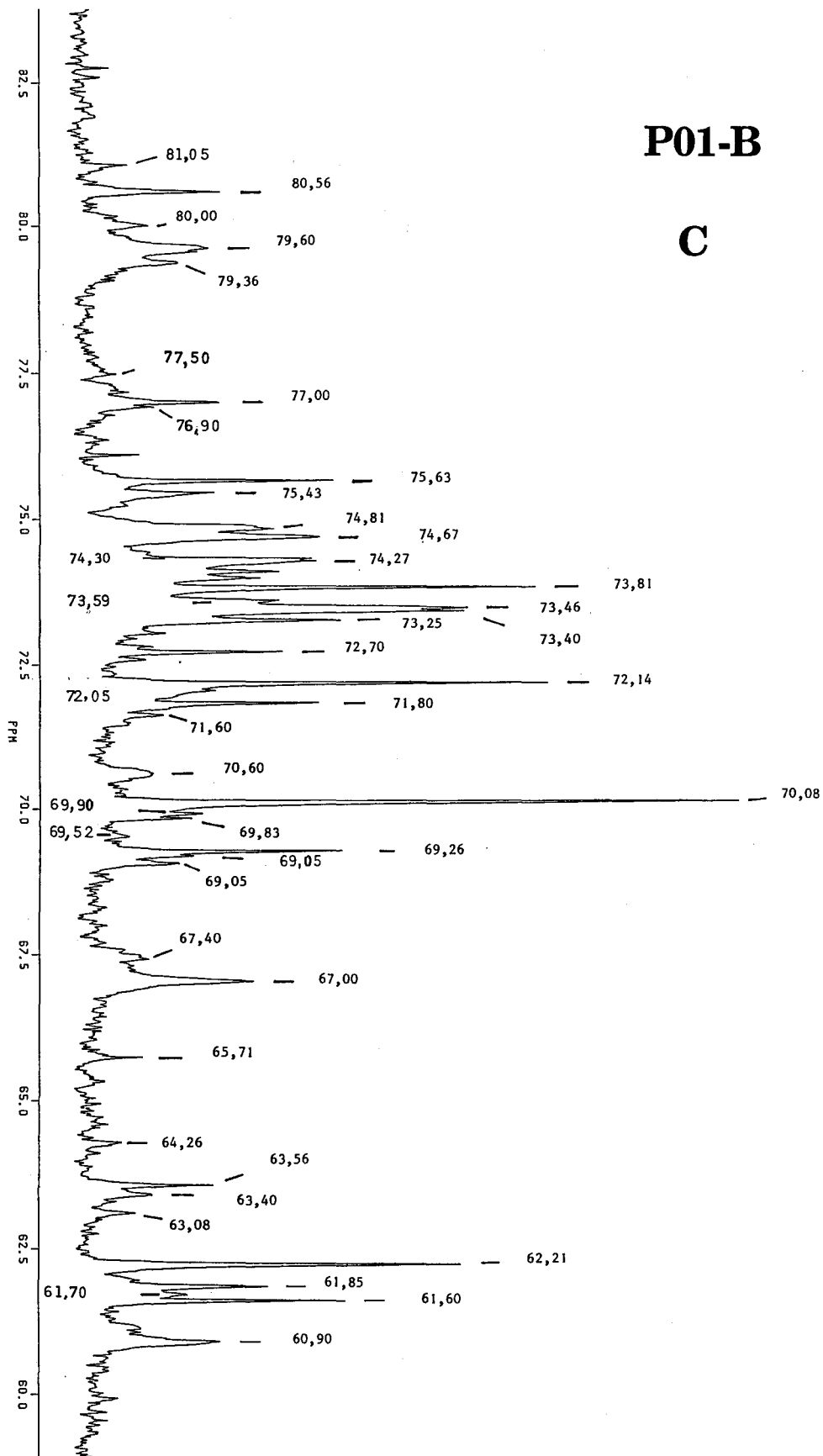
A: Détail des carbones anomériques C-1

B: Spectre total (10-200 ppm)

C : Spectre détaillé de la zone (60-82,5 ppm)

P01-B

C



f)- Fraction P03-B

L'analyse de la composition en monosaccharides de cette fraction avait permis de la considérer comme formée de fragments pectiques dont la moitié de la masse était constituée de chaînes latérales d'arabinogalactanes. La déduction provenait de la connaissance des structures classiques de pectines fortement substituées, sans qu'aucune donnée n'ait réellement étayé la proposition.

L'étude du spectre général de ce polymère (Fig. 43) permet immédiatement de confirmer la première qualification proposée. En effet, la présence des larges signaux à 174,87 ppm, 99,94-99,50, 78,38 et à 72,15, (Colquhoun et al., 1990 et Odonmazig et al., 1992) concrétise la nature pectique de la fraction (Tab. XXII). Le premier δ provient de la résonance du C=O du GalA-6. L'abondance des signaux compris entre 68 et 70 ppm ne permet pas de discerner ceux relatifs aux C-2 et C-3. Ce sont les acides galacturoniques qui sont majoritaires (Tab. XIV) puisqu'ils représentent 36 % des monosaccharides contre 5,1 % d'acide glucuronique. L'étalement et l'atténuation de ces signaux sont dus à la diversité des substitutions et des liaisons du GalA mais également à une certaine difficulté de résonance provoquée par la rigidité de la fonction carbonyle. Il apparaît qu'une partie du GalA soit estérifiée en C-6 par un groupement méthyle, comme l'indique le signal à 53,70 ppm (Schols et al., 1990-b). Un autre δ à 56,25 ppm correspond également à un méthyle, mais lié cette fois par une liaison éther sur le C-4 du GlcA. Le fait que le composé (4-O-Me-GlcA) n'a pas été détecté par CLG confirme que lorsque sa teneur est en limite de détection, l'existence du signal caractéristique du méthyle permet son repérage (Léon de Pinto, 1991). L'acide glucuronique (5,1%, Tab. XIV) est détectable par le signal à 98,26 ppm (C-1).

Par ailleurs, la présence du signal à 20,80 ppm (Fig. 43A) indique probablement la présence de groupes acétyl, substituant le GalA en O-2 ou O-3 (Schols et al., 1990-b ; Odonmazig et al., 1992). Enfin, le doublet à 17,15 ppm, correspondant au C-6 des rhamnosyles terminaux et liés qui composent la RG I (Joseleau et Chambat 1984-b ; Colquhoun et al., 1990), complète la caractérisation du squelette pectique. L'absence de signal à 18 ppm environ marquant la présence du fucosyle qui caractérise la RG II, n'est pas surprenante car ce résidu n'est décelé qu'à un taux de 0,4 % (Tab. XIV).

En outre, la présence du galA et du Rha déjà signalée précédemment, est matérialisée par une série de signaux entre 96,91 et 92,34 ppm (Tab. XXII, Fig. 43B). Ceux-ci correspondent aux δ anomériques des galacturonoyles situés aux extrémités réductrices des chaînes principales des pectines, d'une part l'oligoRG I à 93,00 et 96,91 ppm (Colquhoun et al., 1990), et d'autre part à 92,34 et 96,00 ppm pour l'oligogalacturonane (Hricovini et al. 1991). Par ailleurs, les δ du GalA lié

Tableau XXII: Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction P03-B

<u>Composition</u> <u>en résidus liés</u>	Déplacement chimique δ (ppm)					
	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-4</u>	<u>C-5</u>	<u>C-6</u>
<i>L-Arabinosyle</i>						
α -L-Araf -	109,65	81,93	(77,32)	84,65	61,89	
5- α -Ara-	108,22	---	77,32	83,00	67,09 (AG) 66,50/67,60 (AA)	
2,5-Ara-	---	---	---	---	---	
3- α -Ara-	107,69	---	---	---	---	
3,5- α -Ara-	---	---	(79,88/79,72)	82,87	---	
Ara	107,00					
<i>D-Galactosyle</i>						
β -Gal-	104,87	71,81	73,36 (RGI)	69,54	75,09 (GG)	61,62
	104,12		73,88 (GG)		75,63 (RGI)	
3- β -Gal-	103,96	70,85	81,52	69,07	76,79	---
3,6- β -Gal-	103,27	71,81	81,52 (GG ₃) 74,00 (AG ₃)	69,32 (GG ₃) 69,07 (AG ₃)	74,00	70,00
<i>L-Rhamnosyle</i>						
α -Rha-	101,24	71,43	70,85	73,36	69,54	17,15
4- α -Rha-	---	-	-	---	81,52	---
2- α -Rha-	99,94-99,50	76,79	70,00	72,70	69,54	---
2,4- α -Rha-	---	(77,34)	---	81,20	69,07	---
<i>D-Galacturonyle</i>						
α -GalA-	99,94-99,50	-	-	-	-	-
4- α -GalA-1 (HG)	---	(69,07)	69,32-69,54	78,38	72,15	174,87
4-GalA	92,34 (α)	---	---	---	---	---
	96,00 (β)	---	---	---	---	---
4- α -GalA- (RGI)	98,26	---	72,15	---	74,00	---
4-GalA	93,00 (α)	---	---	---	---	---
	96,91 (β)	---	---	---	---	---
-(6-OMe)-GalA-					53,70 (6-OMe)	
<i>Autres</i>						
4- β -Xyl-	-	-	-	-	63,54	
GlcA-	98,26	-	-	O-Me/ 56,25	-	174,87
Acétyl-	20,80					174,87

Cf légendes précédentes pour AG, AG₃ et AG₆ ; RGI : Relatif à la chaîne principale de la rhamnogalacturonane I ; HG : *Idem* pour l'homogalacturonane

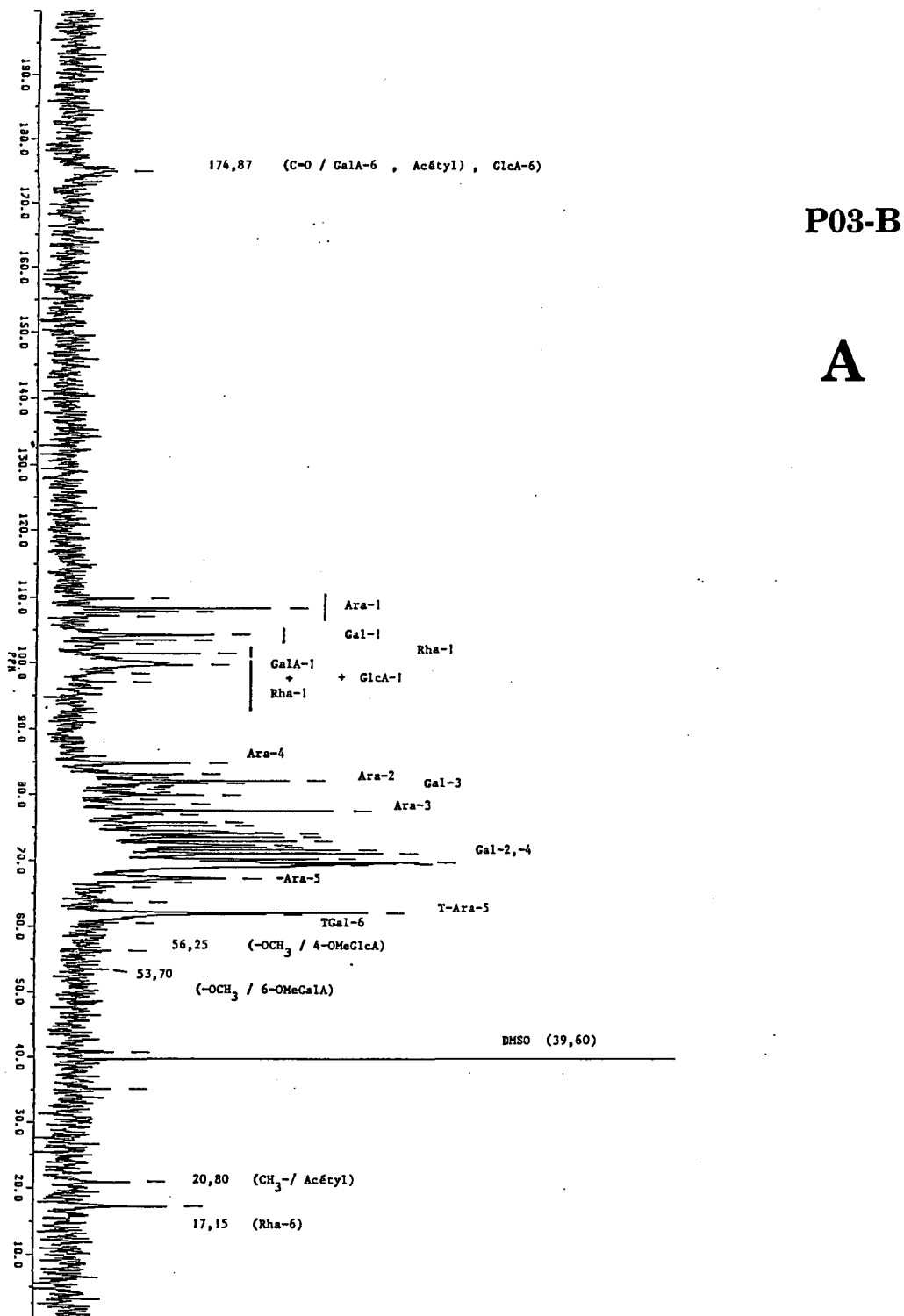


Figure 43 : Spectres ^{13}C -R.M.N. de la fraction P03-B :

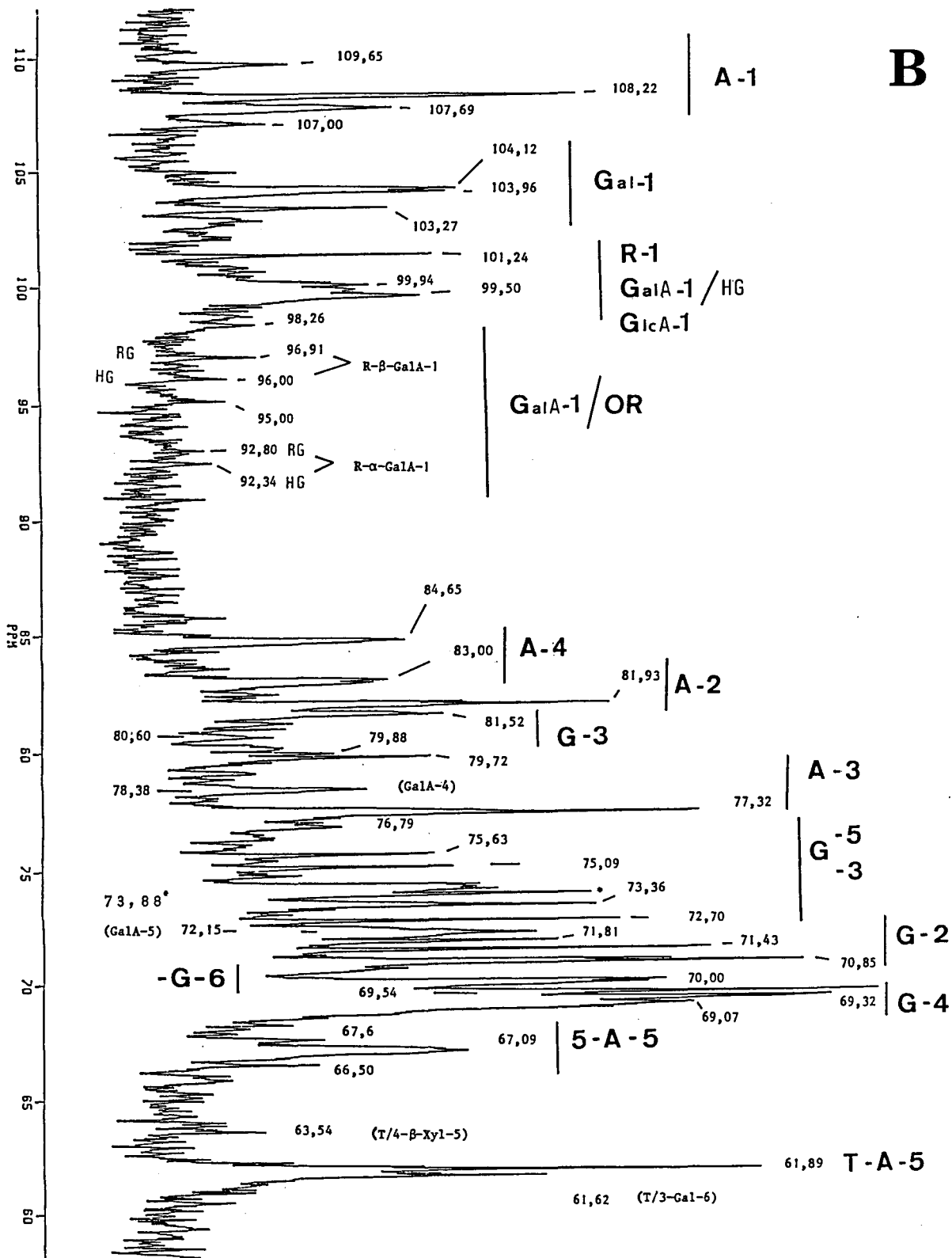
A: Spectre total (10-200 ppm)

B: Spectre détaillé de la zone (60-110 ppm)

Légendes:

- C-1, C-2,...C-5, de l'arabinsyle A-1 ou Ara-1, le même en position terminale (T- a-Ara-1, T-A-1 ou TA-1) et l'arabinsyl réducteur (R-Ara-1).
- C-1, ..., C-6 du galactosyle : G-1 ou Gal-1,,
- G6, C-1,..., C-6 de l'acide galacturonique : GalA-1, et R-(a,b)-GalA-1, le galacturonosyl réducteur. Il en est de même pour les autres monosaccharides.
- OR : Oligosaccharide, RG correspond au motif du rhamnogalacturonane I tandis que HG se rapporte à celui de l'homogalacturonane.

P03-B



différent selon qu'il fait partie d'une homogalacturonane (HG:99,50-99,94) ou d'une rhamnogalacturonane I à 98,26 ppm.

Il résulte de ces observations que la fraction considérée pourrait être formée par des polymères, aisément précipitables par 1 volume d'éthanol absolu, présentant des successions de blocs alternés de RG I et d'homogalacturonanes, conformément au modèle classique proposé par Jarvis (1984). De plus, il s'y trouve également des oligosaccharides, révélés par les signaux des GalA réducteurs. Leur présence dans la fraction ne peut s'expliquer que parce que ces oligosaccharides sont alourdis par des chaînes latérales volumineuses ou bien parce qu'ils sont associés latéralement à des chaînes plus longues d'homogalacturonanes, par l'intermédiaire d'ions divalents (Ca^{++}), selon le modèle egg-box qui peut se mettre en place lorsque les oligogalacturonates atteignent un DP minimum égal à 7 ou 9 (Marga et al. 1990). Ce dernier argument est plausible puisque aucun chélateur de cations divalents ($\text{EDTA}_{\text{Na}_2}$) n'a été utilisé durant la préparation.

Enfin, un dernier signal ($\delta = 95,00$ ppm) n'a pas pu être attribué, faute d'avoir trouvé un δ comparable dans la littérature. En considérant les données concernant cette fraction, deux hypothèses viennent à l'esprit ; la première est relative au fait que le δ du C-1 d'un GalA réducteur substitué par un méthyle ou un acétyle pourrait être déporté ; la seconde correspondrait également à une déviation du C-1 d'un GalA associé à un xylosyle lui même signalé par le δ à 63, 54 ppm, selon Colquhoun et al. (1990), pour constituer une région de xylogalacturonane.

Pour ce qui concerne les résidus arabinosyl, on observe 5 signaux anomériques distincts (105,10 à 109,65 ppm) dont celui à 108,22 ppm (T/5-Ara-1/RG I) est le plus intense. Ce dernier, couplé aux δ à 77,32 et 83,00 ppm, désigne les 5-arabinanes I branchés à la RG I (Schols et al., 1990-b ; Odonmazig et al., 1992), et avec le δ à 105,10 ppm ($\text{Ara}_p\text{-1-}$) caractérisant les arabinanes II (Hervé du Penhoat et al., 1987 ; Swamy et Salimath, 1991). La présence des 3-arabinanes est indiquée par le signal à 107,69 ppm (Varljen et al., 1989) qui est en rapport avec ceux à 79,72-79,88 ppm. Ces catégories d'arabinanes sont effectivement liées au RG I car si elles étaient libres, elles seraient dans une fraction de polymères neutres, comme ceux qui ont été identifiés dans la fraction Snr-A avec les δ des T/5-Ara-1 à 108,96 et 109,01 ppm. Par ailleurs, les signaux à 109,65 ppm (T-Araf-1 / AGII) et 107,69 ppm (3,5-Ara-1 / AGII) correspondent aux arabinosyles qui substituent les 3,6-galactanes pectiques ou protéiques pour former les arabinogalactanes II (Saulnier et al., 1992). Ces arabinanes sont probablement différentes de celles identifiées dans les fractions Snr-B et S01-B par le fait que leurs 5-Ara-1 respectifs soient à 108,22 et 108,13 ppm. Une autre arabinane serait indiquée par le δ à 107,00 ppm qui correspondrait à la substitution en O-3 de la 3-arabinane.

Quant aux galactanes II, elles sont identifiées par leurs trois carbones anomériques à 103,27, 103,96 et 104,12 ppm. Ces valeurs sont caractéristiques des 3,6- β -galactanes substituées en O-6 par des chaînes latérales d'arabinanes (Joseleau et Chambat, 1984 ; Varljen et al., 1989 ; Colquhoun et al., 1990). Ceci explique la différence de δ des 5-Ara-1 constatée ci-dessus. En effet, le signal à 108,13 ppm définit l'arabinoxylane tandis que celui à 108,22 ppm marque l'arabinogalactane II. Par ailleurs, les signaux 104,25 et 104,11 désignant un β -Gal-1 terminal ou substitué en O-3, correspondraient au galactosyle branché sur le rhamnosyle de la RGI. D'après Colquhoun et al. (1990), ils sont attribués aux motifs Gal(1 $\rightarrow$ 4)Rha- et Gal(1 $\rightarrow$ 4)[GalA(1 $\rightarrow$ 2)]Rha-. L'absence du signal à 103,77 ppm signifie que la fraction P03-B ne renferme que des polysaccharides pectiques à 3- β -galactanes substituées en O-6 par des arabinoxyles, soient des arabino-6,3- β -galactanes.

En définitif, la fraction P03-B est effectivement constituée de polysaccharides pectiques. Cette identification a été faite principalement par analyse spectroscopique (^{13}C -RMN) basée sur des données de référence et comparatives et sur sa composition en monosaccharides.

IV - CONCLUSION

Comparativement aux résultats du chapitre I, on est passé de trois à une vingtaine de fractions au sortir de la chromatographie d'échange d'anions, sans tenir compte des oligo- et des monosacchariques. Dans l'ensemble, on retrouve les principales catégories de polysaccharides proposées au chapitre précédent mais la caractérisation est affinée par la mise en évidence de fractions particulières. Certaines présentent des compositions et des structures charnières, intermédiaires entre deux ou plusieurs classes de polysaccharides, comme Snr-C, S01 et S03, qui sont respectivement des arabinogalactanes II pectiques, des xylanes et des arabinogalactanes II pectiques avec des protéines. D'autres sont assez homogènes pour être considérées comme pures (Snr-A et Pnr). De même, des fractions riches en fucose qui témoignent de la présence de RG II, ont pu être isolées, par exemple S05-B. Ainsi, seules les fractions caractéristiques et représentatives ont été analysées par méthylation et par chromatographie liquide-gaz couplée à la spectrométrie de masse, afin de préciser leur identification. Ces analyses sont complétées par la spectroscopie ^{13}C -RMN qui permet de déceler des variabilités structurales non déterminées par la méthylation. De fait, l'utilisation de la ^{13}C -R.M.N. doit actuellement précéder toute investigation analytique, de façon à mieux adapter les protocoles d'étude en fonction de la nature des fractions préalablement isolées par des méthodes simples comme celles qui ont été utilisées dans cette étude.

Par ailleurs, l'hypothèse de l'existence d'enzymes endogènes est soulevée par les

caractéristiques de certains polysaccharides :

- la présence de rhamnose en positions réductrice (P1i, S1 P6 P3, chapitre I) et terminale P03-B, chapitre II) témoigne de l'éventualité d'une nouvelle activité "Rhamnogalacturonase" coupant entre le rhamnosyle et l'acide galacturonique ;

- Ce dernier en extrémité réductrice (P03-B, chapitre II) signale l'action des pectinases telles que les endo-polygalacturonases ou les Rhamnogalacturonases de type *Aspergillus aculeatus* (Schols et al., 1990a).

- l'absence de galactose à l'extrémité réductrice des polysaccharides et sa présence dans les oligosaccharides (cf. chapitre I) supposent que les galactosidases, probablement des endogalactosidases, n'agissent plus sur les galactanes résiduelles du milieu de culture. L'explication complémentaire serait que ces dernières sont intégrées dans des structures complexes comme les arabinogalactanes pectiques et protéiques, bloquant ainsi l'action des galactosidases qui n'agiraient que sur des substrats linéaires. Ceci semble être en accord avec les structures des polysaccharides galactosylés (mannanes et arabinogalactanes) dans lesquels le galactosyle appartient à une chaîne latérale plus ou moins ramifiée.

Enfin, la stratégie est limitée dans l'étude fine de la structure des polysaccharides contenus dans les fractions de composition intermédiaire. En effet, le cas de la fraction Snr-A a permis de constater le manque de cohésion absolue entre les analyses par RMN et par méthylation, même si cela est inhérent à la limite des méthodes et à l'irrégularité intrinsèque des structures des glucides végétaux. A la différence des glucides bactériens, les polysaccharides végétaux n'ont pas de motif aussi régulièrement agencé. C'est pourquoi, l'utilisation de méthodes complémentaires appropriées (enzymes et coupures chimiques spécifiques) alliée aux notions d'oses réducteurs et de liaisons caractéristiques permettra d'élucider les relations entre polysaccharides.

CHAPITRE III

Relation structurale

entre

les polysaccharides pectiques

et

les xylanes

*“Tout apprentissage exige ce voyage avec l'autre et vers l'altérité.
Pendant ce passage, bien des choses changent.”*

M. SERRES, Le Tiers-Instruit, 1991

I - INTRODUCTION

L'étude précédente a permis de déterminer les fractions intéressantes dans le but de poursuivre la caractérisation structurale et de mettre en évidence des relations covalentes entre certaines catégories de polysaccharides, en particulier les polymères pectiques et les xylanes. Ceux-ci ont souvent été obtenus ensemble dans des préparations de polysaccharides pariétaux ou d'exopolysaccharides de suspensions cellulaires et ont été considérés comme des mélanges de molécules différentes (Keegstra et al., 1973). Ces auteurs, ainsi que Chambat et al. (1984), ont suggéré l'existence de liaisons covalentes entre les polysaccharides pariétaux, à l'exception de la cellulose. L'utilisation de combinaisons de méthodes enzymatiques et chimiques a permis la mise en évidence de liaisons covalentes alcalilabiles entre le xyloglucane et les polysaccharides pectiques. Selon Talmadge et al. (1973), des chaînes latérales de 4-galactane pectique interviendraient également dans la jonction avec le xyloglucane. C'est à partir de ces travaux que l'équipe d'Albersheim a proposé un modèle structural de la paroi cellulaire d'érable (cf. Fig.2, Généralités p. 7) et que Fry (1986) a élaboré son modèle des interconnexions (cf. Fig 16, Généralités p. 42).

Par ailleurs, la mise en évidence de la participation structurale des acides phénoliques (acides férulique et coumarique) dans certains arabinoxylanes (Nishitani et Nevins, 1989 ; Ishii et Hiroi, 1990a-b et Ishii, 1991) et dans des polysaccharides pectiques (Fry, 1982a), complète ces travaux antérieurs. L'hypothèse des relations entre les xylanes et les polysaccharides pectiques (Selvendran et King, 1989) en découle. Toutes ces données associées aux résultats du chapitre II montrent que certaines fractions (Snr-C, S01A et B et S03) possèdent des caractéristiques permettant l'étude détaillée des relations interpolysaccharidiques.

Notre stratégie diffère de celle de l'équipe d'Albersheim (Keegstra et al., 1973) dans la mesure où elle fait appel à des dégradations enzymatiques sur des fractions uniformes et homogènes d'EPS, obtenues après plusieurs étapes de purification. En outre , elle prend en compte la nature de l'ose réducteur des fractions issues de l'hydrolyse enzymatique pour contrôler l'uniformité de la spécificité de l'enzyme et la régularité structurale des hydrolysats. Par exemple, des xylanes soumises à une xylanase pure ne donnent que des fragmenst de xylanes dont l'ose réducteur ne peut être que du xylose. Par conséquent, toute déviation à cette règle renseigne sur la structure du substrat.

II - PRESENTATION DES METHODES

Les méthodes de dosage, de quantification et de caractérisation sont celles utilisées dans les deux chapitres précédents. Seuls les protocoles spécifiques à chaque étude seront décrits.

A.- Etude de la fraction pectique (Préparation d'arabino-galactanes II)

L'étude du surnageant éthanolique S_1° (équivalent à S''_1 du chapitre II) comprend une hydrolyse enzymatique suivie de plusieurs purifications, selon le protocole décrit à la figure 44. Malgré la précipitation par 3 vol. d'EtOH absolu de S_1° , on peut considérer que la fraction F05-I équivaut à l'ensemble des fractions S03, S05-A et S05-B (cf. chapitre II), débarrassé des éventuels oligomères libres.

Le protocole établi (Fig. 44) comprend 2 chromatographies d'échange d'anions distinctes, effectuées sur le même type de résine mais différant par leurs séquences d'élution : eau distillée puis successivement des solutions de NaCl 0,1 et 0,5 M (I) et eau distillée puis directement NaCl 0,5 M (II).

1 - Action de la pectinase sur la fraction pectique F05-I

500 μ l de la fraction F1 (cf. Annexe 4) de la pectinase (E.C 3.2.1.15, 0,26 U/mg, *Aspergillus niger*, Serva) sont utilisés pour hydrolyser 25 mg de la fraction F05-I dissoute dans 15 ml de tampon AcONa 50 mM, pH 4,5. La réaction a lieu pendant 24 h à 40° C, en présence de toluène. 25 mg d'acide pectique de citron traités simultanément dans les mêmes conditions, serviront de témoin.

2 - Isolement des produits de l'hydrolyse

Après une précipitation éthanolique (3 vol.) de l'hydrolysate (Fig. 44), le précipité PII obtenu subit une deuxième DEAE (II) qui donne une première fraction non retenue (Fnr-II) et une seconde (F05-II), élue par NaCl 0,5M. Cette dernière est successivement chromatographiée sur Séphacryl S400 (75x2 cm) et S200 (115x2 cm) avant d'être analysée par ^{13}C -RMN (15,0 mg / 0,5 ml D_2O) et par méthylation. Par ailleurs, une chromatographie d'exclusion sur Biogel P2 20-40 mesh (129x2,7 cm ; 30 ml/h) sépare le surnageant SII en deux fractions F2-A et F2-B.

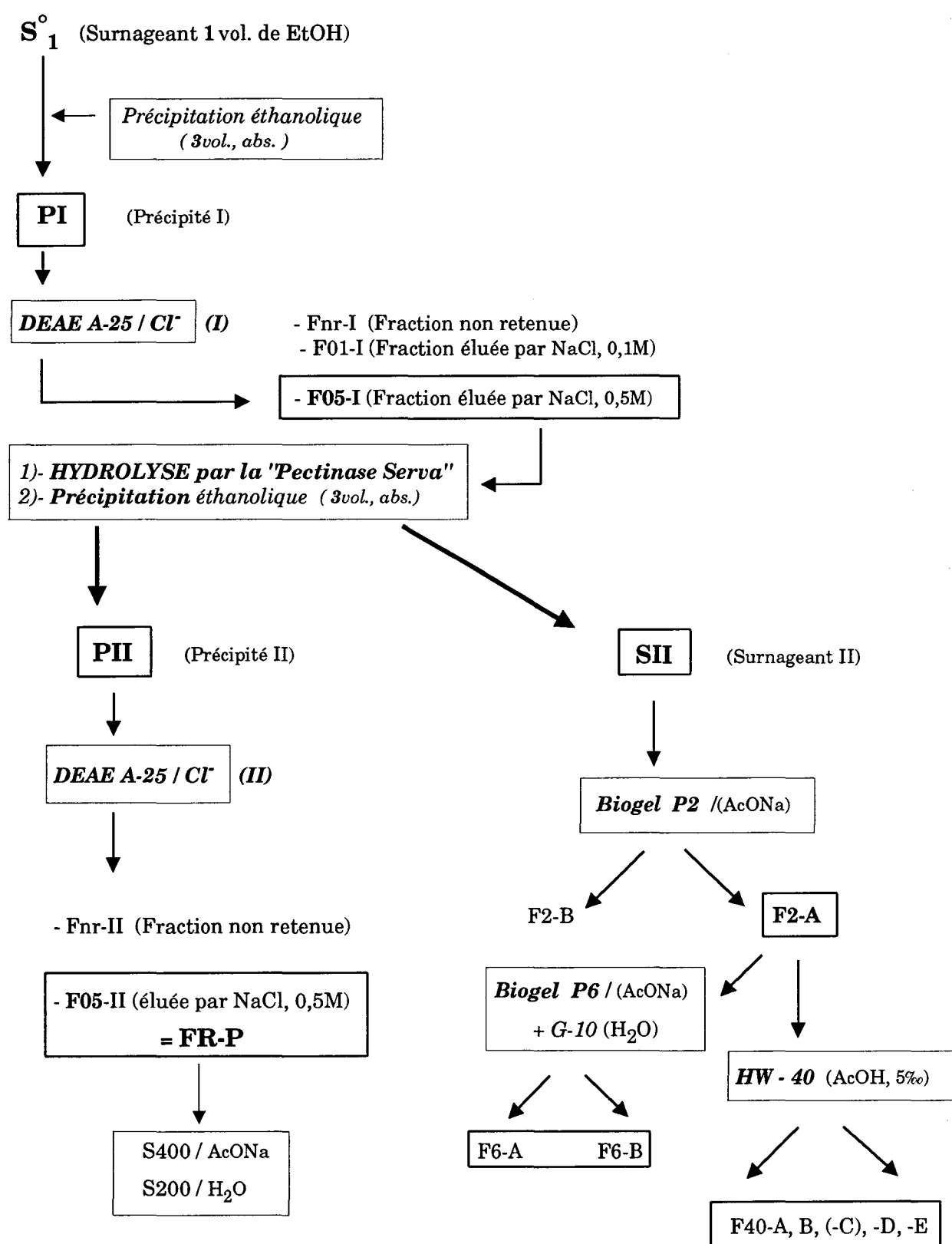


Figure 44 : Protocole d'étude des polysaccharides acides du surnageant S₁^o

Obtention de la fraction résistante à la "Pectinase" : FR-P

Seule la première est analysée parallèlement par chromatographie d'exclusion sur Biogel P6 (54x1,8 cm ; 8 ml/h) et par CLHP (HR16, 50x1,6 cm ; 0,5 ml/mn) sur Fractogel TSK HW-40S (Merck), associée à une détection au réfractomètre (Knauer). Les fractions, issues du Biogel P6, sont désalées sur Séphadex G-10 (52x1,8 cm ; 8 ml/h) pour obtenir les fractions F6-A et F6-B. Toutes les analyses chromatographiques à basse pression sont suivies par une détection spectrophotométrique à 206 nm et par dosage colorimétrique au phénol sulfurique.

3 - Composition

Seules les fractions résultant des dernières étapes de purification ont été analysées par CLG sous formes de dérivés peracétylés (AA) et/ou triméthylsilylés (TMS) selon les méthodes décrites précédemment (cf. Annexe 3 et chapitres I et II).

B.- Utilisation de l'endo- β (1,4)-xylanase "39" sur une fraction de xylanes

Le caractère particulier (intermédiaire) de la fraction S01-A issue du chapitre II permet l'étude des interactions structurales entre les xylanes et les polysaccharides pectiques. La réalisation de cet objectif a nécessité la vérification de l'homogénéité de S01-A et l'utilisation d'une enzyme pure et caractérisée, telle que l'endo- β (1,4)-xylanase de 39 KDa isolée du *Clostridium thermolacticum* (Debeire et al., 1990).

1 - Etude de l'homogénéité de la fraction S01-A

Des contrôles de l'homogénéité moléculaire sont effectués par différentes approches (Fig.45).

a)- Chromatographie

*- Exclusion stérique de masse (CESM) sur Biogel P2 (eau UHQ), sur Séphacryl S500 (eau UHQ) puis en série sur S200 avec divers tampons d'élution { AcONa 50 mM à pH: 4,5 et à pH:7,1 puis AcOH 1%}. Le fractionnement direct par l'eau UHQ sur la S200 fournit deux fractions, S200-I et S200-II, qui subiront l'étape suivante (LS-DEA) et dont la composition sera établie par l'analyse des dérivés peracétylés (AA) et triméthylsilylés (TMS).

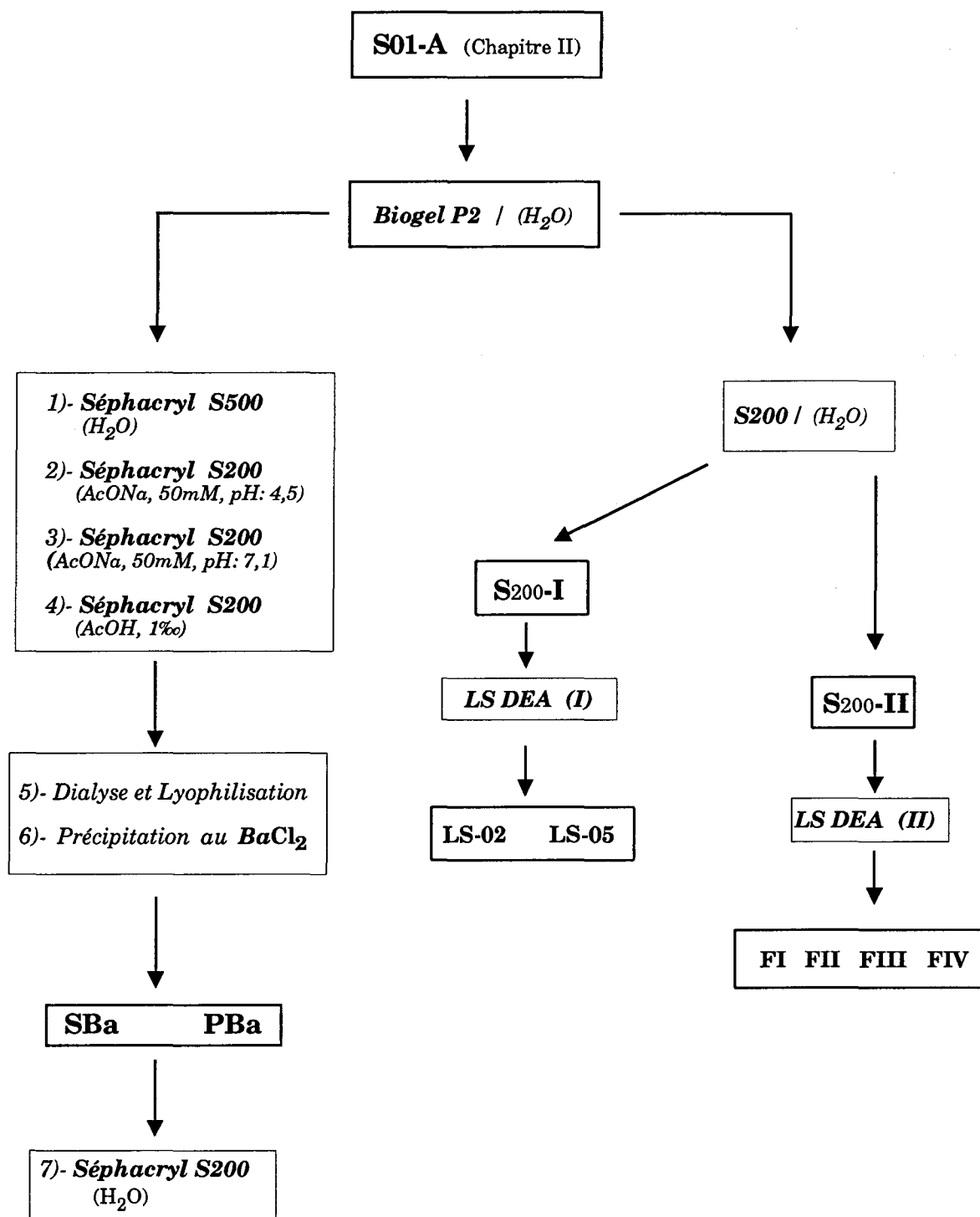


Figure 45 : Protocole de purification de la fraction S01-A

*- Echange d'anions sur Sphérosil LS DEA (IBF, France). La matrice du gel utilisé est à base de silice et légèrement hydrophobe, si bien qu'il faut l'hydrater progressivement par des solutions aqueuses d'éthanol de degrés décroissants avant de l'activer et de l'équilibrer dans le tampon aqueux. La colonne, de dimension 10x2 cm, est conditionnée dans le tampon AcONa de 50 mM à pH 6,6. Une partie de la fraction S200-I (6,2 mg) est éluée par un gradient continu de NaCl de 0 à 0,2 M, puis par des gradients discontinus de 0,5 M et 1 M. Parallèlement, 5,0 mg de S200-II sont analysés avec un gradient continu de NaCl de 0 à 0,15 M. Les profils d'élution sont enregistrés en UV à 206 nm et contrôlés par dosage colorimétrique (phénol sulfurique et m-HDP).

b)- Par précipitation au $BaCl_2$ (Taiz et Honigman, 1976)

8 ml d'une solution de $BaCl_2$ 0,34‰ sont ajoutés goutte à goutte à une solution de S01-A (20 mg/20 ml NaOH 1,25‰) jusqu'à l'apparition d'un trouble dans le mélange réactionnel. Celui-ci est laissé 30 mn à 4°C avant de le centrifuger. Le surnageant SBa est neutralisé à pH 6,5-7,0 avec de l'acide acétique glacial pendant que le précipité PBa est repris dans l'eau. Ces deux solutions sont précipitées à l'éthanol et les culots obtenus sont redissous dans l'eau distillée avant d'être chromatographiés sur un gel Sephacryl S200. Finalement, leur composition est analysée par triméthylsilylation et par peracétylation.

2)- Hydrolyse par l'endoxylanase "39"

Une part de S01-A (33 mg / 36 ml d'AcONa 50mM, pH 5,8) est traitée par 46,7 UI d'enzyme à 60°C pendant 6 h (Fig.46). L'arrêt de la réaction se fait à 100°C pendant 10 mn après addition de 1 ml d'EtOH absolu. La solution refroidie est ensuite précipitée par 3 vol. d'EtOH absolu et laissée à 4°C pendant une nuit. Une centrifugation permet de séparer un surnageant S3 et un précipité P3, lequel est chromatographié sur S200. La fraction principale qui en résulte, correspond à la fraction résistante (FR-X) à l'endoxylanase 39. Celle-ci est caractérisée par sa composition molaire en monosaccharides, puis par le type de substitution glycosidique (méthylation et dérivés AAPM) et par spectroscopie ^{13}C -RMN.

Quant au surnageant, il subit une séparation sur des résines Dowex 50x8 et 1x2 montées en série. On obtient alors une fraction non retenue (FN) et une autre (FH) éluée sur la Dowex 1x2 par une solution de formiate d'ammonium 0,5 M à pH 8. La première est analysée sur Biogel P2 par l'eau UHQ et la seconde sur le même gel équilibré avec AcOH, 5‰. Les fractions issues des

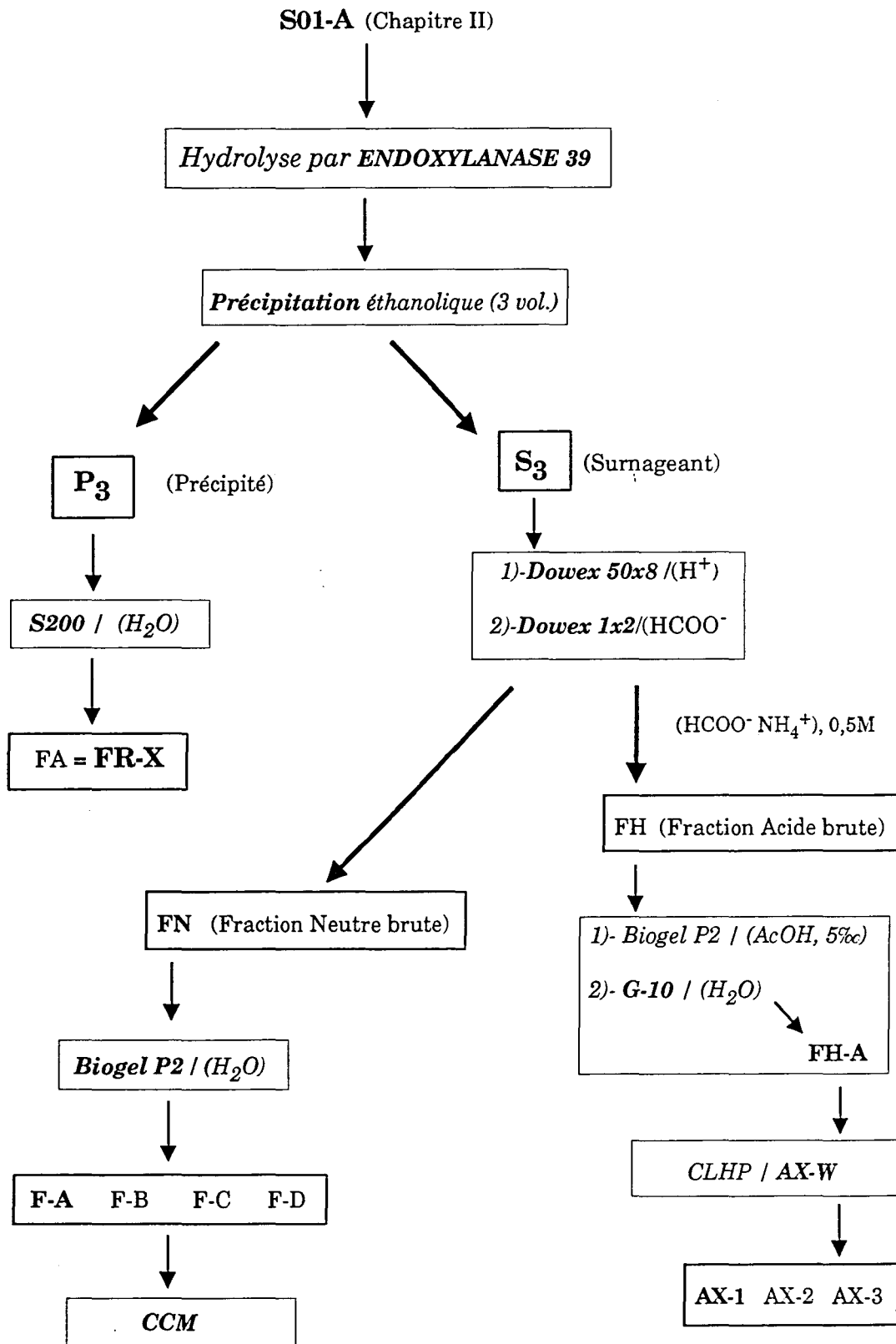


Figure 46 : Protocole d'étude de l'hydrolyse de la fraction S01-A.

- Obtention de la fraction résistante à l'Endoxylanase "39" : FR-X
- Mise en évidence des relations structurales entre les xylanes et les arabinogalactanes II

étapes de purification de FN et de FH sur Biogel P2 sont chromatographiées sur couche mince de silice 60, en présence de mélanges de témoins neutres (TN) et acides (TH) provenant de l'hydrolyse de xylane de bois de mélèze par cette enzyme. Le premier (TN) correspond aux oligoxyanes de DP 2 à 5 alors que le second (TH) renferme les isomères de pentaxylosides $[Xyl_4(4-O-Me-GlcA) = X_4AU]$ et de hexaxylosides $[Xyl_5(4-O-Me-GlcA) = X_5AU]$, selon les données fournies par Debeire et al. (1990). Pour pouvoir comparer convenablement les échantillons aux témoins, un coefficient de migration Rx, est défini par rapport au D-xylose.

La totalité de la fraction acide est ensuite chromatographiée sur Séphadex G-10/eauUHQ (52x1,8 cm). La fraction majeure exclue FH-A (Fig. 46) est analysée par CLHP sur une colonne d'échange d'anions AX-W (Merck), 10 μ m (250x4,5 mm). Le gradient binaire discontinu est réalisé avec de l'eau UHQ et une solution de phosphate monopotassique KH_2PO_4 100 mM à pH 4,5, comme suit : l'échantillon de FH-A (300 μ g / 100 μ l) est injecté dans la colonne équilibrée dans l'eau UHQ avec un débit de 1 ml/mn. Les tubes contenant 0,5 ml d'éluat sont collectés. La concentration de KH_2PO_4 est amenée progressivement à 10 mM pendant 15 mn. Cette concentration est maintenue pendant 5 mn puis est augmentée à 25 mM en 10 mn. Le tracé de la concentration de KH_2PO_4 est établi par la mesure de la conductivité de l'éluat tous les deux tubes à raison de 10 μ l par injection en CLHP dans une boucle de 10 μ l montée sur un injecteur Rhéodyne 7125 directement relié au conductimètre (Milton Roy). L'étalonnage est effectué par dilution en série de la solution de KH_2PO_4 100 mM. Chaque mesure est égale à la moyenne de trois injections par tube et par dilution. Les fractions obtenues sont dosées par les méthodes au phénol sulfurique et au m-HDP, avec du xylose et de l'acide glucuronique comme témoins. Les compositions des fractions finales sont déterminées par triméthylsilylation et/ou par peracétylation. La fraction FH-A issue du G-10 est analysée par méthylation. Les produits méthylés (FR-X et FH-A) sont hydrolysés en deux étapes, d'abord avec de l'acide formique $HCOOH$ 90 % pendant 1 h à 100 ° C puis par de l'ATFA 2 N pendant 2 h à 100 ° C, après évaporation à siccité. Finalement, FR-X est analysée en spectroscopie ^{13}C -RMN à une concentration de 8 mg/0,5 ml de D_2O .

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS

A-Action de la pectinases "Serva" sur une fraction de polysaccharides pectiques

La fraction F05-I possède la composition suivante : Rha(7,5), Ara(38,5), Xyl(8,7), Gal(43,3%mol.). L'objectif de cette étude est d'apprécier la résistance de cette fraction à la "Pectinase Serva" au moyen de la caractérisation des composés qui résultent de l'hydrolyse.

l'observation d'oligosaccharides, produits caractéristiques de chaque type d'activité enzymatique signifie, à priori, que F05-I est un mélange hétérogène de pectines, de xylanes et de β -4-galactanes. Ainsi, le polysaccharide restant, résistant à la "Pectinase Serva", sera considéré comme plus homogène.

La méthode décrite dans la figure 44 permet l'obtention de fractions représentatives de l'activité de la pectinase qui sont réparties en deux catégories:

*)- Les oligosaccharides contenus dans le surnageant SII, qui sont ensuite répartis dans les fractions F6-A, F6-B, F40-A, F40-B, ..., et F40-E (Fig. 44, 47 et 48).

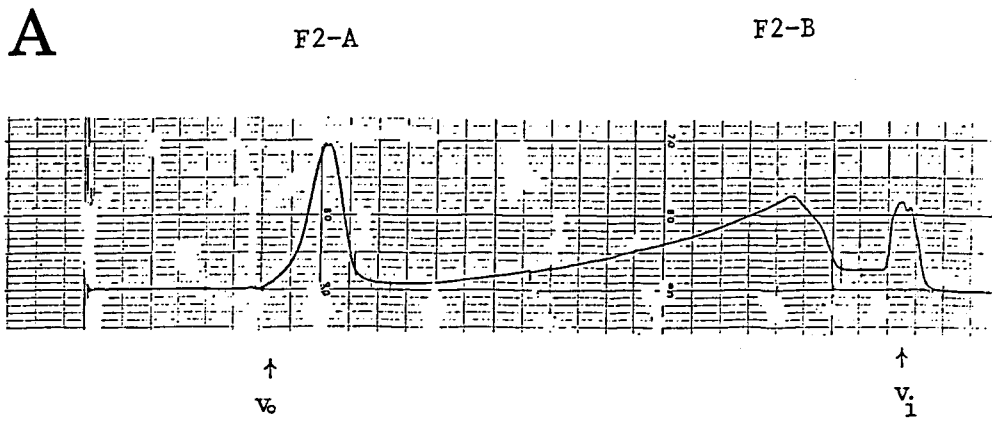
*)- Les polysaccharides qui sont dans le précipité PII correspondent principalement à la fraction F05-II (FR-P), Fnr-II ne représentant qu'une quantité négligeable (≤ 1 mg).

1)- Les oligosaccharides produits par la "Pectinase Serva"

L'étape préliminaire de leur caractérisation consiste à les séparer par leur différence de masse moléculaire en utilisant la CESM à basse Biogel (P2 et P6, voir Fig. 44 et 47) et à haute pression (CLHP/HW40, voir Fig. 44 et 48). Un passage du SII (5 mg) sur Biogel P2 donne deux fractions, F2-A (3,58 mg) et F2-B. La première pratiquement exclue présente une courbe d'élution symétrique tandis que l'élution de la seconde s'étale continuellement (Fig. 47A). Ainsi, à cause de l'homogénéité apparente et de la prépondérance de F2-A, celle-ci est analysée sur Biogel P6 (Fig. 47B) pour vérifier son homogénéité. La première fraction exclue (F6-A = 3,27 mg) est largement majoritaire par rapport à la seconde (F6-B, 0,31 mg). De même, la CLHP semi-préparative sur une colonne HW-40S (Fig. 48) de la fraction F2-A, révèle une grande hétérogénéité en masse moléculaire, séparant au moins cinq pics F40-A (0,34 mg), -B (0,67 mg), -C (?), -D (1,08 mg) et F40-E (0,6 mg). L'analyse de la composition de ces fractions (Tab. XXIII) montre qu'elles contiennent principalement des oligosaccharides d'arabinogalactane (F6-A, F40-A) et de 4-O-Méthyl-glucuronoxylane (F6-B ; F40-B, -D, et -E).

a)- Xylanes

L'acide 4-O-Méthyl-glucuronique est principalement présent dans les fractions riches en xylose, qu'elles soient issues du P6 ou du HW-40 (Tab. XXIII). Ceci démontre que les fractions F6-B, F40-B, -D et -C sont en majorité constituées d'oligosaccharides de 4-O-Me-glucuronoxylane. L'homogénéité de leur composition (xylose et 4-O-Me-GlcA) permet de calculer



B

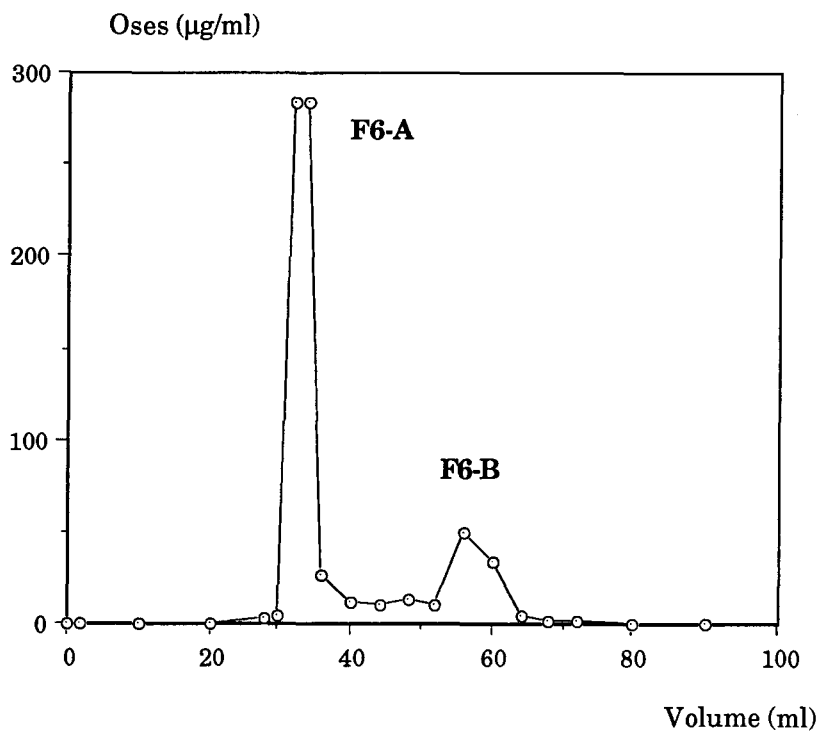


Figure 47 : Profils d'élution du contenu du surnageant SII issu de l'hydrolyse de la fraction pectique F05-I par la "Pectinase Serva"

A : sur Biogel P2 : F2-A et F2-B.

B : Analyse de la fraction F2-A sur Biogel P6 : F6-A et F6-B

Volume mort (V_0) et Volume interne (V_i), en ml

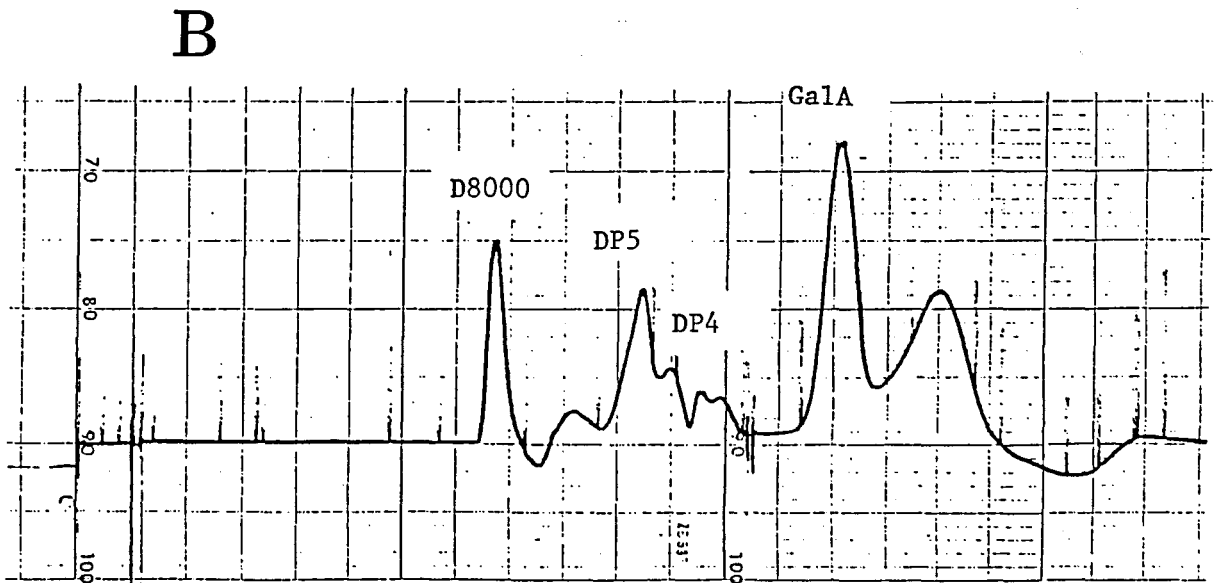
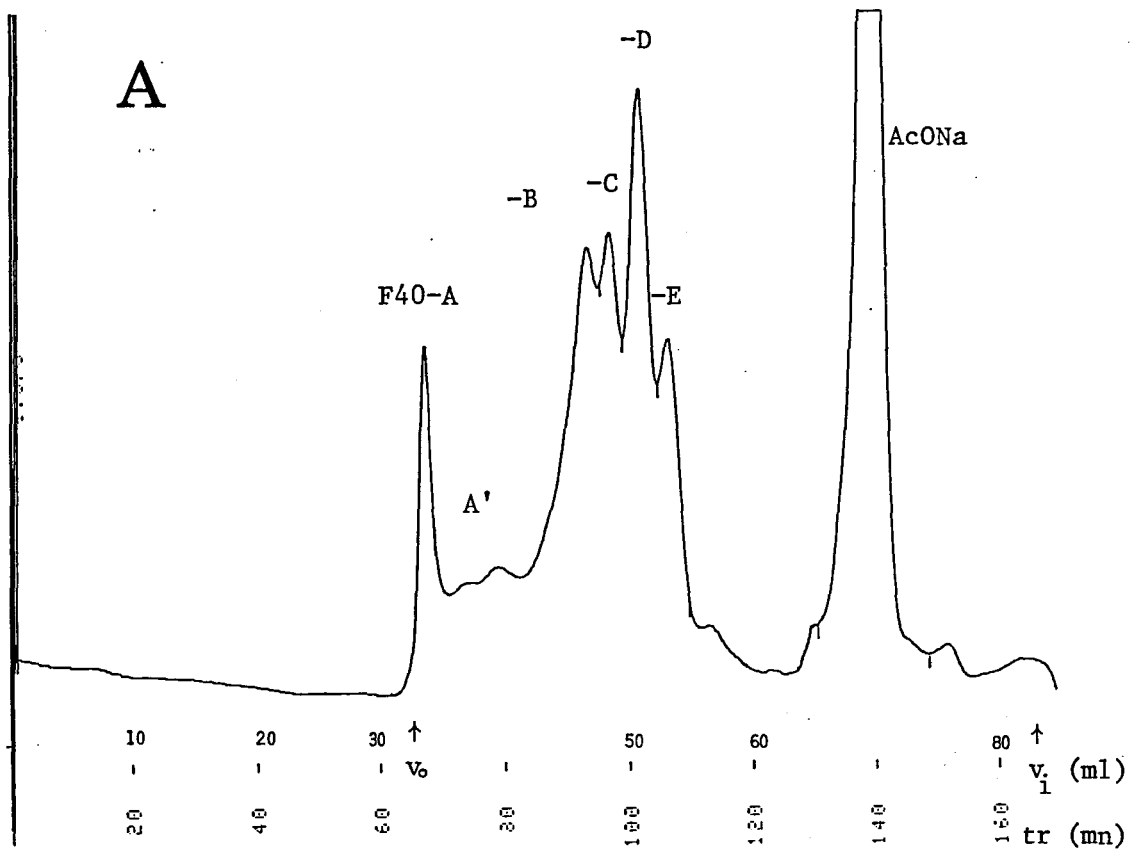


Figure 48 : Chromatographie (CESM) sur Fractogel HW-40S

A : de la fraction F2-A

B : Etalonnage avec du dextran sulphaté 8000 (D8000), des oligogalacturonides de DP5 et DP4 et GalA

Volume d'élution en ml et temps de rétention (tr) en min

Tableau XXIII : Composition en monosaccharides des fractions chromatographiques de SII et PII

FRACTIONS (%p)	Composition molaire ^a (%molaire)										DPa
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-OMeGlcA	
F6-A (26,2)	6,0	nd	34,4	1,6	3,0	2,7	37,3	2,4	10,4	2,2	-
F6-B (2,5)	2,6	0,7	5,1	50,0	6,8	11,3	6,0	nd	nd	17,2	3,9
b											
F40-A (2,7)	9,3	2,8	59,2	4,4	1,6	1,9	15,7	3,5	1,6	nd	-
F40-B (5,4)	nd	nd	nd	78,1	2,0	2,3	nd	nd	nd	17,6	5,4
F40-D (8,7)	0,6	nd	nd	73,7	0,3	1,2	0,5	1,9	tr	21,7	4,4
F40-E (4,8)	0,7	nd	nd	61,7	1,2	10,0	1,2	3,6	tr	21,5	3,9
FR-P (54,8)	8,4	nd	34,5	nd	0,8	2,9	47,8	nd	5,6	nd	-

(a) : Valeurs obtenues par CLG (AA et TMS) selon la méthode décrite en annexe 3 .

(b) : Analyse des dérivés TMS uniquement

(DPa) : Degré de polymérisation approximatif exprimé par le rapport [(Xyl+4-O-Me-GlcA) / 4-O-Me-GlcA]

(% p) : Pourcentage pondéral exprimé par rapport à la quantité de F05-I traitée

(nd) : non décelé

Tableau XXIV : Composition molaire des liaisons glycosidiques de la fraction FR-P

Types de liaisons	% molaire	Types de liaisons	% molaire
T-Rha _p -	3,0 (0,7)	4-Man _p -	0,8
T-Ara _f -	21,7 (5,3)	T-Gal _p -	4,1 (1,0)
3-Ara _f -	2,4 (0,6)	3-Gal _p -	6,0 (1,5)
5-Ara _f -	11,2 (2,7)	6-Gal _p -	5,3 (1,3)
		3, 6-Gal _p -	42,9 (10,5)

Les pourcentages molaires relatifs ont été calculés à partir des aires des pics corrigées par les facteurs de reponse établis par Sweet et al. (1975).

() : rapport molaire

un degré de polymérisation approximatif (DPa) exprimé par le rapport $[(\text{Xyl}+4\text{-O-Me-GlcA}) / 4\text{-O-Me-GlcA}]$. Il en découle que les DPa des fractions citées sont respectivement 3,9 (F6-B), 5,4 (F40-B), 4,4 (-D) et 3,9 (-C). Ces valeurs calculées sont en accord avec l'étalonnage de la colonne de HW-40S par des oligogalacturonides de DP5 et DP4 (Fig. 48B). La présence de l'acide galacturonique dans les deux dernières fractions indique que les oligosaccharides pectiques produits par la dégradation enzymatique correspondent à des oligogalacturonides de DP 3 à 4, d'après l'étalonnage.

Par ailleurs, le pourcentage non négligeable (10 %mol.) de glucose dans les fractions F6-B et F40-E serait dû à la présence d'oligoglucanes coélusés (cellulose et xyloglucane), dont le DPa serait au minimum de 4. Cependant, des oligosaccharides neutres présentant un tel degré de polymérisation devraient être retardés sur la colonne de P2 alors que les fractions étudiées en sont exclues. Il s'avère donc que leur DP réel est plus élevé. Un argument a été apporté lors de la purification des glycanes extracellulaires de la suspension cellulaire de silène, réalisée dans les mêmes conditions (Priem, 1990). En effet, le xylomannoside (DP7) et l'oligomannoside (DP6) sont respectivement élués à 50,1 et 52,3 ml. Les volumes d'élution respectifs des fractions F40-B, -C, -D et -E étant de 46,8 ml, 48,6 ml, 51 ml et 53,3 ml, le DP des oligosaccharides neutres contenus dans ces fractions est plus élevé que celui des oligosaccharides acides coélusés. Ainsi, les DP des oligoglucanes contenus dans les fractions F6-B et F40-E sont supérieurs ou égaux à 6 et 7. En outre, la différence entre les volumes d'élution des xylanes acides présents dans F40-D et -E qui ont pratiquement le même DPa (respectivement 4,4 et 3,9) n'est pas compréhensible. La seule explication serait que le xylose appartenant aux xyloglucosides soit pris en compte dans le calcul du DPa de la fraction F40-E.

Par conséquent, l'hypothèse de l'existence d'oligoxyloglucosides est fort probable car York et al. (1990), ont montré par une approche similaire, qu'ils ont des DP situés entre 3 et 10. Elle est corroborée par la correspondance du DPa (3,9) et des pourcentages du glucose entre les fractions F6-B (11,3 %mol.) et F40-E (10,0 %). Il s'avère donc que la "Pectinase Serva" renferme des glucanases de type Endo- β -(1,4)-glucosidases. Cette activité n'avait pas été détectée lors des essais préliminaires de caractérisation de l'enzyme commerciale (Annexe 4) faute d'avoir utilisé les substrats spécifiques tels que la cellulose et la xyloglucane (par exemple, la fraction Pnr du chapitre II).

Il en résulte que les fractions présentent des compositions voisines à l'exception de F40-E qui contient des oligosaccharides pectiques correspondant à l'excédent de pourcentage pondéral (2,3 %p), exprimé par rapport à la somme des fractions F6-A et F6-B (Tab. XXIII). Par ailleurs, le taux pondéral (14,1 %p) des fractions riches en xylanes acide, F40-B et -D, ne semblent pas

correspondre aux résultats obtenus sur Biogel P6 qui donnent la F6-A majoritaire à 26,2 %p. En effet, la distribution des polysaccharides est comparativement inversée sur les deux colonnes. L'explication probable serait que l'utilisation du HW-40S favorise une sous-estimation du contenu en arabinogalactane, faute de données complémentaires sur les compositions de la zone A' (Fig. 48A) et de la fraction F40-C. De plus, la présence de xyloles acide, marquée par le 4-O-Me-GlcA (2,2 %mol), dans la fraction F6-A est masquée par les arabinogalactanes. En définitif, les fractions riches en xylose contiennent principalement des oligosaccharides de 4-O-méthyl-glucuronoxylane de DP variable avec quelques oligosaccharides pectiques et de glucanes.

b)- Arabinogalactanes

La composition des fractions F6-A et F40-A (Tab. XXIII) atteste qu'elles contiennent principalement des arabinogalactanes. La comparaison des pourcentages pondéraux montre que la fraction F6-A majoritaire possède une composition proche de celle de la fraction minoritaire F40-A (2,7 %p). Il est donc concevable qu'une partie non quantifiée sur le HW-40S corresponde à A' et F40-C (Fig. 48A), conformément à une remarque formulée précédemment. De plus, la présence exclusive de l'acide glucuronique dans les fractions riches en arabinose et en galactose permet de supposer qu'il est impliqué dans la structure des arabinogalactanes. Ceci confirme la distribution hétérogène des masses moléculaires du contenu du surnageant SII, et en même temps, l'homogénéité ou la régularité des oligosaccharides, arabinogalactane et de 4-O-méthyl-glucuronoxylane.

En conclusion, l'étude de la composition du surnageant SII montre la diversité des tailles des oligosaccharides pectiques et hémicellulosiques (4-O-Méthyl-glucuronoxylane principalement) qui proviennent de l'hydrolyse de la fraction acide F05-I. De ce fait, celle-ci est un mélange constitué de polysaccharides en majorité pectiques et accessoirement hémicellulosiques. Le bilan chromatographique de SII montre une bonne concordance entre la quantité traitée (5 mg) et celle obtenue avec les Biogel P6 et P2 (F2-A: 3,6 mg et F2-B: 1,3 mg), compte tenu du fait que les fractions F6-A et F6-B proviennent de la F2-A.

2)- La fraction résistante à la "Pectinase Serva"(FR-P)

La fraction FR-P, est éluée respectivement à 1,6.Vo et à 1,1.Vo, au sortir des colonnes de S400 et S200. Du fait de l'allure gaussienne des courbes d'élution, la fraction peut être considérée comme homogène, voir pure.

a)- Composition

Sa composition riche en arabinose et en galactose la caractérise en tant qu'arabinogalactane. La présence de 5,6 %mol. d'acide glucuronique (Tab. XXIII) confirme la participation de celui-ci dans la structure des arabinogalactanes (voir SII, ci-avant) qui seraient alors de type gomme arabique (Stephen, 1983 ; Leon de Pinto, 1991). Par conséquent, puisque la gomme arabique et la plupart des glucuronoarabinogalactanes sont des produits de sécrétion (Stephen, 1983), les polysaccharides originels de FR-P pourraient aussi provenir du même processus de sécrétion, différent de celui d'une origine pariétale. La présence de protéines (9%) dans la même fraction s'accorde avec cette interprétation. Néanmoins, l'absence d'acide galacturonique dans cette fraction est très surprenante, ce qui permet difficilement de la qualifier d'origine pectique. La composition de cette fraction n'est pas sans rappeler celle de la fraction S03 (Cf. Tab. XIV, p. 115), ce qui semble normal dans la mesure où l'équivalent de S03 est logiquement inclus dans F05-I, comme indiqué précédemment.

La disposition des liaisons glycosidiques (Tab. XXIV) est cohérente avec la composition en monosaccharides (Tab. XXIII), caractérisée par la prépondérance des résidus arabinose (36,3 %) et galactose (58,3%). Le rhamnose semble, comparativement, avoir subi des pertes alors que l'augmentation du galactosyle de 10 % proviendrait du mode de calcul sans l'acide glucuronique ni le glucose. La nature des dérivés analysés montre autant de galactosyles liés en O-3, O-6 que de terminaux, et une forte substitution latérale des galactanes liées en O-3 et O-6 avec 42,9 % de dérivés 3, 6-Gal. Par ailleurs, la teneur élevée de l'arabinofuranose lié en O-5 caractérise les 5- α -arabinanes qui sont les plus répandues chez les dicotylédones (Darvill et al., 1980 ; Stephen, 1983). La proportion de 2:1 entre les arabinosyles terminaux et les précédents suppose que des arabinosyles (L-Ara $\rightarrow$) et des diarabinosides (Ara $\rightarrow$ 5-O-Ara $\rightarrow$) substituent en O-6 ou O-3 les β -galactanes. L'analyse ne permet pas de différencier les deux types de chaînes de galactanes. De même, l'équivalence des galactosyles liés en O-6 et de l'acide glucuronique correspondrait aux disaccharides (GlcA $\rightarrow$ 6Gal $\rightarrow$) qui substituent la 3- β -galactane en O-6 et/ou la 6- β -galactane en O-3. La présence des résidus 3-O-Ara- et T-Rha- serait en rapport avec les chaînes latérales (Rha $\rightarrow$ 4-GlcA $\rightarrow$ 6-Gal $\rightarrow$)3-Ara $\rightarrow$ liée en O-6 ou O-3 des β -galactanes II, rappelant les polysaccharides des exudats d'*Acacia* (Stephen, 1983).

En général, la composition de la fraction FR-P ressemble à celle des arabinogalactanes II rencontrées dans les milieux de suspensions cellulaires d'Erable (Aspinall et al., 1969 ; Keegstra et al., 1973 et Stevenson et al., 1986), de Tabac (Kato et al., 1977a) ainsi que dans les parois primaires des cellules cultivées in vitro (Keegstra et al., 1973 et Talmadge et al., 1973).

Toutefois, certaines différences existent entre les arabinogalactanes extracellulaires du silène (FR-P et S03, voir le chapitre II) et celles de l'érable, notamment au niveau de la teneur en arabinosyle et rhamnosyle terminaux. Elle est faible chez le silène puisque le rapport T-Ara-/5-Ara- est de 1 à 3 contre 4 à 5 chez l'érable (Aspinall et al., 1969 et Stevenson et al., 1986). Ces différences peuvent être attribuées à des activités glycosidiques. Même si l'activité arabinofuranosidase n'a pas été vérifiée dans la fraction F1 "Pectinase Serva", l'effet de celle-ci sur les précurseurs de FR-P est peu probable, puisque des fractions correspondantes (P03-B, voir chapitre II) contenant des arabinanes hydrolysables sont isolées. Ces arabinanes sont différentes de celle de FR-P puisqu'elles possèdent un rapport T-Ara-/5-Ara- égal à 3 et des dérivés 3-Ara (5,2 %) et 2,5-Ara (4,5). Par contre, la déglycosylation par des enzymes endogènes (*endo*- et *exo*-glycosidases) est probable, si la présence de celles-ci dans la suspension cellulaire est confirmée. En effet, l'existence de ces arabinosidases est évoquée au chapitre I suite à la mise en évidence des arabinosyles réducteurs marquant la présence des oligoarabinosides dans les surnageants S_1S_6 et $S_1P_6S_3$ (Tab. VI et VII, p.80-81) et aussi dans les précipités P_{1i} et $S_1P_6P_3$ (Tab. IV, p. 78). Comme dans le cas de l'arabinane de jus de pomme, Aspinall et Fanous (1984) expliquent ainsi la différence entre la teneur élevée (56 %) d'arabinosyles liés en O-3, 5 et terminaux contenus dans le fruit de pomme et celle obtenue (8%) dans le jus de pomme (Churms et al., 1983).

b)- Caractérisation par spectroscopie ^{13}C -RMN

La figure 49 montre un spectre dont les signaux sont en parfait accord avec la structure d'arabinogalactanes II. Une modification des paramètres de mesure est à l'origine du décalage négatif de - 0,7 ppm entre ce spectre et les précédents. Il en sera tenu compte pour l'interprétation. Les signaux des carbones anomériques (Tab.XXV) des résidus galactose à 103,52 ppm, 103,08 et à 102,52 caractérisent respectivement les liaisons en O-3, en O-6 et en O-3, 6 qui définissent les arabinogalactanes II. L'importance du signal à 102,52 ppm corrobore la prépondérance du galactosyle disubstitué en O-3 et en O-6 (42,9 %), analysé par méthylation (Tab. XXIV). De plus, les signaux du Gal-3 à 80,80 et à 80,07 ppm témoignent respectivement de la présence de la chaîne 3- β -galactane et de la chaîne 6- β -galactane substituées ou non par du galactosyle ou de l'arabinosyle, tandis que celui à 79,02 ppm signale la forte substitution en O-3 de la 6- β -galactane par des arabinosyles (Cartier et al., 1987). En outre, les arabinosyles présentent deux signaux anomériques distincts caractérisant les dérivés terminaux (109,16 ppm) et ceux liés en O-5.

FR-P

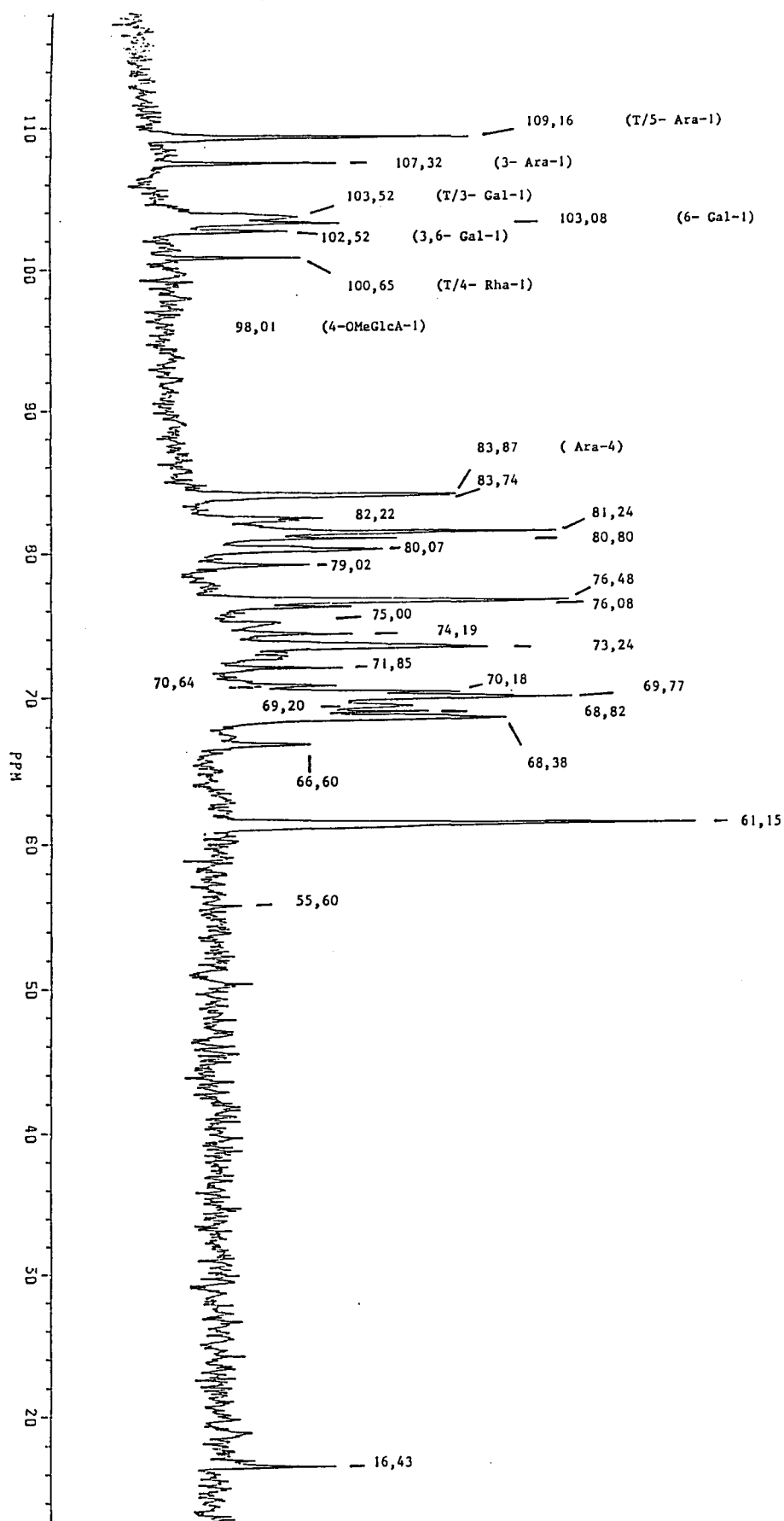


Figure 49 : Spectre ^{13}C -RMN de la fraction FR-P

Tableau XXV : Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction FR-P

<u>Composition en résidus liés</u>	Déplacement chimique δ (ppm)					
	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-4</u>	<u>C-5</u>	<u>C-6</u>
<i>L-Arabinosyle</i>						
α -Ara-	109,16	81,24	76,48	83,87-83,74	61,15	
5- α -Ara-	107,32	-"-	(-"-)	(-"-)	66,60	
3,5- α -Ara-	-"-		(79,02)	(82,22)	-"-	
<i>D-Galactosyle</i>						
β -Gal-	(103,52)	69,77	(73,24)	-	74,19 G ₃ 75,00 G ₆	61,15
3- β -Gal-	103,52	-"-	80,80	68,38	76,08	-"-
6- β -Gal-	103,08	-"-	80,07	-"-	73,24	69,20
3,6- β -Gal-	102,52	-"-	80,80 (GG ₃ /AG ₃) 79,02 (AG ₆)	-"-	73,24	69,20
<i>L-Rhamnosyle</i>						
α -Rha-	100,65	70,64	70,18	71,85	68,82	16,43

Les conditions d'analyse sont différentes des autres spectres : 13 mg / 0,6 ml D₂O, 23 °C, Temps d'acquisition : 0,36 s , 16 h, 60 000 mesures, 100,6 MHz

RGI : Relatif à la chaîne principale de la rhamnogalacturonane I

- (-"-): Signifie le report de la valeur située au-dessus

- GG₃: Gal→6(3 Galactane): Galactose lié en O-3 substitué par un galactosyle en O-6

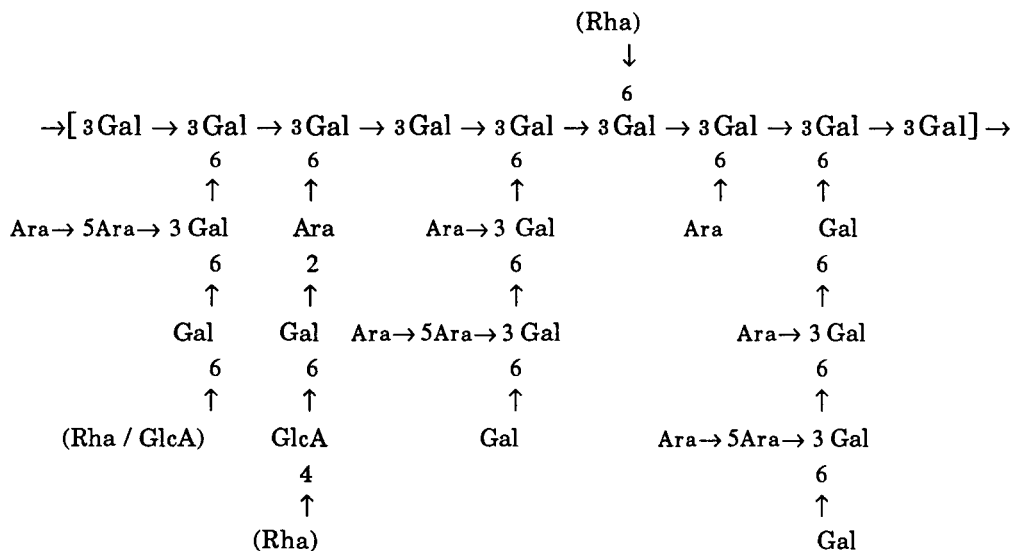
- AG₆: Gal→3(6 Galactane): Galactose lié en O-6 substitué par un arabinose en O-3

- AG₃: Gal→6(3 Galactane): Galactose lié en O-3 substitué par un arabinose en O-6

Le déplacement chimique à 107,32 ppm est relatif aux arabinosyles liés en O-3 et probablement à certains arabinosyles terminaux qui substituent les chaînes de galactane. Des résidus de rhamnose signalés par le couple de δ à 100,65 et 16,43 ppm, sont principalement en position terminale et confirment les données de la méthylation. Le signal à 61,15 ppm correspond au C-5 de l'arabinose terminal et du galactose terminal.

Par conséquent, le contenu glucidique de la fraction résistante à la "Pectinase Serva", FR-P, est bien de l'arabinogalactane II protéique comparables à celles trouvées dans les suspensions cellulaires d'érable (Aspinall et Molloy, 1969 et Stevenson et al., 1986). Il est important de noter la différence avec les arabinogalactanes de la fraction P03-B, étudiée dans le chapitre II (cf p.), qui sont exclusivement des arabino-3- β -galactanes pectiques. Il y a donc deux types d'arabinogalactanes parmi les exopolysaccharides de la suspension cellulaire de silène dont les arabino-3- β -galactanes pectiques (P03-B) qui seraient exceptionnelles, puisqu'elles n'ont jamais été signalées dans d'autres modèles végétaux (Cartier, 1986).

En conclusion, compte tenu de toutes ces données et celles de la méthylation (rapport molaire, Cf. Tab. XXIV, p. 165), le modèle structural de l'arabinogalactane II de la fraction FR-P devrait correspondre au motif suivant :



B.- Etude de la fraction xylanique (S01-A) : Mise en évidence de la relation structurale entre les polysaccharides pectiques et les xylandes

La fraction S01-A riche en xylandes (62,4 %), contient également une quantité non négligeable d'arabinogalactanes II (Cf. Chapitre II). La présence de ces deux polymères dans une même fraction justifie une étude approfondie pour savoir s'ils forment un mélange de deux

polysaccharides distincts ou un seul complexe macromoléculaire. Pour parvenir à cet objectif, une épreuve chromatographique supplémentaire est entreprise pour tenter de les séparer, ensuite la dégradation enzymatique des xylanes doit permettre l'obtention des arabinogalactanes.

1.- Purification de la fraction S01-A

a)- Par chromatographie CESM

L'étude de la fraction S01-A par CESM décrite dans la figure 45 montre qu'elle est difficile à séparer convenablement. L'analyse sur colonne S200 équilibrée dans l'eau a permis l'obtention de deux fractions S200-I et S200-II qui sont à peine séparées (Fig. 50A). Par contre, la série obtenue sur la même colonne, équilibrée par différents tampons, renseigne sur le comportement variable de la fraction en fonction du tampon d'élution utilisé, sans que la séparation soit équivalente à la précédente. En effet, avec l'acide acétique 1% les tracés d'élution en UV206 (1) et au m-HDP (1[•]) ont leur optimum respectif opposé (Fig. 50B) : les acides uroniques qui sont élués par 240 ml de tampon, sont retenus tandis que l'UV206 dont l'optimum est pratiquement à V_0 , indique que des molécules absorbant à 206 nm sont exclues. Il semble alors que S01-A contienne deux types de molécules qui ne sont pas bien séparés. De plus, la comparaison de la courbe (1) au tracé UV206 correspondant à l'élution avec le tampon AcONa 50 mM à pH 4,5 (2), présente une inversion de profil car l'optimum de (2) coïncide avec celui du m-HDP (1[•]) de l'acide acétique 1%. Enfin, le même tampon acétate de sodium à pH: 7,1 (3), donne une courbe d'élution uniforme dont l'optimum s'étale entre le V_0 et celui du m-HDP.

Par conséquent, la difficulté à fractionner convenablement S01-A et la présence de deux optima signifient, d'une part la présence d'au moins deux fractions (Fig. 50A), et d'autre part la présence d'un composé qui absorbe fortement à 206 nm à pH acide (1 et 2, Fig. 50B). L'optimum à pH acide varie en fonction de la nature du tampon ; ceci s'expliquerait par la présence de l'acide 4-O-Me-glucuronique qui se comporte différemment en présence de l'acide acétique et de l'acétate de sodium. Dans le premier cas (1), il serait sous forme acide (-COOH) et l'optimum est à V_0 , alors que dans le second (2), il serait ionisé en sel de sodium (-COONa) et l'optimum apparaît à 240 ml (Fig. 7B). Enfin, l'obtention des fractions S200-I et S200-II a permis l'analyse de leur composition molaire respective (Tab. XXVI). Globalement, deux fractions distinctes sont séparées, la première (S200-I), contient presque autant de xylose (38,0 % mol.) que de galactose (32,9%), sans compter l'arabinose à 16,7 %.

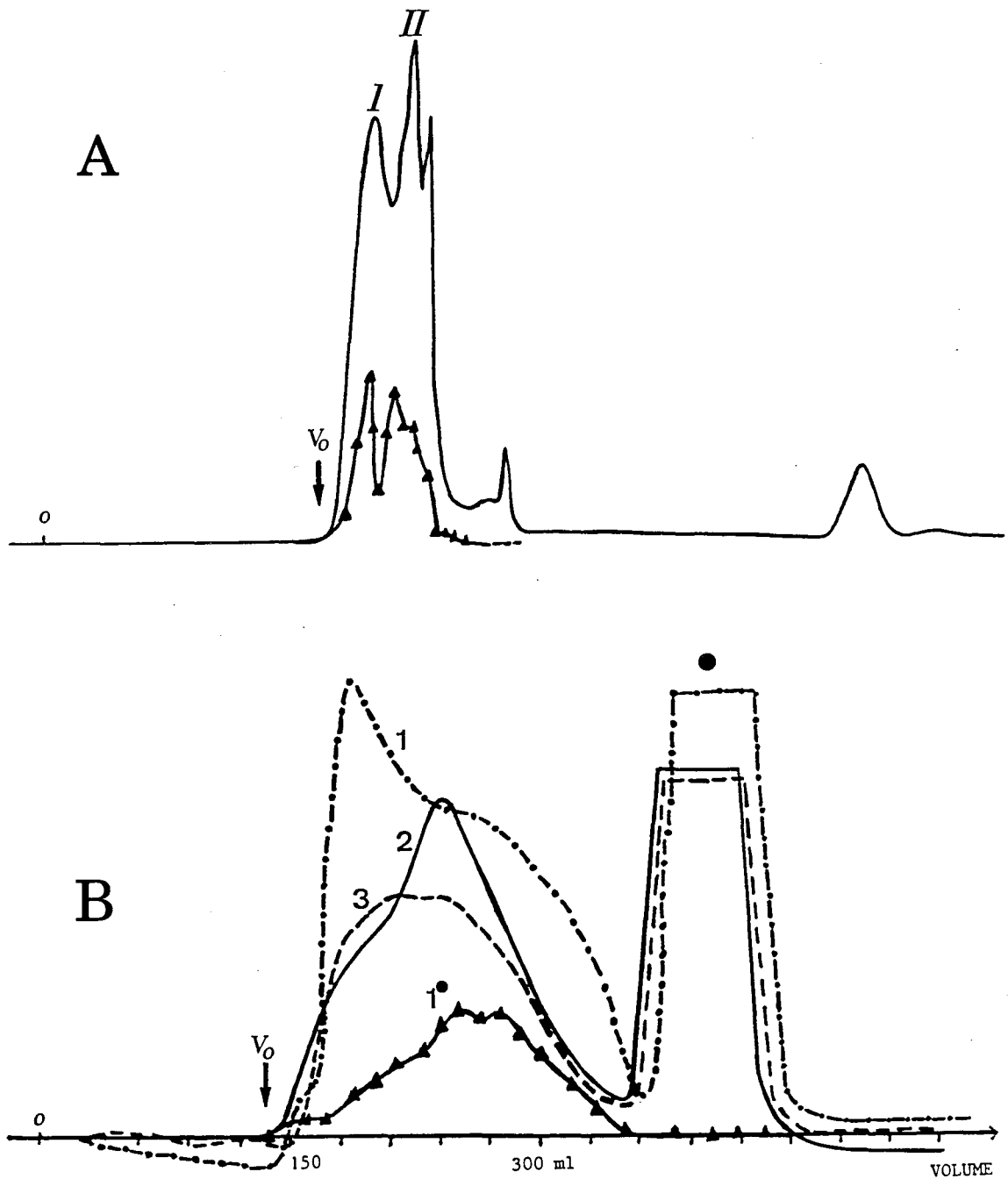


Figure 50 : Profils d'élution de la fraction S01-A sur Séphacryl S200 (130 x 2,0 cm) équilibrée avec différents tampons :

A : Elution avec de l'eau UHQ : (—), UV 206 nm ; (—▲—), m-HDP

B : Elution avec divers tampons :

*)- AcOH à 1%, en UV206 nm (1) et au m-HDP (1[•]) à 520 nm

*)- AcONa, 50mM à pH: 4,5 (2) ; et pH: 7,1 (3) ; (•): Sels

Les amplitudes sont en unités relatives de DO à 520 nm et d'Absorbance à 206 nm

Tableau XXVI : Composition en monosaccharides des fractions chromatographi-
ques issues de la S200, des LS DEA (I) et (II), lors de l'étude de la
fraction S01-A

FRACTIONS (%p)	Composition molaire ^a (%molaire)									
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-OMeGlcA
S200-I (50,0)	1,7	nd	16,7	38,0	1,3	1,4	32,9	nd	2,7	5,3
S200-II (50,0)	1,1	tr	4,1	74,2	2,6	2,0	7,6	nd	1,2	7,2
LS DEA (I) (b)										
LS-02 (59,7)	2,5	nd	16,5	34,4	0,8	3,2	34,8	nd	2,4	5,4
LS-05 (19,3)	2,0	nd	14,7	25,9	6,3	20,5	22,0	5,6	3,0	nd
LS DEA (II) (b)										
FI (34,0)	0,3	nd	3,1	75,9	3,4	5,0	6,6	nd	tr	5,3
FII (22,0)	0,3	nd	0,8	74,8	nd	2,1	8,0	nd	nd	14,2
FIII (14,0)	nd	nd	2,5	79,7	0,7	3,6	7,2	nd	tr	6,3
FIV (12,0)	0,6	nd	2,5	80,0	0,5	1,2	5,9	nd	0,8	8,5

Tableau XXVII : Composition en monosaccharides du surnageant SBa et du
précipité PBa, obtenus par précipitation au BaCl₂ de S01-A

FRACTIONS (%p)	Composition molaire ^a (%molaire)									
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-OMeGlcA
S01-A	1,1	0,2	11,3	62,4	2,1	1,9	14,6	nd	1,6	4,8
SBa (36,0)	1,2	0,6	11,3	54,1	1,5	2,1	22,0	nd	2,4	4,8
PBa (20,0)	0,5	nd	4,8	68,2	3,8	3,0	10,3	nd	1,9	7,3

(a) : Valeurs obtenues par CLG (AA et TMS) selon la méthode décrite en annexe 3 .

(b) : Analyse des dérivés TMS uniquement

(% p) : Pourcentage pondéral exprimé par rapport à la quantité de la fraction traitée

(nd) : non décelé

Il semble que cette fraction soit un mélange équimolaire de xylanes et d'arabinogalactanes II, si on admet qu'il puisse exister de l'arabinoxylane parmi ces xylanes. Par contre, la seconde est principalement une fraction de xylanes pures à 82 % en tenant compte des acides glucuroniques et 4-O-Me-glucuronique. Quelques traces de polymères différents sont pourtant signalées, comme celle des arabinogalactanes. Ce qui n'est pas étonnant au vue du profil d'élution (figure 50A) qui montre que la chromatographie n'est pas bien résolue. La fraction S01-A est donc composée de complexes "xylanes-arabinogalactanes" (S200-I) et de 4-O-Me-glucuronoxylanes (S200-II) en proportion pondérale égale (50 %p.).

b)- Par précipitation au BaCl₂

La difficulté d'obtenir une bonne séparation des contenus de S01-A et la nécessité d'isoler distinctement les xylanes et les arabinogalactanes II, ont conduit à l'utilisation de la méthode de précipitation des polysaccharides sans xylane par le chlorure de barium en présence de soude (Taiz et Honigman, 1976). La fraction de S01-A qui a subi la série chromatographique sur S200, a servi à cette étude (Fig. 45). Celle-ci fournit le surnageant SBa et le précipité PBa dont les compositions respectives (Tab. XXVII) reflètent celles de S200-I et S200-II, tout en étant proche de celle de la fraction de départ, S01-A. Par ailleurs, la nature du précipité est plutôt une xylane contrairement au résultat attendu qui aurait dû donner des polysaccharides autres que des xylanes, comme les arabinogalactanes dans ce cas-ci. De plus, des pertes importantes d'environ 44%p sont constatées puisque les rendements en poids de SBa et PBa sont respectivement de 36 % et 20 %. La précipitation en milieu fortement alcalin et celle à l'éthanol ont probablement contribué à rendre non précipitable à l'alcool certains polysaccharides, par β -élimination ou désestérification. Toutefois, ces pertes n'ont pas entraîné de changement dans les compositions des fractions SBa et PBa ; elles contiennent toujours des xylanes et des arabinogalactanes (Tab. XXVII). Par conséquent, la purification des xylanes par précipitation au BaCl₂ des autres polysaccharides contaminants n'a pas permis la séparation des xylanes et des arabinogalactanes.

c)- Par chromatographie d'échange d'anions au Sphérosil LS DEA

Le fractionnement de S200-I et de S200-II donne respectivement les résultats suivants :

La première fournit deux fractions principales dont l'une (LS-02) correspond à celle éluee par le gradient continu [0 à 0,2 M], et l'autre (LS-05) est obtenue par NaCl 0,5 M.

Le pourcentage en masse montre une prépondérance de LS-02 à 59,7 %p, avec un rendement de 79,0 %. Il y a eu donc des pertes, probablement dues à l'étalement de certains polysaccharides au cours de l'élution, ce qui expliquerait qu'ils n'aient pas été pris en compte dans les mesures. Leur composition respective (Tab. XXVI) montre qu'elles contiennent autant de xylose que de galactose (34,4 % de Xyl et 34,8 % de Gal, pour l'une, et pour l'autre, 25,9 % et 22,0 %), elles sont proches de celle de S200-I. La détection de glucose (20 %) et d'acide galacturonique (5,6 %) dans LS-05 s'explique par la concentration dans cette fraction, de polysaccharides comportant ces monosaccharides. Il peut s'agir de glucanes (xyloglucanes) et de pectines. Il est également possible qu'une partie du glucose provienne de la dégradation de la matrice constituée de Séphadex. En outre, le 4-O-Me-GlcA est absent dans LS-05. Par conséquent, la particularité de LS-05 et la ressemblance chimique avec LS-02 et S200-I renforce le caractère original de cette dernière qui se confirme comme une fraction complexe de xylane et d'arabinogalactane associées.

Quant à la seconde, S200-II, sa séparation par chromatographie donne des tracés spectrophotométriques (DO480 et DO520) dont les optima situés au début, coïncident aux fractions FI et FII (Fig. 51). Les fractions sont principalement délimitées en fonction du tracé DO480, si bien que l'optimum du profil DO520 est à cheval sur ces deux fractions qui sont pas ou très légèrement retenues. L'élution par le gradient décroît progressivement signifiant une distribution éparse des polysaccharides retenus. En tout, quatre fractions sont isolées, FI, FII, FIII et FIV. Leur composition respective (Tab. XXVII) montre un taux important de xylose (74,8 à 80,0 %mol.) équivalent à celle de la fraction de départ S200-II (74,2 %). Ceci indique la bonne homogénéité moléculaire de cette fraction. Contrairement aux fractions de S200-I, celles provenant de S200-II ne renferment pas d'acide glucuronique. Dans les fractions FI, FII, FIII et FIV, la présence exclusive du 4-O-Me-GlcA corrélativement à l'enrichissement en xylose est interprétée comme une contribution de cet acide uronique dans la structure des xylanes. De plus, le pourcentage molaire de cet ose évolue proportionnellement avec celui du xylose dans les autres fractionnements. C'est le cas de PBa, de S200-I et de LS-02. Par conséquent, l'acide 4-O-Méthyl-glucuronique constitue principalement les xylanes acides.

En conclusion de cette étude de purification de la fraction S01-A, celle-ci est constituée au moins de deux types de xylanes, l'une moins acide que l'autre reste éluée avec les arabinogalactanes. Aussi, pour tenter de déterminer la nature de ce mélange, une enzyme spécifique et pure, l'endo- β (1,4)-xylanase de 39 Kd (Debeire et al., 1990) est utilisée.

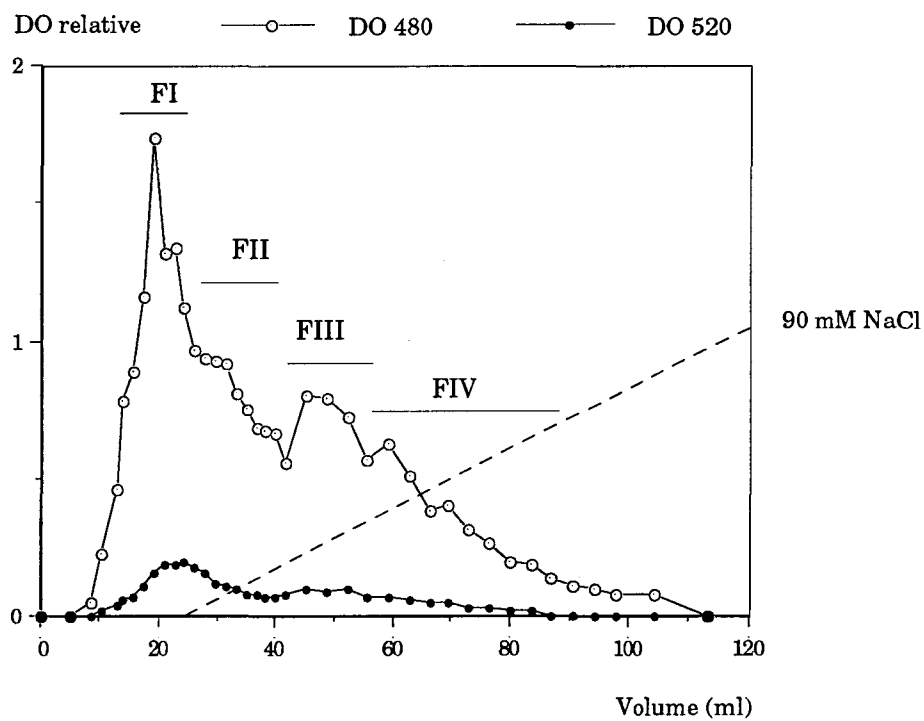


Figure 51 : Profil d'élution de la fraction S200-II sur Sphérosil *LS DEA (II)*

Gradient continu de NaCl [0 à 150 mM] (---) dans tampon AcONa 25 mM, pH: 6,6

DO 480 : Dosage au phénol sulfurique ; DO520 : Dosage au m-HDP

2.- Action de l'endo-xy lanase sur la fraction S01-A

Le protocole décrit dans la figure 46 a permis d'obtenir plusieurs fractions issues de l'hydrolysât du substrat traité, S01-A. L'importance relative de chacune d'elles est représentée par son pourcentage pondéral par rapport à S01-A (Tab. XXVIII et XXIX). Elles sont réparties en trois groupes, le précipité P_3 (46,0 %) qui représente la fraction résistante ou résiduelle (Tab. XXVIII), donne FR-X (41,3 %) sur S200. Les deux autres fractions, neutre (FN = 11,7 %) et acide (FH = 36,7 %) proviennent du surnageant S_3 (54,0 %). Leur analyse respective fournit des fractions caractéristiques de l'activité enzymatique sur le substrat S01-A.

L'analyse de la composition molaire (Tab. XXVIII) des fractions P_3 et S_3 montre la prépondérance du xylose, dans le surnageant, alors que le précipité renferme autant d'arabinose et de galactose que de xylose. De plus, les taux des acides 4-O-méthyl-glucuronique et glucuronique ont une répartition inverse dans le surnageant et le précipité : la teneur en 4-O-méthyl-glucuronique est plus élevée dans le premier que dans le second et inversement pour ce qui concerne la teneur en acide glucuronique. Par ailleurs, les teneurs de l'arabinose et du galactose sont très faible dans le surnageant alors que celles du mannose et du glucose, de 10 % en moyenne, restent significatives. Ces deux derniers peuvent correspondre à la présence de mannanes ou de glucanes résiduelles ou associées.

a) - Etude de la fraction acide FH

La fraction acide FH est chromatographiée sur Biogel P2; le suivi de l'élution par CCM des principales fractions (Fig. 52A) montre la nature oligosaccharide de FH. La migration en présence de témoins acides définis TH (=X₄AU et X₅AU) montre que les deux taches supérieures des tubes T28 à T34 ont les mêmes coefficients de migration relatifs que des témoins définis, ce qui démontre la présence d'un seul résidu de 4-OMe-GlcA par oligosaccharide de la fraction AX-1. Les compositions molaires de FH-A et de AX-1 (Tab. XXIX) sont dominées par du xylose, respectivement de 87,6 % et 83,2 %. La première fraction contient encore des traces de glucose, de galactose et d'arabinose avec seulement 2,4 % de 4-OMe-GlcA, alors que la seconde, AX-1, ne renferme que du xylose et du 4-OMe-GlcA (16,8 %). L'estimation du DP de cette fraction par rapport à l'acide uronique donne un DP de 5,9 d'après le pourcentage molaire alors que le DP n' est que de 5,1 s'il est exprimé par rapport aux masses. Ainsi, le degré de polymérisation de ces oligoxylosides est bien compris entre 5 et 6. La composition des dérivés méthylés AAPM (Tab. XXX) de la fraction FH-A est principalement marquée par du xylose lié en O-4 (75 %) et du xylose

Tableau XXVIII : Composition en monosaccharides du surnageant S3, du précipité P3 et de FR-X obtenus par hydrolyse enzymatique de S01-A

<u>FRACTIONS</u> (%p)	Composition molaire ^a (% molaire)									
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-OMeGlcA
S01-A	1,1	0,2	11,3	62,4	2,1	1,9	14,6	nd	1,6	4,8
S3 (54,0)	nd	nd	2,9	81,2	0,7	3,4	3,3	nd	1,2	7,3
P3 (46,0)	0,9	0,4	21,5	24,0	10,8	9,9	26,7	nd	2,2	3,6
FR-X (41,3) (OR)	2,0	nd	26,0	12,0 0,5	2,2	1,2	51,6	nd	3,5	1,0

Tableau XXIX : Composition en monosaccharides des fractions d'oligosaccharides neutres (FN et FN-A) et acides (FH-A et AX-1)

<u>FRACTIONS</u> (%p)	Composition molaire ^a (% molaire)									
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-OMeGlcA
FN (11,7)	nd	nd	9,8	83,8	1,3	2,7	2,4	nd	nd	nd
F-A (4,9)	nd	nd	5,1	72,3	5,7	5,8	11,1	nd	nd	nd
(b)										
FH-A (23,4)	nd	nd	1,2	87,6	1,4	4,5	2,9	nd	nd	2,4
AX-1 (14,8)	nd	nd	nd	83,2	nd	nd	nd	nd	nd	16,8

(a) : Valeurs obtenues par CLG (AA et TMS) selon la méthode décrite en annexe 3 .

(b) : Analyse des dérivés TMS uniquement

(% p) : Pourcentage pondéral exprimé par rapport à la quantité de la fraction S01-A traitée

(nd) : non décelé

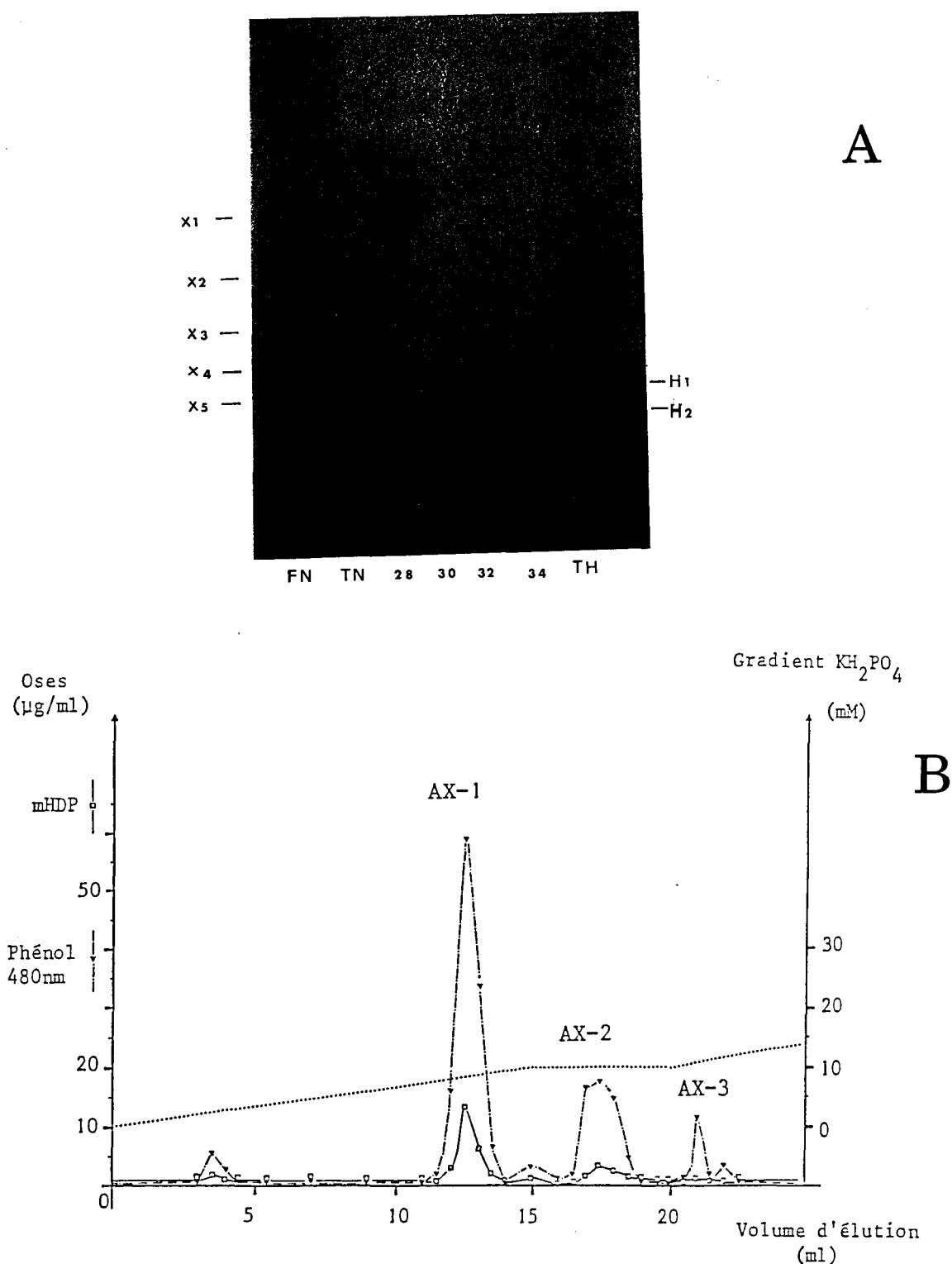


Figure 52 : Chromatogrammes des fractions d'oligosaccharides acides (FH et FH-A) issues de l'hydrolyse de S01-A

A : CCM des tubes d'élution sur Biogel P2 de FH (T28, 30, 32 et T34) et de FN, en présence de mélanges de témoins acides (TH) et neutres (TN) et de D-Xylose (X1).

B : CLHP sur colonne AX-W de la fraction FH-A : AX-1, AX-2 et AX-3 sont les fractions obtenues par gradient discontinu de KH_2PO_4 : De 0 à 10 mM en 15 mn, maintenu à 10 mM pendant 5 mn, puis à 25 mM en 10 mn

TN = X-2345, série de xylosides de DP 2 à 5 (X2, X3, X4, X5)

TH= H1 : $\text{Xyl}_4(4\text{-O-Me-GlcA})$ et H2 : $\text{Xyl}_5(4\text{-O-Me-GlcA})$, des pentaxylosides et hexaxylosides

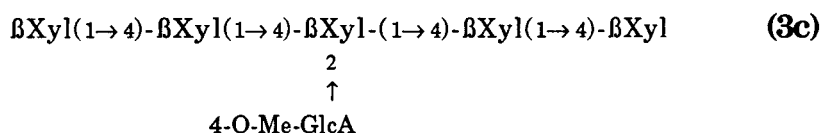
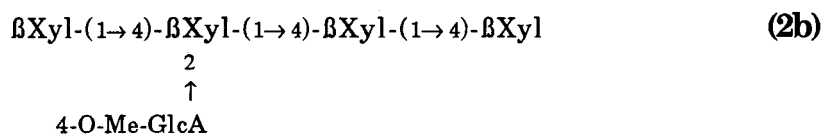
Tableau XXX : Composition centésimale des dérivés acétates d'alditol partiellement méthylés (AAPM) des fractions FR-X et FH-A

Position des groupes O-Me	Nature des liaisons	Fractions (% molaire relatif)*	
		FR-X	FH-A
2,3,4-Rha	1- ou T-Rha	1,0	0,4
3,4-Rhap	1, 2-	trace	-
3-Rhap	1, 2, 4-	0,1	-
2,3,5-Araf	1- ou T-Araf	5,7	-
3,5- Araf	1, 2-	0,3	-
2,5-Araf	1, 3-	0,5	-
2, 3-Ara	1,4- ou 5-	12,6	-
2-Ara	1,3,4- ou 5-	0,2	-
2,3,4-Arap	1- ou T-Arap	-	-
2, 4-Arap	1, 3-	-	-
2,3,4-Xylp	1- ou T-Xylp	1,7	4,3
2,3-Xyl	1,4- ou 5-	10,2	75,0
3,4-Xylp	1, 2-	-	-
2-Xyl	1,3,4- ou 5-	0,3	3,3
3-Xyl	1,2,4- ou 5-	5,0	14,0
2,3,4,6-Manp	1- ou T-Manp	0,2	-
2,3,6-Man	1,4- ou 5-	3,1	-
2,3,4-Manp	1, 6-	-	-
2,3-Man	1, 4 ou 5, 6-	1,8	-
3,6-Man	1, 2, 4- ou 5-	0,6	-
2,3,4,6-Glcp	1- ou T-Glcp	-	-
2,3,6-Glc	1, 4- ou 5-	2,6	1,0
2,3,4-Glcp	1, 6-	-	-
2,3-Glc	1, 4 ou 5, 6-	0,5	-
2,3,5,6-Galf	1- ou T-Galf	trace	-
2,3,4,6-Galp	1- ou T-Galp	10,6	0,7
2,4,6-Galp	1,3-	9,0	0,4
2,3,4-Galp	1,6-	10,3	0,5
2,4-Galp	1, 3, 6-	23,9	0,4
2,6-Gal	1, 3, 4- ou 5-	0,4	-
Particularités			
2-Gal	3,4,6-	+	
3-Gal	2,4,6-	++	
Glc	2,3,6,4/5-Glc	+	
Gal	2,3,6,4/5-Gal	++	

(*) Les pourcentages molaires relatifs ont été calculés à partir des aires des pics corrigées par les facteurs de réponse établis par Sweet et al. (1975).

substitué en O-4 et O-2 (14 %), ce qui concorde avec les structures citées au-dessus. Une estimation du DP des oligoxylosides acides à partir du rapport 4-Xyl: 2,4-Xyl, donne un DP 5, ce qui corrobore les résultats précédents.

Par conséquent, en se référant aux données de Debeire et al. (1990), ces oligoxylosides acides de DP 5-6 correspondent principalement aux oligosaccharides 2b et 3c suivants:

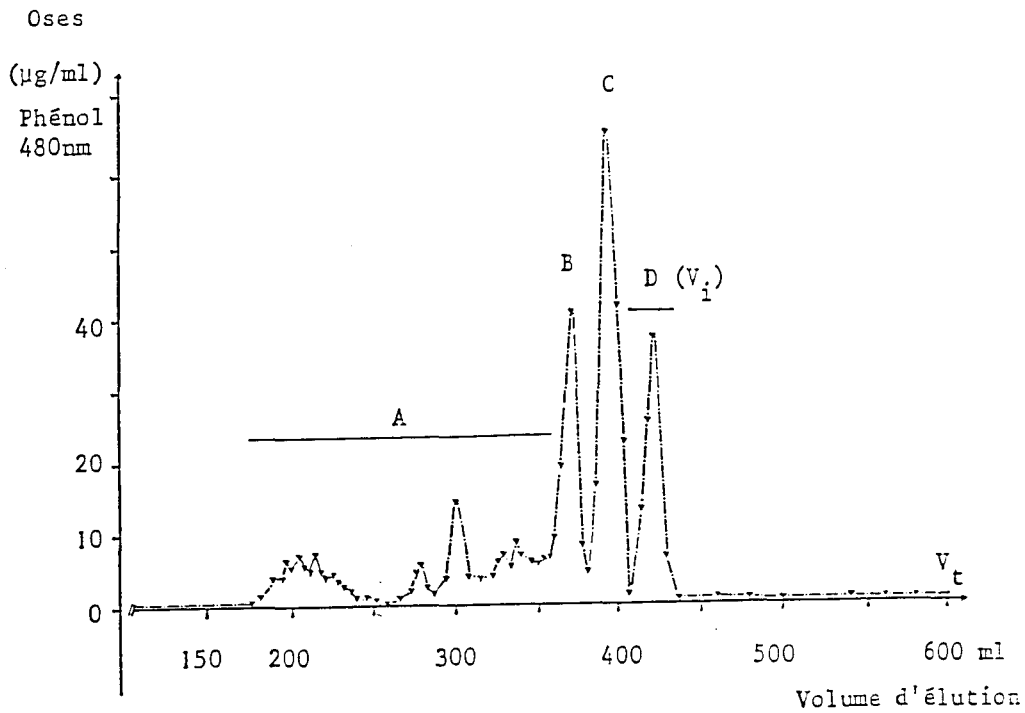


Enfin, les fractions AX-2 et AX-3 (Fig. 52B) sont décelées en faible quantité et possèdent les mêmes volumes d'élution que leurs témoins qui portent respectivement deux ou trois acides uroniques, en particulier le 4-O-méthyl-glucuronique.

b) - Etude de la fraction neutre FN

Cette fraction est composée principalement de xylose à 83,8 %, d'arabinose à 9,8 %, et secondairement de plusieurs hexoses (Tab. VII). Son analyse par CESM sur Biogel P2 (Fig. 53 A) fournit quatre fractions dont F-A, F-B, F-C et F-D, qui représentent respectivement 4,9 %, 2,6 %, 3,4 % et 0,8 % du substrat S01-A. De plus, la chromatographie ascendante sur couche mince (Fig. 53 B) de ces fractions, en présence de témoins définis de DP 2 à 5, permet de déterminer qu'elles sont effectivement constituées du xylose et de ses oligoxylosides. La fraction F-A est un mélange d'oligosaccharides "lourds" tandis que F-B, ayant le même coefficient de migration que X3, est un xylotriose. De même, F-C qui migre à la même distance que X2, est un xylobiose. Enfin, la fraction D contient en majorité du xylose et un second composé. Celui-ci est inconnu puisqu'il ne migre pas comme les autres monosaccharides classiques (Fru, Ara, Rha, Glc, Gal, GalA) utilisés comme témoins. Du fait de la faible quantité de la fraction D, la détermination de ce composé n'a pu être poursuivie et la spécificité de l'activité endoxylanase est confirmée.

Enfin, la composition de F-A, montre l'augmentation des pourcentages molaires des



A



B

Figure 53 : Chromatogrammes des fractions neutres issues de l'hydrolyse de S01-A

A : Analyse de la fraction neutre FN sur colonne Biogel P2 (130x2,7 cm) élué à l'eau UHQ : F-A, F-B, F-C et F-D sont les fractions obtenues

Vi : Volume interne du gel contenu dans la colonne correspondant au volume d'élution de petites molécules. Vt : Volume total du gel

B : CCM des fractions de FN issues du Biogel P2, F-A, F-B, F-C et F-D, en présence de mélanges de témoins neutres (TN), de xylose et d'acide glucuronique[▲].

TN = X-2345, série de xylosides de DP 2 à 5 (X2, X3, X4, X5)

autres monosaccharides, particulièrement le galactose. La présence de ce dernier aussi bien dans le précipité P_3 que dans le surnageant de l'hydrolysate, suppose l'existence d'un lien structural avec les xylanes. Il peut s'agir de molécules d'arabinogalactanes liées aux xylanes. Enfin, le rapport entre le mannose et le glucose ($Glc/Man = 1,0$) dans la composition de P_3 est identique à celui observé dans la fraction F-A. Par conséquent, il est probable que des mannanes, des glucanes ou des glucomannanes soient liées à ces xylanes.

c) - Etude du précipité P_3

α) - Analyse de l'action de l'enzyme

P_3 est analysé sur une colonne de Séphacryl S200 équilibrée dans l'eau pour pouvoir le comparer aux fractions S200-I et S200-II du substrat S01-A. Ces dernières sont respectivement éluées à 157 ml et à 181 ml, pour un volume mort (V_0) de 150 ml. Le volume d'élution (163 ml) de la fraction FR-X obtenue est située entre ceux des fractions S200-I et S200-II. Ceci signifie que ces dernières ont été hydrolysées par l'endoxylanase 39 Kd, avec un rendement estimé à 54,0 %, d'après le pourcentage pondéral du surnageant S_3 (Tab. XXVIII).

De plus, les compositions molaires de S_3 et de P_3 sont respectivement équivalentes à celles de S200-II et de S200-I (Tab. XXVI). S_3 et S200-II contiennent principalement du xylose (81,2 et 74,2 %) et de l'acide 4-O-Méthyl glucuronique (7,3 et 7,2 %) alors que P_3 et S200-I sont composés essentiellement de galactose (26,7 et 32,9 %) et d'arabinose (21,5 et 16,7 %) en plus du xylose (24,0 et 38,0 %). En outre, les taux pondéraux respectifs des fractions non hydrolysées (50,0 %) correspondent au taux d'hydrolyse de 54 %. En conséquence, les deux fractions qui composent le substrat ne sont pas hydrolysées avec la même efficacité. La première (S200-I) étant moins hydrolysée, constitue principalement le précipité P_3 alors que la seconde (S200-II) très dégradée, fournit la majorité du surnageant riche en oligoxylosides acides.

β) - Caractérisation de la fraction résistante FR-X

La composition molaire (Tab. XXVIII) de cette fraction ne diffère de S01-A et de P_3 que par la baisse du pourcentage molaire du xylose (jusqu'à environ 12,0 %) et par l'augmentation de la teneur du galactose (51,6 %) et de l'arabinose (26,0 %). Compte tenu de cette composition qui caractérise des arabinogalactanes plutôt que des xylanes, la détermination des oses réducteurs (Fig. 54) fournit uniquement le xylose à raison de 0,5 % (Tab. XXVIII). L'estimation du degré de

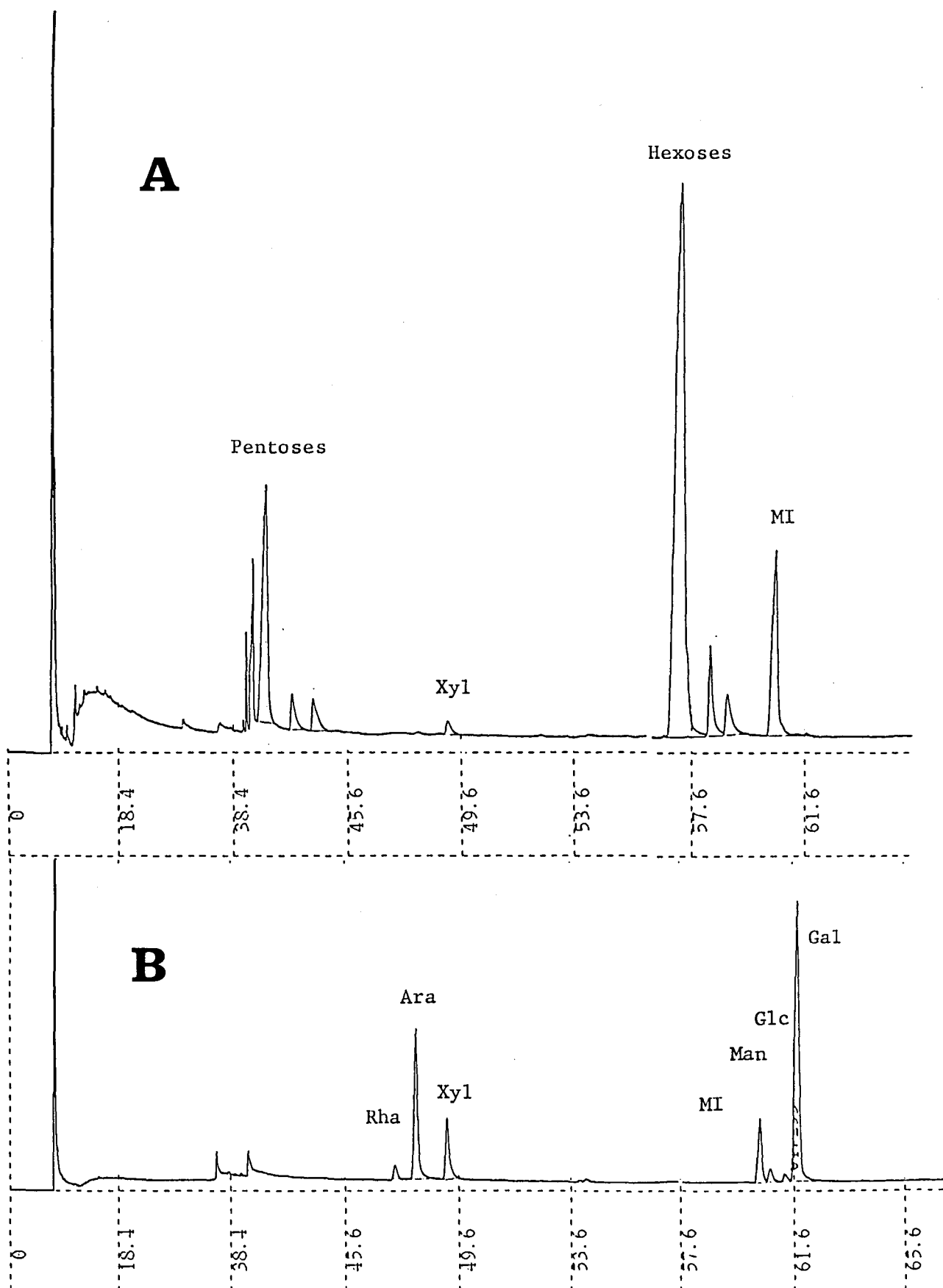


Figure 54 : Détermination des oses réducteurs de la fraction FR-X

A : Préparation analytique des oses réducteurs (AAR)

B : Préparation analytique des oses totaux (AAT)

polymérisation à partir de cette valeur donne 26 (13:0,5). Elle atteint au maximum 52 si on considère l'implication de la moitié seulement de l'arabinose, ce qui correspond au cas extrême d'une arabinoxylane. Des dextrans sulfates de masse 100, 40 et 8-10 KD ont permis d'étalonner la colonne de Séphacryl S200. Le volume mort V_0 est déterminé grâce au 100 KD. Les deux autres catégories sont plus ou moins retenues et présentent des volumes d'exclusion proche de V_0 pour 40 KD et d'une valeur double de V_0 pour 8-10 KD. Compte tenu de cet étalonnage et de l'ordre de grandeur des masses moléculaires des xylanes, ces dernières devraient être retardées sur la colonne, contrairement à ce qui est observé. Même si la nature des étalons de masse est différente de celle de FR-X, un tel écart de volume d'élution ne s'explique que par une augmentation apparente de la masse de ces xylanes provoquée par la fixation d'autres structures telles que des galactanes ou des arabinogalactanes. Concernant les acides uroniques, la teneur en acide glucuronique est plus élevée (3,5 %) que celle d'acide 4-O-Méthyl-glucuronique (1,0 %). En considérant l'ensemble du tableau XXVIII, le premier acide cité se concentre dans les fractions P3 et FR-X, le second dans le surnageant S3. Par conséquent, l'un fait plutôt partie des arabinogalactanes tandis que l'autre entre dans la structure des xylanes.

La distribution des liaisons (Tab. XXX) indique une substitution en O-2 d'un xylosyle sur trois, en raison de la répartition des xylosyles liés en O-4 (10,0 %) par rapport à ceux liés en O-4 et O-2 (5,0 %). De plus, la teneur élevée du galactose lié à la fois en O-3 et O-6 (23,9 %) caractérise une structure très substituée de ces galactanes. Celles-ci possèdent autant de galactosyles liés en O-3 (9,0 %) que de résidus de galactose terminaux (10,6 %) et liés en O-6 (10,3 %). Quant aux liaisons de l'arabinose, elles sont marquées par des résidus terminaux (5,7 %) et liés en O-5 (12,6 %). Le rapport 1:2 entre ces dérivés informe sur la présence d'oligoarabinosides de DP 2 à 3 pour former les arabinogalactanes II.

Etant donné que certains arabinosyles terminaux participent aux structures des arabinoxylanes et des arabinogalactanes, l'excédent d'arabinose terminal (au plus 2,8 %) prend part à la structure des oligoarabinosides qui devrait donc avoir un DP de 5,5 $[(12,6 + 2,8)/2,8]$. Or, la présence de 5-arabinanes de DP 5 à 6 dans les structures d'arabinogalactanes est rarement mise en évidence. Dans ce cas, les arabinosidases ne sont pas présentes ou sont inactives dans le milieu de culture. Par conséquent, le contenu de FR-X serait des arabinoglucuronoxylanes sur lesquelles se fixent des arabinogalactanes II.

L'analyse par spectroscopie ^{13}C -RMN de la fraction FR-X (Fig. 55.A) révèle des signaux qui se rapportent aux résidus suivants :

- les groupes de signaux situés aux environs de 148,11 ppm de 128,16 ppm et de 114,95 ppm sont relatifs à la présence de composés phénoliques (Ishii et Hiroi, 1990 a-b et Ishii, 1991) tels que

l'acide férulique (128,16/AF-1), l'acide diférulique (127,26/DF-1) et l'acide coumarique (127,44/AC-1). Présents en faible quantité, ces composés n'ont pu être décelés que par la présence des signaux de leur C-1, C-8 et le signal (56,90 ppm) du groupe méthoxyle ($\text{CH}_3\text{-O-}$) substituant les dérivés féruliques en C-3 (Cf. Généralités). Par ailleurs, le signal à 59,90 ppm correspond à l' α -Xyl-5 d'oligoxyloglucanes substitués en O-4 par un acide férulique (Ishii et Hiroi, 1990 b).

- les signaux vers le bas champ à 177,5 et 175,0 ppm correspondent aux fonctions carbonyles attribuables à la présence des acétyles et des acides uroniques, comme les acides glucuronique et 4-O-Méthylglucuronique. Les acétyles sont aussi décelés par le signal du méthyle ($\text{CH}_3\text{-}$) à 18,75 ppm (Tab. XXXI). De plus, l'analyse des carbones anomériques et des autres signaux caractéristiques (Tab. XXX) a permis d'établir le contenu glucidique de la fraction FR-X se référant à l'interprétation du spectre de la fraction S01-B (Cf. chap. II) qui correspond au substrat S01-A. Les couples de signaux (102,19 et 65,72 ppm, et 102,19 et 63,56 ppm) sont respectivement attribués aux résidus β -xylosyle terminaux et liés en O-4, qui caractérisent les xylanes. Le signal à 65,72 ppm du β xylose terminal confirme la présence d'oligoxylane qui a été suggérée précédemment suite à la détermination du xylose réducteur. En outre, ceux à 109,66 ppm et 108,14 ppm représentent des arabinosyles terminaux et liés en O-5 qui constituent les chaînes latérales des xylanes (Hoffmann et al, 1992). Ces résidus arabinoses terminaux sont liés en O-2 et en O-3 ou en O-2 et en O-3 du xylosyle. Ces substitutions du xylose sont caractérisées par les signaux des C-5 des xylosyles à 63,37 ppm (monosubstitué) et à 63,07 ppm (disubstitué), distincts du déplacement chimique du C-5 non substitué (63,56 ppm).

Par ailleurs, des arabinosyles liés en O-5, signalés par les δ à 108,14 ppm et à 67,58 ppm correspondent aux oligoarabinosides de DP 2 à 3 des arabinogalactanes II. Ces dernières sont aussi caractérisées par les carbones anomériques à 104,13 ppm (T-Gal-1), à 103,96 ppm (3- β -Gal-1), à 103,79 ppm (6- β -Gal-1) et à 103,22 ppm (3,6- β -Gal-1). L'amplitude relative des signaux du 6- β -galactose (Fig. 55B-C) à 103,79 ppm (C-1), 70,50 ppm (C-2), 80,70/79,85 (C-3) et 69,66 ppm (C-6 lié) et 62,01 ppm (C-6 libre) est légèrement supérieure à celle des signaux du 3- β -galactose. De ce fait, les arabinogalactanes II de la fraction FR-X possèdent plus de 6- β -galactane que de 3- β -galactane. Il est donc probable que la teneur en 3,6-galactose (23,9 %) corresponde en majorité à du galactose lié en O-6 substitué en O-3, comme dans les arabinogalactanes protéiques de la fraction FR-P. Toutefois, celles-ci sont beaucoup plus substituées par des arabinosyles terminaux puisque le rapport T-Ara : 5-Ara est plus élevé (Tab. XXIV), alors que AGX est composé de galactose terminal puisque les C-6 correspondant sont à 61,61 et 62,01 ppm.

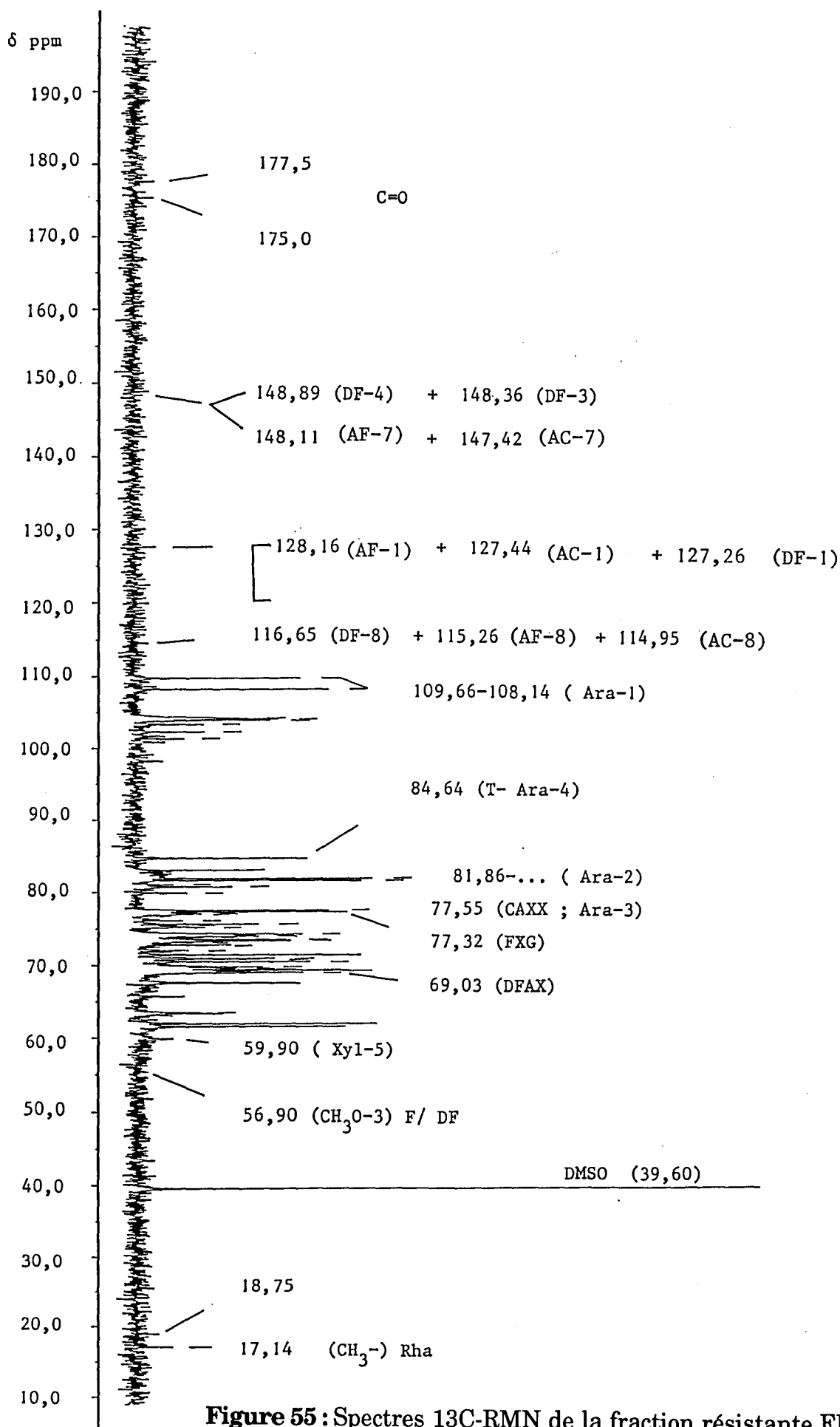
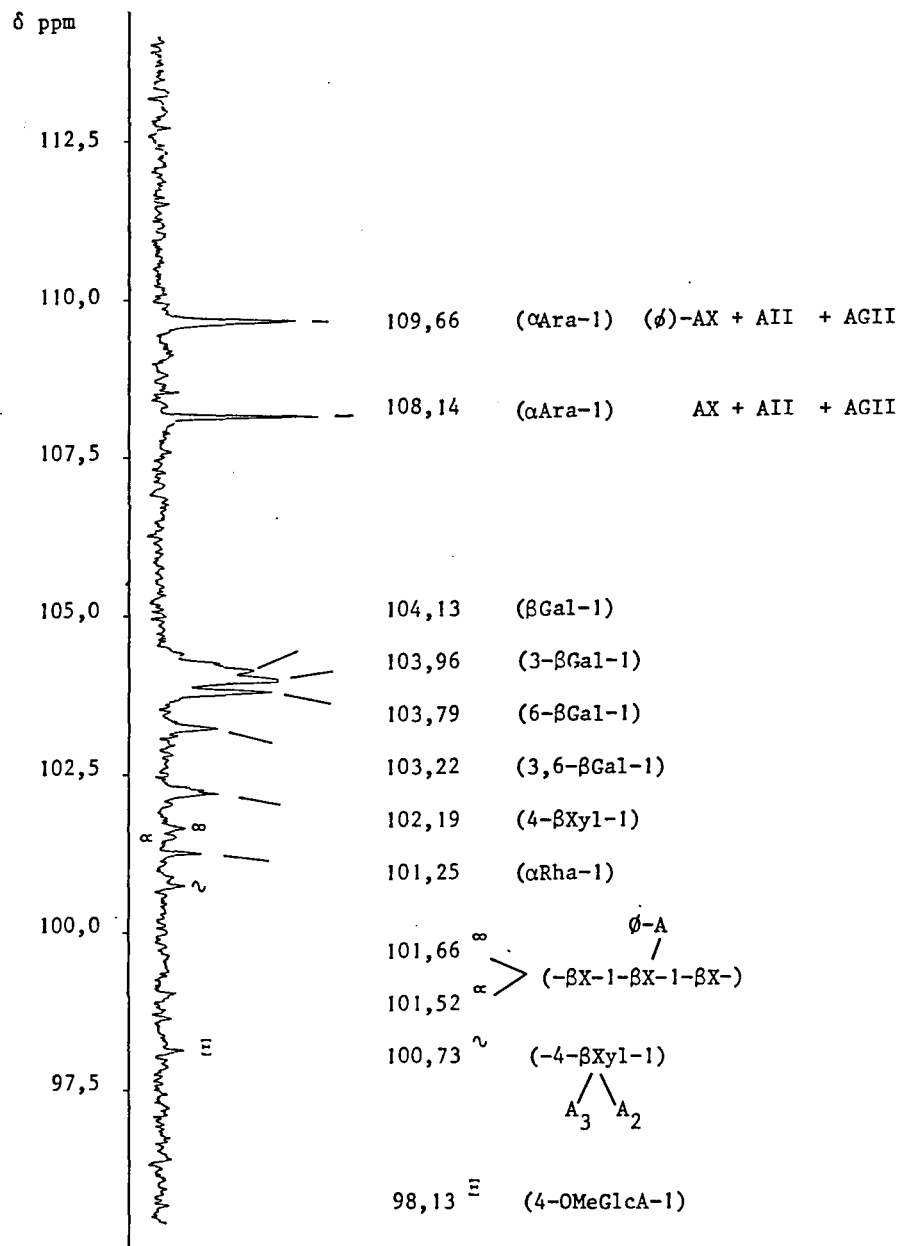
A

Figure 55 : Spectres 13C-RMN de la fraction résistante FR-X

55A : Spectre total de 0 ppm à 200 ppm

(DF : Acide diférulique ; AC ou C : Acide coumarique ; AF ou F : Acide férulique)

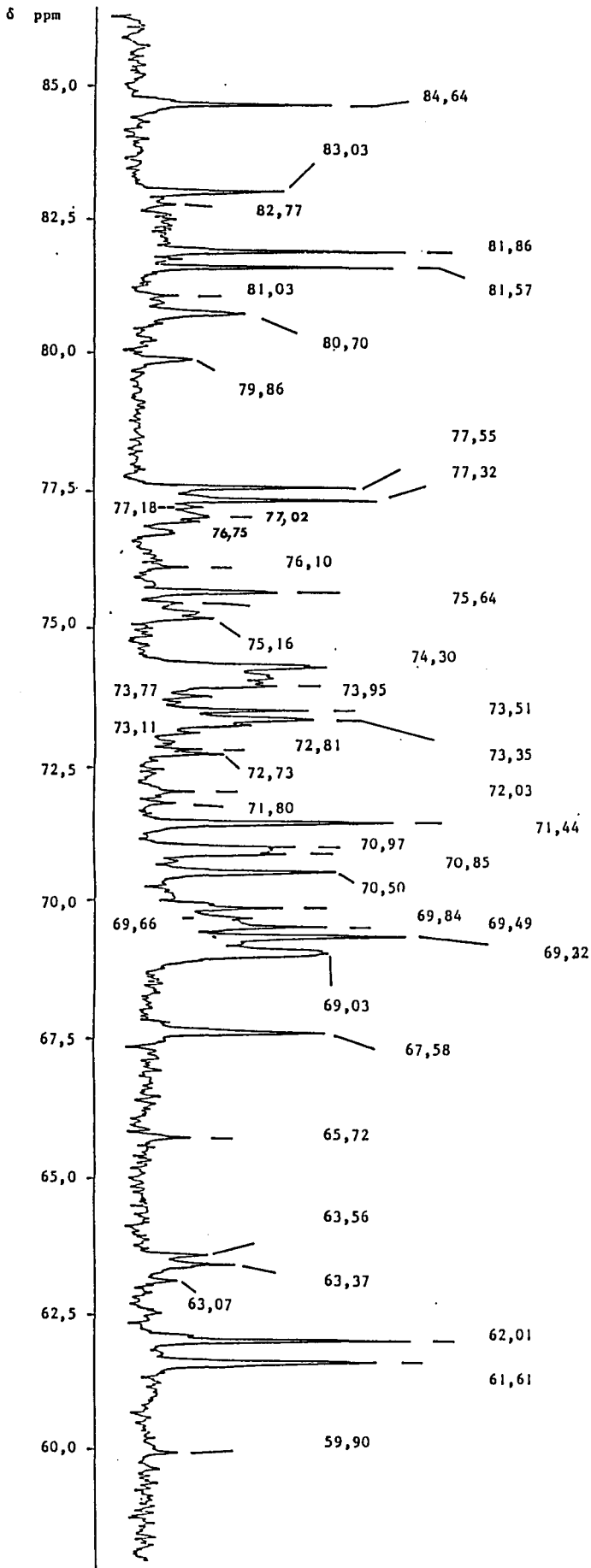
B

55B : Région des carbones anomériques

AX : Arabinoxylyanes ; AII : Arabinanes ; AGII : Arabinogalactanes II ;

ϕ : Acides phénoliques (DF, AC et AF)

C



55C : Région des autres carbones

Tableau XXXI : Déplacement chimique δ du spectre ^{13}C -RMN de la fraction FR-X

Composition en résidus liés	Déplacement chimique δ (ppm)					
	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-4</u>	<u>C-5</u>	<u>C-6</u>
<i>D-Xylosyle</i>						
$\beta\text{-Xyl}_p$ -	102,19	73,35	-	-	65,72	
4- $\beta\text{-Xyl}$ -	-"-	-"-	74,31	77,02	63,56	
2,4- $\beta\text{-Xyl}$ -	-"-	-"-	77,55	-"-	63,37	
2,3,4- $\beta\text{-Xyl}$ -	100,73	74,30	77,02	-"-	63,07	
<i>L-Arabinosyle</i>						
$\alpha\text{-Ara}_f$	108,14	81,86	77,55	83,03	62,01	
	109,66	-"-	-"-	-"-	-"-	
5- $\alpha\text{-Ara}$ -	108,14	-"-	77,32	83,03	67,58	
3,5- $\alpha\text{-Ara}$ -	-"-	-"-	79,86	82,77		
<i>L-Galactosyle</i>						
$\beta\text{-Gal}_p$ -	104,13	71,44	73,51	69,49	75,64	61,61
3- $\beta\text{-Gal}$ -	103,96	70,81- 70,97	81,57	69,03	76,75	-"-
6- $\beta\text{-Gal}$ -	103,79	70,50	80,70	-"-	74,00	69,66
3,6- $\beta\text{-Gal}$ -	103,22	70,50	81,57(GG ₃ /AG ₃)	69,32	74,00	-"-
		71,81 - 72,01	79,85 (AG ₆)			
<i>Autres</i>						
$\alpha\text{-Rha}$ -	101,25	71,44	70,81	73,35	69,49	17,14
(4-OMe)-GlcA-	98,13	-			-	-
Acétyl-	18,75					
C/F/DF-	127,26-128,16					56,90
AF-A-3- $\beta\text{-Xyl}$ -	101,66					
AF- $\alpha\text{-Xyl}$ -1-	59,90					

- (-"-): Signifie le report de la valeur située au-dessus

- (A₃X) et (A₂X), correspondent respectivement aux motifs suivants:

Ara(1→3)Xyl et Ara(1→2)Xyl

- GG₃: Gal→6(3 Galactane): Galactose lié en O-3 substitué par un galactosyle en O-6.

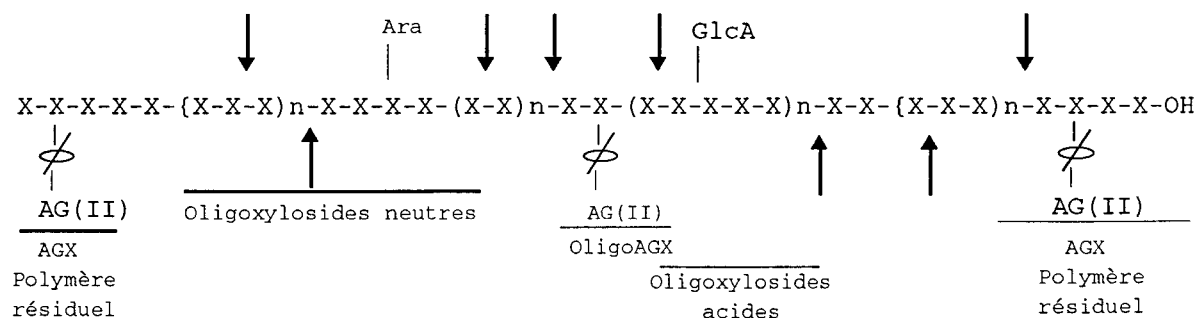
- AG₆: Gal→3(6 Galactane): Galactose lié en O-6 substitué par un arabinose en O-3.

IV - CONCLUSION

L'utilisation de la pectinase "Serva" sur la fraction F05-I a conduit à la détermination de son contenu glucidique grâce à la caractérisation des fractions issues de l'analyse de l'hydrolysats. Celui-ci contient principalement des oligosaccharides de 4-O-méthyl-glucuronoxylanes et d'arabinogalactanes d'une part, et d'autre part, des arabinogalactanes protéiques de la fraction FR-P. En outre, la détection d'acide galacturonique dans les fractions d'oligosaccharides confirme que ces derniers proviennent de la dégradation de polysaccharides pectiques. De plus, des oligoxyloglucanes sont présents dans les fractions F6-B et F40-E. Compte tenu de ces résultats, la fraction F05-I est considérée comme étant un mélange de 4-O-méthyl-glucuronoxylanes et d'arabinogalactanes. Ces dernières proviennent, d'une part, des arabinogalactanes pectiques puisque des oligosaccharides sont produits, et d'autre part, d'arabinogalactanes protéiques constituant la fraction FR-P.

L'hydrolyse de la fraction S01-A a permis l'isolement et la caractérisation de deux catégories de xylanes extracellulaires, puisque l'analyse de l'hydrolysats a révélé des 4-O-méthyl-glucuronoxylanes (S200-II, FH-A et AX-1), et des xylanes complexées avec des arabinogalactanes II (FR-X et F-A). Le fait de retrouver les mêmes compositions structurales (Ara, Xyl, Gal) dans les polysaccharides et les oligosaccharides de l'hydrolysats de S01-A et la mise en évidence du xylose comme unique sucre réducteur dans la fraction résistante FR-X, nous amènent à considérer que le polysaccharide contenu dans FR-X est une xylane sur laquelle est liée une arabino 3,6-galactane.

Reconstruite à partir de la composition des hydrolysats, la structure du substrat correspondrait au modèle suivant :



X: Résidu Xylose ; X: Fonction réductrice ; Ara: Résidu Arabinose ; GlcA: (4-O-Méthyl)-Glucuronic acid ; n: Unité de répétition ; AG(II): Arabinogalactanes type II ; AGX: Arabinogalactoxylane. $\rightarrow$: Accessibilité de l'endoxylanase

ϕ : Liaison de covalence de type ose-ose, ose-phénol, ...

L'existence du complexe arabinogalactane-xylane a déjà été citée par Buchala (1973) dans les parois isolées de feuilles d'orge et par Nishitani et Nevins (1989) sur des parois isolées de coléoptiles de maïs. Le premier auteur conclut à une structure de 4- β -xylane, substituée par de l'arabinose terminal, de l'acide 4-O-Méthyl GlcA et par le trisaccharide Gal $\rightarrow$ 4 Xyl $\rightarrow$ 2 Ara. Ces auteurs n'ont pas précisé l'orientation du complexe par la détermination de la nature des oses en position réductrice qui permet de préciser que c'est bien la xylane qui porte les arabinogalactanes.

En effet, la caractérisation de l'arabinogalacto-xylane de la suspension cellulaire de silène est précisée par la détermination du xylose réducteur. Ceci permet de confirmer que la xylane est bien substituée par des arabinogalactanes II.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un programme général de recherche qui concerne le métabolisme des polysaccharides pariétaux chez les végétaux. Il fait suite à un précédent consacré à une étude générale des polysaccharides pectiques acides (Morvan, 1986). Le choix d'une suspension cellulaire comme matériel biologique place également notre contribution dans la continuité des études structurales réalisées précédemment sur des exopolysaccharides isolés des milieux de culture, depuis ceux inaugurés par l'équipe d'Albersheim, il y a une vingtaine d'années.

L'objectif de ce travail étant de caractériser chimiquement les polysaccharides natifs libérés dans le milieu de culture, sans les dégrader, un protocole expérimental original a été imaginé pour isoler les polymères et les purifier par des méthodes douces de séparation (précipitations sélectives, chromatographies préparatives). C'est ainsi que des séquences de précipitations par des proportions variables d'éthanol, suivies de chromatographies d'exclusion moléculaire et d'échange d'ions, permettent de récupérer finalement, après centrifugations, dialyses et lyophilisations, plus de 20 fractions parmi lesquelles ont été choisies celles qui ont servi pour la caractérisation chimique.

Plusieurs enseignements d'ordre méthodologique peuvent être tirés des résultats obtenus et des difficultés rencontrées :

La donnée la plus importante dont il faut disposer avant d'entreprendre l'identification du contenu d'une fraction est son état de pureté. Pour ce faire, l'allure des courbes d'étalonnage des masses moléculaires par chromatographie d'exclusion est un premier critère. Lors de l'analyse de la composition en monosaccharides, après hydrolyse des polymères, la nature des oses réducteurs a été déterminée systématiquement. En effet, la qualification des oses réducteurs permet par référence aux règles de nomenclature en usage, de déterminer les catégories de polysaccharides en présence et de confirmer ainsi le stade de purification atteint. Seule l'unicité de l'ose réducteur constitue le critère de certitude pour l'isolement d'une seule catégorie de polymère.

Les méthodes de dérivation employées ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients et il est indispensable d'en combiner plusieurs pour parvenir par CLG, à une identification complète des monosaccharides, neutres, acides, osamines et autres polyols. Il est nécessaire de faire appel à un couplage de la CLG avec la spectrométrie de masse pour préciser la

nature des composés nouveaux, dont on ne dispose pas de témoins.

Au passage, la méthode analytique par CLG permet une quantification efficace des différents monosaccharides constitutifs d'un polysaccharide. Cette étape indispensable est généralement abordée par le biais de dosages colorimétriques dont les limites ont été discutées et qui s'avèrent souvent inadéquates et imprécises dans le cas de polyholosides hétérogènes, faute de pouvoir faire appel au mélange approprié comme témoin.

Il est intéressant de caractériser les polysaccharides par des techniques non destructives telles que la RMN, notamment pour compléter les données par CLG-SM et par méthylation. Au terme de cette étude, il apparaît que l'utilisation de la ^{13}C -RMN doit être recommandée comme méthode prospective, à utiliser avant toute autre identification, de façon à guider l'expérimentateur et lui permettre d'adapter les protocoles analytiques plus précis. En effet, de relatives incohérences ou contradictions sont apparues entre les résultats obtenus par ^{13}C -RMN et par méthylation, dans la fraction Snr-A, par exemple. Il ne faut pas perdre de vue qu'à la différence des polysaccharides algaux ou bactériens, ceux produits par les végétaux supérieurs, pectiques et hémicellulosiques n'ont pas de motif aussi régulièrement agencés. En effet, les rhamnogalacturonanes I, xyloglucanes et autres glucomannanes, généralement citées comme exemples de polysaccharides possédant des motifs de répétition ne constituent pas obligatoirement la majorité des polysaccharides complexes de la matrice pariétale.

La détermination des liaisons intramoléculaires et la nécessité de les distinguer des relations intermoléculaires ont été parmi nos préoccupations majeures. En effet, les méthodes de séparation employées aboutissent à des séries de fractions dont les analyses globales révèlent leur parenté chimique. Outre les quelques-unes aisément caractérisées (...), il en subsiste d'autres, qualifiées d' "intermédiaires", dont le contenu ne correspond pas aux modèles déjà décrits dans la littérature. Après avoir vérifié leur homogénéité structurale en multipliant les épreuves de fractionnement non dégradant, ces fractions ont été soumises à l'action d'enzymes purifiées (pectinase et xylanase). Ayant la garantie du mode de fonctionnement de ces enzymes, l'analyse des fragments oligosaccharidiques fournit de nombreux renseignements sur les chaînes principales pectiques et hémicellulosiques ainsi que sur leurs substitutions les plus courtes. En consacrant une attention particulière aux fractions résistantes à la dégradation enzymatique, il devient possible de considérer que les points de branchements élucidés correspondent à des jonctions intermoléculaires covalentes, eu égard aux définitions actuellement en vigueur à propos des familles polysaccharidiques. C'est ainsi que nous avons mis en évidence pour la première fois dans un milieu de culture de suspension cellulaire une complexation entre les xylanes et les arabino3,6- β -galactanes II.

L'examen des résultats d'analyse peut être également entrepris dans le but de déterminer l'origine des molécules présentes dans le milieu de culture à la fin du cycle cultural (14 jours) et d'y apporter des interprétations d'ordre physiologique :

Parmi les 3 premières fractions issues de la première étape de préparation, la fraction insoluble P1i se révèle être un complexe de polysaccharides pectiques, de cellulose et de galactomannanes qui correspond à des fragments arrachés à la paroi. Les 2 autres fractions sont des mélanges solubles de glucanes, d'hémicelluloses et de pectines fortement branchées dont la structure détaillée a été établie par la suite. La présence d'une quantité significative de galactose réducteur dans les surnageants, permet de suspecter l'existence de galactosidases, susceptibles d'expliquer la présence de galactanes dans le milieu en étant à l'origine de leur libération, mais également de justifier que la dégradation des molécules ramifiées ne se poursuive pas et qu'on les retrouve quasiment intégralement dans les précipités issus du premier surnageant.

Il a été surprenant de constater la présence de polyols en quantité importante et majoritairement sous forme liée. Ce sont, avec d'autres monosaccharides phosphatés, des intermédiaires métaboliques, localisés dans le cytoplasme ou stockés dans les vacuoles dont la présence dans le milieu extracellulaire n'est pas immédiatement explicable. Il en est de même du digalactosylglycérol et des N-glycannes qui sont considérés comme des marqueurs d'une activité catabolique intense lorsqu'ils sont à l'état libre. L'hypothèse d'un éclatement des cellules les plus âgées peut être envisagée mais dans ce cas tous les intermédiaires cytosoliques devraient être présents, notamment les trioses-3-phosphate, à moins que leur disparition marque également l'intense activité respiratoire des cellules en fin de cycle.

Le milieu de culture révèle quantité d'oligosaccharides et petits polysaccharides, caractérisés par leurs oses réducteurs nombreux et variés. Cette constatation implique l'existence d'activités hydrolytiques, y compris extracellulaires, qui n'ont pas été caractérisées mais qui sont validées par nos observations et par des résultats acquis par ailleurs. Sans pouvoir apporter ici d'argument définitif sur l'origine des fragments pariétaux isolés dans le milieu de culture, il paraît raisonnable d'admettre que plus ils sont de faible taille plus ils proviennent de zones accessibles à une dégradation enzymatique efficace, ce qui renforce le concept des blocs, établi par Jarvis (1984) pour les fragments pectiques.

Au contraire, les fragments polysaccharidiques généralement très branchés, sont ceux dont l'arrangement stérique n'a pas permis l'accès aux enzymes telles que les galactosidases, probablement présentes dans le milieu extracellulaire. Leur étude détaillée, inaugurée par un tri moléculaire intensif, poursuivie par des dégradations enzymatiques contrôlées et achevée par une caractérisation précise par méthylation, CLG-SM et ^{13}C -RMN confirme la présence probable de

liaisons covalentes entre les pectines et les hémicelluloses de la matrice pariétale. Des jonctions intermoléculaires ont déjà été envisagées par les auteurs et figurent parmi les modèles de référence (Fry, 1986) ; la mise en évidence de l'assemblage entre xylanes et arabinogalactanes II, qui n'a pas été mentionné dans le modèle de Fry (1986), en est une excellente illustration.

Enfin, il convient de noter que la qualification de ces arabinogalactanes en tant que substances pectiques vient de la détection des traces de rhamnose lié en O-2 sans que l'acide galacturonique soit décelé. Aussi, la forte proportion des arabinogalactanes permet de supposer que certaines (sinon la majorité) n'ont aucun lien avec les monosaccharides pectiques et, de ce fait, pourraient être considérées comme des molécules à part entière. Par conséquent, les arabinogalactanes peuvent former une seule classe de polysaccharides végétaux au même titre que les mannanes, les xyloglucanes ou les xylanes qui font partie des hémicelluloses. Leur présence dans plusieurs polymères structuraux (protéiques, pectiques,...), toujours en tant que substituants, oriente vers cette considération. De ce fait, elles peuvent être des agents de liaison (interconnection) entre les polysaccharides qui deviennent alors plus ou moins ramifiés ou associés.

Cette notion n'est pas vraiment nouvelle, puisqu'elle a été mentionnée par Albersheim et ses collaborateurs (Talmage et al., 1973; Bauer et al., 1973; Keegstra et al., 1973) concernant la liaison covalente de la xyloglucane aux polymères pectiques (RGI) par le biais des chaînes latérales de 4- β -galactanes. Par ailleurs, Dey et Brinson (1984) considèrent l'association entre la xyloglucane et les xylanes isolées de la paroi primaire des cellules d'érable cultivées en suspension, même si les auteurs (Bauer et al., 1973) suggèrent une contamination de la xyloglucane par les xylanes. Cette hypothèse expliquerait la présence de deux fractions majeures de xyloglucanes dont l'une (Pnr) neutre, est homogène alors que la seconde (P01-B), légèrement acide, renferme une faible quantité de xylanes acides. Par conséquent, les xyloglucanes et les xylanes s'associent à la fois aux celluloses et probablement entre elles.

A l'heure du bilan final, il est peut être utile d'insister sur le fait que ce travail a été l'occasion d'élaborer une stratégie originale, de mettre au point des protocoles préparatifs destinés à orienter et à accentuer la séparation des molécules sans les dégrader puis de caractériser finement les produits isolés, par des analyses CLG-SM, des méthylations et de la ^{13}C -RMN. Une telle démarche peut être utilisée à nouveau en modifiant, le cas échéant, l'ordre des opérations, en plaçant plus hâtivement l'étude spectroscopique par ^{13}C -RMN. Le choix des outils enzymatiques dépend également de la catégorie moléculaire à dégrader pour avoir accès aux zones de branchements intermoléculaires. La même stratégie peut également être réalisée par CLHP, en faisant appel à des matrices très résolutes (HPX-87H, -42A, -42C, Biorad ; système Dionex ;

nouvelles phases, ...) qui permettent de déceler à la fois tous les monosaccharides, les polyols et les autres composés mis en évidence lors de ce travail. Le couplage CLHP-SM complèterait efficacement cette approche dans la mesure où les molécules entières sont identifiables avec ou sans modifications préalables.

Au plan physiologique, la principale insuffisance de cette étude est qu'elle n'a pas pu s'appuyer sur la certitude de l'existence des enzymes hydrolytiques extracellulaires pour valider les interprétations concernant l'origine des oligosaccharides et des petits polysaccharides. De telles hypothèses demeureront spéculatives tant que ces activités enzymatiques extracellulaires n'auront pas été étudiées, ce qui constitue une piste majeure pour une poursuite de ce travail. Il ne faut pas perdre de vue que l'on ne sait que depuis à peine dix ans que des fragments pariétaux de petite taille, sont susceptibles de constituer de véritables signaux chimiques, capables d'instruire les relations endo et inter-cellulaires. Comprendre leur origine est un véritable enjeu en même temps qu'une étape nécessaire pour envisager leur production par voie biotechnologique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKIYAMA Y. and KATO K., 1982.- Methylation analysis of extracellular polysaccharides from suspension cultured cells of *Nicotiana tabacum*. **Phytochemistry**, 21: 1325-1329.
- AKIYAMA Y., EDA S., MORI M., and KATO K., 1983.- A galactoglucomannan from extracellular polysaccharides of suspension-cultured cells of *Nicotiana tabacum*. **Phytochemistry**, 22: 1177-1180.
- AKIYAMA Y., EDA S., MORI M., and KATO K., 1984.- An arabino-glucuronomannan from extracellular polysaccharides of suspension-cultured Tobacco cells. **Agric. Biol. Chem.**, 48: 403-407.
- ALBAN C., JOYARD J. and DOUCE R., 1989.- Comparison of glycerolipid biosynthesis in non green plastids from sycamore (*Acer Pseudoplatanus*) cells and cauliflower (*Brassica oleracea*) buds. **Biochem. J.**, 259: 775-783.
- ALBERSHEIM P., MÜHLETHALER K., and FREY-WYSSLING A., 1960.- Stained pectin as seen in the electron microscope. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, 8: 501-506.
- ALBERSHEIM P. 1965.- Biogenesis of the cell wall. Dans: **Plant biochemistry**, J Bonner and J. E. Varner (eds); Academic Press.
- ALBERSHEIM P., NEVINS D.J., ENGLISH P.D., and KARR A., 1967.- A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. **Carbohydr. Res.**, 5: 340-345.
- ALBERSHEIM P., 1976.- The primary cell wall. Dans: **Plant biochemistry**, pp. 225-274. J Bonner and J. E. Varner (eds); New York Academic.
- ALBERSHEIM P., 1984.- Why study the structures of biological molecules?: The importance of studying the structures of complexe carbohydrates. Dans: **Structure, Fonction and Biosynthesis of Plant Cell Walls. Proc. 7th Ann. Symp. Bot.**, p19-5; Rockville.
- ANDERSON R. L., CLARKE B. A., JERWYN M. A., KNOX R. B. and STONE B. A., 1977.- A carbohydrate-binding arabinogalactan-protein from liquid suspension cultures of endosperm from *Lolium multiflorum*. **Aust. J. Plant. Physiol.**, 4: 143-158.
- ANGYAL S.J., and JAMES K., 1970.- Oxidation of carbohydrate with chromium trioxide in acetic acid. **Aust. J. Chem.**, 23: 1209-1221.
- ASPINALL G.O., BEGBIER R., HAMILTON A. and WHYTE J.N.C., 1967. - Polysaccharides of soy-beans. Part III. Extraction and fractionation of polysaccharides from cotyledon meal. **J. Chem. Soc., C**, 1065-1070.
- ASPINALL G.O., CRAIG J.W.T. and WHYTE J.L., 1968. - Lemon peel pectine I : fractionation from partial hydrolysis of water soluble pectines. **Carbohydr. Res.**, 7: 442-452.
- ASPINALL G.O., MOLLOY J.A., and CRAIG J.W.T., 1969.- Extracellular polysaccharides from suspension-cultured sycamore cells. **Can. J. Biochem.**, 47: 1063-1070.
- ASPINALL G.O., and COTTRELL I.W., 1970.- Lemon peel pectin II: Isolation of homogenous pectins and examination of some associated polysaccharides. **Can. J. Chem.**, 48: 1283-1289.
- ASPINALL G.O., and ROSELL K.-G., 1977.- Base-catalyzed degradations of methylated acidic polysaccharides: a modified procedure for the determination of sites of attachment of hexuronic acid residues. **Carbohydr. Res.**, 57: C23-C26.
- ASPINALL G.O., 1980.- Chemistry of cell wall polysaccharides. Dans: **The biochemistry of plants** (Preiss J., ed.), vol.3: **Carbohydrate -Structure and function**, 473-500. Acad. Press, New York.
- ASPINALL G.O., 1983.- Classification of polysaccharides. Dans: **The polysaccharides** (Aspinall G.O., ed.), vol. 2: 1-9. Academic press, New York.

- ASPINALL G.O., and FANOUS H.K., 1984.- Structural investigations on the nonstarchy polysaccharides of apple. **Carbohydr. Polymers**, 4: 193-214.
- ASPINALL G.O., KHONDO L., and PUVANESARAJAH V., 1989.- Selective fragmentation of methylated tobacco extracellular arabinoglucuronomannan by cleavage of α -D-glucopyranosiduronic acid units. **Carbohydr. Res.**, 188: 113-120.
- AZUMA J.-I., 1989.- Analysis of lignin-carbohydrate complexes of plant cell walls. Dans: Plant fibers., Linskens H.F. and Jackson J.F. (eds); Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 10: 100-126.
- AZUMA J.-I., KATO A., KOSHIJIMA T., and OKAMURA K., 1990.- Arabinosylxylotriose mixedly esterified with acetic acid and ferulic acids from sugar cane bagasse. **Agric. Biol. Chem.**, 54(8): 2181-2182.
- BACIC A., HARRIS P.J. and STONE B.A., 1988.- Structure and Function of Plant Cell Walls. Dans: **The Biochemistry of Plants** (Preiss, J., ed.) pp. 297-371. Academic Press, Inc. London.
- BARNOUD F., 1980.- La cellulose. Dans: **Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés**; Monties B. (ed.), Gauthier-Villars, Paris ; p66-86.
- BARRETT A.J., and NORTHCOTE D.H., 1965.- Apple fruit pectic substances. **Biochem. J.**, 94: 617-627.
- BARRY J.H.S. and SELVEDRAN R.R., 1984.- Structural features of cell-wall polymers of the apple. **Carb. Res.**, 135: 155-166.
- BARZ W., REINHARD E., and ZENK M. H., 1977.- **Plant cell culture and Its biotechnological application**; eds., Springer-Verlag, Berlin, and New York.
- BAUER W. D., TALMADGE K. W., KEEGSTRA K., and ALBERSHEIM P., 1973.- The structure of plant cell walls. II: The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiol.**, 51: 174-187.
- BECKER G.E., HUI P.A., ALBERSHEIM P., 1964.- Synthesis of extracellular polysaccharides by suspensions of *Acer pseudoplatanus* cells. **Plant Physiol.**, 39: 913-920.
- BIEMANN K., DEJONGH D.C., and SCHNOES H.K., 1963.- Application of mass spectrometry to structure problems. XIII- Acetates of pentoses and hexoses. **J. Am. Chem. Soc.**, 85: 1763-1771.
- BLAKE D.J. and RICHARDS G.N., 1971.- An examination of some methods for fractionation of plant hemicelluloses. **Carbohydr. Res.**, 17: 253-268.
- BLAKENEY A.B., HARRIS P.J., HENRY P.J., and STONE B.A., 1983.- A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. **Carbohydr. Res.**, 113: 291-299.
- BLAKENEY A.B., and STONE B.A., 1985.- Methylation of carbohydrates with lithium methylsulfonyl carbanion. **Carbohydr. Res.**, 140: 319-324.
- BLASCHEK W., HAAS D., HOEHLER H., and FRANZ G., 1981.- Cell wall regeneration by *Nicotiana tabacum* protoplasts: chemical and biochemical aspects. **Plant Sci. Lett.** 22: 47-57.
- BLUMENKRANTZ N., and ASBOE-HANSEN G., 1973.- New method for quantitative determination of uronic acids. **Anal. Biochem.**, 54: 484-489.
- BOCK K., PEDERSEN C., and PEDERSEN H., 1984.- Carbon-13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, 42: 193-225.
- BOLLER and WIEMKEN, 1986.- Dynamics of vacuolar compartmentation. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, 37: 137-164.
- BONFANTE-FASOLO P., VIAN B., PEROTTO S., FACCIO A., and KNOX J.P., 1990.- Cellulose and pectin localisation in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: labelling continuity between host cell and interfacial material. **Planta**, 180: 537-547.

- BRADBURY J.H., and JENKINS G.A., 1984.- Determination of the structure of trisaccharides by ^{13}C -N.M.R. spectroscopy. **Carbohydr. Res.**, 126: 125-156.
- BRADFORD M.M., 1976.- A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254.
- BRADY C. J., 1987- Fruit ripening. **Anal. Rev. Plant Physiol.**, 38: 155-177.
- BRANCA C., De LORENZO G., and CERVONE F., 1988.- Competitive inhibition of the auxine-induced elongation by α -D-oligogalacturonides in pea stem segments. **Physiol. Plant.** 72: 499-504.
- BRASSART C., DUBOIS J. and BOURRIQUET R., 1977. Nutrition carbonnée d'une suspension cellulaire de Silène (*Silene alba*(Miller)E.H.M. Kraus). **C.R. Acad. Sc. Paris**, 285: 759-762.
- BUCHALA A.J., 1973.- An arabinogalacto(4-O-methylglucurono)xylan from the leaves of *Hordeum vulgare*. **Phytochemistry**, 13: 1373-1376.
- BUCHALA A.J., GENOUD T., and MEIER H., 1987.- Polysaccharides in the culture medium of cotton cells cultured *in vitro* . **Food Hydrocolloids**, 1: 359-363.
- BURKE D., KAUFMAN P., Mc NEIL M., and ALBERSHEIM P., 1974.- The structure of plant cell walls. VI: A survey of the walls of suspension-cultured monocots. **Plant Physiol.**, 54: 109-115.
- CARPITA N.C., 1984.- Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentrations of alkali. **Phytochem.**, 23: 1089-1093.
- CARTIER N., 1986.- Les polysaccharides de la paroi primaire des cellules de *Rubus fruticosus* cultivées en suspensions. Intervention des polyosidases endogènes dans leur réarrangement au cours de la croissance. **Thèse de Doct., Biochim.**, 470p.
- CARTIER N., CHAMBAT G., and JOSELEAU J.-P., 1987.- An arabinogalactan from the culture medium of *Rubus fruticosus* cells in suspension. **Carbohydr. Res.**, 168: 275-283.
- CHAMBAT G., JOSELEAU J.-P. and BARNOUD F., 1981.- The carbohydrate constituents of the cell wall of suspension cultures of *Rosa glauca*. **Phytochem.**, 20: 241-246.
- CHAMBAT G., BARNOUD F. and JOSELEAU J.-P., 1980.- Isolation and characterization of a homogalacturonan in primary walls of *Rosa* cells cultures *in vitro*. **Carbohydr. Res.**, 85: C10-C12.
- CHAMBAT G., BARNOUD F. and JOSELEAU J.-P., 1984.- Structure of the primary cell walls of suspension-cultured *Rosa glauca* cells. 1: Polysaccharides associated with cellulose. **Plant Physiol.** 74: 687-693.
- CHANZY H., CHUMPITAZI B., and PEGUY A., 1982. - Solutions of polysaccharides in 4-methyl morpholine-N-oxide (MMNO). **Carbohydr. Polym.**, 2: 35-42.
- CHIZHOV O.S., ZOLOTAREV B.M., USOV A.I., RECHTER M.A., and KOCHETKOV N.K., 1971.- Mass-spectrometric characterization of 3,6-anhydrogalactose derivatives. **Carbohydr. Res.**, 16: 29-38.
- CHURMS S. C., MERRIFIELD E.H., STEPHEN A.M., WALMYN D.R., POLSON A., VAN DER MERWE H. C., and SPIES H.S.C., 1983.- An arabinan from apple juice concentrate. **Carbohydr. Res.**, 113: 339-344.
- CIUCANU I., and KEREK F., 1984.- A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, 131: 105-123.
- CIUCANU I., and LUCA C., 1990.- Avoidance of degradation during the methylation of uronic acids. **Carbohydr. Res.**, 206: 71-77.
- CLAMP J.R., BHATTI T., and CHAMBERS R.E., 1971.- The determination of carbohydrate in biological materials by gas-liquid chromatography. **Methods of biochem. anal.**, 19: 229-344.

- CLARKE A.E., ANDERSON R.L., and STONE B.A., 1979.- Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. **Phytochem.**, 18: 521-540.
- CLARKE S.J., 1983.- **Carbohydr. Res.**, 115: 231.
- CLELAND R. E., 1981.- Wall extensibility hormones and wall extension. Dans: **Plant Carbohydrates II**; pp. 255-273. Tanner W. and Loewus F.A., (eds) ; Springer-Verlag ; Berlin, Heidelberg, New York.
- COLQUHOUN I.J., de RIUTER G.A., SCHOLS H.A., and VORAGEN A.G.J., 1990.- Identification by n.m.r. spectroscopy of oligosaccharides obtained by treatment of the hairy regions of apple pectin with rhamnogalacturonase. **Carbohydr. Res.**, 206: 131-144.
- COOPER J. B. and J. E. VARNER , 1984.- Cross-linking of soluble extensin in isolated cell walls. **Plant Physiol.**, 76: 414-417.
- COURTOIS J.E., et LE DIZET P., 1974.- Etude comparée de la structure de trois galactoxyloglucanes (amyloïdes de graines). **Ann. Quim.**, 70: 1067-1072.
- CROWELL E.P. and BURNETT B.B., 1967. Determination of the carbohydrate composition of wood pulps by gas chromatography of alditol acetates. **Anal. Chem.**, 39 (1): 121-124.
- DARVILL A.G., MC NEIL and ALBERSHEIM P., 1978. - Structure of plant cell walls. Part VIII : new pectic polysaccharide. **Plant Physiol.**, 62: 418-422.
- DARVILL A.G., McNEIL M., ALBERSHEIM P., and DELMER D.P., 1980.- The primary cell walls of flowering plants. Dans: **The Biochemistry of plants**, vol. 1 ; (Tolbert N.E., ed.). Academic Press, New York, pp 91-162.
- DARVILL A.G., ALBERSHEIM P., Mc NEIL M., LAU J.M., YORK W.S., STEVENSON T.T., THOMAS J., DOARES S., GOLLIN D.J., CHELF P., and DAVIS K., 1985.- Structure and Function of Plant Cell Wall Polysaccharides. **J. Cell Sci. Suppl.**, 2: 203-217.
- DEBEIRE P., PRIEM B., STRECKER G., and VIGNON M., 1990.- Purification and properties of an endo-1,4-xylanase excreted by a hydrolytic thermophilic anaerobe, *Clostridium thermolacticum*: A proposal for its action mechanism on larchwood 4-O-methylglucuronxylan. **Eur. J. Biochem.**, 187: 573-580.
- DEJONGH D.C., 1965.- Mass spectrometry in carbohydrate chemistry. Acyclic peracetates of pentoses and hexoses. **J. Org. Chem.**, 30: 453-457.
- DELMER D.P., 1987.- Cellulose biosynthesis. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, 38: 259-290.
- DePINTO G.L., 1991.- Carbon-13 n.m.r.- Spectral study of Acacia xanthopholea gum and its degradation products. **Carbohydr. Res.**, 220: 29-242.
- DeVRIES J.A., HANSON M., SODERBERG J., GLAHN P.-E., and PEDERSON J.K., 1986.- Distribution of Methoxyl groups in pectins. **Carb. Polymers**, 6: 165-176.
- DEY P.M., and BRINSON K., 1984.- Plant cell walls. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** 42: 265-382.
- DOUGALL D. K., 1980.- Nutrition and Metabolism. Dans: **Plant tissue culture as a source of biochemicals**, (STABA E. J., ed.), C.R.C. Press, 21-58.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., and SMITH F., 1956.- Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, 28: 350-356.
- DUBOIS J. et BOURIQUET R., 1973.- Culture in vitro de tissus et de suspensions cellulaires du Silène (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Kraus). **Bull. Soc. Bot. N. Fr.**, 26-27: 43-54.
- DUTTON G.G.S., PAROLIS H. et PAROLIS L.A.S., 1986.- The structural elucidation of the capsular polysaccharides of *Klebsiella* K68. **Carbohydr. Res.**, 152: 249-259.

- ELBEIN A.D., 1980.- Glycolipids. Dans: **The Biochemistry of plants, vol3** pp. 571-587. Carbohydrates- Structure and Function. J. Preiss, (ed) ; Academic Press, N-Y, London.
- ENGLISH P.D., MAGLOTHIN A., KEEGSTRA K., and ALBERSHEIM P., 1972.- A cell wall-degrading endopolygalacturonase secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Plant Physiol.**, **49**: 293-297.
- ERASO F., and HARTLEY R.D., 1990.- Monomeric and dimeric phenolic constituents of plant cell walls-Possible factors influencing wall biodegradability. **J. Sci. Food Agric.**, **51**: 163-170.
- FALES H.M., JAOUNI T.M. et BABASHAK J.K., 1973.- Simple device for preparing ethereal diazomethane without resorting to codistillation. **Anal. Chem.**, **45**: 2302-2303.
- FANUTTI C., GIDLEY M. J. and REID J. S. G., 1991.- A xyloglucan-oligosaccharide-specific α -D-xylohydrolase from germinated nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seeds. **Planta**, **184**: 137-147.
- FARKAS V., and MACLACHLAN G., 1988.- Stimulation of pea 1,4-B-glucanase activity by oligosaccharides derived from xyloglucan. **Carbohydr. Res.**, **184**: 213-219.
- FEATHER M.S., and HARRIS J.F., 1973.- Dehydration reactions of carbohydrates. Dans: **Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.**, vol**28**: 161-224. Tipson R.S. and Horton D. (eds.) ; Acad. Press Inc., N-Y, London.
- FERRIER R.J., 1988.- The synthesis and reactions of monosaccharide derivatives. Dans: **Carbohydrate chemistry**, Kennedy J.F. (ed.). Clarendon press-Oxford Univ. press, Oxford. **443-499**.
- FINCHER G.B., STONE B.A., and CLARKE A.E., 1981.- Metabolism of noncellulosic polysaccharides. Dans: **Plant Carbohydrates II**; pp. 68-132. Tanner W. and Loewus F.A., (eds) ; Springer-Verlag ; Berlin, Heidelberg, New York.
- FINCHER G.B., STONE B.A. and CLARKE A. E., 1983.- Arabinogalactan-proteins: Structure, Biosynthesis, and Function. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, **34**: 47-70.
- FINNE J., KRUSIUS T., and RAUVALA H., 1980. - Use of potassium tert-butoxide in methylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, **80**: 336-339.
- FRANZ G., 1972. - Polysaccharide metabolism in the cell walls of growing *Phaseolus aureus* seedlings. **Planta**, **102**:334-347.
- FRY S.C., 1979.- Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. **Planta**, **146**: 343-351.
- FRY S.C., 1982a.- Phenolic components of the primary cell wall. Feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharides. **Biochem. J.**, **203**: 493-504. ;
- FRY S.C., 1982b.- Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell wall glycoprotéin. **Biochem. j.**, **204**: 449-455.
- FRY S.C., 1983.- Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. **Planta**, **157**: 111-123.
- FRY S.C., 1986a.- Cross- linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, **37**: 165-186.
- FRY S.C., 1987a - Formation of isodityrosine by peroxydase isoenzymes. **J. Exp. Bot.**, **38**: 853-862.
- FRY S.C., 1987b - Intracellular feruloylation of pectic polysaccharides. **Planta**, **171**: 215-211.
- FRY S.C., 1988.- The Growing Plant Cell Wall: Chemical and metabolic analysis. **Monographs and Survey in the Biosciences**. Longman Scientific and Technical. Harlow, Essex, UK.
- FRY S.C., 1989a.- The structure and functions of xyloglucan. **J. Experiment. Bot.**, **210**: 1-11.

- FRY S.C., 1989b.- Analysis of cross-links in the growing cell walls of higher plants. Dans: Plant fibers. **Modern methods of plant analysis**, 10: 12-36, Linskens H.F. and Jackson J.F. (eds); Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- GAHAN P.B., and BELLANI L.M., 1984.- Identification of shoot apical meristem cells committed to form vascular elements in *Pisum sativum* L. and *Vicia faba* L.. **Ann. Bot.**, 54: 837-841.
- GAILLARD B.D.E., 1965.- Comparison of the hemicelluloses from plants belonging to two different plant families. **Phytochem.**, 4: 631-634.
- GAMINI A., de BLEIJSER J., and LEYTE J.C., 1991. Physico-chemical properties of aqueous solutions of xanthan: An n.m.r. study. **Carbohydr. Res.**, 220: 33-47.
- GARDNER K.H., and BLACKWELL J., 1974.- **Biopolymers**, 13: 1975-2001.
- GEISSMAN T., and NEUKOM H., 1973.- A note on ferulic acid as a constituent of the water-insoluble pentosans of wheat flour. **Cereal Chem.**, 50: 414-416.
- GOLDBERG R., GILLOU L., PRAT R., HERVE DU PENHOAT C., and MICHON V., 1991.- Structural features of the cell-wall polysaccharides of *Asparagus officinalis* seeds. **Carbohydr. Res.**, 210: 263-276.
- GRASDALEN H., and PAINTER T., 1980.- N.M.R. studies of composition and sequence in legume-seed galactomannans. **Carbohydr. Res.**, 81: 59-66.
- GRAY G.R., 1987. - Reductive cleavage of permethylated polysaccharides. **Methods enzymol.**, 138: 26-38.
- GRIFFITHS A.J., and KENNEDY J.F., 1988.- Biotechnology of polysaccharides. Dans: **Carbohydrate chemistry**, Kennedy J.F. (ed.). Clarendon press-Oxford Univ. press, Oxford. 42-72.
- GRIGNON S., 1974.- Etude des flux et de la distribution endocellulaire du potassium chez les cellules libres d'*Acer pseudoplatanus* L. **Thèse Doct. Sci. Nat., Paris**, 300 p.
- GRUBER P.R., and GRAY G.R., 1990.- Isolation and analysis by the reductive-cleavage method of linkage positions and ring forms in the *Mycobacterium smegmatis* cell-wall arabinogalactan. **Carbohydr. Res.**, 203: 79-90.
- GUILLON F., and THIBAULT J.-F., 1989.- Methylation analysis and mild acid hydrolysis of the "hairy" fragments of sugar-beet pectins. **Carbohydr. Res.**, 190: 85-96.
- GUILLON F., and THIBAULT J.-F., 1990.- Oxidative cross-linking of chemically and enzymatically modified sugar-beet pectin. **Carbohydr. Polym.**, 12: 353-374.
- GUPTA A.K. et BEMILLER J.N., 1990.- A galactomannan from *Crotalaria medicaginea* seeds. **Phytochem.**, 29(3): 853-855.
- HAKOMORI S.-I., 1964.- A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharides catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. **J. Biochem.**, 2: 205-208.
- HAMALAINEN M.D., THEANDER O., NORDKVIST E., and TERNRUD I.E., 1990.- Multivariate calibration in the determination of acetylated aldoses by g.l.c.. **Carbohydr. Res.**, 207: 167-175.
- HANNESSIAN S., 1971.- Mass spectrometry in the determination of structure of certain natural products containing sugars. **Methods Biochem. Anal.**, 19: 105-228.
- HARRIS P.J., HENRY R.J., BLAKENEY A.B., and STONE B.A., 1984.- An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, 127: 59-73.
- HAYASHI T., KATO Y., and MATSUDA K., 1980.- Xyloglucan from suspension-cultured soybean cells. **Plant Cell Physiol.**, 21: 1405-1418.
- HAYASHI T., and MACLACHLAN G., 1984.- Pea Xyloglucan and Cellulose. I: Macromolecular organization. **Plant Physiol.**, 75: 596-604.

- HAYASHI T., WONG Y.-S., and MACLACHLAN G., 1984.- Pea Xyloglucan and Cellulose. II: Hydrolysis by pea endo-1,4- β -glucanases. **Plant Physiol.**, 75: 605-610.
- HAYASHI T., POLONENKO D.R., CAMIRAND A., and MACLACHLAN G., 1986.- Pea xyloglucan and cellulose. IV. Assembly of β -D-glucans by pea protoplasts. **Plant Physiol.**, 82: 301-306.
- HAYASHI T., 1989a.- Xyloglucans in the primary cell wall. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 40: 139-168.
- HAYASHI T., 1989b.- Measuring β -glucan deposition in plant cell walls. Dans: Plant fibers., Linskens H.F. and Jackson J.F. (eds); Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. **Modern methods of plant analysis**, 10: 138-160.
- HERVE DU PENHOAT C., MICHON V., and GOLDBERG R., 1987.- Development of arabinans and galactans during the maturation of hypocotyl cells of mung bean (*Vigna radiata*) Wilczek). **Carbohydr. Res.**, 165: 31-42.
- HOEBLER C., BARRY J.-L., DAVID A., and DELORT-LAVAL J., 1989.- Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, 37: 360-367.
- HOFFMANN R.A., KAMERLING J.P., and Vliegenthart J.F.G., 1992.- Structural features of a water-soluble arabinoxylan from the endosperm of wheat. **Carbohydr. Res.**, 226: 303-311.
- HORTON D., WANDER J.D., and FOLTZ R., 1974.- Analysis of sugar derivatives by chemical-ionization mass-spectrometry. **Carbohydr. Res.**, 36: 75-96.
- HRICOVINI M., SLAVOMIR B., and MALOVIKOVA A., 1991.- Conformations of (1-4)-linked α -D-galacturono-di- and -tri-saccharides in solution analysed by n.m.r. measurements and theoretical calculations. **Carbohydr. Res.**, 220: 23-31.
- IYAMA K., LAM T.B.T., and STONE B.A., 1990.- Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. **Phytochem.**, 29(3): 733-737.
- INOUE Y., YAMAMOTO A., and NAGASAWA K., 1987.- Depolymerization of pectin with diazomethane in the presence of a small proportion of phosphate buffer. **Carbohydr. Res.**, 161: 75-90.
- ISHII T., THOMAS J., DARVILL A., and ALBERSHEIM P., 1989.- Structure of plant cell walls. XXVI. The walls of suspension-cultured sycamore cells contain a family of rhamnogalacturonane-I-like pectic polysaccharides. **Plant Physiol.**, 89: 421-428.
- ISHII T., and HIROI T., 1990a.- Isolation and characterization of feruloylated arabinoxylan oligosaccharides from bamboo shoot cell-walls. **Carbohydr. Res.**, 196: 175-183.
- ISHII T., and HIROI T., 1990b.- Linkage of phenolic acids to cell-wall polysaccharides of bamboo shoot. **Carbohydr. Res.**, 206: 297-310.
- ISHII T., 1991.- Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls. **Carbohydr. Res.**, 219: 15-22.
- JANSSON P.E., KENNE L., LIEGREN H., LINDBERG B., and LONNGREN J., 1976.- A practical guide to the analysis of carbohydrate. **Chem. Commun. Univ. Stockholm**, 8: 1-75.
- JARVIS M.C., 1982.- The proportion of calcium-bound pectin in plant cell walls. **Planta**, 154: 344-346.
- JARVIS M.C., 1984.- Structure and properties of pectine gels in plant cell walls. **Plant Cell Environ.**, 7: 153-164.
- JONES T. M., and ALBERSHEIM P., 1972.- A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. **Plant Physiol.**, 49: 926-936.

- JOSELEAU J.-P., CHAMBAT G., VIGNON M., and BARNOUD F., 1977.- Chemical and ^{13}C -N.M.R. studies on two arabinans from the inner bark of young stems of *Rosa glauca*. **Carbohydr. Res.**, **58**: 165-175.
- JOSELEAU J.-P., 1980.- Les hémicelluloses. Dans: **Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés**, pp 87-121. Monties B. et al, Gauthier-Villars, Bordas Paris.
- JOSELEAU J.-P., CHAMBAT G., and CHUMPITAZI-MERMOZA B., 1980.- Solubilisation of cellulose and other plant structural polysaccharides in 4-methylmorpholine-N-oxide (MMNO): an improved method for the study of cell wall constituents. **Carbohydr. Res.**, **90**: 339-344.
- JOSELEAU J.-P., and CHAMBAT G., 1984a.- Structure of the primary cell walls of suspension-cultured *Rosa glauca* cells. II. Multiple forms of xyloglucans. **Plant Physiol.**, **74**: 694-700.
- JOSELEAU J.-P., and CHAMBAT G., 1984b.- ^{13}C -N.M.R. spectroscopy to identify complex polysaccharide fractions from the plant cell wall. **Physiol. Vég.**, **22(4)**: 461-470.
- JOSELEAU J.-P., FAIK A., CHAMBAT G. and RUEL K., 1992. - Elicitation activity of xyloglucan fragments on *Rubus fruticosus* cells in suspension. Dans : **Sixth Cell Wall Meeting**, August 25-28, Nijmegen, the Netherlands. Sassen M.M.A., Derksen J.W.M., Emons A.M.C. and Wolters-Arts (Eds) ; University Press, Nijmegen. **Book of Abstracts** p. 213
- KAMERLING J.P., GERWIG G.S., VLIEGENTHART J.F.G., and CLAMP J.R., 1975.- Characterization by gas liquid chromatography mass spectrometry of pertrimethylsilyl glycosides obtained in methanolysis of glycoproteins and glycolipids. **Biochem. J.**, **151**: 491-495.
- KAMISAKA S., TAKEDA S., TAKAHASHI K., and SHIBATA K., 1990.- Diferulic and ferulic acid in the cell wall of *Avena coleoptiles*- Their relationships to mechanical properties of the cell wall. **Physiol. Plant.**, **78**: 1-7.
- KANARI M., TOMODA M., GONDA R., SHIMIZU N., KIMURA M., KAWAGUCHI M., and KAWABE C., 1989.- A reticuloendothelial system-activating arabinoxylan from the bark of *Cinnamomum cassia*. **Chem. Pharm. Bull.**, **37(12)**: 3191-3194.
- KATO K., WATANABE F., and EDA S., 1977a.- An arabinogalactan from extracellular polysaccharides of suspension-cultured tobacco cells. **Agric. Biol. Chem.**, **41**: 533-538.
- KATO K., WATANABE F., and EDA S., 1977b.- Interior chains of glucuronomannan from extracellular polysaccharides of suspension-cultured Tobacco cells. **Agric. Biol. Chem.**, **41**: 539-542.
- KATO Y., and MATSUDA K., 1980-a.- Structure of oligosaccharides obtained by controlled degradation of mung bean xyloglucan with acid and *Aspergillus oryzae* enzyme preparation. **Agric. Biolog. Chem.**, **44**: 1751-1758.
- KATO Y., and MATSUDA K., 1980-b.- Structure of oligosaccharides obtained by hydrolysis of mung bean xyloglucan with *Trichoderma viride* cellulase. **Ibid.**, **44**: 1759-1766.
- KATO Y., and MATSUDA K., 1985a.- Acidic arabinoxylan as an extracellular polysaccharides of suspension-cultured soybean cells. **Plant and Cell Physiol.**, **26**: 287-294.
- KATO Y., and MATSUDA K., 1985b.- Xyloglucan in cell walls of suspension-cultured rice cells. **Plant and Cell Physiol.**, **26**: 437-445.
- KEEGSTRA K., TALMADGE K.W., BAUER W.D., and ALBERSHEIM P., 1973.- The Structure of Plant Cell Walls. III: A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnection of the macromolecular components. **Plant Physiol.** **51**: 188-196.
- KENNEDY J.F., and WHITE C.A., 1988a.- The plant, algal, and microbial polysaccharides. Dans: **Carbohydrate chemistry**, Kennedy J.F. (ed.). Clarendon press-Oxford Univ. press, Oxford. 3-41.

- KENNEDY J.F., and WHITE C.A., 1988b.- The plant, algal, and microbial polysaccharides. Dans: **Carbohydrate chemistry**, Kennedy J.F. (ed.). Clarendon press-Oxford Univ. press, Oxford. **220-262**.
- KIEFER L.L., YORK W.S., DARVILL A.G., and ALBERSHEIM P., 1989.- Xyloglucan isolated from suspension-cultured sycamore cell walls is O-acetylated. **Phytochem.**, **28(8)**: 2105-2107.
- KIEFER L.L., YORK W.S., ALBERSHEIM P., and DARVILL A.G., 1990.- **Carbohydr. Res.**, **197**: 139-158.
- KIYOHARA H., and YAMADA H., 1989.- Structural analysis of pectic polysaccharides by base-catalysed b-elimination in the presence of sodium borodeuteride. **Carbohydr. Res.**, **187**: 117-129.
- KNEE and BARTLEY I.M., 1981. - Composition of metabolism of cell wall polysaccharides in ripening fruits. Dans : Recent Advances in the biochemistry of fruits and vegetables, Friend J. and Rhodes M.J.C. (eds.), Academic press, New-York, **133-148**.
- KNOX J.P., DAY S. and ROBERTS K., 1989.- A set of cell surface glycoproteins forms an early marker of cell position, but not cell type, in the root apical meristem of *Daucus carota* L.. **Development**, **106**: 47-56.
- KNOX J.P., LINSTEAD P.J., KING J., COOPER C., and ROBERTS K., 1990.- Pectin esterification is spatially regulated both within cells walls and between developing tissues of root apices. **Planta**, **181**: 512-521.
- KOCHETKOV N.K. and CHIZHOV O.S., 1966. Mass spectrometry of carbohydrate derivatives. Dans: Advance in carbohydrate chemistry, Wolfrom M.L. and Tipson R.S. (eds). **Acad. press New-York and London**, **39-93**.
- KOMALAVILAS P., and MORT A.J., 1989.- The acetylation at O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. **Carbohydr. Res.**, **189**: 261-272.
- KONNO Yamasaki and KATOH K., 1986. - Enzymatic degradation of pectic substances and cell walls purified from carrot cell cultures. **Phytochem.**, **25**: 623-627.
- KOOIMA P., 1960.- On the occurrence of amyloids in plant seeds. **Acta Bot. Néer.**, **9**: 208-219.
- KORT M.J., 1970.- Reactions of free sugars with aqueous ammonia. Dans: **Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.**, vol. **25**: 311-349. Tipson R.S. and Horton D. (eds.) ; Acad. Press Inc., N-Y, London.
- KUO M.-S., and MORT A.J., 1986.- Location and identity of the acyl substituents on the extracellular polysaccharides of *Rhizobium trifolii* and *Rhizobium leguminosarum*. **Carbohydr. Res.**, **145**: 247-265.
- LABAVITCH J.M., and RAY P.M., 1974.- Relationship between promotion of xyloglucan metabolism and induction of elongation by IAA. **Plant Physiol.**, **54**: 499-502.
- LABAVITCH J.M., 1981.- Cell wall turn-over in plant development. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, **32**: 385-406.
- LAMPORT D.T.A., 1967.- Hydroxyproline-O-glycosidic linkage of plant glycoprotein extensine. **Nature**, **216**: 1322-1324.
- LAMPORT D.T.A., 1970.- Cell wall metabolism. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, **21**: 235-270.
- LAMPORT D.T.A. and MILLER D.H., 1971.- Hydroxyproline arabinosides in the plant kingdom. **Plant Physiol.**, **48**: 454-456.
- LAMPORT D.T.A. and CATT J.W., 1981. - Glycoproteins and enzymes of the cell walls. Dans : Encyclopedia of plant physiology vol. VIII B : Plant carbohydrates II : extracellular carbohydrates, Tanner W. and Loewus F.A. (eds), Springer - Verlag, Berlin, **133-165**.

- LAMPORT D.T.A., and EPSTEIN L., 1983.- A new model for the primary cell wall: a concatenated extensin-cellulose network. Dans: Randall DD, Blevins DG, Larson RL, Rapp BJ (eds). **Current topics in plant biochemistry and physiology**. University of Missouri, Columbia, Missouri, pp73-83.
- LAU J.M., McNEIL M., DARVILL A.G., and ALBERSHEIM P., 1985.- Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. **Carbohydr. Res.**, 137: 111-125.
- LAU J.M., McNEIL M., DARVILL A.G., and ALBERSHEIM P., 1987-a.- Selective degradation of the glycosyluronic acids in complex carbohydrates by lithium dissolved in ethylenediamine. **Carbohydr. Res.**, 168: 219-243.
- LAU J.M., McNEIL M., DARVILL A.G., and ALBERSHEIM P., 1987-b.- Structure of plant cell walls. XX. Treatment of rhamnogalacturonan I with lithium in ethylenediamine. **Carbohydr. Res.**, 168: 245-274.
- LAU J.M., McNEIL M., DARVILL A.G., and ALBERSHEIM P., 1988.- Enhancement of protonated molecular ions and ammonium molecular ion complexes in direct-liquid-introduction-mass spectrometry of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, 173: 101-111.
- LESCURE A. M., 1996.- Etude quantitative de la croissance d'une culture d'*Acer pseudoplatanus* L. **Physiol. Vég.**, 4: 367-378.
- LEVER M., 1972.- A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Anal. Biochem.**, 47: 273-279.
- LHERNOULD S., KARAMANOS Y., BOURGERIE S., STRECKER G., JULIEN R. and MORVAN H., 1992.- Peptide-N⁴-(N-acetylglucosaminyl)asparagine amidase (PNGase) activity could explain the occurrence of extracellular xylomannosides in a plant cell suspension. **Glycoconjugate J.**, 9: 191-197.
- LINDBERG B., LONNGREN J., and TLOMPSON J.L., 1973.- Degradation of polysaccharides containing uronic acid residues. **Carbohydr. Res.**, 28: 351-357.
- LINDBERG B., and LONNGREN J., 1978.- Methylation analysis of complex carbohydrates: General procedure and application for sequence analysis. **Methods Enzymol.**, 50: 3-33.
- LLAMAZARES J., ACEBES J.L., and ZARRA I., 1987.- Cell wall autolysis in *Pinus pinaster* aiton hypocotyls. Enzymatic activities involved. **J. Plant Physiol.**, 127: 11-22.
- LLOYD L.L., WARNER F.P., KENNEDY J.F., and RIVERA Z.S., 1991.- Cellulose molecular weights by GPC/LiCl-DMAC solvent system. **Europ. Chromatog. Anal.**, vol??: 11-13.
- LOEWUS F.A., 1990.- Cyclitols. Dans: **Methods in plant biochemistry**, Dey P.M. & Harborne J.B. (eds); vol.2 **Carbohydrates**, Dey P.M. (ed): 219-233; Academic Press, London.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR L., and RANDALL R.J., 1951.- Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275.
- MANKARIOS A.T., HALL M.A., JARVIS M.C., THRELFALL D.R., and FREIND J., 1980.- Cell wall polysaccharides from onion. **Phytochem.**, 19: 1731-1733.
- MANTE S., and BOLL W.G., 1975.- Comparison of growth and extracellular polysaccharide of cotyledon cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv Contender) growth in coconut milk and synthetic medium. **Can. J. Bot.**, 53: 1542-1548.
- MANTE S., and BOLL W.G., 1978.- Effect of either 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or kinetin on production and composition of various fractions from extracellular polysaccharides produced by cotyledon cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender). **Can. J. Bot.**, : 1816-1822.
- MANZI A.E., and CEREZO A. S., 1984.- The galactomannan-like oligosaccharides from the endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*. **Carbohydr. Res.**, 134: 115-131.

- MANZI A.E., CEREZO A. S., and SHOOLERY J. N., 1986.- High resolution ^{13}C -N.M.R. spectroscopy of legume-seed galactomannans. **Carbohydr. Res.**, 148: 189-197.
- MARCHESSAULT R.H., and SUNDARARAJAN P.R., 1983.- Cellulose. Dans: **The Polysaccharides**, vol.2, (Aspinall G.O., ed.), Academic Press ; New York, London, 11-95.
- MARGA F., 1990.- Effets stimulateurs des oligogalacturonates sur l'excrétion de polysaccharides acides par la suspension cellulaire de silène. **Can. J. Bot.**, 68: 1833-1839.
- MASSIOT P., and THIBAUT J.-F., 1989.- Enzymic analysis of carrot cell-wall polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, 190: 121-136.
- MASUDA H., OZEKI Y., AMINO S. and KOMAMINE A., 1984.- Changes in cell wall polysaccharides during elongation in a 2,4-D free medium in a carrot suspension culture. **Plant. physiol.**, 62: 65-72.
- MATHESON N.K., 1990.- Mannose-based polysaccharides. Dans: **Methods in plant biochemistry**, vol.2, **Carbohydrates**, Dey P.M. (ed) ; (Dey P.M. & Harborne J.B., eds). Academic Press, London, 371-413.
- McCOMB E.A., and McCREADY R.M., 1957.- Determination of acetyl in pectin and acetylated carbohydrate polymers. **Anal. Chem.**, 29: 818-821.
- McDUGALL G.J., and FRY S.C., 1988.- Inhibition of auxin-stimulated growth of pea stem segments by a specific nonasaccharide of xyloglucan. **Planta**, 175: 412-416.
- McDUGALL G.J., and FRY S.C., 1989.- Structure-activity relationships for xyloglucan oligosaccharides with antiauxin activity. **Plant Physiol.**, 89: 883-887.
- McDUGALL G.J., and FRY S.C., 1990.- Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase: Evidence for a role of cellulase in cell expansion. **Plant Physiol.**, 93: 1042-1048.
- McDUGALL G.J., and FRY S.C., 1991.- Xyloglucan nonasaccharide, a naturally-occurring oligosaccharin, arises in vivo by polysaccharide breakdown. **J. Plant Physiol.**, 137: 332-336.
- McNEIL M., ALBERSHEIM P., TAI Z L., and JONES R.L., 1975.- The structure of plant cell walls. VII. Barley aleurone cells. **Plant Physiol.**, 55: 64-68.
- McNEIL M., DARVILL A.G., and ALBERSHEIM P., 1979.- The Structural Polymers of the Primary Cell Walls of Dicots. Dans: **Fortschritte d. Chem. org. Naturst.**, Vol37, Herz W., Grisebach H., and Kirby G.W., (eds). Springer-Verlag, New York, 191-249.
- McNEIL M., DARVILL A.G., and ALBERSHEIM P., 1980.- Structure of plant cell walls. X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiol.**, 66: 1128-1134.
- McNEIL M., DARVILL A.G., FRY S.C., and ALBERSHEIM P., 1984.- Structure and Function of the Primary Cell Walls of Plants. **Ann. Rev. Biochem.**, 53: 625-663.
- MONTIES B., CATESSON A. M., ROLAND J. C., BARNOUD F., JOSELEAU J. P. TOLLIER M. T., MERCIER C. THIBAUT J. F., METCHE M., DE LESTANG-BREMOND G. and JANIN G., 1980.- Dans: **Les polymères végétaux- polymères pariétaux et alimentaires non azotés**. Monties B.; Ed., Gauthier-Villars, Paris
- MISAWA M., 1980.- Industrial and government research. Dans: **Plant tissue culture as a source of biochemicals**, (STABA E. J. , ed.), C.R.C. Press, 167-190.
- MONTREUIL J., and SPIK G., 1963.- Microdosage des glucides, Fasc.1: **Methodes colorimétriques de dosages des glucides totaux**. Laboratoire de Chimie Biologique, Fac. Sci., éd., Lille, 148p.
- MONTREUIL J., and SPIK G., 1968.- Microdosage des glucides, Fasc.2.: **Methodes chromatographiques et électrophorétiques de dosage des glucides constituant les glycoprotéines**. Laboratoire de Chimie Biologique, Fac. Sci., éd., Lille, 268p.

- MONTREUIL J., BOUQUELET S., DEBRAY H., FOURNET B., SPIK G. and STRECKER G., 1986.- Glycoproteins. Dans: **"Carbohydrate analysis, a practical approach"**. Chaplin M.F. & Kennedy J. F. (Eds) ; IRL Press, Oxford, Washington DC. 143-204.
- MOORE Jr. T.M., 1973.- An extracellular macromolecular complex from the surface of soybean suspension cultures. **Plant Physiol.** 51: 529-536.
- MOORE P.J., DARVILL A.G., ALBERSHEIM P. and STAEHELIN A., 1986.- Immunogold localization of xyloglucan and rhamnogalacturonan I in the cell walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiol.**, 82: 787-794.
- MOORE P.J. and STAEHELIN A., 1988.- Immunogold localization of the cell wall matrix polysaccharides rhamnogalacturonan I and xyloglucan during cell expansion and cytokinesis in *Trifolium pratense* L. ; implication for secretory pathways. **Planta**, 174: 433-445.
- MORI M. and KATO K., 1981.- An arabinoglucuronomannan from suspension-cultured cells of *Nicotiana tabacum*. **Carbohydr. Res.**, 91: 49-58.
- MORRE D.J., and MOLLENHAUER H.H., 1974.- The endomembrane concept: a functional integration of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Dans: **Dynamic aspects of plant ultrastructure**, (Robards A.W. (ed) ; McGraw Hill, New York, 84-137.
- MORRE D.J., KARTENBECK J., and FRANKE W.W., 1979.- Membrane flow and interconversions among endomembranes. **Biochem. Biophys. Acta**, 559: 71-152.
- MORRIS M. R, AND NORTHCOTE D. H. , 1977.- Influence cations at the plasma membrane in controlling polysaccharides secretion from sycamore suspension cells. **Biochem. J.**, 166: 603-618.
- MORT A.J., and BAUER W.D., 1982.- Application of two new methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharide fragments. Structure of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum* that bind soybean lectin. **J. Biol. Chem.**, 257: 1870-1875.
- MORT A.J., KOMALAVILAS P., MANESS N., RYAN J., MOERSBACHER B., and AN J., 1988.- Dans: **"XIV International Carbohydrate Symposium, Stockholm"**, Abstract A6.
- MORVAN H., 1982.- Libération de polymères pectiques acides au cours de la croissance de suspensions cellulaires de silène. **Physiol. Vég.**, 20: 671-678.
- MORVAN H., 1986.- Etude de quelques propriétés des polymères pectiques acides excrétés dans le milieu de culture par la suspension cellulaire de silène (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause). **Thèse Doct. ès Sci. Nat.**, p117, 239 p.
- MUELLER-HARVEY I., HARTLEY R.D., HARRIS P.J., and CURZON E.H., 1986. - Linkage of p-coumaryl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. **Carbohydr. Res.**, 148: 71-85.
- NARUI T., IWATA S., TAKAHASHI K., and SHIBATA S., 1987.- Partial hydrolysis of α -glucans with the presence of 1,1,3,3-tetramethylurea. **Carbohydr. Res.**, 170: 269-273.
- NAZIH E.-H., 1988.- Isolement, purification et identification d'oligosaccharides à partir du milieu de culture de la suspension cellulaire de *Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause. **DEA**, 36 p.
- NIWA T., YAMADA K., OHKI T., and SAITO A., 1984.- Identification of 6-deoxygulitol in human urine. Electron-impact mass spectra of eight isomers of 6-deoxyhexitol. **J. Chrom. Biomed. Appl.**, 336: 345-350.
- NISHITANI K., and MASUDA Y., 1979.- Growth and cell wall changes in azuki bean epicotyls. I. Changes in wall polysaccharides during intact growth. **Plant Physiol.**, 20: 63-74.
- NISHITANI K., and NEVINS ,1989.- Enzymatic analysis of feruloylated arabinoxylans (feraxan) derived from *Zea mays* cell walls. **Plant Physiol.**, 91: 242-248.

- NORTHCOTE D.H., 1963.- The biology, and chemistry of the cell walls of higher plants, Algae and fungi. *Int. Rev. Cyt.*, **14**: 223-265.
- NORTHCOTE D.H., 1972- Chemistry of the plant cell wall. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **23**: 113-132.
- NOTHNAGEL E.A., Mc NEIL M., ALBERSHEIM P. and DELL A., 1983.- Host-pathogen integrations. XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. *Plant. Physiol.*, **71**: 916-926.
- O'BRIEN T.P., 1972.- The cytology of cell-wall formation in some eukariotic cells. *Bot. Rev.*, **38**: 87-118.
- ODOMAZIG P., BADGA D., EBRINGEROVA A., and ALFODI J., 1992.- Structures of pectic polysaccharides isolated from the Siberian apricot (*Armeniaca siberica* Lam). *Carb. Res.*, **226**: 353-358.
- O'DWYER M.J., 1926.- *Biochem. J.* **20**: 656.
- O'NEILL M.A., and SELVENDRAN R.R., 1985.- Structure analysis of the xyloglucan from *Phaseolus coccineus* cell-walls using cellulase-derived oligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, **145**: 45-58.
- O'NEILL M., ALBERSHEIM P., and DARVILL A., 1990.- The pectic polysaccharides of primary cell walls. Dans: *Methods in plant biochemistry*, Dey P.M. & Harborne J.B. (eds); **vol.2 Carbohydrates**, Dey P.M. (ed): 415-441; Academic Press, London.
- OPARKA K.J., PRIOR D.A.M., and HARRIS N., 1990.- Osmotic induction of fluid-phase endocytosis in onion epidermal cells. *Planta*, **180**: 555-561.
- PAUL R.E., and JONES R.L., 1976.- Studies on the secretion of maize root cap slime. V. The cell wall as a barrier to secretion. *Z Pflanzenphysiol.*, **79**: 154-164.
- PAZ PARENTE J., CARDON P., LEROY Y., MONTREUIL J., FOURNET B., and RICART G., 1985.- A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.*, **141**: 41-47.
- PENNARUM A. M., 1980.- Mécanisme de la distribution endocellulaire des ions sodium dans les cellules libres d'*Acer pseudoplatanus* L. *Thèse Doct. Sci. Nat.*, Paris, 334 p.
- POPE D.G., 1977.- Relationships between hydroxyproline-containing proteins secreted into the cell wall and medium by suspension- cultured *Acer pseudoplatanus* cells. *Plant. Physiol.*, **59**: 894-900.
- POSTERNAK T., 1962.- "Les Cyclitols", Hermann, Paris.
- POWELL D.A., MORRIS E.R., GIDLEY M.J., and REES D.A., 1982.- Conformation and interactions of pectins. II: Influences of residue sequence on chain association in solution. *J. Mol. Biol.*, **155**: 517-531.
- PRESTON R.D., 1974.- *The physical biology of plant cell walls*. London: Chapman and Hall ; pp 491 .
- PRHEM P., 1980.- Methylation of carbohydrates by methyl-trifluoromethanesulfonate in trimethyl phosphate. *Carbohydr. Res.*, **78**: 372-374.
- PRIEM B., 1990. Contribution à l'étude structurale et fonctionnelle d'oligosaccharides végétaux: les acides oligogalacturoniques et les oligosaccharides extracellulaires de la suspension cellulaire de silène. Thèse de doctorat de l'université de Lille, 166 p.
- PRIEM B., SOLOK WAN J., WIERUSZESKI J.M., STRECKER G., NAZIH H., and MORVAN H., 1990. Isolation and characterization of free glycans of the oligomannoside type from the extracellular medium of a plantcell suspension. *Glycoconjugate J.*, **7**: 121-132.
- REDGWELL R.J., O'NEILL M.A., SELVENDRAN R.R., and PARSLEY K.J., 1986.- *Carbohydr. Res.*, **153**: 97-106.

- REDGWELL R.J., O'NEILL M.A., SELVENDRAN R.R., and PARSLEY K.J., 1986-b.- **Carbohydr. Res.**, 153: 107-118.
- REDGWELL R.J., and SELVENDRAN R.R., 1986.- Structural features of cell wall polysaccharides of onion, *Allium cepa*. **Carbohydr. Res.**, 157: 183-199.
- REDGWELL R.J., MELTON L.D., and BRASCH D.J., 1988.- Cell-wall polysaccharides of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*): Chemical features in different zones of fruit at harvest. **Carbohydr. Res.**, 182: 241-258.
- REES D.A., 1982.- Polysaccharide conformations in solutions and gels. Recent results on pectins. **Carbohydr. Polymers**, 2: 254-263.
- REICHER F., CORREA J.B.C. and GORIN P.A.J., 1984.- Location of O-acetyl groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scabrella* (Bracatinga). A study of O-acetyl group migration. **Carbohydr. Res.**, 135: 129-140.
- REID J.S.G., 1989.- Analysis of carbohydrates conferring hardness on seeds. Dans: Plant fibers., Linskens H.F. and Jackson J.F. (eds); Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. **Modern methods of plant analysis**, 10: 295-312.
- REIS D., VIAN B., and ROLAND J. C., 1978.- In vitro and in vivo polysaccharide assembly. Ultrastructural and cytochemical study of growing plant cell wall components. 9th Int. Congr. Electron Microsc., Toronto, 2: 434-435.
- RENARD C.M.G.C., VORAGEN A.G.J., THIBAUT J.-F., and PILNIK W., 1990.- Studies on apple protopectin: I. Extraction of insoluble pectin by chemical means. **Carbohydr. Polym.**, 12: 9-25.
- REYNOLDS J. F. and MURASHIGE T., 1979.- **Plant cell lines. Methods in Enzymology**, vol. LVIII "Cell culture". by Jakoby W. B. and Pastan I. H., (eds.). 478-486.
- RIMINGTON C., 1931.- The carbohydrate complex of serum proteins. II: Improved method for isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from proteins of ox blood. **Biochem. J.**, 25: 1062-1071.
- ROLAND J.C., and VIAN B., 1981.- Use of purified endopolygalacturonase for a topochemical study of elongating cell walls at ultrastructural level. **J. Cell Sci.**, 48: 333-343.
- ROMBOUTS F.M., and THIBAUT J.-F., 1986a.- Feruloylated pectic substances from sugar-beet pulp. **Carbohydr. Res.**, 154: 177-187.
- ROMBOUTS F.M., and THIBAUT J.-F., 1986b.- Enzymic and chemical degradation and the fine structure of pectins from sugar-beet pulp. **Carbohydr. Res.**, 154: 189-203.
- ROUGIER M., 1981.- Secretory activity of the root cap. Dans: **Plant Carbohydrates II**. Tanner W. and Loewus F.A. (eds); Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York.; pp. 542-574.
- RUEL K. et JOSELEAU J.-P., 1984.- Use of enzyme-gold complexes for the ultrastructural localization of hemicelluloses in the plant cell wall. **Histochemistry**, 81: 573-580.
- RYDEN P. and SELVENDRAN R.R., 1990.- Structural features of cell-wall polysaccharides of potato (*Solanum tuberosum*). **Carbohydrate Research**, 195: 257-272.
- SASAKI K., and NAGAHASHI G., 1989.- Autolysis-like release of pectic polysaccharides from regions of cell walls other than the middle lamella. **Plant Cell Physiol.**, 30 (8): 1159-1169.
- SAULNIER L., 1987. Etude structurale des substances pectiques de la pulpe de raisin (Carignan rouge). Thèses de troisième cycle de l'université Paul Sabatier (Toulouse), 104p.
- SAULNIER L., BRILLOUET J.-M., MOUTOUNET M., HERVE DU PENHOAT C., and MICHON V., 1992.- New investigations of the structure of grape arabinogalactan-protein. **Carbohydr. Res.**, 224: 219-235.

- SAWARDEKER J.S., SLONEKER J.H., and JEANES A., 1965.- Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. **Anal. Chem.**, 37: 1602-1604.
- SCHOLS H.A., GERAEDS C.C.J.M., LEEUWEN M.F.S.;-V., KORMELING F.J.M., and VORAGEN A.G.J., 1990a.- Rhamnogalacturonase: a novel enzyme that degrades the hairy regions of pectins. **Carbohydr. Res.**, 206: 105-115.
- SCHOLS H.A., POSTHUMUS M.A., and VORAGEN A.G.J., 1990b.- Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process. **Carbohydr. Res.**, 206: 117-129.
- SELVENDRAN R.R., 1985.- Developpements in the Chemistry and Biochemistry of Pectic and Hemicellulosic Polymers. **J. Cell Sci. Suppl.**, 2: 51-88.
- SELVENDRAN R.R., and KING S.E., 1989.- Strutural features of the cell-wall polysaccharides of the parchent layers of the pods of mature runner beans. **Carbohydr. Res.**, 195: 87-99.
- SELVENDRAN R.R., and RYDEN P., 1990.- Isolation and analysis of plant cell walls. Dans: **Methods in plant biochemistry**, Dey P.M. & Harborne J.B. (eds), vol.2 **Carbohydrates**, Dey P.M. (ed), 443-579; Academic Press, London.
- SEYMOUR G.B. and HARDING S.E., 1987.- Analysis of the molecular size of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruit polyuronides by gel filtration and low-speed sedimentation equilibrium. **Biochem. J.**, 245: 463-466.
- SEYMOUR F.R., UNRUH S.L., and NEHLICH D.A., 1989.- Quantitation of free sugars in plant tissue by g.l.c. of their peracetylated aldononitrile and ketoxime derivatives. **Carbohydr. Res.**, 191: 175-189.
- SEYMOUR G.B., COLQUHOUN I.J., DUPONT M.S., PARSLEY K.R. and SELVENDRAN R.R., 1990. Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. **Phytochem.**, 29(3): 725-731.
- SHAW P.E., TATUM J.H., and BERRY R.E., 1968.- Base-catalyzed fructose degradation and its relation to nonenzymic browning. **J. Agr. Food Chem.**, 16(6): 979-982.
- SMITH J.J., MULDOON E.P., and LAMPORT D.T.A., 1984.- Isolation of extensine precursors by direct elution of intact tomato cell suspension cultures. **Phytochem.**, 23: 1233-1240.
- SMITH R. C., and FRY S. C., 1991.- Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. **Biochem. J.**, 279: 529-535
- SOMOGYI M., 1952.- Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.**, 195: 19-23.
- SPELLMAN M.W., McNEIL M., DARVILL A.G., and ALBERSHEIM P., 1983.- Characterization of a structural complex heptasaccharide isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. **Carbohydr. Res.**, 122: 131-153.
- SRIVASTAVA R., and KULSHRESHTHA K., 1989.- Bioactive polysaccharides from plants. **Phytochem.**, 28(11): 2877-2883.
- STEPHEN A.M., 1983.- Other plant polysaccharides. Dans: **The Polysaccharides**, vol.2, (Aspinall G.O., ed.), Academic Press ; New York, London, pp 97-193.
- STEVENS B.J.H., and SELVENDRAN R.R., 1984a.- Pectic polysaccharides of cabbage (*Brassica oleracea*). **Phytochem.**, 23(1): 107-115.
- STEVENS B.J.H., and SELVENDRAN R.R., 1984b.- Structural feature of cell-wall polymers of the apple. **Carbohydr. Res.**, 135: 155-166.
- STEVENSON T.T., Mc NEIL M., DARVILL A.G. and ALBERSHEIM P., 1986.- Structure of Plant Cell Walls: XVII. An analysis of the extracellular polysaccharides of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiol.**, 80: 1012-1019.

- STEVENSON T.T., DARVILL A.G., and ALBERSHEIM P., 1988.- **Carbohydr. Res.**, 179: 269-288.
- STURGEON C.M., 1988.- The synthesis of polysaccharide derivatives. Dans: **Carbohydrate chemistry**, Kennedy J.F. (ed.). Clarendon press-Oxford Univ. press, Oxford. 560-594.
- SUN H.H., WOOTEN J.B., RYAN W.S.J., BOKELMAN G.H., and AMAN P., 1987.- Structural characterization of a tobacco rhamnogalacturonan. **Carbohydr. Polymers**, 7: 143-158.
- SUZUKI Z., AMINO S.-I., TAKEUCHI Y., and KOMAMINE A., 1990.- Differences in the Composition of the Cell Walls of Two Morphologically Different Lines of Suspension-Cultured *Catharanthus roseus*. **Plant Cell Physiol.**, 31(1): 7-14.
- SWAMY N.R., and SALIMATH P.V., 1991.- Arabinans from *Cajanus cajan* cotyledon. **Phytochem.**, 30(1): 263-265.
- SWEELEY C.C., WELLS W.W., and BENTLEY R., 1966.- Gas chromatography of carbohydrates. **Methods Enzymol.**, 8: 95-108.
- SWEET D.P., ALBERSHEIM P., and SHAPIRO R.H., 1975a.- Partially ethylated alditol acetates as derivatives for elucidation of the glycosyl linkage-composition of polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, 40: 199-216.
- SWEET D.P., SHAPIRO R.H., and ALBERSHEIM P., 1975b.- Quantitative analysis by various g.l.c. response-factor theories for partially methylated partially ethylated alditol acetates. **Carbohydr. Res.**, 40: 217-225.
- SWORDS K.M.M., and STAEHELIN L.A., 1989.- Analysis of extensin structure in plant cell walls. Dans: Plant fibers, Linskens H.F. and Jackson J.F. (eds); Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. **Modern methods of plant analysis**, vol. 10: 219-231.
- TAIZ L., and HONIGMAN W. A., 1976.- Production of cell wall hydrolyzing enzymes by barley aleurone in response to gibberellic acid. **Plant Physiol. (Bethesda)**, 58: 380-386.
- TAIZ L., 1984.- Plant Cell Expansion: Regulation of cell wall. Mechanical properties. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, 35: 585-657.
- TAKEUCHI Y. and KOMAMINE A., 1978.- Changes in the composition of cell wall polysaccharides of suspension cultured *Vinca rosea* cells during culture. **Physiol. Plant.**, 42: 21-28.
- TAKEUCHI Y., KOMAMINE A., SAITO T., WATANABE K., and MORIKAWA N., 1980.- Turnover of cell wall polysaccharides of a *Vinca rosea* suspension culture. **Physiol. Plant.**, 48: 536-541.
- TAKEUCHI Y. and KOMAMINE A., 1980a.- Turnover of cell wall polysaccharides of a *Vinca rosea* suspension culture. I. Synthesis and degradation of cell wall components. **Physiol. Plant.**, 48: 271-277.
- TAKEUCHI Y. and KOMAMINE A., 1980b.- Turnover of cell wall polysaccharides of a *Vinca rosea* suspension culture. II. Turnover of arabinogalactan. **Physiol. Plant.**, 50: 113-118.
- TAKEUCHI Y., and KOMAMINE A., 1981.- Glucans in the cell walls regenerated from *Vinca rosea* protoplasts. **Plant Cell Physiol.**, 22: 1585-1594.
- TALMADGE K. W., KEEGSTRA K., BAUER W.D., and ALBERSHEIM P., 1973.- The structure of plant cell walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. **Plant Physiol.**, 51: 158-173.
- TAYLOR W.I., and BATTERSBY A.R., 1967.- **Oxydative coupling of phenols**. Dekker, New York.
- TAYLOR R.L., and CONRAD H.E., 1972.- Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochem.**, 11(8): 1383-1388.

- TERRY M.E., and JONES R.L., 1981a.- Effect of salt on auxin-induced acidification and growth by pea internode sections. **Plant Physiol.**, 68: 59-64.
- TERRY M.E., JONES R.L., and BONNER B.A., 1981b.- Soluble cell wall polysaccharides released by pea stems by centrifugation. I: Effect of auxin. **Plant Physiol.**, 68: 59-64.
- TEZUKA Y., IMAI K., OSHIMA M., and CHIBA T., 1990. Determination of substituent distribution in cellulose ethers by ¹³C- and ¹H-N.M.R. Studies of their acetylated derivatives: O-(2-Hydroxypropyl)cellulose. **Carbohydr. Res.**, 196: 1-10.
- THELEN M.P., and DELMER D.P., 1986.- Gel-electrophoretic separation, detection, and characterization of plant and bacterial UDP-glucose glucosyltransferases. **Plant Physiol.**, 81: 913-918.
- THIBAUT J.-F., 1979.- Automatisation du dosage des substances pectiques par la méthode au méta-hydroxydiphenyl. **Lebensm. Wiss. u. Technol.**, 12: 247-251.
- THIBAUT J.-F., 1980.- Les substances pectiques. Dans les **polymères végétaux- polymères pariétaux et alimentaires non azotés**; pp 232-251. (Monties et al), Gauthier-Villars, Bordas, Paris
- THOIRON B., 1984.- Restauration d'activités de perméation après le "choc de dégazage" chez les suspensions cellulaires d'*Acer pseudoplatanus* L. **Thèse Doct. Sci. Nat.**, Rouen, 118 p.
- THOMAS J.R., McNEIL M., DARVILL A.G., and ALBERSHEIM P., 1987.- Structure of Plant Cell Walls. XIX. Isolation and characterization of wall polysaccharides from suspension-cultured Douglas fir cells. **Ibid.**, 83: 659-671. (Plant physiol.)
- THOMAS J.R., DARVILL A.G. and ALBERSHEIM P., 1989a.- Isolation and structural characterization of the pectic polysaccharides rhamnogalacturonan II from walls of suspension-cultured rice cells. **Carbohydr. Res.**, 185: 261-277.
- THOMAS J.R., DARVILL A.G. and ALBERSHEIM P., 1989b.- Rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide that is the components of monocot cell walls. **Carbohydr. Res.**, 185: 279-305.
- THORNER J.P., et NORTHCOLE D.H., 1962.- Changes in the chemical composition of a cambial cell during its differentiation into xylem and phloem tissues in trees. 3- Xylan, glucomannan and α-cellulose fractions. **Biochem. J.**, 82: 340-346.
- TILLMANS J., and PHILIPPI K., 1929.- The carbohydrate content of the important proteins of foodstuff and a colorimetric procedure on the determination of nitrogen free sugar in protein. **Biochem. Z.**, 215: 36-40.
- TOMODA M., GONDA R., SHIMIZU N., and YAMADA H., 1989- Plant Mucilages. XLII- An anti-complementary mucilage from the leaves of *Malva sylvestris* var. *mauritica*. **Chem. Pharm. Bull.**, 37(11): 3029-3032.
- UEDA M. and BANDURSKI R.S., 1969.- A quantitative estimation of alkali-labile indole-3-acetic acid compounds in dormant and germinating maize kernels. **Plant Physiol.**, 44: 1175-1181.
- VALENT B.S., DARVILL A.G., McNEIL M., ROBERTSEN B.K., and ALBERSHEIM P., 1980.- A general and sensitive chemical method for sequencing the glycosyl residues of complex carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, 79: 165-192.
- VARLJEN J., LIPTAK A. and WAGNER H., 1989.- Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immuno-stimulating activity from *calendula officinalis*. **Phytochem.**, 28(9): 2379-2383.
- VANDENBOSCH K.A., J.BRADLEY D., KNOX J. P., PEROTTO S., W.BUTCHER G. and J.BREWEN N., 1989.- Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. **The EMBO J.**, 8(2): 335-342.

- VODONIK S.A., and GRAY R.G., 1988.- Analysis by the reductive-cleavage method of linkage positions in a polysaccharide containing 4-linked D-glucopyranosyluronic residues. **Carbohydr. Res.**, 175: 93-102.
- VORAGEN A.G.J., TIMMERS J.P.J., LINSSEN J.P.H., SCHOLS H.A., and PILNIK W., 1983.- Methodes of analysis for cell wall polysaccharides of fruits and vegetables. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, 177: 251-256.
- VORAGEN A.G.J., SCHOLLS H.A., and PILNIK W., 1986.- Determination of the degree of methyletion and acetylation of pectins by HPLC. **Food Hydrocolloids**, 1: 65-70.
- WAEGHE T.J., DARVILL A.G., McNEIL M., and ALBERSHEIM P., 1983.- **Carbohydr. Res.**, 123: 281-304.
- WATANABE T., KAIZU S., and KOSHIJIMA T., 1986.- Binding sites of carbohydrate moieties toward lignin in "lignin-carbohydrate complex" from *Pinus densiflora* wood. **Chem. Lett.** : 1871-1874.
- WOZNIEWSKI T., BLASCHEK W., and FRANZ G., 1990.- Isolation and structure analysis of a glucomannan from the leaves of *Aloe arborescens* var. Miller. **Carbohydr. Res.**, 198: 387-391.
- WHITE C.A., and KENNEDY J.F., 1988a.- Identification and structural analysis of monomeric and polymeric carbohydrates. Dans: **Carbohydrate chemistry**, Kennedy J.F. (ed.). Clarendon press-Oxford Univ. press, Oxford. 42-72.
- WHITE C.A., and KENNEDY J.F., 1988b.- The carbohydrate-directed enzymes. Dans: **Carbohydrate chemistry**, Kennedy J.F. (ed.). Clarendon press-Oxford Univ. press, Oxford. 342-375.
- WHITE C.A., and KENNEDY J.F., 1988c.- Biotechnology of bioactive derivatives of polysaccharides. Dans: **Carbohydrate chemistry**, Kennedy J.F. (ed.). Clarendon press-Oxford Univ. press, Oxford. 636-664.
- WHITMORE F.W., 1976.- Binding of ferulic acid to cell walls by peroxydases of *Pinus elliotii*. **Phytochem.**, 15: 375-378.
- WILDER B.M. and ALBERSHEIM B., 1973.- The structure of plant cell walls. IV. A structural comparison of the wall hemicellulose of cell suspension cultures of Sycamore (*Acer pseudoplatanus*) and of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). **Plant. Physiol.**, 51: 889-893.
- WILKIE K.C.B., 1979.- The hemicelluloses of grasses and cereals. **Adv. Carbohydr. Chem; and Biochem.**, 36: 215-264.
- WILLISON J.H.M., 1981.- Secretion of cell wall material in higher plants. Dans: **Plant Carbohydrates II** Tanner W. and Loewus F.A. (eds); Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York.; pp. 511-541.
- YAMAOKA T. and SATO S., 1977.- Analysis of extracellular macromolecules of cultured tobacco cells in comparison with cell-wall macromolecules. **Bot. Mag. Tokyo**, 90: 153-163.
- YORK W.S., DARVILL A.G., and ALBERSHEIM P., 1984.- Inhibition of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. **Plant Physiol.**, 75: 295-297.
- YORK W.S., DARVILL A.G., Mc NEIL M., STEVENSON T.T. and ALBERSHEIM P., 1985.- Isolation and carактерization of plant cell walls and cell wall compenents. **Methods in enzymol.** 118: 3-40.
- YORK W.S., OATES J.E., VAN HALBEEK H., ALBERSHEIM P., TILLER P.R., and DELL A., 1988.- Location of the O-acetyl substituents on a nonasaccharide repeating unit of sycamore extracellular xyloglucan. **Carbohydr. Res.**, 173: 113-132.
- YORK W.S., VAN HALBEEK H., DARVILL A.G. and ALBERSHEIM P., 1990a.- Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by ¹H-n.m.r. spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. **Carbohydr. Res.**, 200: 9-31.

- YORK W.S., KIEFER L.L., ALBERSHEIM P, and DARVILL A.G., 1990b.- Oxydation of oligoglycosyl alditols during methylation catalyzed by sodium hydroxide and iodomethane in methyl sulfoxide. **Carbohydr. Res.**, 208: 175-182.
- ZITKO V., and BISHOP C.T., 1965. Fractionation of pectin from sunflowers, sugar beets, apples and citrus fruits. **Can. J. Chem.**, 43: 3206-3214.
- ZITKO V., and BISHOP C.T., 1966. **Can. J. Chem.**, 44: 1275-1282.

A n n e x e 1

ORIGINE ET CONDITIONS DE CULTURE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE

La culture de cellules de silène (*Silene alba* E.H.L. Krause) faisant l'objet de cette étude provient de la souche isolée par Dubois et Bourriquet (1973). Depuis dix ans, les cellules ont été cultivées, sans interruption, dans des conditions précisées par Morvan (1986):

-durée du cycle : 14 jours

-milieu de culture : solution nutritive de Lamport modifiée par Lescure (1966), contenant 2 % de saccharose

-conditionnement : 200 ml de milieu de culture par fiole de 500 ml

-autoclavage : 120 °C / 20 min

-inoculum : $3 \pm 0,2$ g de matière fraîche

-température : 25 +/- 1 °C

-lumière : 5 à 7 W.m⁻², 24 h par jour.

A n n e x e 2

METHODES D'ANALYSES

Les diverses fractions obtenues sont analysées qualitativement et quantitativement par pesée, par dosages colorimétriques, et par chromatographie en phase liquide-gaz (CLG).

I.- LES GLUCIDES

Les dosages des sucres sont effectués avec les méthodes au phénol-acide sulfurique (Dubois et al., 1956) et/ou à l'orcinol-acide sulfurique de Tillmans et Philippi (1929) modifiée par Rimington (1931) pour les oses totaux ou neutres, et par celle au méta-hydroxydiphényl (m-HDP) (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973) pour les acides uroniques. L'application de la méthode de correction selon Montreuil et Spik (1963) permet de déterminer les quantités relatives en oses neutres et en acides uroniques. Les oses de référence sont généralement le galactose et l'acide galacturonique.

Ces méthodes reposent toutes sur le même principe de condensation des dérivés furfural, obtenus par l'hydrolyse des oses, avec des réactifs (chromogènes) (phénol, orcinol, m-hydroxydiphényl, ...) pour donner des chromophores. L'absorbance de ces derniers en lumière visible permet alors le dosage, à la longueur d'onde (λ) maximale déterminée. Pour les dosages cités, la méthode de microdosage a été adoptée.

A.- Dosages des oses neutres

1.- Phénol sulfurique (Dubois et al., 1956)

a)- Réactifs

L'acide sulfurique concentré (96 %) pour analyses et une solution aqueuse de phénol à 5 % (m:v) sont utilisés.

b)- Protocole

On dispose de solutions d'oses neutres (D-galactose ou D-xylose, Merck) et d'acide uronique (acide D-galacturonique, Merck), dans une gamme de concentrations de 400 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, et 50 $\mu\text{g/ml}$ qui vont servir à l'étalonnage. Le mélange réactionnel contient la solution à doser, du phénol 5 %, et de l'acide sulfurique concentré, selon le rapport 1:1:5 (volume).

Aux 200 μl de solution à doser, on ajoute 200 μl de réactif à 5 % de phénol. Après mélange au vortex, 1 ml d'acide sulfurique concentré est brutalement ajouté. Après homogénéisation, l'ensemble est placé 5 mn au bain-marie à 100°C pour uniformiser la réaction sur les différents tubes réactionnels. Après refroidissement des tubes d'analyse, la lecture des densités optiques se fait généralement à 480 nm ou à 492 nm, selon la nature de l'échantillon.

c)- Remarques

Cette méthode est dépendante de la nature de la solution à doser. En effet, les pentoses repondent à 480 nm plus que les hexoses à 492 nm ; et les acides uroniques ont une réponse deux fois moindre. Par conséquent, on effectue la correction de ces interférences en tenant compte de ces différentes absorbances relatives qui figurent dans le tableau suivant (Montreuil et Spik, 1963).

Tableau : Absorbances relatives ar (mesurées par rapport au galactose) des colorations données par les principaux oses avec les méthodes de dosage utilisées.

<u>Nature de l'ose</u>	<u>Type de dosage</u>		
	<u>Orcinol-sulfurique</u>	<u>Phénol-sulfurique</u>	
	<i>510 nm</i>	<i>480 nm</i>	<i>492 nm</i>
Rha	55	133	100
Fuc	76	55	44
Ara	93	111	72
Xyl	96	193	130
Man	81	122	136
Glc	83	128	138
Gal	100	100	100
GlcAU	44	50	47
GalAu*	44	50	47

(*): Les valeurs ont été vérifiées et admises comme identiques à celles du GlcAU
D'après Montreuil et Spik (1963)

2.- Orcinol sulfurique (Rimington, 1931)

La méthode a été décrite pour la première fois par Tillmans et Philippi (1929). De nombreuses modifications ont été apportées à cette méthode, parmi lesquelles celle de Rimington (1931) qui est généralement la plus utilisée par les auteurs. Ainsi, l'orcinol (3,5-dihydroxytoluène) donne avec les oses, en milieu sulfurique et à chaud, une coloration brun-orangé. Les conditions de chauffage ont une importance fondamentale sur la stabilisation et la fidélité de la coloration. En effet, celle-ci varie au cours de la réaction allant du jaune au brun-orangé.

a)- Réactifs

*)- Solution d'orcinol à 1,5 % (m.v)

1,5 g d'orcinol pur sont dissous dans 100 ml de solution d'acide sulfurique 30 % (v:v). La solution obtenue est stockée à 4°C dans des flacons en verre borosilicaté et à l'obscurité. Les cristaux qui se forment à froid sont dissous au bain-marie à 30°C. Le réactif est renouvelé tous les deux à trois semaines selon la fréquence d'utilisation.

*)- Solution d'acide sulfurique à 60 %

La solution est préparée à froid en mélangeant 60 ml d'acide sulfurique concentré avec de l'eau désionisée, qsp 100 ml.

**)- Solution de témoins*

Les solution-mères sont faites à partir de 200 mg de D-galactose ou de D-xylose pour les oses neutres, et de l'acide D-galacturonique pour les acides uroniques, dans 100 ml d'eau désionisée UHQ. Quelques gouttes de chloroforme et une goutte d'acide chlorhydrique concentré sont ajoutées dans les solutions, avant qu'elles soient complétées au volume convenable, afin de stabiliser les oses. Un aliquot de chaque solution est dilué au dixième pour faire la solution-témoin à 200 µg/ml. Cette solution est diluée en série pour faire des solutions à 100 µg/ml et 50 µg/ml. Ces dilutions vont servir à établir respectivement la gamme étalon en oses neutres et en acides uroniques. De toutes ces solutions de témoins, des aliquots de 4 ml conservées à -20°C ne serviront qu'une seule fois après leur décongélation.

b)- Mode opératoire

Dans des tubes à essai de 15 ml, sont introduits 0,2 ml de solutions à doser (échantillons et témoins) renfermant 200 µg/ml à 50 µg/ml d'oses totaux, 0,4 ml de la solution d'orcinol et 3 ml de la solution d'acide sulfurique à 60 %. Les tubes réactionnels sont agités au vortex puis maintenus 20 mn exactement au bain-marie à 80°C. Après refroidissement, ils sont placés à l'obscurité pendant 45 mn à température ambiante.

L'absorbance de chacune des solutions contenus dans les tubes est déterminée à la longueur d'onde de 510 nm. Chaque tube est agité avant sa lecture au spectrophotomètre. Bien que la coloration soit stable pendant 24 h à + 2°C, une lecture rapide est conseillée.

c)- Remarques

Chaque solution à doser est préalablement évaluée au phénol sulfurique afin de chercher les dilutions adéquates pour l'analyse. On procède généralement par dilution au demi en série de façon à se situer dans la gamme de 200 µg/ml à 50 µg/ml d'oses totaux. Chacune des dilutions est analysée en triple, au minimum en double. Les solution-témoins sont analysées en triple sur deux dilutions (200 µg/ml et 100 µg/ml d'oses totaux). Toutefois, les réactifs neufs sont systématiquement testées en triple sur trois dilutions: 400 µg/ml, 200 µg/ml et 100 µg/ml ou 50 µg/ml d'oses totaux.

Même si le maximum de dilution soit à 420 nm, la mesure des absorbances en vue des dosages est faite à 510 nm pour éviter les interférences des protéines. Ainsi, pour des échantillons dont la composition protéique est inférieure à 5 et 10 %, la lecture peut se faire à 420 nm. Enfin, pour la quantification (Annexe 3) les absorbances relatives des principaux oses par rapport au D-galactose dans ce dosage, sont indiquées dans le tableau ci-dessus.

B.- Dosage des acides uroniques au méta-Hydroxydiphényl

Il a été établi par Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) sur des acides mucopolysaccharidiques et s'avère beaucoup plus spécifique des acides uroniques que celui au carbazol. Par chauffage en milieu sulfurique concentré, les polysaccharides à acides uroniques sont dégradés en donnant des acides uroniques, et éventuellement des hexoses, désoxyhexoses et des pentoses. Ces monosaccharides transformés en leurs dérivés furural, l'acide 5-formyl-furoïque pour l'acide uronique, se condensent avec le m-HDP pour donner des chromophores rose-violacés.

1.- Réactifs

*)- La solution de *m*-HDP est faite à 0,15 % (m:v) avec de la soude 0,5 % (m:v) dans de l'eau désionisée. La solution est conservée à 0 - +4°C à l'obscurité et renouvelée toutes les deux ou trois semaines, selon la fréquence d'utilisation.

*)- La solution de tétraborate de sodium à 0,125 M est préparée avec de l'acide sulfurique concentré.

2.- Protocole

Des solutions de D-galactose de 400 µg/ml, 200 µg/ml et 100 µg/ml, et d'acide D-galacturonique de 100 µg/ml et 50 µg/ml et 25 µg/ml, sont respectivement préparées pour servir de témoins d'étalonnage. Dans des tubes à essai contenant 0,2 ml de solutions à doser, maintenus à 0 - +4°C, sont ajoutés 1,2 ml de tétraborate de sodium. Après refroidissement des tubes, ceux-ci sont agités au vortex, avant d'être placés au bain-marie à 100°C pendant 5 mn, à l'obscurité. Ensuite, les tubes sont mis à 0 - +4°C avant d'y ajouter 20 µl de *m*-HDP. Ils sont vigoureusement agités au vortex jusqu'au développement de la coloration. Enfin, la lecture est effectuée à 520 nm après 5 - 10 mn de repos.

3.- Remarques

Les chromophores sont généralement rose-violacés pour les acides uroniques et certains oses neutres, comme le galactose à forte concentration alors que les oses donnent principalement une coloration brune. Les interférences des oses neutres sont négligeables par rapport aux acides uroniques comme l'acide galacturonique. Il faudrait, en effet, une concentration 40 fois supérieure à celle de l'acide galacturonique pour provoquer des erreurs de 2 à 5 % (Thibault, 1979). Cependant, la méthode de correction décrite ci-après par Montreuil et Spik (1963) est appliquée aux couples de dosages (orcinol, *m*-HDP) et (phénol, *m*-HDP).

C.- Méthode de correction (Montreuil et Spik, 1963)

A cause des interférences des acides uroniques dans les dosages des oses neutres, on applique la méthode de correction obtenue à partir du système d'équations à deux inconnus, X et Y :

$$\alpha = a/200 \cdot X + b/200 \cdot Y$$

$$\beta = d/200 \cdot X + c/50 \cdot Y$$

X : Teneur en oses neutres des solutions inconnues à doser

Y : Teneur en acides uroniques des solutions inconnues à doser

α : Absorbance de 1 ml de solution inconnue au phénol ou à l'orcinol

β : Absorbance de 1 ml de solution inconnue au *m*-HDP

a : Absorbance de 200 µg/ml de galactose ou de xylose au phénol ou à l'orcinol

b : Absorbance de 200 µg/ml d'acide galacturonique au phénol ou à l'orcinol

c : Absorbance de 50 µg/ml d'acide galacturonique au *m*-HDP

d : Absorbance de 200 µg/ml de galactose ou de xylose au m-HDP

D'où, les valeurs en {µg/ml} ou mg/ml:

$$X = \left\{ \frac{4 \alpha c - \beta b}{4 a c - d b} \right\} : 1000$$

$$Y = \left\{ \frac{\beta a - \alpha d}{4 a c - d b} \right\} : 1000$$

Les valeurs obtenues sont ensuite comparées à celles déterminées en CLG (Annexe 3).

D- Chromatographie sur couche mince

Des échantillons de 1 à 10 µg en solution aqueuse sont déposés sur des plaques de silicagel sur aluminium 20 x 20 cm (Merck). Après une migration dans le solvant n-butanol/acide acétique/eau (2/1/1), la plaque est séchée et pulvérisée par le révélateur à l'orcinol sulfurique (orcinol 0,1 % dans l'acide sulfurique 20 %) ; la coloration bleu violacée caractéristique des oses se développe dans une étuve à 110 °C.

II.- LES PROTEINES

Leur quantité est déterminée par la méthode de Lowry et al., (1951) pour les protéines solubles et insolubles.

A.- Réactifs

- *)- Solution A: Na₂CO₃ à 2 % (m:v) dans du NaOH 0,1 N
- *)- solution B: CuSO₄, 5 H₂O , à 0,5 % (m:v).
- *)- Solution C: Aux 50 ml de la solution A, est ajouté 1 ml de B
- *)- Solution D: Réactif de Folin-Ciocalteu (Merk) est extemporanément dilué au demi.

B.- Solution de témoins d'étalonnage

Elles sont faites avec du sérum albumin bovin (SAB) à différentes concentrations, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,25 µg/ml, et 6,125 µg/ml. Chacune est analysée en triple exemplaires.

C.- Dosage

1 ml de la solution C sont versés dans les tubes à essai contenant 0,2 ml des solutions à doser (échantillons inconnus et témoins) ; le mélange est agité et laissé au repos pendant 10 mn. 0,1 ml de la solution D sont alors ajoutés dans les tubes. Après agitation, la densité optique est mesurée à 500 ou à 750 nm.

A n n e x e 3

DETERMINATION DE LA COMPOSITION GLUCIDIQUE PAR C.L.G.

200 à 500 μg de polysaccharides, réduit ou non, sont traités (voir, 50 μg pour les oligosaccharides). Le méso-inositol est utilisé comme témoin interne à raison de 10 à 50 % de la quantité du produit selon la diversité en oses de celui-ci. Généralement, l'aire du témoin doit correspondre à celle du pic majeur, ou au moins à la moitié de celle-ci. La figure suivante représente un diagramme du protocole général des analyses dont la méthodologie est exposé au chapitre I.

I- ACETATES D'ALDITOLS (AA)

D'après Sawardeker et al. (1965), Jones et Albersheim (1972).; Blakeney et al. (1983), Hoebler et al. (1989), Hämäläinen et al. (1990). Deux méthodes issues de ces travaux ont été adoptées. Leurs différences résident principalement sur les modes de réduction et d'acétylation.

A.- L'hydrolyse

L'acide trifluoroacétique (ATFA) est utilisé dans les conditions suivantes: 2 N, 2 h, 100°C ou 4 N, 4 h, 100°C ; dans un tube d'hydrolyse SVL muni d'un bouchon bakélite à joint en téflon.

Selon le type de polysaccharide, une pré-hydrolyse de 6,5 N d'une durée de 30 à 60 mn à 100°C, précède parfois les conditions normales décrites ci-dessus sans toutefois excéder la durée totale de 2 h à 4 h. L'acide est ensuite éliminé par coévaporation (4 fois) à siccité avec de l'éthanol absolu à l'évaporateur rotatif. L'échantillon sec est repris par 1 ml d'eau UHQ, puis placé ou reparté dans de tubes d'hydrolyse (SVL).

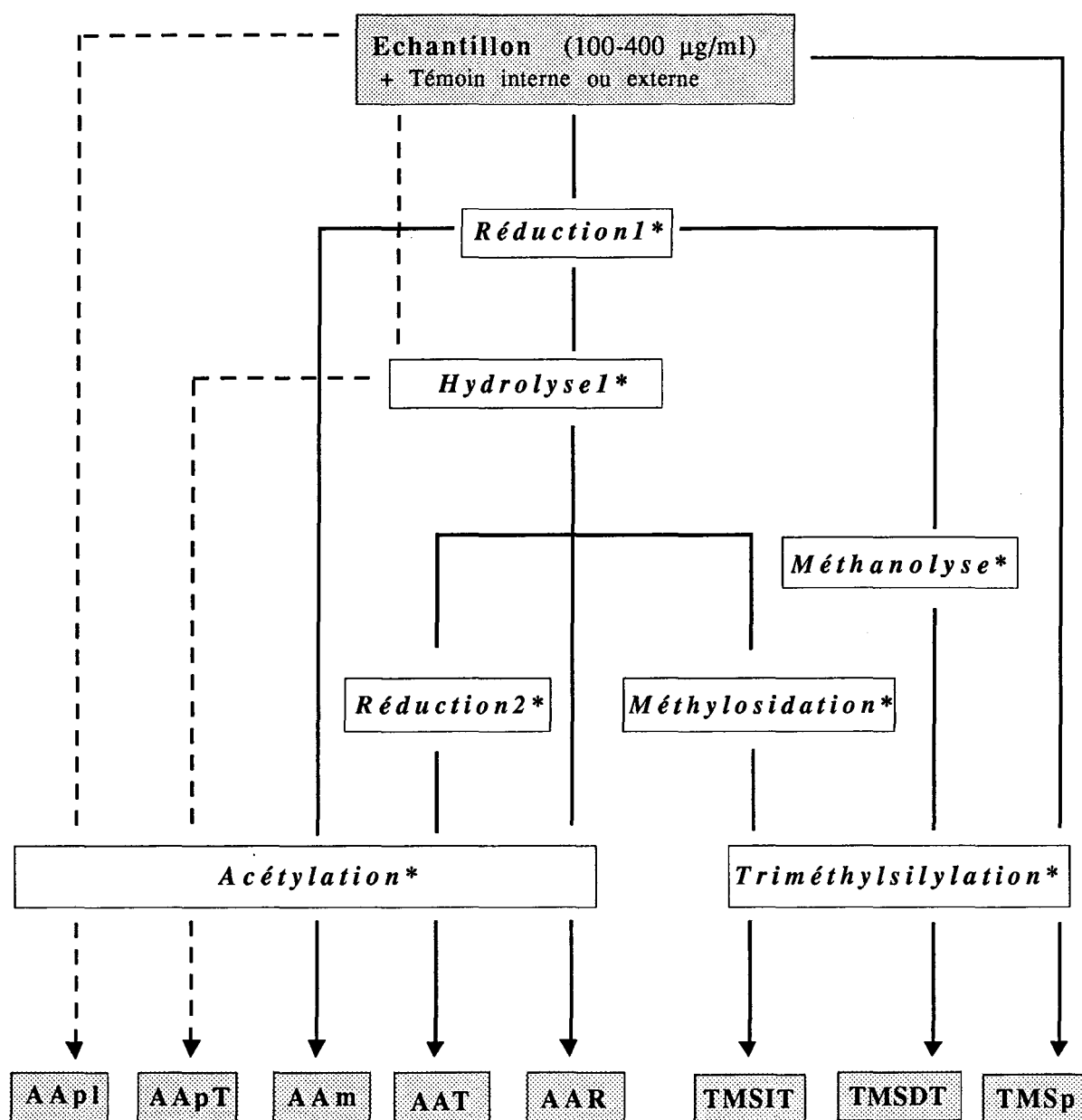
B.- Réduction et Acétylation

1- Méthode 1

D'après Sawardeker et al., (1965) ; Jones et Albersheim, (1972). Elle est marquée par une série d'évaporations et de prélèvements qui séparent la réduction et l'acétylation.

a)- La réduction

L'échantillon aqueux est alcalinisé à pH 8-9 avec de la soude (NaOH) ou de l'ammoniaque (NH₄OH) 2 M avant d'ajouter du sodium tétrahydruroborate (NaBH₄) ou du sodium tétradeutéroborate (NaBD₄) (10 mg/1 mg d'oses), et laisser une nuit à 20 - 25°C sous agitation. La réaction est arrêtée par addition de résines 50x8 (H+) ou d'acide acétique glacial (20 à 50 μl) qui détruit l'excédent d'agent réducteur.



Protocole général d'analyse par CLG des surnageants.

&. Les préparations analytiques :

- Analyse des acétates d'alditol :

AApl : Polyols libres (pl) ; AApt: Polyols totaux (pT) = pl + Polyols liés (pL) ;

AAm : Monosaccharides (m) + pl ; AAR: Oses réducteurs (OR) + m + pT ;

AAT : Oses totaux (OT) = Oses liés (OL) + OR + m + pT

- Analyse par triméthylsilylation :

TMSp : Dérivés TMS glycosides (pl, ...) ;

TMSIT : Triméthylsilylation indirecte (pT, Méthylglycosides) ;

TMSDT : Triméthylsilylation directe (pT, Méthylglycosides)

&. Réduction 1 : Principalement au NaBD₄ ; Réduction 2 : au NaBD₄ ou NaBH₄

&. (*) : Les conditions expérimentales sont détaillées dans le texte

Plusieurs coévaporations avec du méthanol(v:v) (5x1 ml) sont nécessaires pour éliminer les borates sous forme de méthyl borates. La première évaporation est faite en présence d'acide acétique 1% (v:v).

L'échantillon est transféré dans un tube d'hydrolyse SVL par 1 ou 2 ml de MeOH. Il est ensuite séché à l'air comprimé et laissé une nuit dans un dessicateur sous vide en présence de silicagel et de NaOH, à température ambiante.

b)- L'acétylation

On fait agir sur l'échantillon anhydre, un mélange d'anhydride acétique et de la pyridine dans la proportion 1:1 (v:v) pendant une nuit à 20 - 25°C ; ou bien, 3:1 (v:v) pendant 45 - 60 mn à 100°C. Refroidir. Les réactifs sont évaporés sous un flux d'air ou d'azote anhydre.

Les acétates d'alditols sont dissous par du dichlorométhane à raison de 1 ml pour 10 µg de méso-inositol). Injecter 1 µl en analyse.

2- Méthode 2

D'après Blakeney et al., (1983) ; Harris et al., (1984) ; Hoebler et al., (1989) ; Hämäläinen et al., (1990). La réduction et l'acétylation ont successivement lieu dans un même et seul tube à essai ou SVL.

a)- La réduction

- A l'hydrolysate sec, on ajoute 200 - 500 µl du NaBH₄ ou du NaBD₄ (10 mg/1 mg d'oses) dissous dans du NH₄OH 3 M (20 mg/ml). On maintient le mélange à 4°C avant d'ajouter 1 ml de DMSO. On mélange avant de laisser le tube réactionnel sous agitation à 40 - 60°C dans un bain-marie pendant 60-90 mn.

- Après refroidissement du tube, la réaction est neutralisée à pH: 4 - 5 par 50 à 200 µl d'acide acétique glacial versé goutte à goutte jusqu'à cessation de l'effervescence due au dégagement d'hydrogène, en agitant au vortex.

b)- Acétylation au 1-Méthylimidazole et extraction des acétates d'alditol

Le mélange réactionnel est maintenu entre 0°C et 4°C avant d'ajouter 100-200 µl de 1-méthylimidazole (conserver à 4°C) et 0,5-1,0 ml d'anhydride acétique. Après mélange et refroidissement à 4°C (5 mn), on laisse le tube réactionnel hermétique à l'obscurité pendant 10-15 mn à température ambiante.

Après l'avoir refroidi à 4°C, on ajoute 1 à 2 ml (v:v) d'eau UHQ. Après une agitation au vortex, les AA sont extraits par 4 fois 0,5 ml de dichlorométhane. On agite vigoureusement au vortex à chaque extraction. Et on laisse décanter jusqu'à la séparation complète des phases.

Ensuite, on rassemble les phases organiques pour les laver rapidement 5 fois (v:v) à l'eau UHQ (+4°C).

Enfin, la phase organique est desséchée avec du sulfate de sodium en poudre (Na₂SO₄) et transférée dans un tube SVL hermétique avant de le sécher à l'azote. Il est possible de la stocker à

-20°C ou à +4°C.

Finalement, on la reprend par un volume donné de dichloromethane (1 ml pour 10 µg de mésoinositol) ajouté d'une goutte d'anhydride acétique glacial. L'échantillon peut aussi être conservé sous cette forme, à -20°C ou à +4°C.

Injecter 1 µl pour l'analyse.

3- Remarques concernant le choix de ces deux méthodes

Chacune d'elles a son intérêt. La première permet une acétylation douce à l'aide de la pyridine. Cependant, ce catalyseur se complexe avec certains réactifs, comme l'acide acétique issu de la réaction de l'anhydride acétique, en formant l'acétate de pyridine qui contamine la colonne capillaire, et donc, l'analyse de certains dérivés. De plus, cette méthode est longue à cause des séries d'évaporation et de prélèvement qui occasionnent des pertes et des risques de contamination.

La seconde méthode se fait, quant à elle, rapidement dans un seul et même tube, limitant ainsi les pertes et les contaminations. Par ailleurs, l'obtention d'échantillon propre par lavage à l'eau des réactifs (sels, acide,...) facilite l'analyse. Néanmoins, cette étape de lavage doit se faire rapidement à froid pour éviter le risque de désacétylation des dérivés. Et l'utilisation du 1-méthylimidazol, catalyseur puissant, doit comporter certaines précautions, comme son utilisation à froid (+4°C) pour limiter entre autre la destruction de l'anhydride (Harris et al., 1984 ; Hämäläinen et al., 1990). De plus, il accélère l'acétylation en présence de borates qui augmentent la durée d'acétylation (Crowell et Burnett, 1967).

En conclusion, cette dernière méthode est plus avantageuse par sa rapidité, sa propreté et la bonne quantification des dérivés. Elle permet ainsi de traiter raisonnablement 5 à 10 échantillons par jour.

II- DERIVES METHYLGLYCOSIDES TRIMETHYLSILYLES (TMS)

D'après les méthodes de Sweeley et al. (1966), Clamp et al. (1971), et celle de Kamerling et al. (1975) modifié par Montreuil et al. (1986).

Le principe repose sur l'obtention de méthylglycosides triméthylsilylés par une méthanolyse ou une méthylosidation suivie d'une pertriméthylsilylation à partir des monosaccharides constituant l'échantillon étudié. En conservant les configurations furannique ou pyranique, chaque ose peut présenter les anoméries α ou β en donnant quatre isomères dont la proportion et la nature dépendent de l'orientation et de la mutarotation de celui-ci.

A- Méthanolyse

Elle est réalisée avec du méthanol chlorhydrique (MeOH/HCl, Instant methanolic HCl Kit, Alltech) de deux façons:

1- La méthode directe (TMSD)

L'échantillon anhydre est directement méthanolysé dans les conditions normales: 1 ml de MeOH/HCl 1 N à 2 N (Instant methanolic HCl, Alltech), 24 h, 85°C, dans un tube d'hydrolyse SVL (pyrex).

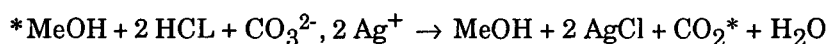
2- La méthode indirecte (TMSID)

Le principe repose sur une méthylosidation des oses libérés par hydrolyse préalable.

L'échantillon anhydre qui correspond au tiers (1/3) ou au quart (1/4) de l'hydrolysate destiné à la préparation des acétates d'alditols, est méthanolysé (méthylosidation) selon les conditions suivantes: MeOH/HCl 1 N à 85°C pendant 6 - 8 h.

3- Etapes communes aux deux méthodes

Après refroidissement du tube réactionnel, on neutralise le réactif d'hydrolyse par du carbonate d'argent (vert) en excès jusqu'à cessation de l'effervescence due au dégagement de gaz, le dioxyde de carbone (CO₂)*. Agiter et attendre 5 à 10 mn.



Facultativement, on ajoute de l'anhydride acétique pour procéder à la N-réacétylation des osamines éventuellement présentes dans les fractions. Laisser à l'obscurité une nuit à température ambiante.

Après centrifugation (4000 rpm, 30 mn ; centrifugeuse Janetzki T32c), la phase liquide est séparée du précipité blanc (chlorure d'argent) et vert (excès de carbonate d'argent) par transfert dans un tube SVL. Elle est ensuite délipidée par trois lavages successifs à l'heptane (v:v).

Enfin, la fraction contenant le méthanolysat, est séchée à l'azote anhydre, puis laissée une nuit dans un dessiccateur sous vide en présence de dessiccants, à 20 - 25°C. On obtient alors un méthanolysat anhydre prêt pour l'étape suivante.

B.- Triméthylsilylation

Elle est effectuée sur le méthanolysat anhydre à l'aide du réactif BSTFA (bis-silyltri fluoroacétamide) à 1 % de TMCS (Triméthylchlorosilane) (Pierce) et de la pyridine (Merck) (100 µl : 200 µl). Le mélange réactionnel est maintenu à l'obscurité pendant 2 h-3 h, à température ambiante (20 - 25°C). Avant l'injection, diluer le mélange à l'heptane à raison de 1 ml au total pour 10 µg de témoin interne). L'analyse est effectuée sur 1 µl.

III.- ANALYSE DES DERIVES EN C.L.G.

Les dérivés sont alors analysés en C. L. G.. munie d'une colonne capillaire CP Sil 5CB (0,32 mm x 50 m, 11  m ; Chrompack) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) ; le gaz vecteur est l'azote sous pression de 0,45 bar. La programmation de la température du four est:

- de 130  C (15 mn)   230  C (5 mn)   raison de 2 C.mn-1 pour les acétates d'alditol ;
- de 120  C   240  C (5 mn)   raison de 2  C.mn-1 pour les TMS.

IV.- TRAITEMENT DES DONNEES

Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire (% molaire) après correction des aires des pics chromatographiques par les facteurs de correction (cf.Tableau, ci-dessous). Cette dernière s'effectue en divisant l'aire totale de chaque monosaccharide par son facteur de correction.

A partir des % molaires, on peut les exprimer en rapport molaire en se référant à un monosaccharide judicieusement choisi.

Par ailleurs, Crowell et Burnett (1967) utilisent les coefficients de conversion des monosaccharides en polysaccharides qui sont respectivement de 0,88 (=150-18/150) pour les pentoses et de 0,90 (=180-18/180) pour les hexoses, en les multipliant aux aires des monosaccharides.

Le résultat d'une fraction est l'association des oses neutres obtenus en AA avec les acides uroniques calculés en TMSID ou TMSD. Ainsi, on a un aperçu relatif et global des acides uroniques entre eux (GlcAU, 4-OMe-GlcAU et GalAU) et par rapport aux oses neutres.

Tableau : Coefficients de réponse des dérivés acétates d'alditols et méthylglycosides trim thylsilyles

Oses										
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-OMeGlcA
Dérivés										
(AA)	0,76	0,85	0,83	0,78	0,83	0,80	0,81	-	-	-
(TMS)		0,88	0,98	0,72	0,89	0,86	0,92	0,95	0,41	0,45

(AA):  tablis à partir de monosaccharides et vérifiés avec des polysaccharides connus pour les conditions d'hydrolyse: ATFA 2 N, 2 h, 100 C et 4 N, 4 h, 100 C.

(TMS): Conditions de méthanolyse 1 N, 6-8 h, 85 C pour les monosaccharides, et 16-24 h pour les polymères.

METHODES DE CARACTERISATION

I.- CARACTERISATION DES SITES DE LIAISON PAR METHYLATION

A.- Protocole de méthylation

1- L'installation du poste de travail

1 à 5 mg de polymère (oligosaccharide et polysaccharide) débarrassé de sels et de solvants sont lyophilisés dans un tube d'hydrolyse SVL. Le lyophilisat est utilisé directement sorti du lyophilisateur ou préalablement conservé dans un dessiccateur sous vide en présence de silicagel, de tamis moléculaires activés, et de soude (produits desséchants).

Une heure avant la méthylation, une boîte en plexiglas pourvue de gants (ou un dessiccateur large et profond) est saturée en azote anhydre (ou argon) en présence de produits desséchants. Ensuite, les réactifs (échantillon ; base: le lithium méthylsulfinyl carbanion ; le solvant: diméthylsulfoxyde, DMSO et l'agent alkylant: iodure de méthyle, ICH₃) et les ustensiles (pipettes pasteur sèches, pipetman, ...) sont placés dans le récipient conditionné.

Les réactifs stockés à froid (la base, le ICH₃) sont préalablement mis à température ambiante et leurs flacons sont séchés à l'éthanol, avant leur introduction dans le dispositif .

2- La méthylation

Une fois l'installation réalisée, tout flacon ouvert est saturé d'azote, sauf le ICH₃ que l'on garde encore au froid.

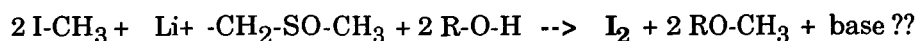
L'échantillon dissous par 1-2 ml de DMSO anhydre (Merck) est enfermé dans un tube d'hydrolyse muni d'un bouchon en bakélite pourvu de pastille de téflon. L'ensemble est mis dans un bain à sonication (BS) jusqu'à la dissolution ou dispersion du produit (30 - 60 mn, ou plus) sans que la température du bain (eau : éthanol, 1 : 2) n'excède 40°C.

Ensuite, le tube est séché à l'éthanol avant de le replacer dans la boîte conditionnée. On attend 5 - 10 mn avant de poursuivre l'opération.

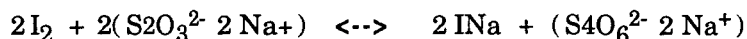
0,5 ml de base sont ajoutés dans le tube réactionnel qui est tout de suite saturé d'azote et refermé avant de le remettre dans le BS, pendant 1 - 2 h jusqu'à dissolution ou dispersion des réactifs. La température du BS ne doit pas excéder 30°C. Pendant ce temps, le ICH₃ est conditionné en le plaçant dans la boîte, avec les mêmes précautions.

De la même façon, on ajoute 0,5 à 1 ml de ICH₃ dans le tube réactionnel avant de le refermer et de le replacer dans le BS pendant 45 à 60 mn. La température du bain doit être à 5 - 10°C, sans dépasser 17 - 20°C.

La réaction est arrêtée par addition d'eau désionisée (1 à 1,5 ml) et de quelques grains de thiosulfate de sodium (S₂O₃Na₂, 5 H₂O) dès l'apparition de coloration brune du milieu réactionnel due à la formation d'iode (I₂) par oxydation de l'iodure par un anion (probablement, la base: -CH₂-SO-CH₃):



Le thiosulfate intervient pour décomposer l'iode selon la réaction suivante:



On obtient alors de l'iodure de sodium (INa) et du tétrathionate de sodium ($\text{S}_4\text{O}_6\text{Na}_2$) qui sont des sels extractibles à l'eau UHQ. D'autres réactions ont lieu et aboutissent à la formation d'iodure de lithium, de DMSO, de méthyléthylsulfoxyde et d'iodure de triméthylloxosulphonium (Harris et al., 1984).

Par la suite, le produit méthylé est extrait par 4 fois 0,5 ml de chloroforme. Les phases organiques sont réunies et lavées abondamment à l'eau UHQ (v:v). La phase organique finale est desséchée au sulfate de sodium anhydre, puis évaporée sous courant d'azote et reprise par 1 ml de solvant organique chloroforme:méthanol (v:v). Cette phase organique est purifiée sur une colonne de gel Séphadex LH-20 (1 cm x 35 cm) (Pharmacia LKB, Uppsala, Suède) équilibrée dans le même solvant organique.

L'élution de la colonne est à débit libre, sans pompe, à raison de 0,5 ml/5 mn par tube (petit tube en verre). Cette étape chromatographique élimine les contaminations par des substances dissoutes dans les solvants utilisés, comme les phtalates qui composent certaines matières.

Après repérage par CCM, les contenus des tubes qui renferment les polymères méthylés sont regroupés, séchés sous flux d'azote et repris par un volume connu (1 ml / mg de produit méthylé) de solvant organique.

Cette solution est dosée selon les méthodes colorimétriques (au phénol sulfurique ou à l'orcinol, généralement) pour estimer sa concentration. Le témoin utilisé est du galactose ou du xylose selon la nature du polymère.

Par la suite, une aliquote de 200 à 500 µg est prélevée pour l'étape suivante. On ajoute le témoin interne, le méso-inositol, à raison de 5 à 10 % de la quantité totale du polymère. L'ensemble est séché sous courant d'azote et stocké une nuit dans un dessiccateur sous vide en présence de dessiccants.

B.- Préparation des dérivés acétates d'alditols partiellement méthylés (AAPM)

1- Hydrolyse

L'aliquote préparé peut être hydrolysé selon deux conditions: avec ou sans pré-hydrolyse.

a)- Avec Pré-hydrolyse

La première hydrolyse est réalisée à l'acide formique 90 %, dans un four à 100°C, pendant 1 h. L'acide est éliminé à l'évaporateur rotatif.

Cet hydrolysate est repris par 1 à 2 ml d'acide trifluoroacétique (ATFA) 1 N ou 3 N. L'ensemble est chauffé au four à 100°C, pendant 1 h ou 3 h, selon la nature du produit. Ensuite, le tube est refroidi avant d'éliminer l'acide à l'évaporateur rotatif par co-évaporation avec de l'éthanol absolu (3 à 4 fois).

b)- Hydrolyse directe

L'hydrolyse est réalisée par 1ml d'ATFA 2 N, à 100°C pendant 2 h ; ou par l'ATFA 4 N à 100°C en 4 h, selon la résistance des polymères méthylés. L'acide est éliminé comme précédemment.

2- Réduction des fonctions réductrices

D'après Harris et al., (1984)

L'hydrolysats repris par 0,5 ml d'eau UHQ, est alcalinisé à pH: 8 - 9 avec de l'ammoniaque (NH₄OH) 20 % (100 µl). Après l'avoir agité, on le laisse au repos 5 mn à température ambiante.

200 µl de tétradeutéroborate de sodium (NaBD₄) dissous dans du NH₄OH 3 M (100 mg/ml) sont ensuite ajoutés. L'ensemble est mélangé avant addition de 1 ml de DMSO. On laisse sous agitation, une nuit à température ambiante ; ou pendant 3 h dans un bain-marie à 40 - 60°C.

La réaction est neutralisée à pH: 4 - 5 par 100 - 200 µl d'acide acétique glacial ou avec du Dowex 50x8 (H⁺), jusqu'à la cessation de l'effervescence due au dégagement d'hydrogène.

Enfin, les borates sont éliminés par co-évaporations au méthanol (MeOH), une première fois en présence de 1 % d'acide acétique. L'hydrolysats réduit est repris dans un tube SVL par 1 ml de MeOH et séché sous flux d'azote. L'échantillon est stocké dans un dessiccateur sous vide, en présence de dessiccants, en attendant la suite de la manipulation.

3- Acétylation

On procède selon deux méthodes dépendantes de la nature du catalyseur d'acétylation.

a)- Acétylation en présence de pyridine

L'échantillon sec ci-dessus, contenant les polyols partiellement méthylés, est repris par 500 µl du mélange de pyridine et d'anhydride acétique (1:2 ou 1:3). L'ensemble est laissé à l'obscurité pendant une nuit, à température ambiante ; ou pendant 45 mn, à 100°C. La réaction est arrêtée en évaporant à siccité les réactifs sous courant d'azote. La persistance de la pyridine est éliminée par co-évaporation au MeOH, sous flux d'azote. Le tube contenant les dérivés est stocké à +4°C ou à -20°C.

b)- Acétylation au 1-méthylimidazol

L'acétylation se fait immédiatement après la neutralisation de la réduction par l'acide acétique glacial, sans nécessité d'éliminer préalablement les borates. Le tube est systématiquement refermé après addition de réactif.

Après arrêt de la réduction, le tube réactionnel est refroidi à +4°C, avant d'ajouter 50 - 100 µl de 1-méthylimidazol froid et 0,5 - 1 ml d'anhydride acétique. Après homogénéisation, l'ensemble est refroidi et laissé à l'obscurité pendant 10 - 15 mn à température ambiante.

Au milieu réactionnel refroidi, on ajoute 1 - 2 ml d'eau UHQ pour détruire l'excès d'anhydride. On mélange vigoureusement avant de refroidir 5 mn.

Les AAPM sont ensuite extraits par 4 fois 0,5 ml de Cl_2CH_2 , en agitant bien lors de chaque extraction. Les phases organiques sont rassemblées avant de les laver abondamment à l'eau UHQ (5 à 10 fois 2 ml).

Enfin, la phase organique finale est desséchée au sulfate de sodium (en poudre sec). Elle est ensuite placée dans un tube SVL avant de la sécher sous courant d'azote. L'échantillon peut être stocké à -20°C ou à $+4^\circ\text{C}$.

4- Analyse en CLG seule et en couplage avec le Spectromètre de Masse (CLG-SM)

Les AAPM sont alors dissous au dichlorométhane à raison de 1 ml pour 5 à 10 μg de méso-inositol. L'échantillon est stocké à -20°C , avant son analyse en chromatographie liquide-gaz (CLG). Injecter 1 à 2 μl .

L'analyse est faite sur un chromatographe Girdel série 300 muni d'une colonne capillaire CP Sil 5CB (0,32 mm x 50 m, 11 μm ; Chrompack) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le gaz vecteur est de l'azote U sous pression de 0,45 bar. Le programme de température est de 120°C à 240°C pendant 5 mn, à raison de $2^\circ\text{C} / \text{mn}$.

Le système de couplage CLG-SM est composé d'un chromatographe Delsi série 1000 muni d'une colonne capillaire DB-1 (0,32 mm x 25 m ; J&W) et d'un spectromètre de masse Riber Mag 10-10 (Reuil-Malmaison, France). Le gaz vecteur utilisé en CLG est de l'hélium sous pression de 0,5 atm. Le SM est utilisé en mode impact électronique (IE).

C.- Interprétation des données

Elle se fait selon la détermination établie dans le chapitre II, grâce au couplage du CLG au spectromètre de masse. On applique aux données obtenues les facteurs de correction e.c.r. établis par Sweet et al. (1975).

II.- RMN DU ^{13}C

Les échantillons anhydres sont dissous dans 0,5 à 1 ml de D_2O avec 1 μl de Diméthylsulfoxyde pur (DMSO) pour 10 mg de polysaccharide. Le DMSO sert de témoin interne à 39,6 p.p.m. relatif au Triméthylsilane (TMS). Le spectre RMN du ^{13}C a été enregistré sur un spectromètre Bruker AM400 (100,62 MHz) avec une sonde dual de 5 mm contenant l'échantillon à 80°C , pour un temps d'acquisition de 0,655 seconde et un temps de relaxation de 0,5 seconde. L'interprétation des spectres est réalisée selon les références citées.

III.- ENZYMES

A.- Pectinase Serva

On a utilisé 0,5 g de la préparation de pectinase E.C 3.2.1.15 (0,26U/mg, *Aspergillus niger*, Serva) après une chromatographie sur une colonne de Séphacryl S200 dans un tampon d'acétate

de sodium (AcO-Na⁺) 50 mM à pH 4,5. La première fraction F1 contient plusieurs activités enzymatiques [pectinases et xylanases en majorité, et des $\beta(1,4)$ galactosidases et galactomannosidases] et est composée de glucides (473 μ g/ml) et de protéines (65,2 μ g/ml). Le test d'activité est réalisé sur des polysaccharides témoins et révélé à l'orcinol sulfurique en chromatographie sur couche mince de silice. Cette fraction possède une activité qui dégrade 1 mg d'acide pectique de citron (Serva) en acide galacturonique au cours d'une réaction de 6 h à 40°C moyennant 13 μ g de protéines totales (200 μ l de F1). Les réactions enzymatiques ont lieu dans des récipients hermétiques en présence de quelques ml de toluène et sont légèrement agitées.

B.- Endo- β 1,4-xylanase (*Clostridium thermolacticum*)

Cette enzyme a été fournie gracieusement par Dr. Ph. Debeire (INRA, Villeneuve d'Ascq) (Debeire et al., 1990). Elle est généralement utilisée à 10 U / 20mg de substrat témoin dans un tampon AcONa, 0,05 M à pH 5,8 ; 60 °C pendant 6 h-8 h.

