

Biosynthèse de β -glucanes par des préparations enzymatiques de Blé

M. AXELOS et C. PÉAUD-LENOËL

Laboratoire de photosynthèse, C. N. R. S., 91 — Gif-sur-Yvette, France

On a préparé des extraits enzymatiques particuliers et solubles qui catalysaient l'incorporation de glucosyl à partir de l'UDP-Glc dans des β -glucanes. La présence d'ions divalents, notamment de Mg^{2+} , est nécessaire à l'activité. L'hydrolyse partielle ainsi que l'analyse structurale des disaccharides obtenus ont prouvé que les résidus glucosyl de ces glucanes étaient liés essentiellement en $\beta_{1\rightarrow4}$ (structure de cellulose) lorsque l'incubation avait lieu en présence d'UDP-Glc à faible concentration (10^{-5} à 10^{-6} M). Au contraire, les glucosyl étaient liés en $\beta_{1\rightarrow3}$ (structure de laminarane) dans les glucanes synthétisées à partir d'UDP-Glc à forte concentration (10^{-4} à 10^{-3} M).

Particulate and soluble enzyme extracts were prepared which catalyzed the incorporation of the glucosyl from UDP-Glc into β -glucans. The reactions required divalent ions, preferentially Mg^{2+} . By partial hydrolysis of these glucans and structural analysis of the disaccharides thereby produced, it was shown that the glucans were essentially $\beta_{1\rightarrow4}$ linked (cellulose structure) when the substrate UDP-Glc was incubated at low concentration (10^{-5} to 10^{-6} M). The glucans were mainly $\beta_{1\rightarrow3}$ linked (laminarane structure) at higher substrate concentration (10^{-4} to 10^{-3} M).

La biosynthèse des polysaccharides des parois cellulaires des plantes pose de très nombreux problèmes. Nous étudierons dans ce qui suit les propriétés des systèmes enzymatiques conduisant à la biosynthèse in-vitro des β -glucanes. Nous savons que la paroi des cellules végétales contient des glucanes dont les radicaux glucosyl sont liés soit en $\beta_{1\rightarrow4}$ (cellulose), soit en $\beta_{1\rightarrow3}$ (laminarane), soit alternativement suivant les deux modes de liaison (lichenine).

Il semble, d'après les données bibliographiques, que les enzymes responsables de ces biosynthèses soient contenus dans des *particules* qui sédimentent dans un gradient de gravité de 10 000 à 45 000 $\times g$. Villemetz et coll. [1] supposent que ces particules sont des fragments de membrane plasmatique.

La nature des substrats UDP-Glc (uridyl diphosphate glucose) et GDP-Glc (guanosyl diphosphate glucose) a fait l'objet d'études parfois contradictoires. Certains auteurs [2, 3] ont trouvé que le glucosyl du GDP-Glc était transféré en formant spécifiquement un polysaccharide à structure $\beta_{1\rightarrow4}$, alors que le glucosyl de l'UDP-Glc était transféré par les mêmes préparations enzymatiques en formant spécifiquement des chaînons liés en $\beta_{1\rightarrow3}$ [4, 5]. Suivant d'autres expériences [3, 6, 7], le glucosyl de l'UDP-Glc pourrait se retrouver dans des polysaccharides contenant les deux types de liaison. Il apparaît donc indispensable d'étudier en détail la structure des polysaccharides formés et les conditions des réactions.'

Communication présentée au colloque franco-tchécoslovaque sur la Chimie et la Biochimie des Glucides, Smolenice (Slovaquie), 29. Septembre — 4. Octobre 1969.

Nous avons entrepris des expériences de biosynthèse de β -glucanes avec des préparations enzymatiques extraites de racines de Blé en germination. Nous exposons dans ce qui suit quelques-uns des résultats que nous avons obtenus et nous discuterons les réponses partielles apportées aux problèmes précédents.

Préparation et activité des extraits enzymatiques

Les préparations enzymatiques ont été extraites en suivant la méthode proposée initialement par *Feingold* et coll. [4]. Elle a été modifiée suivant les indications du Schéma 1. On obtient d'abord une préparation particulière qui peut ensuite être solubilisée par l'usage de détergents. L'activité a été mesurée en ajoutant à la préparation particulière ou soluble de l'UDP-Glc [U - ^{14}C] ou du GDP-Glc [U - ^{14}C]. Après incubation à 25°C pendant 15 mn, on arrête la réaction par chauffage à 100°C et on mesure la radioactivité incorporée dans le résidu insoluble dans la soude 4 N. Certaines conditions d'activité du système ont été étudiées.

L'activité d'incorporation n'est observée qu'en présence d'ions divalents: Mg^{2+} est le plus actif et sa concentration optima est environ 2×10^{-2} M. Le remplacement de l'ion Mg^{2+} par Mn^{2+} dans le milieu réactionnel réduit environ deux fois l'activité. Le remplacement de l'UDP-Glc 7×10^{-5} M par le GDP-Glc 7×10^{-5} M réduit deux fois environ l'activité. Le remplacement de l'UDP-Glc 2×10^{-3} M par le GDP-Glc 2×10^{-3} M réduit 23 fois l'activité.

D'autre part, nous avons ajouté systématiquement au mélange réactionnel des cello-dextrines hydro-insolubles. Celles-ci n'activent pas d'une manière significative la réaction d'incorporation mais facilitent l'isolement par centrifugation du polysaccharide radioactif. L'activité des préparations varie suivant la concentration ionique du milieu d'extraction et d'incubation: la plus efficace est aux alentours de 0,1 M. Les extraits solubles ne sont actifs qu'en présence de saccharose qui a été ajouté au moment de la solubilisation à la concentration 0,3 M. Remarquons de plus que les conditions de broyage sont importantes; un broyage prolongé des racines, même dans l'azote liquide, détruit l'activité. Les préparations sont toujours instables: 50% de l'activité disparaît en 4 h de l'extrait particulière lavé et en 17 h de l'extrait solubilisé, conservés à 0°C. Dans les conditions standard de l'essai, c'est-à-dire en présence d'UDP-Glc 3×10^{-3} M, l'activité d'incorporation par mg de protéines est d'environ 10 nmoles de glucosyl incorporé en 15 mn pour l'extrait particulière lavé et de 80 nmoles pour l'extrait solubilisé. Les figures 1 et 2 donnent des exemples des mélanges mis en incubation.

Après une incubation de 15 mn, l'incorporation n'est plus linéaire en fonction du temps. Dans le cas où l'UDP-Glc est employé comme substrat, il est entièrement consommé après 30 mn mais l'enzyme n'est pas inactivé; on constate une nouvelle incorporation de radioactivité par une seconde addition d'UDP-Glc.

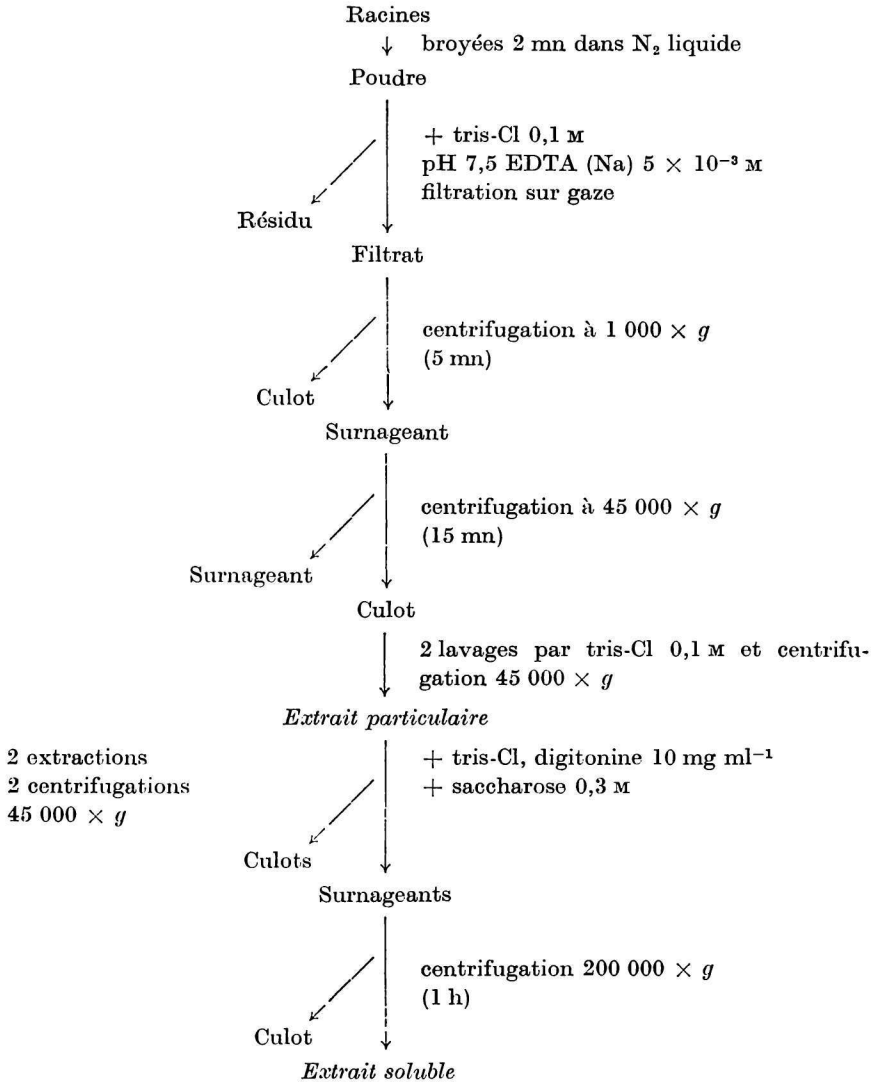
Analyse des produits de la réaction

En raison des faibles rendements d'incorporation obtenus en employant le GDP-Glc comme substrat, nous avons analysé seulement les polysaccharides synthétisés en présence d'UDP-Glc par des préparations particulières ou solubles. Les polysaccharides alcali-insolubles ont été hydrolysés par l'acide chlorhydrique fumant pendant 2 h à 20°C. Après élimination de l'acide, les oligosides radioactifs obtenus sont solubles dans l'eau. Ils ont été chromatographiés dans le système solvant I: *n*-butanol—acide acétique—eau (4 : 1 : 2 v/v) et dans le système solvant II: *n*-propanol—acétate d'éthyle—eau (7 : 1 : 2 v/v).

Schéma 1

Préparations enzymatiques

(0°C)



Les pics d'oligosides correspondant aux polysaccharides synthétisés avec les préparations particulières sont complexes. Dans la région où migrent les disaccharides,

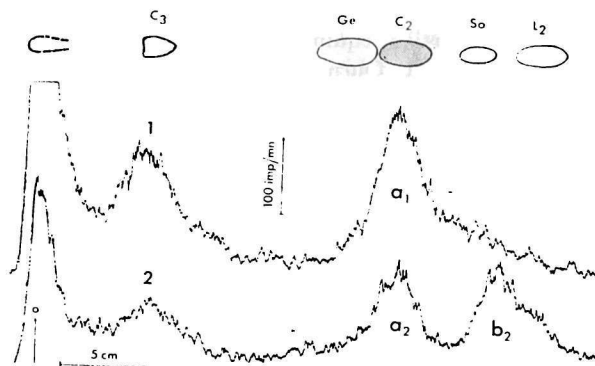


Fig. 1. Enregistrement de la radioactivité sur des chromatogrammes de produits d'hydrolyse ménagée des β -glucanes.

Conditions d'incubation: extrait particulière 200 mg contenant 6 mg de protéines; cellodextrines 2 mg; $MgCl_2$ 5 μ moles; Glc-1-P (α -D-glucopyranosyl-1-phosphate) 0,6 μ mole; tris-Cl [tris = tri(hydroxyméthyl) aminométhane], pH 7,5, 20 μ moles; UDP-Glc 0,04 μ mole (courbe 1) ou UDP-Glc 0,70 μ mole (courbe 2) contenant 1,7 μ Ci dans chaque cas. Volume total: 250 μ l. Incubation 30 mn à 25°C.

En haut: position des taches témoins sur le chromatogramme: L_2 — laminaribiose, So — sophorose, C_2 — cellobiose, Ge — geniobiose, C_3 — cellotriose.

Chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le système solvant II.

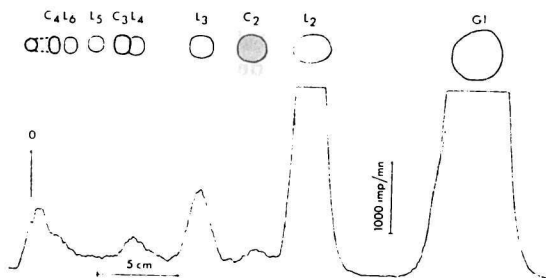


Fig. 2. Enregistrement de la radioactivité sur un chromatogramme de produits d'hydrolyse ménagée de β -glucane synthétisée en présence d'extrait soluble.

Conditions d'incubation: extrait solubilisé 1 ml contenant 2,8 mg de protéines; cellodextrines 2 mg; $MgCl_2$ 12 μ moles; Glc-1-P 3 μ moles; tris-Cl, pH 7,5, 100 μ moles; UDP-Glc 1,7 μ mole contenant 1,5 μ Ci. Volume total: 1,24 ml. Incubation 30 mn à 25°C.

En haut: position des taches témoins sur le chromatogramme: Gl — glucose; L_2 , L_3 , etc. — série d'oligosides liés en $\beta_{1\rightarrow3}$; C_2 , C_3 , etc. — série de cellodextrines.

Chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le système solvant I.

on peut distinguer au moins deux taches qui cochromatographient avec le cellobiose (*O*- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose) ou le laminaribiose (*O*- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)-D-glucopyranose). La structure de ces deux substances a été déterminée suivant la méthode de *Smith* [8]: Après réduction des produits d'oxydation périodique par le borohydrure de sodium et hydrolyse acide ménagée, l'un des pics (a_1 ou a_2 de la figure 1) fournit une proportion équimoléculaire de glycérol et d'érythritol radioactifs, l'autre pic (b_2 de la figure 1) fournit une proportion équimoléculaire de glycérol et d'arabinitol radioactifs, ce qui permet d'identifier a_1 et a_2 au cellobiose, b_2 au laminaribiose.

La proportion de radioactivité contenue dans le cellobiose par rapport à celle du laminaribiose augmente lorsque la concentration du substrat UDP-Glc est faible. C'est ce qui apparaît sur les courbes de la figure 1 correspondant respectivement aux chromatogrammes des produits d'hydrolyse ménagée des polysaccharides synthétisés en présence d'UDP-Glc $1,6 \times 10^{-4}$ M (courbe 1) ou 3×10^{-3} M (courbe 2).

Il faut remarquer d'autre part que la proportion de radioactivité due aux oligosaccharides restés sur la ligne de départ est beaucoup plus importante dans le cas de la courbe 1. Bien que la structure de ces oligosaccharides n'ait pas été déterminée dans cette expérience, leur présence majoritaire plaide en faveur d'une forte proportion de liaisons $\beta_{1 \rightarrow 4}$ dans le polysaccharide 1. Cette situation qui a été retrouvée systématiquement avec les extraits particuliers est plus nette encore et plus facile à interpréter dans le cas des polysaccharides synthétisés en présence des extraits solubles. Lorsque le substrat UDP-Glc est à concentration élevée ($1,4 \times 10^{-3}$ M) on retrouve, par hydrolyse acide ménagée, uniquement des oligosides de la série laminarane (fig. 2). A concentration faible de substrat (4×10^{-5} M), seule la série des cellobiosides apparaît sur le chromatogramme [9].

Conclusion

Les préparations enzymatiques de Blé semblent donc capables de biosynthétiser alternativement des chaînes $\beta_{1 \rightarrow 4}$ (structure cellulose) ou $\beta_{1 \rightarrow 3}$ (structure laminarane), suivant la concentration du substrat UDP-Glc. L'interprétation la plus plausible de ce phénomène est qu'il existe deux enzymes différents, l'un spécifique du transfert du glucosyl en $\beta_{1 \rightarrow 4}$ possédant une forte affinité pour le substrat, l'autre spécifique du transfert en $\beta_{1 \rightarrow 3}$ doit posséder une affinité plus faible. Une hypothèse alternative est un effet modificateur de la structure d'un seul enzyme par le substrat UDP-Glc lui-même, conduisant à un changement de la stéréospécificité de la réaction.

D'autres effecteurs peuvent également intervenir, notamment la nature des cofacteurs ioniques. Le Mn^{2+} semble plus favorable à la biosynthèse des chaînons $\beta_{1 \rightarrow 4}$. D'autre part, les composés possédant des radicaux glycol semblent être des activateurs de ces réactions [10] et pourraient activer de préférence la biosynthèse des laminaranes.

Remarquons que les expériences décrites ne permettent pas de préciser si les liaisons $\beta_{1 \rightarrow 4}$ et $\beta_{1 \rightarrow 3}$ coexistent dans le même polysaccharide ou bien dans deux molécules différentes.

Il est certain que seule la purification des enzymes permettra de préciser davantage la spécificité des substrats et les conditions des réactions conduisant soit à l'une, soit à l'autre des structures de ces β -glucanes.

Bibliographie

1. Villemez C. L., Mac Nab J. M., Albersheim P., *Nature* **218**, 878 (1968).
2. Barber G. A., Elbein A. D., Hassid W. Z., *J. Biol. Chem.* **239**, 4056 (1964).
3. Villemez C. L., Jr., Franz G., Hassid W. Z., *Plant Physiol.* **42**, 1219 (1967).
4. Feingold D. S., Neufeld E. F., Hassid W. Z., *J. Biol. Chem.* **233**, 784 (1958).
5. Flowers H. M., Batra K. K., Kemp J., Hassid W. Z., *Plant Physiol.* **43**, 1703 (1968).
6. Brummond D. O., Gibbons A. P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**, 156 (1964).
7. Ordin L., Hall M. A., *Plant Physiol.* **43**, 473 (1968).
8. Goldstein I. J., Hay G. W., Lewis B. A., Smith F., *Methods in Carbohydrate Chemistry* (R. L. Whistler, Editor), V (76), p. 361. Academic Press, New York—London, 1965.
9. Péaud-Lenoël C., Axelos M., non publié.
10. Thomas D. des S., Smith J. E., Stanley R. G., *Can. J. Botany* **47**, 489 (1969).