

50.376

1964

14-2

50376

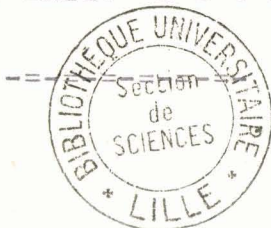
1964

14-2

MEMOIRE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU GRADE DE DOCTEUR-ÈS-SCIENCES D'ETAT  
(Mention Chimie)

par

Monsieur Emile S E G A R D



1ère Thèse :

ETUDE SUR LES CELLULES LIBRES

- 1° - Description d'un procédé original de préparation d'hépatocytes du foie de Rat .
- 2° - Applications biochimiques .

2ème Thèse :

ETUDE CRITIQUE DES PROCÉDES DE PERMETHYLATION DES GLUCIDES - QUELQUES APPLICATIONS .

-----

TABLE DES MATIERES

---

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>GENERALITES</u>	
- QUELQUES NOTIONS SUR LA CHIMIE ET SUR LA STRUCTURE DES OSES ET DES OSIDES	3
<u>I - FORMULES ET PROPRIETES CHIMIQUES DES OSES</u>	3
A - <u>LES FORMULES DES OSES</u>	4
B - <u>QUELQUES PROPRIETES CHIMIQUES IMPORTANTES DES OSES</u>	6
1 - <u>Oxydation des oses</u>	6
2 - <u>Réduction des oses</u>	9
3 - <u>Réactions de condensation</u>	9
a - Osidation des oses	11
b - Ethérification	11
c - Estérification	15
4 - <u>Stabilité des oses</u>	15
a - Stabilité en milieu alcalin	17
b - Stabilité en milieu acide	17
<u>II - PROPRIETES ESSENTIELLES ET METHODES D'ETUDE DE LA STRUCTURE DES OSIDES</u>	19
1 - <u>DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN OSES DES OSIDES</u>	20
A - <u>DETERMINATION DE LA TENEUR EN OSES TOTAUX DES OSIDES</u>	20
1 - <u>DOSAGE DES OSES NEUTRES TOTAUX</u>	20
2 - <u>DOSAGE DES OSAMINES TOTALES</u>	20
3 - <u>DOSAGE DES ACIDES URONIQUES TOTAUX</u>	20
4 - <u>DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES TOTAUX</u>	20
B - <u>DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLAIRES EN OSES DES OSIDES</u>	21
1 - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES OSES NEUTRES</u>	21
2 - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES OSAMINES</u>	22



	<u>Pages</u>
3 - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES ACIDES URONIQUES</u>	24
4 - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES</u>	24
2 - <u>DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES OSIDES</u>	25
A - <u>DETERMINATION DE L'ORDRE D'ENCHAINEMENT DES OSES</u> <u>DANS LES MOLECULES D'OSIDES</u>	25
1 - <u>DETERMINATION DE L'OSE TERMINAL</u>	25
2 - <u>DETERMINATION DE LA SEQUENCE DES OSES</u>	25
B - <u>DETERMINATION DU POINT D'ATTACHE DES LIAISONS</u> <u>OSIDIQUES</u>	27
1 - <u>OXYDATION PERIODIQUE DES OSIDES</u>	27
2 - <u>PERACETYLATION DES OSIDES</u>	29
3 - <u>PERMETHYLATION DES OSIDES</u>	29
 <u>LES METHODES DE METHYLATION DES GLUCIDES</u>	 33
I - <u>METHYLATION PAR LE SULFATE DE METHYLE</u>	35
A - <u>PROCEDE ORIGINAL D'HAWORTH</u>	35
B - <u>PROCEDES DE HAWORTH MODIFIES</u>	36
1 - <u>METHYLATION DES POLYOSIDES</u>	36
a- Méthylation des polysides natifs	37
b- Méthylation des polysides acétylés	38
c- Mode opératoire personnel	40
2 - <u>METHYLATION DES OLIGOSIDES</u>	41
3 - <u>METHYLATION DU GROUPEMENT MUCOPOLYSACCHARIDIQUE</u> <u>DES GLYCOPROTEIDES</u>	43
II - <u>METHYLATION PAR L'IODURE DE METHYLE</u>	44
A - <u>PROCEDE ORIGINAL DE PURDIE ET IRVINE</u>	44
B - <u>PROCEDES DE PURDIE ET IRVINE MODIFIES</u>	44
1 - <u>METHYLATION DES POLYOSIDES</u>	45
a- Méthylation des méthylpolyosides en présence d'oxyde d'argent	45

	<u>Pages</u>
b- Méthylation en présence de sodium dans l'ammoniac liquide	46
c- Méthylation des polyosides sous la forme de complexes du thallium	47
2 - <u>METHYLATION DES OLIGOSIDES</u>	48
a- Méthylation en présence de sodium	49
b- Méthylation en présence de diméthylformamide	49
c- Méthylation en présence de baryte ou de strontiane	51
3 - <u>METHYLATION DU GROUPEMENT MUCOPOLYOSIDIQUE DES     GLYCOPROTEIDES</u>	51
a- Méthylation de l'ovomucoïde	51
b- Méthylation de l'orosomucoïde	52
 III - <u>METHYLATION PAR LE DIAZOMETHANE</u>	 52
1 - Méthylation des polyosides	53
2 - Méthylosidation des oses et des oligosides	54
 <u>CONCLUSIONS</u>	 55
 APPENDICE n° 1 - METHODE DE DOSAGE DES GROUPEMENTS "METHOXY" *****	 56
 <u>PRINCIPE DES METHODES</u>	 56
 <u>PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE HOFFMAN et WOLFROM</u>	 57
  <u>PROCEDES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES OSES METHYLES</u>	  61
I - <u>PROPRIETES DES OSES METHYLES</u>	61
A - <u>PROPRIETES MHSIQUES</u>	61
1 - <u>POUVOIR ROTATOIRE</u>	61
2 - <u>THERMOSTABILITE</u>	61
3 - <u>CARACTERES DE SOLUBILITE</u>	67
4 - <u>CRISTALLISATION</u>	68



	<u>Pages</u>
B - <u>PROPRIETES CHIMIQUES DES OSES METHYLES</u>	68
1 - <u>STABILITE EN MILIEU ACIDE</u>	68
2 - <u>STABILITE EN MILIEU ALCALIN</u>	70
3 - <u>PROCEDES DE DEMETHYLATION DES GLUCIDES METHYLES</u>	70
4 - <u>REACTIONS COLOREES DES OSES METHYLES</u>	71
II - <u>METHANOLYSE ET HYDROLYSE DES OSIDES METHYLES</u>	71
A - <u>METHANOLYSE</u>	71
B - <u>HYDROLYSE</u>	72
III - <u>SEPARATION, IDENTIFICATION ET DOSAGE DES DERIVES</u> <u>METHYLES DES OSES ET DES METHYLOSIDES</u>	74
A - <u>METHODES DE FRACTIONNEMENT</u>	74
1 - <u>CRISTALLISATION FRACTIONNEE</u>	74
2 - <u>DISTILLATION FRACTIONNEE</u>	75
3 - <u>EXTRACTION FRACTIONNEE</u>	75
B - <u>METHODES ELECTROPHORETIQUES</u>	75
C - <u>METHODES CHROMATOGRAPHIQUES</u>	76
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNES</u>	78
2 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	79
3 - <u>CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE</u>	84
4 - <u>CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE</u>	85
 <u>CONCLUSIONS</u>	 90
IV - <u>METHODES COMPLEMENTAIRES</u>	90
A - <u>IDENTIFICATION DES OSES METHYLES</u>	90
1 - <u>DETERMINATION DES CONSTANTES PHYSIQUES</u>	90
2 - <u>REVELATIONS SPECIFIQUES</u>	90
3 - <u>DETERMINATION DES VOLUMES ET TEMPS DE RETENTION</u> <u>EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE</u>	91

	<u>Pages</u>
4 - <u>PROCEDES DE DEMETHYLATION</u>	92
a- Méthode de déméthylation par l'acide bromhydrique	92
b- Méthode de déméthylation par le trichlorure de bore	92
5 - OXYDATION PERIODIQUE	93
B - <u>DOSAGE DES OSES METHYLES</u>	93
<u>CONCLUSIONS</u>	94
APPENDICE n° 2 - <u>PERMETHYLATION DES OSIDES ET SEPARATION</u> ***** <u>QUANTITATIVE DES DERIVES METHYLES DES OSES</u> <u>par WALLENFELS, KUHN, TRISCHMANN et EGGE</u>	96
<u>PROCEDES DE METHYLATION</u>	96
<u>ETUDE CRITIQUE</u>	97
<u>DOSAGE DES METHOXY</u>	97
<u>CHROMATOGRAPHIE DES OSES ET METHYLOSIDES METHYLES</u>	97
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	99
I - <u>ETUDE CRITIQUE DES PROCEDES DE PERMETHYLATION DES</u> <u>OSIDES</u>	100
1 - <u>PROCEDE ORIGINAL DE HAWORTH</u>	101
2 - <u>PROCEDE DE KUHN, BAER et GAUHE au SULFATE DE</u> <u>METHYLE-SOUDE</u>	102
3 - <u>PROCEDE DE PURDIE ET IRVINE A L'IODURE DE METHYLE</u>	102
4 - <u>PROCEDE MIXTE AU SULFATE ET A L'IODURE DE METHYLE</u> <u>(Procédé Personnel)</u>	103
5 - <u>PROCEDE DE KUHN et TRISCHMANN A L'IODURE DE METHYLE-</u> <u>BARYTE</u>	103
6 - <u>PROCEDE DE KUHN, BAER et GAUHE A L'IODURE DE METHYLE,</u> <u>OXIDE D'ARGENT, DIMETHYLFORMAMIDE</u>	104



	<u>Pages</u>
II - <u>LA QUESTION DE L'ALLOLACTOSE DU LAIT DE FEMME</u>	107
III - <u>PERMETHYLATION DES CEREBROSIDES DE RATE DE</u> <u>MALADIE DE GAUCHER</u>	109
IV - <u>ETUDE SUR LA PERMETHYLATION DES GLYCOPROTEIDES</u>	112
 <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	 116
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	 119
 <u>INDEX DES MATIERES</u>	 129

## I N T R O D U C T I O N

-----

L'étude chimique des molécules glucidiques fait intervenir un grand nombre de techniques particulières qui permettent de déterminer successivement leur composition en oses et leur structure, c'est-à-dire, essentiellement, le mode d'enchaînement des oses et les points d'attache des liaisons osidiques.

L'étude de la composition en oses d'un oside est importante pour connaître la nature des oses constituants et leurs proportions molaires, mais elle ne fournit aucun renseignement sur la forme et sur la complexité de la molécule, ainsi que sur ses sites "actifs". Or il s'agit là de l'étude la plus importante, puisqu'elle permet de préciser le "fragment structural" qui est le siège des activités biologiques de la molécule. Ainsi, KUHN (1) a démontré que seule la liaison diholosidique  $\beta$ -galactosido-1,4-N-acétylglucosamine était responsable de l'activité *Lactobacillus bifidus* des polysides du lait de Femme, bénéfique dans la prévention des syndrômes intestinaux du Nourrisson. La connaissance de la structure exacte de ces polysides permet, en outre, d'envisager leur synthèse et, dans un proche avenir, la "maternisation" du lait de Vache.

De même, les travaux de STAUB et TINELLI (2) et de HEIDELBERGER (3) ont permis de préciser que la spécificité immunologique des polysaccharides des Pneumocoques était liée à certaines séquences osidiques comme, par exemple, la liaison acide glycuronique  $\xrightarrow{1,4}$  glucose, spécifique du Pneumocoque III. Ces travaux ont conduit à la préparation de vaccins synthétiques.

Outre l'intérêt purement chimique de ces études structurales, on imagine aisément l'importance fondamentale de ces recherches dans l'interprétation de faits biologiques, physiologiques ou pathologiques et dans certaines applications thérapeutiques, car les recherches en matière de structures moléculaires sont essentiellement fondées sur le principe suivant : il existe une relation étroite entre la structure d'une molécule et son activité biologique, physiologique, pathologique ou thérapeutique.



D'un point de vue purement technique, on peut admettre que, actuellement, les méthodes de détermination de la composition en oses des osides sont satisfaisantes. Au contraire, les recherches sur la structure des molécules glucidiques se heurtent encore à de nombreuses difficultés. En outre, l'application des méthodes modernes d'analyse, fines et sensibles, a mis en évidence les imperfections des procédés anciens d'exploration de la structure des glucides qu'il faut donc améliorer. Elle a permis l'éclosion de nouvelles méthodes qui sont encore au stade des premiers balbutiements du point de vue de la réalisation. C'est ainsi que les procédés de perméthylation des glucides ont révélé leurs imperfections dès l'application de la chromatographie sur papier et de la chromatographie en phase gazeuse. Actuellement, on recherche encore un procédé de perméthylation totale et une méthode d'identification et de dosage des oses méthylés satisfaisante .

C'est pourquoi, nous nous sommes proposé de faire le point de cette question importante de la perméthylation des glucides, puisqu'elle seule permet de préciser les points d'attaches des liaisons osidiques. Nous ferons part de notre expérience en la matière et nous apporterons notre modeste contribution de commentaires.

Nous ferons précéder cette étude par un bref rappel de notions fondamentales en matière de chimie et de structure des glucides.

GENERALITES





QUELQUES NOTIONS FONDAMENTALES SUR LA CHIMIE ET  
SUR LA STRUCTURE DES OSES ET DES OSIDES

---

Les glucides ou hydrates de carbone sont divisés en deux groupes : les oses (ou glucides simples) et les osides qui sont des polymères d'oses (holosides quand la molécule est constituée uniquement d'oses ; hétérosides, si le glucide est associé à un groupement non-glucidique appelé : aglycone).

La définition classique des oses est la suivante : les oses sont des glucides simples, réducteurs, possédant une fonction carbonyle - aldéhydique ou cétonique - et plusieurs fonctions alcooliques. Les oses sont donc, du point de vue chimique, des "polyol-als" ou aldoses, ou des "polyol-ones" ou cétooses. Le nombre des carbones de la chaîne peut varier de 3 à 9, bien que les plus répandus dans la nature comportent 5 carbones (aldo- ou cétopentoses) ou 6 carbones (aldo- ou cétohexoses). Les propriétés essentielles de ces composés et de leurs polymères - les osides - seront donc supportées par les fonctions alcooliques d'une part et par la fonction aldéhydique - ou cétonique - d'autre part.

Les osides résultent de la condensation de molécules d'oses, unies les unes aux autres par des liaisons osidiques qui font intervenir la fonction réductrice de l'ose. Suivant le nombre de molécules d'oses associées, on distingue les oligosides de faible poids moléculaire et les polyosides (ou polysaccharides) de poids moléculaire élevé.

Nous envisagerons successivement :

- 1- les formules et les propriétés chimiques essentielles des oses.
- 2- les propriétés et les méthodes de détermination de la structure des osides.

I - FORMULES ET PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DES OSES

La connaissance de la structure exacte des oses permet, seule, de comprendre certaines des propriétés chimiques particulières à cette classe de composés.

## A - LES FORMULES DES OSES

### 1° - Formules linéaires

La première formule d'un ose (le glucose) fut linéaire (FITTING et BABYER) (4) (figure 1 a ). Elle rendait compte, par sa fonction aldéhydique, des propriétés réductrices des oses, de la formation d'oximes (en présence d'hydroxylamine) ou de celle des hydrazones (en présence de phénylhydrazine), et, par ses fonctions alcooliques, de la formation de dérivés de substitution acétylés, benzoylés ou méthylés. La réduction du glucose en iodohexane normal, par l'action de l'acide iodhydrique, confirmait l'existence d'une chaîne linéaire non ramifiée.

### 2° - Formules cycliques

Cependant, dès 1882, TOLLENS (5) avait observé que certaines des propriétés classiques de la fonction aldéhydique, comme l'oxydation spontanée à l'air ou la recoloration de la fuschine bisulfitee, ne pouvaient être mises en évidence chez le glucose. Aussi proposa-t-il une nouvelle formule, dite formule cyclique semi-acétalique de TOLLENS (figure 1 c ) à laquelle il parvenait par l'intermédiaire de la forme acétalique: une déshydratation s'effectuant entre l'un des hydrogènes de l'hydrate d'aldéhyde et un groupe alcoolique de la chaîne donnait lieu à la formation d'un pont oxydique entre le carbone 1 et le carbone 4 ou 5 de la chaîne. La conception de cette formule cyclique était en accord avec les valeurs élevées du pouvoir rotatoire des oses, voisins de celui des lactones des acides aldoniques correspondants et plus élevées que celui des acides aldoniques ou des polyols que l'en obtient par oxydation ou par réduction des oses et dont le formule est linéaire. En outre, tenant compte de la stabilité des cycles pentagonaux et de la formation aisée des lactones 1-4, TOLLENS supposa que la déshydratation intéressait le carbone 4 et conduisait à une formule "furannique" des oses (figure 1 c ). Mais les études de méthylation des oses ont permis de préciser que la forme "stable" de tous les oses libres et de la plupart des oses combinés se présentait sous la forme "pyrannique", le pont oxydique reliant les carbones 1 et 5 (figure 1 d ).

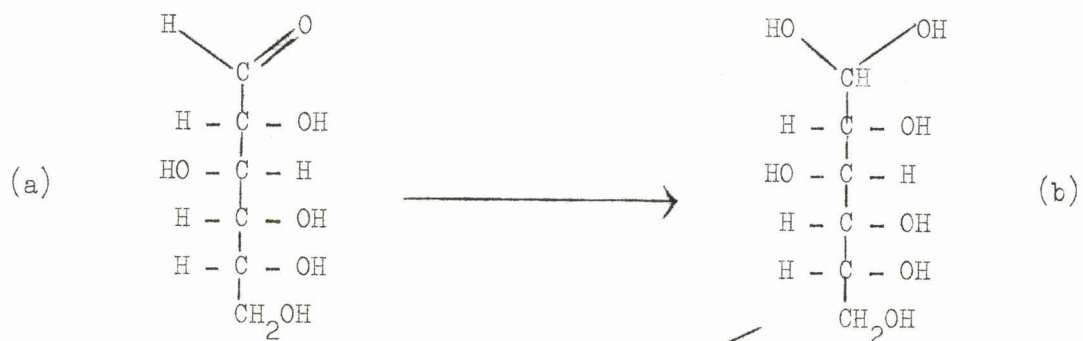
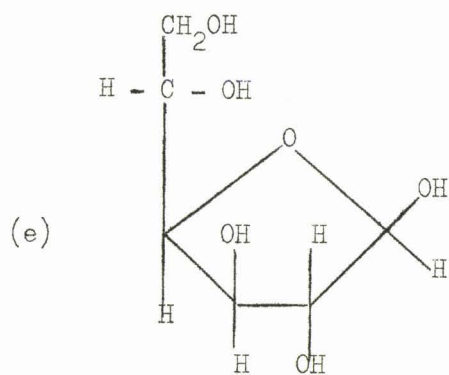
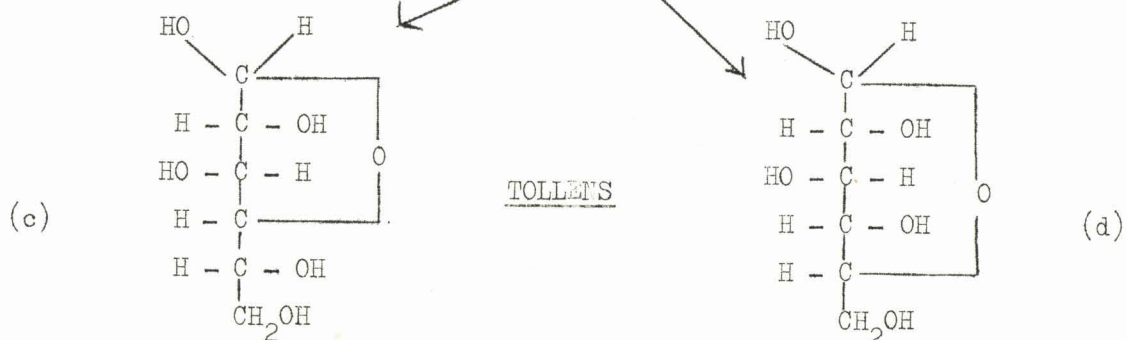
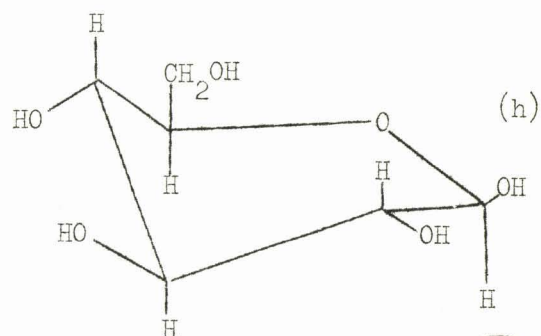
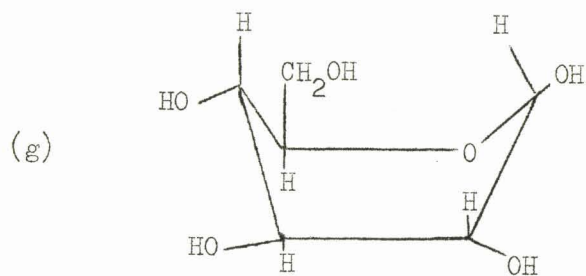
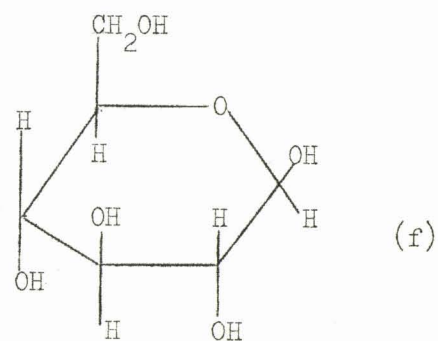
FITIG ET BAEYERHAWORTH

Figure 1

Formule des oses . Cas particulier du glucose





La forme furannique, qui possède un pont oxydique entre les carbones 1 et 4, n'existe que dans certains osides. Un premier exemple en est fourni par le saccharose où le fructose est sous la forme furannique. Un autre exemple est donné par le " $\gamma$ -méthylglucoside" de FISCHER, qui coexiste avec les  $\alpha$  et  $\beta$ -méthylpyrannoglucosides (figure 6, page 12), après l'action du méthanol-chlorhydrique sur le glucose. Ce composé est hydrolysé plus aisément par les acides dilués que les  $\alpha$  et  $\beta$ -méthylglucosides. En outre, son pouvoir rotatoire est lévogyre, tandis que les isomères  $\alpha$  et  $\beta$  sont dextrogyres et sa résistance à l'hydrolyse sous l'action des enzymes (émulsine et invertine) est plus grande. Des expériences de méthylation ont permis de démontrer qu'il s'agissait d'une forme combinée furannique du glucose.

### 3° - Formules stériques

La formule cyclique de TOLLENS ne tient cependant pas compte de la configuration spatiale des molécules. Grâce aux nombreux travaux réalisés par l'école de HAWORTH sur la structure des oses et des osides, les formules stériques de HAWORTH ont conduit à une meilleure représentation de la molécule des oses. Dans ces formules, les atomes d'hydrogène et les fonctions hydroxyles sont disposés par rapport au plan du cycle pyrannique ou furannique de l'ose. Ces dispositions permettent d'expliquer les isoméries "bateau" (figure 1 g, page 5) et "chaise" (figure 1 h, page 5) que l'on rencontre chez les oses.

## B - QUELQUES PROPRIETES CHIMIQUES IMPORTANTES DES OSES

Les propriétés chimiques des oses sont liées, d'une part, à la présence de la fonction carbonyle et, d'autre part, à la présence des fonctions alcooliques. Nous limiterons notre description aux seules propriétés qui interviennent dans les procédés de détermination de la structure des glucides.

### 1 - OXYDATION DES OSES

Par la présence dans leur molécule des fonctions aldéhydiques ou cétoniques, les oses possèdent des propriétés réductrices. Ils sont, en particulier, oxydés en milieu alcalin par les sels de cuivre, de bismuth et de mercure et ces réactions sont classiquement appliquées dans la recherche et le dosage des oses et des osides réducteurs. Dans ce cas, l'oxydation est brutale et

s'accompagne d'une rupture de la chaîne carbonée avec formation d'acides divers, comme l'acide lactique, l'acide tartrique ou l'acide glycérique.

A côté de ces réactions d'oxydation incontrôlables et, par conséquent, ininterprétables, existent des réactions sélectives dont l'application apporte des renseignements précieux sur la structure des oses et des osides. Il s'agit de l'oxydation par l'iode ou par le brome, d'une part, de l'oxydation par l'acide periodique, d'autre part.

#### a - Oxydation des oses en acides aldoniques

L'iode ou le brome, en milieu alcalin (soude, carbonate de soude ou carbonate de calcium) oxyde les aldoses en acides aldoniques (figure 2) (\*).

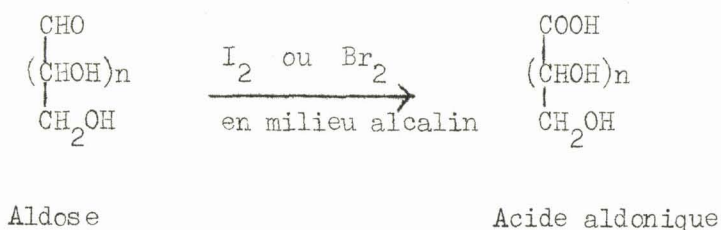


Figure 2

Oxydation des aldoses en acides aldoniques

Cette propriété est mise à profit dans l'identification de l'ose terminal d'une molécule d'oside (voir page 25).

#### b - Oxydation des oses par l'acide periodique

On sait, depuis les travaux de MALAPRARE (6), que l'acide periodique oxyde les fonctions  $\alpha$ -glycols et les fonctions  $\alpha$ -amino-alcools en fonctions aldéhydiques en libérant parfois de l'acide formique ou du formaldéhyde, suivant les modalités de la figure 3 (page 8).

---

(\*) - Il est intéressant de noter que les cétooses ne sont pas oxydés dans ces conditions. En outre, une oxydation plus brutale par l'acide azotique se porte, à la fois, sur la fonction réductrice et sur la fonction alcoolique primaire et donne des acides aldariques. Enfin, l'oxydation des méthylsides conduit aux acides uroniques qui conservent la fonction carbonyle et des propriétés réductrices.

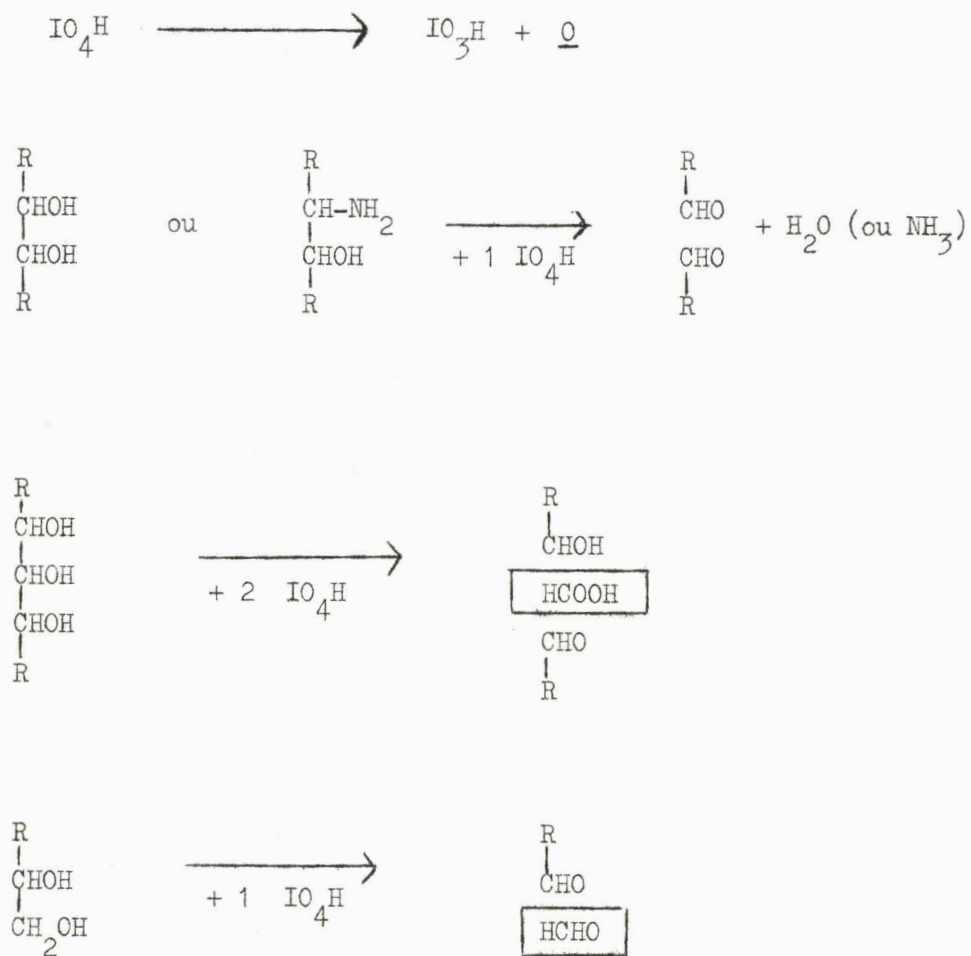


Figure 3

Modalités de l'action de l'acide periodique  
sur les fonctions  $\alpha$ -glycols (ou  $\alpha$ -amino-  
alcools)



La fonction réductrice libre des oses est oxydée en acide formique si les carbonnes voisins portent une fonction alcoolique et l'ose se comporte alors comme un polyol-al linéaire (figure 5 a ; page 10). Au contraire, dans le cas des osides, la fonction réductrice protégée n'est pas oxydée et l'ose se comporte comme un dérivé cyclique (figure 5 b ) donnant naissance à un polyaldéhyde. On voit donc, que le calcul du nombre de molécules d'acide périodique consommées et l'identification et le dosage du formaldéhyde et de l'acide formique libérés apportent des informations intéressantes sur la formule des glucides.

## 2 - REDUCTION DES OSES

La réduction de la fonction carbonyle d'un ose (par le borohydrure de sodium ou de potassium, en général) conduit à un polyol dans le cas d'un aldose et à deux polyols isomères dans le cas d'un cétose (figure 4). Les polyols sont désignés par le suffixe itol ( Ex: glucitol, mannitol).

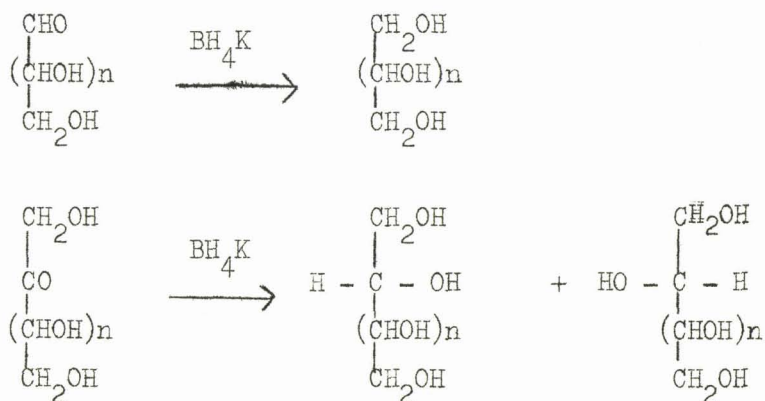


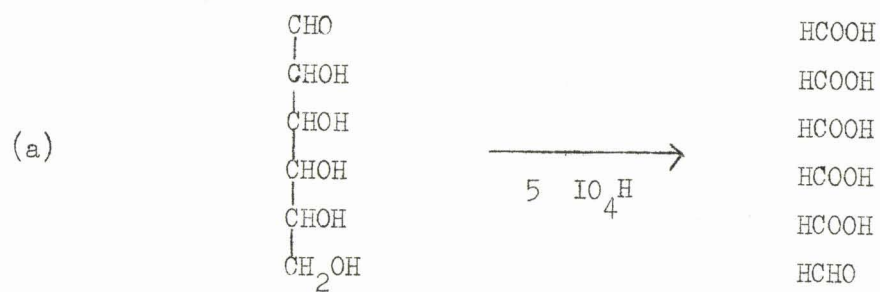
Figure 4

Réduction d'un aldose et d'un cétose en polyols

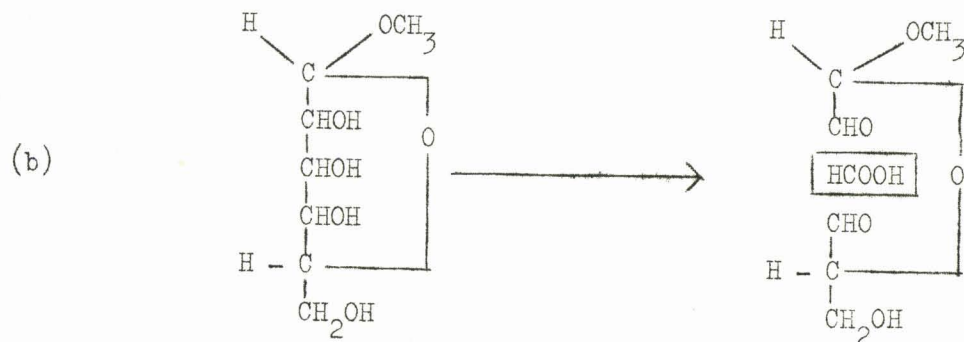
Cette propriété est mise à profit dans l'identification de l'ose terminal d'un oside (voir page 25) .

## 3 - REACTIONS DE CONDENSATION

Les oses sont capables de se condenser avec de nombreuses substances, soit par leur fonction réductrice, soit par leurs fonctions alcooliques.



ose



Méthyl-pyranoside

Figure 5

Oxydation d'un hexose (a) et d'un oside (b)  
par l'acide periodique

Nous nous bornerons à citer - car elles n'offrent qu'un intérêt restreint dans notre étude - les réactions de condensation avec l'hydrazine (formation d'hydrazones et d'osazones), l'hydroxylamine (formation d'oximes), l'acide cyanhydrique (formation de cyanhydrines), l'ammoniac et les amines (formation d'imines), les mercaptols (formation de mercaptals), l'acétone (formation de dérivés isopropylidéniques). Au contraire, nous décrirons en détail certaines réactions de condensation auxquelles le biochimiste fait appel pour explorer la structure des glucides. Ce sont les réactions d'osidation, d'éthérification et d'estérification.

#### a - Osidation des oses

Le passage d'un courant d'acide chlorhydrique gazeux sec dans une solution alcoolique d'ose donnent lieu à une réaction de condensation entre une molécule d'alcool et le groupement semi-aldéhydrique de l'ose (figure 6 ; page 12). La fonction "pseudo-éther" ainsi formée est appelée fonction osidique.

Note 1 : La réaction de condensation conduit à la formation des deux formes osidiques : les anomères  $\alpha$  et  $\beta$  (figure 6) .

Note 2 : L'osidation est aussi réalisée dans les conditions d'éthérification des fonctions alcooliques que nous décrirons plus loin (voir page 29) .

Note 3 : Les fonctions osidiques sont relativement instables : elles sont aisément hydrolysées par l'acide chlorhydrique 1 N ou 2 N à 100°C pendant 1 à 2 heures ou par l'acide sulfurique 1 N ou 2 N à 100°C pendant 4 à 5 heures. Dans ces conditions, les fonctions éthers "véritables" sont stables.

#### b - Ethérification

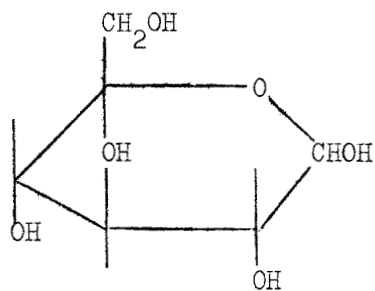
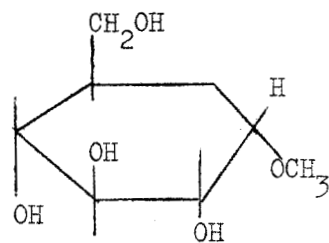
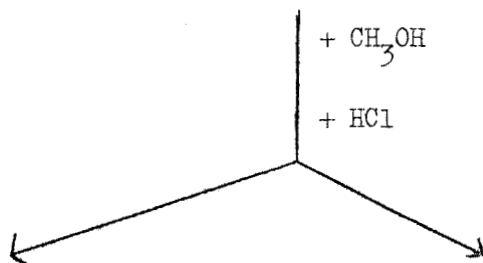
##### $\alpha$ - Tritylation

Le chlorure de trityle ou chlorure de triphénylméthane ( $\text{Cl}-\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$ ) se fixe sélectivement sur la fonction alcoolique primaire et donne lieu à la formation d'un dérivé tritylé (BARKER) (7) . Cette réaction est précieuse pour démontrer que la fonction alcoolique primaire d'un ose est libre.

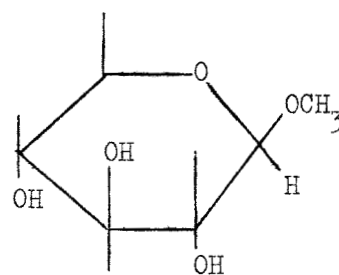
##### $\beta$ - Tosylation

Le chlorure de l'acide p. toluènesulfonique réagit de la même manière, en milieu alcalin et à la température ordinaire, en bloquant la fonction alcoolique primaire et en donnant naissance à un dérivé tosylé.



Glucoseα - méthylglucoside

+

β - méthylglucosideFigure 6

Formation des α et β - méthylglucosides

### - Perméthylation

La réaction la plus fréquemment appliquée dans les études de structures des glucides en général et des oses, en particulier, est la méthode de perméthylation qui consiste à substituer tous les groupements hydroxyles libres par des radicaux "méthoxy" .

La méthyoxylation des oses est réalisée en milieu faiblement alcalin (p.e. en présence de soude diluée , d'oxyde d'argent ou de diméthylformamide) par l'action d'esters neutres du méthanol comme le sulfate, l'iodure ou le chlorure de méthyle.

Nous décrivons plus loin en détail (voir page 35 ) l'historique de la méthode de perméthylation ainsi que les modes opératoires les plus couramment utilisés. Nous précisons, cependant, dans la figure 7 (page 14) le mécanisme de la réaction ainsi que quelques propriétés des dérivés perméthylés.

### Quelques propriétés fondamentales des dérivés perméthylés

1 - Les oses perméthylés ne sont plus réducteurs. Leur fonction réductrice peut être déméthylée par action des acides dilués (voir plus haut les conditions d'hydrolyse chlorhydrique ou sulfurique des osides (page 11 )

2 - Au contraire des fonctions méthylosidiques, les groupements "méthoxy" sont très stables vis-à-vis de l'hydrolyse acide et les hydroxyles alcooliques ne peuvent être régénérés que par l'acide bromhydrique ou le chlorure de bore.

### J - Silylation

SWEELEY, BENTLEY, MAKITA et WELLS (8) ont récemment décrit une méthode de silylation qui consiste à faire agir sur les glucides pendant quelques minutes, à la température du laboratoire, du triméthylchlorosilane ( $\text{Me}_3\text{-Si-Cl}$ ) en présence d'hexaméthylidisilazane ( $\text{Me}_3\text{-Si-Si-Me}_3$ ) . Ils obtiennent de cette manière des triméthylsilyldérivés (TMS-dérivés) des glucides qui résultent de la substitution de tous les hydroxyles par un radical "triméthylsilyl" et dont la séparation par chromatographie en phase gazeuse est relativement aisée.

Cette méthode semble très séduisante par sa simplicité. Elle nécessite en outre de très faibles quantités de glucides (de l'ordre de 10 mg). Elle n'a cependant pas encore reçu la sanction de nombreuses applications qui, seules, apporteront des preuves de son efficacité et de sa valeur.

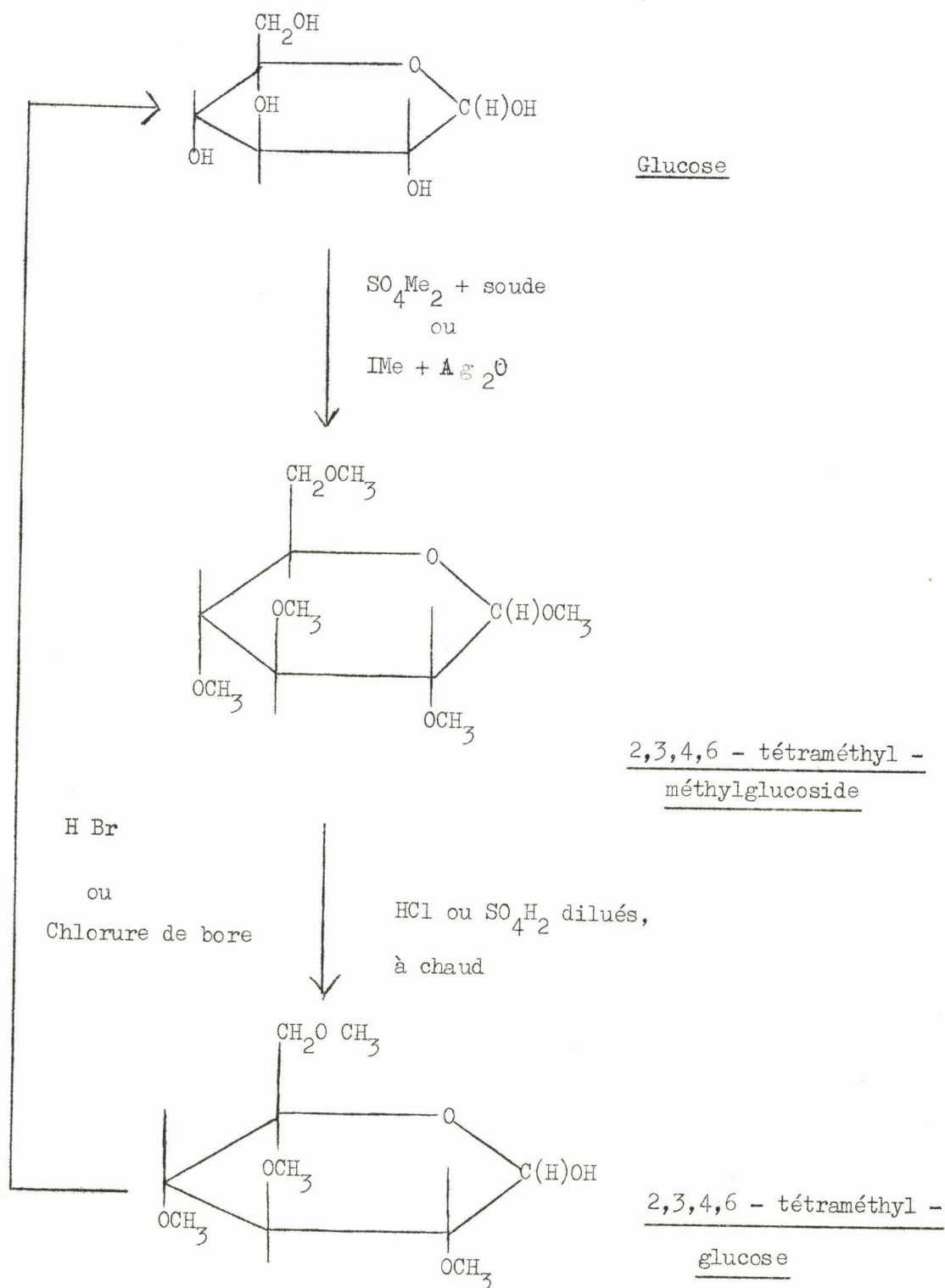


Figure 7

Perméthylation du glucose et stabilité du perméthyl-dérivé



### c - Estérisification

Parmi les nombreux esters minéraux ou organiques que les oses sont susceptibles de fournir, nous retiendrons les esters de l'acide borique et de l'acide acétique dont la formation est largement mise à profit dans l'analyse des glucides.

Esters boratés. Les borates, en milieu alcalin et à la température ordinaire, donnent des esters qui résultent de la condensation de deux des fonctions acides de l'acide borique avec une fonction cis-glycolique des oses (figure 8 a ; p.16). La troisième fonction acide de l'acide borique restant libre, le complexe boraté de l'ose est ionisable et possèdera une vitesse de migration anodique en électrophorèse, tandis que les oses neutres non complexés resteront à l'emplacement de départ. Cette propriété est mise à profit pour réaliser la séparation de certains glucides et pour mettre en évidence des fonctions cis-glycoliques dans leur molécule.

Note 1 : Les esters boriques sont facilement dissociés en milieu acide.

Note 2 : L'hydroxyle réducteur peut donner lieu à la formation d'un ester borique à la condition que l'hydroxyle du carbone 2 se trouve en position cis par rapport au premier (figure 8 a ).

Esters acétiques. Toutes les fonctions hydroxyles (y compris la fonction réductrice) sont acétylées (figure 8 b ) à la température ordinaire par l'anhydride acétique en présence d'acétate de zinc (formation du dérivé  $\alpha$  acétylé) ou de sodium (formation du dérivé  $\beta$  acétylé). Cette réaction de peracétylation fournit les mêmes résultats que la réaction de perméthylation et donne lieu aux mêmes applications.

La désacétylation sélective de l'hydroxyle réducteur est réalisée par les acides halogénés (passage aux dérivés acéto-1-halogénés des oses). La désacétylation de tous les hydroxyles est effectuée par les solutions alcalines diluées .

### 4 - STABILITE DES OSES

La connaissance exacte des conditions de stabilité des oses est indispensable dans les études de structure. En outre, les réactions de dégradation

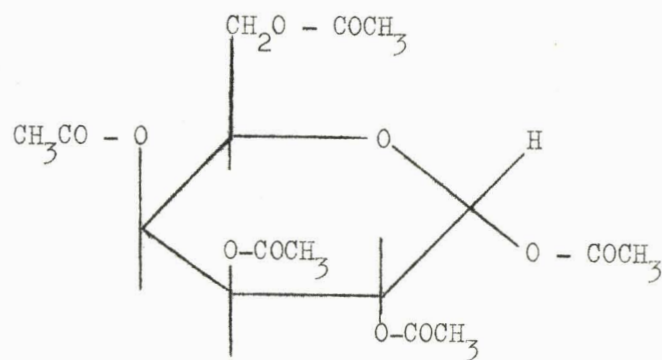
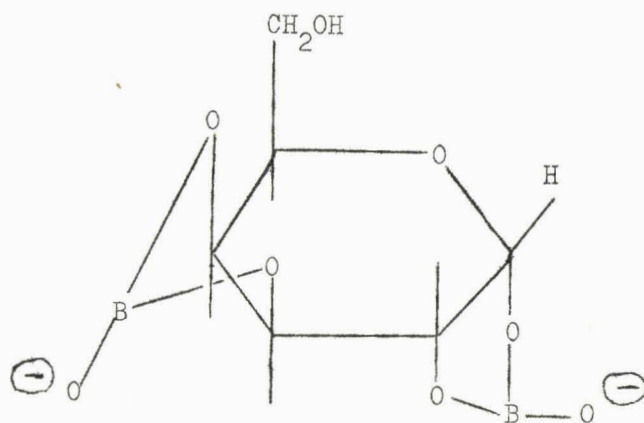


Figure 8

Esters boriques (a) et acétiques (b) des oses.

Exemple de 1'  $\alpha$ -galactose

des oses en milieu acide sont mises à profit dans les réactions colorimétriques qui permettent le dosage des oses (voir revue générale de MONTREUIL et SPIK)(9).

#### a - Stabilité en milieu alcalin

En milieu faiblement alcalin (alcalis dilués (pH12), carbonates alcalins, hydrates alcalino-terreux) et à la température du laboratoire, les oses s'isomérisent : par exemple, à partir d'une solution de glucose on obtient une solution contenant du glucose, du mannose (inversion de WALDEN de l'hydroxyle du carbone 2) et du fructose (isomère cétosique du glucose). Cette réaction - appelée épimérisation - s'explique par le passage à la forme énolique du glucose qui est commune au glucose, au mannose et au fructose (figure 9 ; p.18).

A forte concentration, les solutions de bases fortes produisent une dégradation profonde qui s'accompagne de la rupture de la chaîne carbonée et de l'apparition de nombreux composés comme l'acide lactique et les aldéhydes formique, glycolique et glycérique.

Cette instabilité des oses vis-à-vis des bases est importante à connaître pour la suite de notre étude des procédés de méthylation. En effet, opérant en milieu alcalin, le contrôle constant du pH sera fondamental pendant les opérations de méthylation pour éviter la formation de ces produits de dégradation, en particulier des isomères dont la présence pourrait conduire à des interprétations erronées des résultats.

Note : Seuls les oses sont instables en milieu alcalin. Les osides, en effet, sont très stables puisque le blocage de la fonction réductrice interdit le passage à la forme énolique responsable de la dégradation des oses.

#### b - Stabilité en milieu acide

Les oses sont très stables en milieu acide minéral dilué. Ils résistent, en effet, (sauf les cétooses) à l'action des acides chlorhydrique (\*) et sulfurique 2 N pendant, respectivement, 2 et 8 heures (MONTREUIL et SCHEPPLER)(10).

Les acides minéraux concentrés dégradent, à chaud, les molécules d'oses sans, toutefois, briser le squelette carboné et donnent naissance, par cyclisation de la molécule, à des dérivés du méthylfurfural dont la condensation avec

---

(\*) A condition d'utiliser une solution d'acide chlorhydrique débarrassée, par plusieurs distillations, des sels de fer qui catalysent les réactions de dégradation.

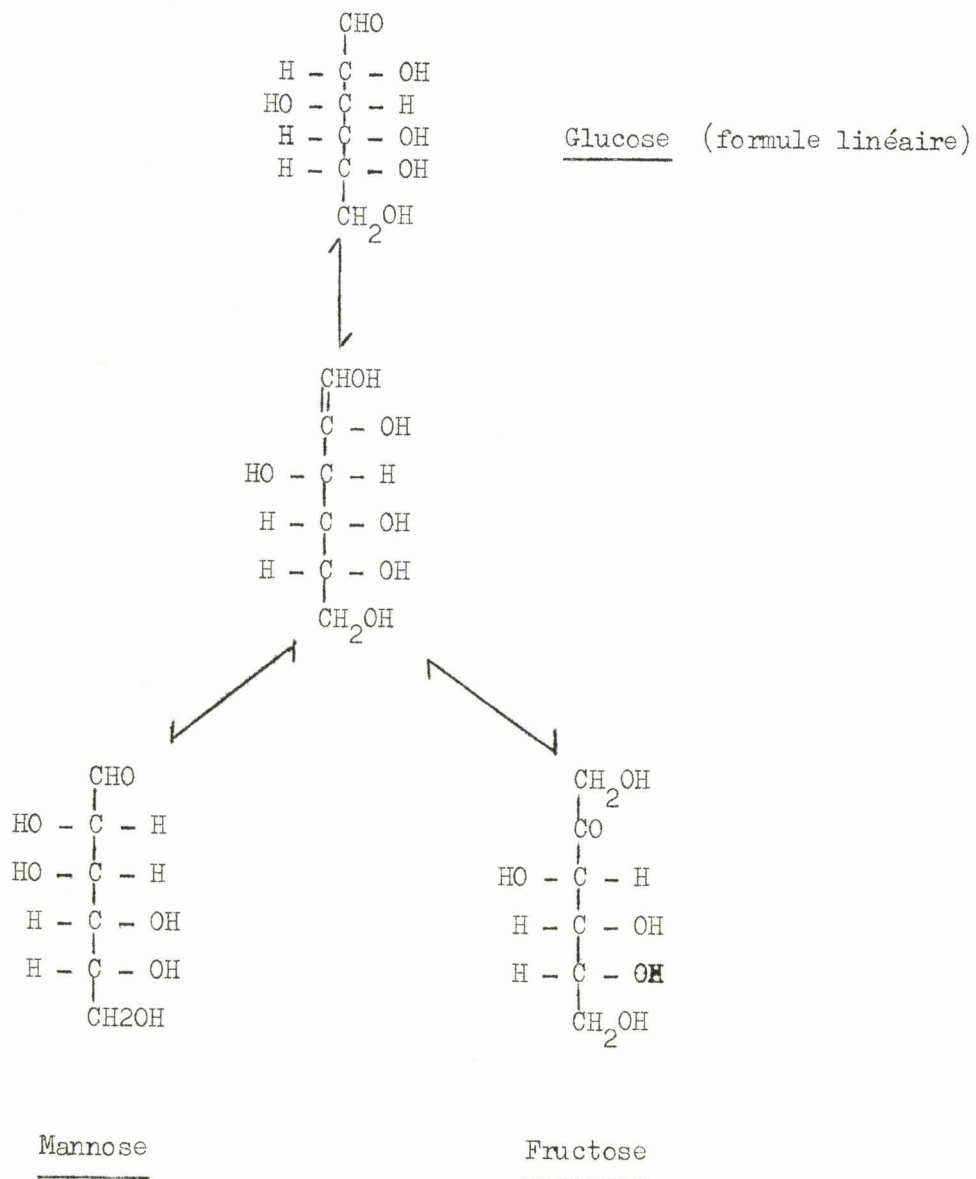


Figure 9

Action des solutions alcalines faiblement  
concentrées sur le glucose .  
Réaction d'épimérisation



divers composés organiques, comme des phénols, provoque l'apparition de colorations qui sont mises à profit dans l'identification et le dosage des glucides (voir la revue générale de MONTREUIL et SPIK) (11).

II - PROPRIETES ESSENTIELLES ET METHODES D'ETUDE DE LA STRUCTURE DES OSIDES
--

Les osides résultent, comme nous l'avons écrit plus haut, de l'union d'un nombre variable de molécules d'oses par des liaisons osidiques. Les osides réducteurs sont appelés osides - oses car le groupement semi-acétalique de l'ose terminal est libre ; les osides non réducteurs sont appelés osides - osides .

Une autre terminologie est fondée sur le nombre de molécules d'oses présents dans la molécule d'oside : les oligosides renferment un nombre limité d'oses et ils sont désignés par le nombre de molécules d'oses les constituant (diholosides, triholosides, p.e.) ; les polyosides sont des macromolécules formées par l'association d'un nombre élevé d'oses (plus de vingt). Les propriétés physiques et chimiques de ces deux catégories d'osides sont voisines de celles des oses. En particulier, les osides sont oxydés par l'acide periodique et donnent lieu aux mêmes réactions de condensation que les oses (osidation, estérification, étherification).

L'étude complète d'une molécule osidique nécessite deux séries distinctes d'expérimentation :

- 1° - la détermination de la composition en oses qui implique l'identification, puis le dosage de chacun des oses constituant l'oside ,
- 2° - la détermination de la structure qui concerne l'ordre d'enchaînement des oses et les modalités de leur union (nature  $\alpha$ - $\beta$  de la liaison osidique ; point d'attache de cette dernière).

Nous examinerons successivement les techniques qui sont utilisées dans ce genre d'étude en nous limitant à un bref exposé des méthodes de détermination de la composition des osides, pour insister, au contraire, sur les procédés d'exploration de leur structure.

## 1° - DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN OSES DES OSIDES

La détermination de la composition en oses des osides s'effectue en deux étapes : on précise d'abord, à l'aide de techniques de dosages colorimétriques la composition en oses totaux (oses, osamines, acides uroniques et acides sialiques), puis, à l'aide de méthodes chromatographiques, la quantité de chacun des oses présents dans l'oside.

### A - DETERMINATION DE LA TENEUR EN OSES TOTAUX DES OSIDES

Nous nous limiterons à l'exposé du principe de chacune des méthodes colorimétriques, en renvoyant, pour plus de détails, à la revue générale de MONTREUIL et SPIK (12).

#### 1 - DOSAGE DES OSES NEUTRES TOTAUX

Le dosage des oses totaux est généralement réalisé par la méthode de TILLMANS et PHILIPPI (13), modifiée par RIMINGTON (14). Les aldohexoses et les méthylpentoses donnent, à chaud, une coloration jaune orangé avec les solutions sulfuriques d'orcinol.

#### 2 - DOSAGE DES OSAMINES TOTALES

Le dosage des osamines présentes dans de nombreux osides est réalisé par une modification de la méthode originale d'ELSON et MORGAN (15) (Méthode de BELCHER et al. (16)). Les osamines, préalablement libérées de leur combinaison par une hydrolyse chlorhydrique, sont d'abord N-acétylées par l'action de l'acétylacétone. L'addition ultérieure de réactif d'EHRLICH au p.diméthylaminobenzaldéhyde, provoque l'apparition d'une coloration rose violacée.

#### 3 - DOSAGE DES ACIDES URONIQUES TOTAUX

Le dosage des acides uroniques est fondé sur la réaction que donnent ces composés avec le carbazole en milieu sulfurique : une coloration pourpre se développe (méthode de DISCHE (17)).

#### 4 - DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES TOTAUX

Les acides sialiques sont dosés par la méthode de NIAZI et STATE (18), modifiée par WERNER et ODIN (19). On met à profit les réactions colorées de ces substances avec le réactif de DISCHE à la diphénylamine.

## B - DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLLAIRE

### EN OSES DES OSIDES

La détermination de la composition en oses des osides nécessite deux étapes :

- 1 - la libération de l'ose
- 2 - son identification à l'aide de méthodes chromatographiques et électrophorétiques.

Nous exposerons seulement les principes des méthodes utilisées.

#### 1- IDENTIFICATION ET DOSAGE DES OSES NEUTRES

Les osides sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique 2 N pendant 1 à 2 heures et les oses sont purifiés par un passage sur des colonnes d'échangeurs d'ions. Ils sont ensuite identifiés et dosés chromatographiquement.

Le mode opératoire comporte donc les étapes suivantes :

- a - hydrolyse chlorhydrique
- b - purification des hydrolysats
- c - chromatographie des oses
- d - dosage des oses.

#### a - Hydrolyse chlorhydrique

L'hydrolyse des osides est réalisée par l'acide chlorhydrique 2 N exempt de fer, pendant 2 heures à 100°C . MONTREUIL et SCHEPPLER (20), puis BOURILLON et coll. (21) ont démontré que ces conditions d'hydrolyse étaient optimales.

#### b - Purification des hydrolysats

L'identification et le dosage individuel des glucides se fait principalement à l'aide de la chromatographie sur papier, mais la séparation des oses n'est possible qu'après une purification préalable des solutions à étudier. La présence des ions minéraux, en particulier, provoque des "traînées" et rend impossible la lecture des chromatogrammes. Il convient donc d'en débarrasser les solutions glucidiques obtenues par hydrolyse des osides.

Cette déminéralisation est réalisée par le passage successif sur des colonnes de résines à échanges de cations (Dowex 50, forme acide), puis d'anions (Duolite A 40, forme formiate). Ce mode opératoire permet, en outre, un



fractionnement des dérivés glucidiques en composés "neutres" (oses, lactones), "basiques" (osamines) et "acides" (acides uroniques) conformément au schéma de la figure 10 (page 23).

#### c - Chromatographie des oses neutres

La fraction "neutre" est soumise à l'analyse chromatographique, généralement, dans les systèmes solvants de PARTRIDGE (22) (n-butanol/acide acétique/eau : 4:1:5) et de JERMYN et ISHERWOOD (23) (pyridine/acétate d'éthyle/eau : 1:2:2). La révélation des oses est réalisée à l'aide du réactif de PARTRIDGE (24) à l'acide oxalique-aniline (taches brunes avec les hexoses, roses avec les pentoses).

#### d - Dosage des oses neutres

Nous appliquons, au laboratoire, le mode opératoire décrit par MONTREUIL (25) et MONTREUIL et SCHEPPLER (26) dont le principe est le suivant : les oses réduisent, en milieu alcalin, le ferricyanure de potassium en ferrocyanure et l'addition d'un sel ferrique provoque la formation de ferrocyanure ferrique (bleu de Prusse) que l'on maintient en solution, par l'addition préalable d'acide oxalique. L'intensité de la coloration bleue est déterminée à l'aide d'un colorimètre.

Ce protocole expérimental est appliqué aux solutions d'élution des oses préalablement séparés par chromatographie sur papier.

## 2 - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES OSAMINES

Les hexosamines sont d'abord libérées par une hydrolyse chlorhydrique (HCl 4 N à 100°C pendant 4 heures). L'acide chlorhydrique est ensuite éliminé par une évaporation prolongée sous vide. Les hexosamines sont enfin identifiées par l'un des trois procédés suivants :

#### a - Procédé de GARDELL, HEIJKENSJOLD et ROCHNORLUND (27)

Les hexosamines sont désaminées à chaud par la ninhydrine, la glucosamine et la mannosamine en arabinose et la galactosamine en xylose. Les pentoses sont identifiés (mais non dosés) par chromatographie sur papier des solutions réactionnelles préalablement purifiées sur échangeurs d'ions.



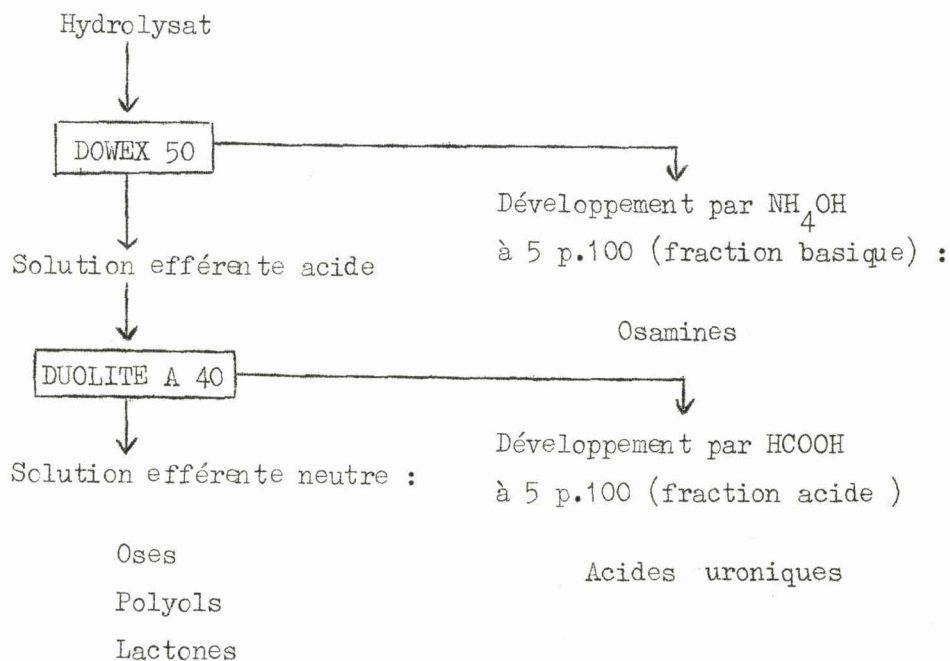


Figure 10

Schéma de fractionnement, sur échangeurs d'ions, des oses et polyols susceptibles d'être présents dans les hydrolysats chlorhydriques d'osides

b - Procédé de GARDELL (28)

Les hexosamines sont identifiées et dosées par chromatographie sur des colonnes de Dowex 50, échangeur de cations, le déplacement étant réalisé par le passage d'acide chlorhydrique 0,3 N .

c - Procédé de LEVY et McALLAN (29)

La fonction amine des osamines est acétylée à la température ordinaire par l'anhydride acétique d'une solution diluée de soude et les N - acétylosamines formées sont dosées par électrophorèse quantitative sur papier réalisée avec un tampon boraté de pH 9,2 . La révélation est effectuée à l'aide de réactif au p.diméthylaminobenzaldéhyde (taches violettes).

3 - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES ACIDES URONIQUES

Les acides uroniques, présents dans la solution d'éluion formique de l'échangeur d'anions (voir la figure 10 ; page 23), sont identifiés et dosés à l'aide du réactif au carbazol sulfurique (voir page 20) par chromatographie quantitative dans le système solvant de FISCHER et NEBEL (30) (pyridine/acétate d'éthyle/ eau/acide acétique : 5:5:3:1 ) ou par électrophorèse quantitative réalisée en tampon pyridine - acide acétique de pH 3,9 .

4 - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES

Les liaisons "sialyl", très labiles en milieu acide, sont hydrolysées par l'acide sulfurique 0,1 N à 80°C pendant 1 heure. Les acides sialiques libérés sont purifiés sur échangeurs d'anions (Dowex 1, forme formiate) et soumis à l'analyse chromatographique quantitative dans le système solvant de NORDAL et OISETH (31) (acétate d'éthyle/acide acétique/eau : 3:1:3 ). La révélation est effectuée avec le réactif au p.diméthylaminobenzaldéhyde de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (32) .

## 2° - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES OSIDES

Après avoir exposé les procédés d'identification et de dosage des oses présents dans les molécules d'osides, il nous reste à décrire les méthodes de détermination de la séquence des oses et des points d'attache des liaisons osidiques.

### A - DETERMINATION DE L'ORDRE D'ENCHAINEMENT DES OSES DANS LES MOLECULES D'OSIDES

#### 1 - DETERMINATION DE L'OSE TERMINAL

Dans les molécules d'osides-osés, un ose porte une fonction réductrice libre et il est aisé de l'identifier. Il suffit, en effet, de réduire la fonction réductrice, à froid, par le borohydrure de sodium ou de potassium, d'hydrolyser l'oside-ose réduit (oside-itol) et d'identifier le polyol formé. On connaît, de cette manière, non seulement la nature de l'ose terminal, mais aussi le poids moléculaire de l'oside, soit en dosant les oses avant et après réduction, soit en dosant le nombre de résidus de polyols formés et d'oses préexistants.

#### 2 - DETERMINATION DE LA SEQUENCE DES OSES

La détermination de la séquence des oses dans une molécule d'oside est essentiellement déterminée par une hydrolyse partielle de la molécule. On obtient, de cette manière, des fragments plus simples (oses et oligosides) dont l'étude chimique est plus aisée et que l'on parvient, généralement, à réassocier pour reconstituer la molécule initiale.

Nous décrirons, à titre d'exemple, les procédés qui ont été appliqués par KUHN et coll. (33) et par MONTREUIL (34) pour déterminer la structure de deux triholosides isolés du lait de Femme. L'un est un 2-fucosido-lactose (figure 11 a) et l'autre est un 3'-fucosido-lactose (figure 11b). Tous deux possèdent, en effet, les propriétés communes suivantes :

- a - ils sont constitués de galactose, de glucose et de fucose en proportions équimolaires.
- b - ils sont tous deux réduits par le borohydrure de potassium et on identifie le glucitol dans les produits d'hydrolyse des triholosides réduits.
- c - l'hydrolyse partielle libre du fucose et du lactose.

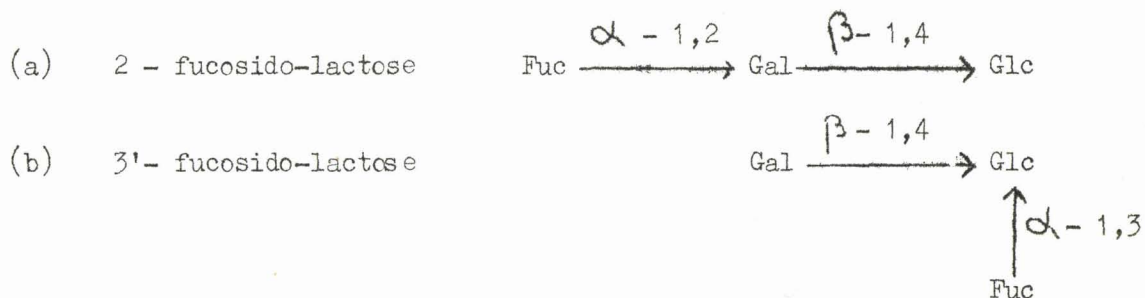


Figure 11

Schémas de structure des deux triholosides  
 isomères du lait de Femme  
 Fuc, Gal, Glc : respectivement, fucose,  
 galactose, glucose

Ils se distinguent, cependant, l'un de l'autre par les résultats de l'action du carbonate de sodium 0,05 N à 100°C pendant 5 minutes qui détruit l'ose réducteur : on obtient un diholoside : l' $\alpha$ -fucosido-1,2-galactose, dans le cas du 2-fucosido-lactose et du galactose et du fucose dans le cas du 3'-fucosido-lactose.

Les schémas de structure de la figure 11 furent complétés par l'application de la méthode de perméthylation (voir plus loin), car l'hydrolyse partielle des osides apporte certes des renseignements sur la séquence des oses (\*), mais non sur les modalités de leur enchaînement, en particulier sur le point d'attache des liaisons osidiques. Ces derniers ne peuvent être précisés que par l'application des méthodes que nous nous proposons de décrire à présent.

---

(\*) Le procédé est parfaitement applicable à l'exploration de la structure de molécules plus importantes comme c'est le cas pour la fraction polyosidique des glycoprotéides. Voir à ce sujet les travaux de MONTREUIL et coll. sur l'ovomucoïde (MONTREUIL, CHOSSON et SCHEPPLER (35) ; MONTREUIL, SPIK, CHOSSON, SEGARD et SCHEPPLER (36) ).



B - DETERMINATION DU POINT D'ATTACHE  
DES LIAISONS OSIDIQUES

L'oxydation periodique et la substitution des hydroxyles libres par estérification (acétylation) ou par éthérification (méthylation) permettent de déterminer les points d'attache des liaisons osidiques.

1 - OXYDATION PERIODIQUE DES OSIDES

Nous avons précisé à la page 7 les modalités de l'oxydation periodique qui porte essentiellement sur les fonctions  $\alpha$ -glycols et  $\alpha$ -amino-alcools. Ce procédé est applicable à l'étude de la structure des osides et nous citerons l'exemple classique de l'oxydation du lactose ( $\beta$ -galactosido-1,4-glucose) et du mélibiose ( $\alpha$ -galactosido-1,6-glucose) dont nous avons rassemblé les résultats dans la figure 12 (page 28). On voit que dans le cas du lactose, 5 moles d'acide periodique sont consommées et que 3 moles d'acide formique et 1 mole de formaldéhyde sont formées. Dans le cas du mélibiose, 6 moles d'acide periodique sont utilisées et 5 moles d'acide formique libérées. En outre, l'oxydation bromique des polyaldéhydes conduit à des polyacides dont l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique fournit, dans le cas du lactose les acides glyoxylique (1 mole), glycérique (1 mole) et tartronique (1 mole) et dans le cas du mélibiose les acides glyoxylique (1 mole), tartronique (1 mole) et glycolique (1 mole).

Cependant, la méthode d'oxydation periodique n'est pas d'une application générale et son emploi se limite à l'étude de la structure des oligosides. Au-delà de 5 à 10 molécules d'oses, il devient impossible d'interpréter les résultats. En outre, l'existence de nombreux cas d'oxydation anormale invite à la prudence. C'est ainsi que l'oxydation des  $\alpha$ -glycols est étroitement liée à la position stérique des hydroxyles (les cis- $\alpha$ -glycols sont oxydés plus facilement et plus rapidement que les trans- $\alpha$ -glycols) et peut, dans certains cas, empêcher l'oxydation. En outre, les acides  $\alpha$ -cétoniques, les  $\alpha$ -hydroxyaldéhydes, les aldéhydes et cétones  $\alpha$ -aminées, les groupes aminés sont oxydés par l'acide periodique. Enfin, la sensibilité particulière de la réaction vis-à-vis d'inhibiteurs, qui sont susceptibles de provoquer une diminution importante de la vitesse de la réaction ou même de la bloquer totalement, introduit de graves causes d'erreur.

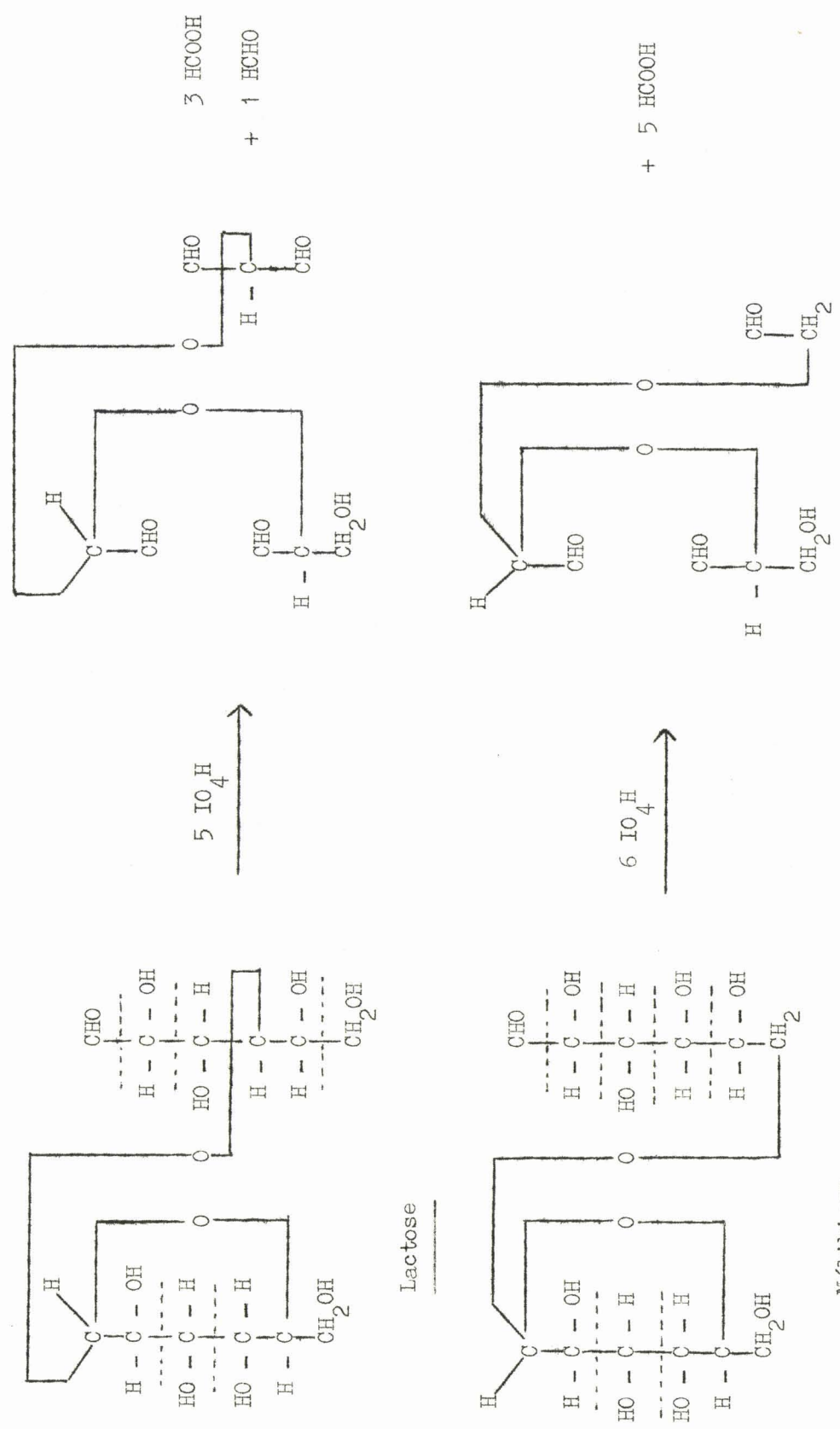


Figure 12

Oxydation par l'acide periodique du lactose et du mélébiose.  
 Le glucose, dont la fonction réductrice est libre, se comporte comme un aldéhyde vrai (voir p. 10)

Pour les raisons que nous venons d'exposer, si la méthode est applicable aux études de structure, elle ne peut se suffire à elle-même à cause des nombreux cas d'oxydation secondaire qui interdisent notamment son application à l'exploration de la structure des fractions osidiques des glycoprotéides.

## 2 - PERACÉTYLATION DES OSIDES

Les hydroxyles des glucides réagissent avec l'anhydride acétique, le plus souvent en milieu alcalin (acétate de sodium ou pyridine) (voir en particulier WOLFROM et THOMPSON (37) ). Une catalyse par les sels de zinc ( $ZnCl_2$ ) ou par les acides ( $ClO_4H$ ) est également réalisable. Dans ces conditions, tous les groupements hydroxyles libres des osides sont acétylés et, après hydrolyse, les oses acétylés sont identifiés, le plus souvent par leurs constantes physiques (point de fusion, pouvoir rotatoire spécifique).

On voit, d'après la figure 13 (page 30), que la peracétylation du lactose conduira à un dérivé dont l'hydrolyse acide fournira du 2,3,4,6-tétra-acétylgalactose et à du 2,3,6-triacétylglucose dont l'identification permettra de placer sur le carbone 4 du glucose la liaison osidique puisque l'hydroxyle porté par ce carbone était protégé de l'acétylation.

Les dérivés acétylés sont très facilement "régénérés" sous forme d'oses par une désacétylation effectuée sous l'action du méthanol, de l'ammoniaque ou de la baryte, en présence d'un catalyseur légèrement basique (pour les détails opératoires, voir en particulier THOMPSON et WOLFROM (38) ). C'est dans cette dernière propriété que réside le grand intérêt de la méthode : la désacétylation, aisée et quantitative, permet la purification ou parfois l'isolement d'osides. La solubilité en milieu organique et la stabilité thermique des dérivés acétylés est mise à profit, par ailleurs, pour la chromatographie en phase gazeuse (voir BISCHOP et COOPER (39) et GUNNER et al. (40) ).

Il semble que cette méthode d'acétylation n'ait pas encore été exploitée au maximum dans les études de structure, mais l'avènement de la chromatographie en phase gazeuse devrait la réhabiliter dans un avenir proche.

## 3 - PERMÉTHYLATION DES OSIDES

Le principe d'application de la méthode de perméthylation des osides à la détermination de leur structure est identique à celui de la peracétylation.





Nous avons vu (voir page 13) que la méthylation des fonctions hydroxyles des oses est réalisée en milieu faiblement alcalin par les esters neutres du méthanol (sulfate, iodure ou chlorure de méthyle). Ce procédé est applicable aux osides.

La figure 13 montre le résultat de l'application de la méthode de perméthylation à la détermination de la structure du lactose. On voit que l'hydrolyse du perméthyl-méthyllactoside conduit au 2,3,4,6-tétraméthylgalactose et au 2,3,6-triméthylglucose dont la fonction hydroxyle en 4, impliquée dans la liaison 1,4-galactosidique a été protégée vis-à-vis de la méthylation.

Note : La méthylation se porte aussi sur le groupement réducteur des osides-oses. Dans le cas du lactose, on obtient le perméthyl-méthyllactoside. L'hydrolyse chlorhydrique conduit aux oses perméthylés dont la fonction réductrice est libre. Nous avons vu, en effet, (page 13) que les liaisons éther-oxydes étaient plus stables que les liaisons osidiques. La méthanolyse chlorhydrique fournit des méthylsides perméthylés.

Le procédé de perméthylation des osides représente le procédé de choix pour déterminer la structure des osides. Il a été largement utilisé par de nombreux auteurs pour préciser la structure de polysides naturels, comme la cellulose, l'amidon ou la chitine et on peut affirmer que nous devons à cette méthode la connaissance, maintenant universellement admise, des structures de la plupart des polysides importants actuellement connus. Il s'agit donc d'une méthode précieuse pour l'étude des structures primaire et secondaire des oses et des osides.

Cependant, en parcourant la littérature, nous avons été frappé par le nombre considérable de modifications qui ont été apportées par les auteurs aux techniques originales de HAWORTH (41) et de PURDIE et IRVINE (42). Cette remarque laissait a priori présager que le procédé était encore bien imparfait et nous avons effectivement vérifié que, rarement, on pouvait acquérir la certitude que la méthylation était complète. En outre, les procédés d'identification des oses méthylés (point de fusion ; pouvoir rotatoire) nécessitent encore des quantités importantes de substances et ne sont donc pas applicables à l'exploration de certains problèmes comme celui de la structure des glycoprotéides. En effet, les procédés de chromatographie sur papier en couche mince ou en phase gazeuse, qui réclament de faibles quantités de produits, sont loin d'être parfaitement au point.

Aussi nous a-t-il paru important de réaliser une étude systématique des procédés de méthylation, proposés jusqu'alors, de façon à déterminer parmi le grand nombre de techniques celles qui conduisaient à une méthylation totale des osides.

Par ailleurs, les procédés de séparation des oses méthylés, obtenus après l'hydrolyse des molécules perméthylées, nous ont paru également nécessiter une étude critique systématique et l'application de nouveaux procédés tels que la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie en couche mince nous a semblé intéressante à envisager.

Nous nous proposons, à présent, de tracer un rapide historique de la question de la perméthylation des glucides et de décrire ensuite, en détail, les méthodes de méthylation.

LES METHODES  
DE METHYLATION DES GLUCIDES

- = - = - = - = - = - = - = - = - =

1° - PROCEDES DE PERMETHYLATION

2° - PROCEDES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES OSES  
METHYLES

---

## I N T R O D U C T I O N

Les premiers procédés de perméthylation des glucides ont été décrits par PURDIE et IRVINE (43) en 1903 (méthylation par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent) et par HAWORTH (44) en 1915 (méthylation par le sulfate de méthyle en milieu sodique).

Ces deux méthodes originales ont subi, ultérieurement, de très nombreuses modifications car leur application a révélé très vite leurs imperfections. La méthode à l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent est rapide mais provoque des dégradations importantes des molécules, vraisemblablement par la formation de radicaux libres. La méthode au sulfate de méthyle en milieu alcalin est au contraire très lente, mais elle se révèle plus souple, en rendant possible des variations plus grandes des conditions de pH et de température qui permettent d'en atténuer l'agressivité. La combinaison des deux méthodes s'est très vite imposée : une méthylation partielle préalable au sulfate de méthyle, effectuée dans des conditions opératoires douces, permet de stabiliser les molécules glucidiques avant de les soumettre à l'action plus énergique de l'iodure de méthyle, qui achève, en principe, la perméthylation.

L'application de ces méthodes a imposé simultanément la recherche de procédés de séparation et d'identification des oses méthylés obtenus par hydrolyse des osides perméthylés.

Nous exposerons donc successivement

- 1- Les procédés de méthylation des osides.
- 2- Les méthodes d'isolement et d'identification des oses méthylés obtenus par hydrolyse des osides perméthylés. Nous y ajouterons nos propres observations.

Nous ferons suivre ces paragraphes d'un "Appendice" dans lequel nous décrirons les procédés de dosage des groupements "méthoxy" (page 56) .

PROCEDES DE PERMETHYLATION DES GLUCIDES
---

I - METHYLATION PAR LE SULFATE DE METHYLEA - PROCEDE ORIGINAL DE HAWORTH (45)PRINCIPE

Les glucides sont méthylés à chaud par le sulfate de méthyle en présence de soude.

Nous décrirons le mode opératoire que nous avons appliqué au lactose.

MODE OPERATOIRE

30 g de lactose sont dissous dans une quantité minimale d'eau tiède et introduit dans un flacon muni d'un agitateur mécanique et d'un condenseur (flacon à 3 orifices). L'ensemble est placé dans un bain de glace. On ajoute 14 ml de sulfate de méthyle (\*), puis 30 ml d'une solution de soude (111 g dans 208 ml) sont introduits, goutte à goutte, sous agitation énergique pour éviter une concentration locale élevée d'alcali. La réaction est effectuée sous courant d'azote.

La température est ensuite amenée à 40°C et une nouvelle addition de 14 ml de sulfate de méthyle est effectuée, suivie de celle de 30 ml de solution de la soude ajoutée goutte à goutte sur une période de 3 heures. L'agitation est ensuite maintenue une nuit à la température ordinaire.

La température est alors portée à 60°C et une nouvelle méthylation est réalisée avec 14 ml de sulfate de méthyle et 26 ml de la solution de soude. On agite ensuite à 60°C pendant une heure supplémentaire et on porte 30 minutes à 100°C pour décomposer l'excès de sulfate de méthyle.

La solution refroidie est neutralisée avec de l'acide sulfurique et extraite par le chloroforme. La solution chloroformique est évaporée à siccité et deux nouvelles méthylations sont effectuées à 70°C dans les conditions précédentes (14 ml de sulfate de méthyle ; 26 ml de solution de soude à 111 g dans 208 ml d'eau).

---

(\*) - Le sulfate de méthyle est un dangereux vésicant qui doit être manipulé avec des gants. L'ammoniaque, en applications locales, est un excellent antidote.



Le dernier extrait chloroformique est distillé sous pression réduite (0,05 mm de mercure) et la fraction passant à 195°C est recristallisée deux fois dans l'éther de pétrole : il s'agit de l'heptaméthyl 0-méthyllactoside (point de fusion : 77 - 82°C ;  $[\alpha]_D^{20} = +5^0$  ) .

### RESULTATS PERSONNELS

Après avoir appliqué le procédé de HAWORTH au lactose, nous avons hydrolysé par l'acide chlorhydrique 1 N à 100°C pendant 1 heure le produit méthylé. L'application à l'hydrolysate du mode opératoire que nous décrirons plus loin (chromatographie sur papier dans le système solvant de HIRST et JONES (46) : *n*-butanol / éthanol / eau : 5:1:4) nous a permis d'identifier, outre le 2,3,4,6-tétraméthylgalactose et le 2,3,6-triméthylglucose, de nombreux produits de méthylation partielle du galactose et du glucose (oses non méthylés, mono- et diméthyles).

La méthode de HAWORTH ne réalise donc pas la perméthylation des osides

### B - PROCÉDES DE HAWORTH MODIFIÉS

La méthode originale de HAWORTH a subi de très nombreuses modifications rendues nécessaires par le caractère incomplet de la méthylation. Elle est généralement utilisée pour réaliser une méthylation partielle d'un oside qui est ensuite parachevée à l'aide de l'iodure de méthyle. Cependant, elle permet d'effectuer la méthylation totale (\*) d'un oside dans certaines conditions expérimentales qui varient avec la nature de l'oside et nous décrirons successivement les procédés de méthylation, par le sulfate de méthyle, des polysides, des oligosides, des glycoprotéides.

#### 1 - METHYLATION DES POLYOSIDES

Nous préciserons dans ce paragraphe les principes généraux tels que nous pouvons les dégager d'expérimentations réalisées depuis plus de vingt années sur les polysaccharides. Pour plus de détails, nous renvoyons à la revue générale de SMITH et MONTGOMERY (47) à laquelle nous nous sommes nous-mêmes reporté.

---

(\*)- Ou considérée comme telle par les auteurs.

a - Méthylation des polyosides natifs

Perméthylation du polyoside

$\alpha$  - En solution aqueuse. Le polyoside est dissous dans le minimum d'eau et la solution, additionnée de volumes égaux de sulfate de méthyle et de soude à 30 p.100 ( p : v ) ajoutée goutte à goutte (\*), est chauffée à des températures variant de 20 à 60°C .

Il est, à ce propos, important de respecter la concentration en soude car une concentration trop élevée provoque une décomposition du sulfate de méthyle au préjudice du rendement de la réaction : les dérivés sodés des fonctions alcooliques ne se forment pas et le sulfate de méthyle se transforme directement en sulfate de sodium à partir de la soude, sans jouer son rôle de donneur de radicaux méthyles.

$\beta$  - En présence de solvants organiques. Les polyosides méthylés sont insolubles dans l'eau. Aussi certains auteurs ont-ils préconisé d'effectuer les méthylation en présence d'acétone, de benzène, de tétrachlorure de carbone ou de dioxane.

NOTE. REBENFELD et PACSU (48) et KURIYAMA et coll. (49) ont employé avec succès la diméthylformamide (en présence de benzène) au lieu de soude.

La durée de la réaction est généralement de 1 à 2 heures à 40-60°C et de 6 à 12 heures à la température ordinaire.

A la fin de la réaction, le mélange est porté à l'ébullition pendant 20 à 30 minutes pour décomposer l'excès de sulfate de méthyle et éliminer les solvants volatils du milieu réactionnel. Généralement, le polyoside méthylé précipite à ce stade.

Isolément du polyoside méthylé

Dans le cas des polyosides de poids moléculaire élevé, l'ébullition finale provoque, comme nous venons de le voir, la précipitation du polyoside méthylé que l'on débarrasse du sulfate de sodium par un lavage à l'eau.

---

(\*) - A 45 p.100 dans le cas des xyloanes .

Dans le cas des oligosides - ou si la méthylation n'est que partielle - le dérivé méthylé reste en solution dans l'eau. On l'extrait, alors, par le chloroforme et la solution chloroformique est privée de sels minéraux par l'un des procédés suivants :

- lavage à l'eau
- dialyse
- précipitation du sulfate de sodium par l'addition d'éthanol (concentration finale : 50 à 60 p.100)
- passage sur des échangeurs de cations et d'anions et évaporation à siccité de la solution effluente.

L'emploi de cette dernière technique devient indispensable dans le cas de polysides solubles dans l'eau et dialysables. En outre, cette technique évite les pertes de glucides partiellement méthylés qui passeraient dans la phase aqueuse lors du lavage de la solution chloroformique.

#### "Cycles" de méthylation

Le mode opératoire que nous venons de décrire représente un "cycle de méthylation". Il conduit généralement à un polyside partiellement méthylé que l'on soumet à un nombre variable de cycles identiques jusqu'à ce que le taux des groupements "méthoxy" - déterminé par les méthodes de ZEISEL (51) ou de VIEBOCK et coll.(52) (\*) - demeure constant.

Le polyside perméthylé est alors extrait une dernière fois par le chloroforme et purifié par des précipitations fractionnées de ses solutions acétoniques, éthanoliques ou chloroformiques par l'addition d'éther de pétrole.

Nous donnons à la page 39 le schéma général de la perméthylation d'un polyhexosane par le procédé au sulfate de méthyle en présence de soude qui a été appliqué par de nombreux auteurs (voir en particulier : HASPINALL, HIRST et NICOLSON (53) ; HASPINALL, HIRST, PERCIVAL et WILLIAMSON (54) ; HIRST et DUNSTAN (55) ; LARSON et SMITH (56) ; PERLIN (57) ; SCHLUBACH et SCHEFFLER (58) ; WHISTLER et coll. (59) ; WICKBERG (60) ).

#### b - Méthylation de polysides acétylés

Pour réaliser la méthylation des polysides en milieu organique, des auteurs effectuent la réaction sur des polysides acétylés qui sont solubles

---

(\*) - On peut aussi suivre la disparition des groupements hydroxyles par spectrométrie dans l'infra-rouge (voir, en particulier, BISHOP et COOPER (61)).

- 1) 10 g de polyhexosane dissous dans le minimum d'eau  
+ 15 ml de sulfate de méthyle  
+ 45 ml de soude à 30 p.100 ajoutée goutte à goutte en 10 min  
Le mélange est maintenu au bain-marie à 50°C sous agitation vigoureuse.  
10 additions successives de sulfate de méthyle et de solution de soude sont effectuées.
- 2) Chauffage à 100°C pendant 30 minutes
- 3) Extraction au chloroforme et lavages à l'eau de la solution chloroformique.  
Evaporation à siccité de cette dernière
- 4) Dissolution du résidu dans l'acétone ou le dioxane
- 5) Plusieurs cycles de méthylation comme en 1 à 4 jusqu'à taux constant des groupements méthoxy
- 6) Le résidu final du polyoside méthylé est dissous dans le minimum de chloroforme et la solution est additionnée d'éther de pétrole. Le précipité est recueilli et séché.

Note : Généralement, ce procédé fournit un polyoside incomplètement méthylé. On en achève la méthylation en appliquant un procédé à l'iodure de méthyle (voir plus loin).

Schéma général de méthylation par le  
sulfate de méthyle d'un polyoside de poids  
moléculaire élevé .



dans les solvants organiques. Ce procédé a été appliqué notamment par HAWORTH et PERCIVAL (62) au glycogène et par BISHOP et COOPER (63) aux glucomannanes. C'est ce dernier que nous nous proposons, à présent, de décrire.

1,5 g de glucomannane est acétylé par 30 ml d'anhydride acétique dans 45 ml de pyridine. Le mélange est additionné d'eau et le précipité obtenu est centrifugé, lavé à l'eau et séché sous vide.

Le produit est dissous dans 25 ml de tétrahydrofurane redistillé et additionné de 17 g de soude et de 20 ml de sulfate de méthyle, ajouté goutte à goutte, sous agitation. Le mélange est traité une nouvelle fois par les mêmes quantités de réactifs, puis porté à l'ébullition à reflux pendant une heure.

Dix additions de soude et de sulfate de méthyle sont ensuite réalisées sur 4 jours, avec agitation continue. On ajoute, de temps à autre, du tétrahydrofurane pour maintenir la fluidité du milieu.

On traite ensuite à reflux pendant une heure. Au refroidissement apparaît un précipité que l'on recueille par filtration et que l'on dissout dans l'eau. La solution aqueuse filtrée est extraite pendant 24 heures par le chloroforme. Les phases aqueuses des deux extractions sont évaporées à sec et les résidus sont extraits à nouveau par le chloroforme et le méthanol.

Note. Le polyside n'est que partiellement méthylé par ce procédé et la méthylation est achevée par la méthode à l'iodure de méthyle (6 méthylations successives avec 25 ml d'iodure de méthyle et 5 g d'oxyde d'argent, à l'ébullition pendant 4 heures).

#### c - Mode opératoire personnel

Nous avons tenté d'améliorer la conduite de ces méthylations en présence de sulfate de méthyle. Les opérations sont en effet toujours très longues et il nous a semblé important d'éviter de laisser séjourner, pendant des temps prolongés, les solutions à des pH fortement alcalins, atteints lors d'additions massives de soude. Nous utilisons un titrateur automatique

à valve électromagnétique (Titromatic Radiometer TTT 1) qui maintient constant le pH du milieu réactionnel. Notre mode opératoire est le suivant.

La réaction est effectuée dans un bécher placé sur un agitateur magnétique. L'électrode du titrateur est introduite dans la solution de polyoside et l'échelle des pH d'utilisation est fixée pour des valeurs comprises entre 7 et 10. L'addition continue de sulfate de méthyle et de soude est contrôlée par deux valves électromagnétiques reliées au titrateur : quand le pH est légèrement supérieur à 10, l'addition de sulfate de méthyle le ramène dans l'intervalle fixé ; inversement, par suite de la consommation des réactifs (production de sulfate de sodium à partir du sulfate de méthyle et de la soude) l'abaissement du pH est compensé par l'addition automatique de sulfate de méthyle.

Quand la quantité calculée de sulfate de méthyle a été ajoutée, on maintient le mélange pendant 24 heures sous agitation jusqu'à ce que le pH soit stable.

Ce procédé "continu" évite la répétition des cycles et s'effectue dans des conditions qui mettent à l'abri des dégradations des glucides occasionnées par une alcalinité trop élevée.

## 2 - METHYLATION DES OLIGOSIDES (\*)

La méthode au sulfate de méthyle a été adaptée à la méthylation de divers oligosides. Des modifications ont, en effet, été apportées aux modes opératoires précédents en vue d'obtenir une méthylation totale en évitant une dégradation des osides au cours de la réaction car la susceptibilité accrue des osides de faible poids moléculaire vis-à-vis des solutions alcalines nécessite des précautions particulières. Les oligosides réducteurs sont, en effet, très instables en milieu alcalin, bien plus que les polyosides et que les osides-osides non réducteurs puisque l'instabilité en milieu alcalin est liée à la présence de la fonction réductrice.

En général, on évite les pH supérieurs à 10 et on opère à des températures beaucoup plus basses que dans le cas des polyosides. Ces conditions opératoires diminuent à la fois la vitesse de la réaction et le rendement. C'est pourquoi beaucoup d'auteurs réalisent, comme dans le cas des polyosides, plusieurs traitements par l'iodure de méthyle, en fin de réaction, pour réaliser la perméthylation des oligosides.

---

(\*)- Revue générale : HIRST et PERCIVAL (64) .

Cependant, KUHN, BAER et GAUHE (65) ont obtenu un dérivé perméthylé du lacto-N-fucopentaose II (\*) en utilisant exclusivement comme agents de méthylation le sulfate de méthyle et la soude à 40 p.100, à des températures inférieures à 4°C. Nous avons, nous-même, obtenu une perméthylation du lactose en appliquant ce mode opératoire.

Le protocole expérimental est le suivant :

A une solution de 2 g d'oligoside dans 30 ml d'eau, constamment maintenue à 0°C, on ajoute lentement, sous agitation douce, 30 ml de sulfate de méthyle, puis, goutte à goutte et pendant 8 heures, sous agitation énergique, 45 ml d'une solution de soude à 40 p.100 (p : v). On agite encore le mélange pendant 12 heures à 0°C.

72 ml de sulfate de méthyle sont de nouveau ajoutés en 2 à 3 heures, puis 100 ml de soude à 40 p.100 goutte à goutte en 9 heures à 0°C. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 12 heures à 0°C.

Une dernière addition de 72 ml de sulfate de méthyle est réalisée en 3 heures, en laissant la température remonter à +3°C. On ramène ensuite à la température ordinaire, en plusieurs étapes : 2 heures à +5°C, puis 7 heures à 17°C et enfin 12 heures à 20-22°C. Si le milieu réactionnel devient trop visqueux, on ajoute environ 10 ml de chloroforme.

On extrait ensuite 8 fois par 150 ml de chloroforme. L'extrait chloroformique est lavé 2 fois à l'eau et les eaux de lavage réunies, sont elles-mêmes lavées 4 fois par du chloroforme. Les solutions chloroformiques sont réunies, séchées sur carbonate de potassium anhydre et évaporées à siccité pendant 12 heures à 100°C sous vide.

Cette méthode est assez longue et nécessite un contrôle sévère de la température. Elle est néanmoins à retenir, car elle respecte l'intégrité des molécules d'osides. Cependant, comme les méthodes précédentes, elle fait courir le risque d'une méthylation incomplète, principalement dans le cas d'oligosides supérieurs. C'est pourquoi, les auteurs appliquent généralement aux oligosides (comme, précédemment, aux polysides) les méthodes "mixtes" de méthylation, associant les procédés au sulfate de méthyle et à l'iodure de méthyle. (COURTOIS et coll.(66) à propos de galactosides divers ; WHISTLER et CONRAD (67) méthylient

---

(\*)- Le lacto-N-fucopentaose II de KUHN ou polyside 9 de MONTREUIL est un constituant normal de la fraction glucidique du lait de Femme qui contient, outre le lactose, 10 à 14 polysides, responsables de nombreuses activités biologiques. Voir plus loin notre étude sur l'allolactose, page 107.

le galactobiose, isolé à partir de certains mucilages, par deux traitements successifs au sulfate de méthyle, suivis de deux "cycles" à l'iodure de méthyle).

### CONCLUSIONS

On peut donc conclure que dans le cas des oligosides, les méthylations doivent être effectuées à basse température, pour éviter des dégradations dues à l'alcalinité du milieu. Par ailleurs, la méthode au sulfate de méthyle, qui est lente et incomplète, doit être utilisée pour réaliser une méthylation partielle préalable des oligosides qui sont ensuite perméthylés par l'iodure de méthyle. On doit donc la considérer comme une étape préalable destinée, par une méthylation partielle, à protéger les osides des dégradations occasionnées par l'iodure de méthyle.

### 3 - METHYLATION DU GROUPEMENT MUCOPOLYOSIDIQUE DES GLYCOPROTEIDES

La perméthylation de la copule glucidique des glycoprotéides n'a pas encore été réalisée jusqu'à présent d'une manière satisfaisante. D'après les travaux de JEANLOZ (68) et les nôtres, il semble que la méthylation du groupement prosthétique pose des problèmes particuliers, par suite, probablement, d'un rôle protecteur que joue la partie protéique de la molécule. En outre, la présence d'une proportion élevée (50 à 75 p.100) d'acides aminés provoque une consommation très importante de groupements méthylés qui se fixent préférentiellement sur les fonctions amines des aminoacides et sur les liaisons peptidiques. La vitesse de réaction se trouve alors ralentie car la méthylation du groupement prosthétique - si toutefois elle est possible - ne pourra se réaliser qu'après avoir saturé en groupements méthylés toutes les fonctions aminées de la copule protéique. (Voir nos résultats personnels, page 112).

A la suite de ses travaux sur l'orosomucoïde, JEANLOZ (69) recommande néanmoins d'opérer à froid ( +4°C ) pour éviter une décomposition partielle du sulfate de méthyle et une dégradation de la molécule en milieu alcalin.

Les résultats que nous avons obtenus avec l'ovomucoïde nous amènent à la conclusion que la perméthylation du mucopolyoside est impossible à réaliser avec le sulfate de méthyle agissant directement sur le glycoprotéide natif.



## II - METHYLATION PAR L'IODURE DE METHYLE

Alors que la méthylation par le sulfate de méthyle est effectuée, en général, en milieu aqueux, la méthylation par l'iodure de méthyle est réalisée en phase organique anhydre, ce qui la rend difficilement applicable aux composés insolubles dans les solvants organiques, comme les glycoprotéides.

### A - PROCEDE ORIGINAL DE PURDIE ET IRVINE (70)

Une mole de méthylglucopyranoside sec et 10 moles d'iodure de méthyle sont dissous dans le minimum de méthanol anhydre et la solution est chauffée à reflux à 40°C sous agitation, le réfrigérant étant muni d'un piège à chlorure de calcium ou à chaux sodée. 5 moles d'oxyde d'argent sec, fraîchement préparé, sont ajoutées en 10 additions espacées de 30 minutes. L'ébullition est prolongée pendant 5 heures.

Le mélange refroidi est filtré et le précipité argentique sur lequel est adsorbée une proportion importante<sup>de</sup> dérivés méthylés, est traité à reflux par du chloroforme ou de l'acétone. Les solutions organiques (filtrat initial et extraits chloroformiques ou acétoniques) sont déshydratées par du sulfate de sodium et évaporées à siccité sous vide.

On obtient un résidu sirupeux qui est soumis à trois "cycles" identiques au précédent après avoir été dissous directement dans l'iodure de méthyle.

Le résidu final est distillé sous pression réduite (13 mm de mercure) et la fraction de PE = 145-150°C est recueillie. Elle est constituée de tétraméthyl- $\alpha$ -D-méthylglucopyranoside (rendement : 97 p.100 ;  $[\alpha]_D^{20} = + 147^\circ$ )

### B - PROCEDES DE PURDIE ET IRVINE MODIFIES

L'adaptation de la méthode de PURDIE et IRVINE à différents substrats explique que des modifications importantes aient été apportées au procédé original. Les auteurs ont recherché, en général, un milieu réactionnel énergique, favorisant à la fois "l'activation" des fonctions hydroxyles et la solubilisation des glucides en phase organique.

Comme dans le cas de la méthylation par le sulfate de méthyle, nous distinguerons les méthodes qui ont été appliquées aux polyosides, aux oligosides et aux glycoprotéides.

## 1 - METHYLATION DES POLYOSIDES

### a - Méthylation des méthylpolyosides en présence d'oxyde d'argent

Des procédés dérivant directement de la méthode de PURDIE et IRVINE ont été appliqués largement pour obtenir des polyosides perméthylés à partir de polyosides déjà partiellement méthylés par une méthode utilisant le sulfate de méthyle.

L'application de la méthode de PURDIE et IRVINE aux polyosides partiellement méthylés fait disparaître certains des inconvénients de cette méthode. Elle permet, en particulier, de résoudre le problème de la dissolution dans l'iodeure de méthyle et évite la destruction par ce réactif de la molécule stabilisée par une méthylation partielle préalable.

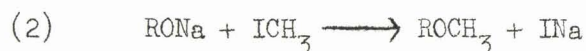
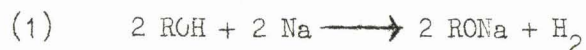
Le protocole expérimental est le suivant :

Le polyoside partiellement méthylé, obtenu selon le mode opératoire précédemment décrit (voir page 39), est dissous dans 1 à 4 fois son poids d'iodeure de méthyle. On ajoute éventuellement de l'acétone ou du méthanol si le composé se dissout difficilement. La solution, additionnée de sulfate de calcium ou de sulfate de sodium anhydre pour assurer la déshydratation du milieu, est ensuite chauffée à reflux et sous agitation pendant 12 à 20 heures. Pendant cette période quatre à cinq additions d'oxyde d'argent, fraîchement préparé, correspondant à 2 à 4 fois le poids du produit de départ, sont effectuées toutes les trois à quatre heures. Le mélange refroidi est ensuite filtré et le filtre est lavé avec du chloroforme chaud. Le filtrat est évaporé à sec et peut être redissous dans l'iodeure de méthyle pour être soumis à un nouveau cycle.

Note. Au cours de la réaction se forment souvent des sels d'argent colloïdaux. On les élimine aisément par l'addition contrôlée d'éther de pétrole à la solution chloroformique. Les sels d'argent précipitent avant le dérivé méthylé et sont séparés par filtration ou par centrifugation.

b - Méthylation en présence de sodium dans l'ammoniac liquide (\*)

La méthode est fondée sur la réaction d'alkylation des alcools dans l'ammoniac liquide, connue depuis 1924 (WHITE, MORRISON et ANDERSON (71) ) selon le procédé de WILLIAMSON (72). Le principe est le suivant :



L'alcoolate se forme par action du sodium dans l'ammoniac liquide. La méthylation s'effectue ensuite, sur cet alcoolate, par l'action de l'iodure de méthyle.

Les réactions (1) et (2) peuvent être réalisées simultanément en présence d'ammoniac liquide (méthodes de FREUDENBERG et BOPPEL (73) et de HODGE et coll. (74) ). Cependant, une étude critique des étapes de la réaction avait conduit MUSKAT (76), FREUDENBERG et RAPP (77) et FREUDENBERG, PLANKENHORN et BOPPEL (78) à admettre l'éventualité d'une méthylation incomplète s'accompagnant de la formation d'iodure de tétraméthylammonium et d'iodure d'ammonium, survenant à la suite d'une réaction secondaire, plus rapide que la réaction 1, entre l'iodure de méthyle et l'ammoniac. C'est pourquoi MUSKAT (79) recommandait, en 1934, le procédé général suivant : la première étape d'alkylation est réalisée dans l'ammoniac liquide puis on passe à la seconde étape, qui est la méthylation proprement dite par l'iodure de méthyle, dans un solvant inerte à la température ordinaire, après l'élimination de l'ammoniac.

FREUDENBERG et BOPPEL (80) et HODGE, KARJALO et HILBERT (81) ont décrit le procédé suivant de méthylation dans l'ammoniac liquide.

10 g d'amidon sec sont agités avec 600 ml d'ammoniac liquide anhydre, dans un vase de DEWAR. La température est voisine de  $-35^\circ\text{C}$ . Sept additions successives de sodium et d'iodure de méthyle sont ensuite réalisées dans les conditions suivantes :

1) l'équivalent de 2 atomes de Na par unités d'anhydroglucose est ajouté par petits fragments, à une fréquence telle que la quantité de sodium libre (visible par la coloration bleue du mélange réactionnel) soit consommée en 15 minutes, par l'addition goutte à goutte d'iodure de méthyle. La totalité de la réaction de substitution n'excède pas une heure.

---

(\*) - Voir la revue générale de TIPSON (75)



2) Les additions ultérieures de sodium se font dans les conditions suivantes : 1,8 atome de Na par unité d'anhydroglucose puis 1,4 et 0,8 atomes de sodium.

L'amidon méthylé insoluble est séparé, par aspiration du liquide surnageant et le résidu solide est lavé avec de l'ammoniac liquide. On procède ensuite à de nouveaux traitements par 1,4, puis 1,0, puis 0,8 atome de sodium par molécule d'anhydroglucose.

Si des nouveaux traitements sont nécessaires, on recueille de nouveau le composé insoluble et on réalise de nouvelles additions de sodium de 1 puis de 0,8 atome de sodium par molécule d'anhydroglucose.

La fin de la méthylation est marquée par l'apparition d'une coloration bleue persistante lors de l'addition, au milieu réactionnel, de sodium en excès.

Le résidu final est séché à l'air, puis sous vide. Il est ensuite purifié par des extractions à l'eau chaude suivies d'une cristallisation par l'addition d'éther de pétrole à partir de sa solution chloroformique. Poids final : 10 à 11 grammes.

Ce procédé a donné d'excellents résultats (VAN CLEVE et al. (82) ; WOLFROM et al. (83). Son intérêt réside dans sa rapidité : la réaction se produit en effet en quelques minutes. Cette technique s'applique cependant plus difficilement aux micromolécules glucidiques dont les dérivés méthylés sont sirupeux. Leur isolement nécessite donc l'élimination de l'ammoniac par distillation et des sels de sodium du résidu par des extractions chloroformiques.

#### c - Méthylation des polysides sous la forme de complexes du thallium

Le procédé de MENZIES (84) de méthylation des composés hydroxylés sous forme de leurs sels de thallium a été adapté, notamment par HIRST et JONES (85), à la méthylation des polysides non réducteurs. L'addition d'hydroxyde de thallium à une solution aqueuse de polyside les précipite généralement sous la forme de complexes du thallium. Si ceux-ci ne précipitent pas, on les isole par précipitation éthanolique ou par évaporation à siccité.

On réalise ensuite la méthylation en traitant, par l'iodure de méthyle à l'ébullition, le "sel" de thallium sec. Quand la réaction est très lente, on peut opérer à 100°C en tubes scellés.



La fin de la réaction est marquée par le virage de la coloration du milieu réactionnel, du brun au jaune clair, correspondant à la formation de l'iodure de thallium. Habituellement, le polyoside perméthylé précipite et on le recueille par filtration. Si un nouveau cycle est nécessaire, on traite au préalable le composé partiellement méthylé par l'hydroxyde de thallium.

Le mode opératoire de HIRST et JONES (86), appliqué à l'étude d'un complexe arabane - acidepectique du Pois, est le suivant :

30 g de polysaccharide sont dissous dans l'eau et 450 ml d'hydroxyde de thallium (\*) sont ajoutés, sous agitation énergique et à l'obscurité. Après un séjour de 2 heures à 20°C, on filtre et le résidu solide est lavé à l'alcool et séché à 60°C sous vide.

Le composé jaune citron (98 g, contenant 49 g de thallium dosable par l'acide sulfurique en présence de phénolphthaleïne) est pulvérisé et traité à reflux pendant douze heures par l'iodure de méthyle, en présence de méthanol redistillé et à l'obscurité (dans le cas où l'on opère à température élevée et sous pression, on ajoute de l'oxyde de thallium ou de l'oxyde d'argent pour éviter une acidification du milieu au cours de la réaction). Le solvant est ensuite éliminé à 30°C sous pression réduite et le résidu est repris par 200 ml d'une solution benzénique d'éthoxyde de thallium à 30 p.100.

Après distillation du benzène, le résidu est traité par l'iodure de méthyle dans les mêmes conditions que précédemment.

La méthode présente un intérêt certain dans le cas de polyosides qui ne peuvent être traités par le sulfate de méthyle en présence de soude à cause de leur instabilité en milieu alcalin (cas des acides pectiques, des acides alginiques ou encore du groupement prosthétique de certains glycoprotéides) ou de leur insolubilité totale en milieu aqueux.

## 2- METHYLATION DES OLIGOSIDES

Les oligosides se prêtent très bien à la méthylation directe par l'iodure de méthyle. Ils sont, en général, aisément solubles, en phase organique à chaud et l'action énergique de l'iodure de méthyle permet l'obtention rapide

---

(\*) - L'hydroxyde de thallium peut être préparé soit par barbotage d'oxygène dans de l'eau bouillante contenant du thallium métallique (la réaction, très lente, est suivie par un dosage acidimétrique d'une quantité aliquote), soit à partir du sulfate de thallium en présence de baryte suivie d'une purification sur résine.

de molécules perméthylées. Les méthodes diffèrent essentiellement par l'agent alcalin utilisé.

a - Méthylation en présence de sodium

La méthode originale de FREUDENBERG et HIXON (86) qui conduisit à la préparation d'octa-O-méthylsaccharose a été reprise, en 1954, par BREDERESCH et coll. (87). Le mode opératoire est le suivant :

5 g de saccharose partiellement méthylé (45 p.100 de groupement méthoxy) sont dissous dans 50 ml d'éther anhydre et agités, pendant plusieurs heures, avec 1 g de fragments de sodium. Après un contact d'une nuit à la température ordinaire, le sodium n'ayant pas réagi est éliminé et le surnageant est introduit dans un flacon contenant 10 ml d'iodure de méthyle. Le mélange est évaporé sous pression réduite, jusqu'à l'obtention d'une pâte.

On ajoute alors 25 ml d'iodure de méthyle et la solution est agitée plusieurs heures, puis abandonnée pendant 24 heures à la température du laboratoire. L'addition d'un volume égal d'éther anhydre précipite alors l'iodure de sodium formé au cours de la réaction. Il est filtré et lavé à l'éther. Les filtrats rassemblés sont évaporés à 30-40°C, puis repris par l'éther de pétrole. Après filtration sur charbon, on obtient l'octa-O-méthylsaccharose (54,48 p.100 de OMe) qui se présente à l'état de sirop jaunâtre ( $3,4 \text{ g} - [\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 68^{\circ}\text{C}$ ).

b - Méthylation en présence de diméthylformamide

α - Méthode KUHN, TRISCHMAN et LÖW (88)

KUHN, TRISCHMAN et LÖW ont proposé, en 1955, la méthode suivante de méthylation des oligosides qui est applicable également aux polyosides.

10 g de glycoside sont introduits dans un flacon, muni d'un bouchon rôdé et sont dissous dans 120 ml de diméthylformamide (DMFA). On ajoute 45 ml d'iodure de méthyle à 20°C et 45 g d'oxyde d'argent par additions successives effectuées en 15 minutes sous agitation vigoureuse. (Après l'addition d'environ 20 g d'Ag<sub>2</sub>O, la température atteint 30°C ; on refroidit le flacon pour éviter de dépasser cette température).

On agite ensuite pendant 12 heures. On centrifuge et on lave le résidu par 50 ml de chloroforme. La solution surnageante de diméthylformamide

et le chloroforme des lavages sont rassemblés et lavés, en plusieurs fois, par 500 ml d'eau contenant 5 g de cyanure de potassium. La phase aqueuse est lavée 5 fois par 100 ml de chloroforme. Ces phases chloroformiques, rassemblées, sont séchées sur sulfate de sodium anhydre et évaporées à sec.

### β - Méthode de KUHN, BAER et GAUHE (89)

KUHN, BAER et GAUHE ont modifié la méthode dès l'année suivante, pour obtenir la perméthylation du lacto-N-fucopentaïtol I, provenant de la réduction du lacto-N-fucopentaose I du lait de Femme. Le mode opératoire est le suivant :

2,1 g de fucopentaïtol (obtenu par réduction du pentaose par le borohydrure de potassium) sont dissous dans 60 ml de DMFA anhydre. 20 ml d'iodure de méthyle et 20 g d'Ag<sub>2</sub>O sont ajoutés en 20 minutes par petites portions à la température ordinaire. On agite ensuite pendant une nuit.

5 ml d'iodure de méthyle et 5 g d'oxyde d'argent sont alors ajoutés au milieu réactionnel et on poursuit l'agitation encore pendant 8 heures. On décante, on filtre et on lave soigneusement le filtre (ou le précipité si on a centrifugé) par le chloroforme.

On abandonne ensuite pendant 18 à 24 heures à + 4°C : les sels d'argent colloïdaux et les formyl-dérivés cristallisent. On élimine les cristaux par filtration et on lave à l'eau la phase chloroformique pour éliminer les dernières traces des dérivés de la diméthylformamide. On sèche sur sulfate de sodium anhydre.

On évapore ensuite sous vide. Le résidu, brunâtre, est alors repris deux fois par 20 à 30 ml d'iodure de méthyle, 5 g d'Ag<sub>2</sub>O et 3 g de sulfate de calcium anhydre. On porte deux fois à l'ébullition à reflux pendant 4 heures.

Après filtration et lavage du résidu insoluble avec du chloroforme, l'oside perméthylé est obtenu par évaporation à sec du filtrat et des extraits chloroformiques.

Notre étude critique des procédés de perméthylation (voir page 104) nous a conduit à adopter cette dernière technique, qui fournit à coup sûr des di- et triholosides perméthylés. Elle présente en outre l'avantage d'être rapide.



c - Méthylation en présence de baryte ou de strontiane

KUHN, BAER et SEELIGER (90) et BOUVENG (91) ont réalisé la perméthylation de diholosides (en particulier de la N-acétyl-lactosamine) en un seul cycle de méthylation par l'iodure de méthyle, en présence de baryte et de diméthylformamide. Le mode opératoire est le suivant :

5 g de N-acétyl-lactosamine sont mis en suspension dans 15 ml d'iodure de méthyle et 18,4 g d'oxyde de baryum sec. On ajoute 50 ml de diméthylformamide saturée en hydroxyde de baryum. On chauffe une heure à 40°C, puis on maintient pendant 5,5 heures sous agitation, à la température ordinaire. Après une extraction par 500 ml de chloroforme, on lave trois fois l'extrait chloroformique par 100 ml d'eau et les eaux de lavage sont reprises trois fois par 50 ml de chloroforme. On sèche l'extrait chloroformique sur sulfate de sodium anhydre.

Note 1 - La baryte et l'oxyde de baryum peuvent être remplacés par la strontiane et l'oxyde de strontium.

Note 2 - Selon KUHN et TRISCHMAN (cité par EGGE (92)) la cinétique de la réaction de méthylation de diholosides en présence du mélange de DMFA, BaO, Ba(OH)<sub>2</sub> et ICH<sub>3</sub> (respectivement 30 ml, 4,5 g, 1,8 g et 6 ml pour 1 gramme de lactose) indique que la réaction est totale après 2 heures d'ébullition. Nos résultats ont été bien différents (voir page 103).

3 - METHYLATION DU GROUPEMENT MUCOPOLYOSIDIQUE DES GLYCOPROTEIDES

La méthylation directe des glycoprotéides par l'iodure de méthyle, en milieu anhydre, est impossible par suite de la dénaturation instantanée de la molécule de glycoprotéide en phase organique. Pour obtenir une molécule soluble en milieu organique, il convient donc de réaliser un certain nombre de cycles préalables de méthylation par le sulfate de méthyle (10 pour l'ovomucoïde, à température ordinaire).

Jusqu'à présent, seul l'ovomucoïde, l'ovalbumine et l'orosomucoïde ont été soumis à la méthylation en vue d'études structurales.

a - Méthylation de l'ovomucoïde

En 1942, STACEY et WOOLLEY (93)<sup>(\*)</sup> ont réalisé la méthylation directe de l'ovomucoïde par le procédé mixte en appliquant le mode opératoire suivant :

(\*)- Voir aussi BRAGG et HOUGH (94) qui ont, en outre, méthylié l'ovalbumine

A 25 g d'ovomucoïde dissous dans 200 ml d'eau, on ajoute 300 ml de tétrachlorure de carbone et 100 ml de sulfate de méthyle. On agite vigou- reusement à 45°C et on introduit goutte à goutte, en 1 heure, 200 ml de soude à 35 p.100. Après une nouvelle addition de 100 ml de sulfate de méthyle, on ajoute de nouveau en 2 heures 200 ml de soude à 35 p.100 . On agite ensuite 2 heures à 60°C .

Le produit méthylé précipite, en même temps que le sulfate de sodium en excès. On filtre et on extrait le précipité par un litre d'acétone. Après neutralisation par l'acide sulfurique dilué et filtration, on évapore à sec.

Le résidu est dissous dans 400 ml d'acétone/eau ( v/v ) et on ajoute 160 ml de sulfate de méthyle , 200 ml de solution de soude à 35 p.100. Un nouveau cycle est effectué, identique au précédent.

Après extraction par l'acétone, le résidu gommeux fournit un sirop par dissolution dans le chloroforme. On précipite par l'éther de pétrole la solution chloroformique.

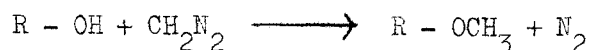
Le précipité obtenu est traité 3 fois par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent. Le précipité que l'on obtient par une nouvelle précipitation par l'éther de pétrole est considéré, par les auteurs, comme de l'ovomucoïde perméthylé.

#### b - Méthylation de l'orosomucoïde

La méthylation de l'orosomucoïde a été réalisée par JEANLOZ et coll. (95). Les procédés appliqués par les auteurs sont différents d'une expérimen- tation à l'autre. Cependant, en règle générale, ils effectuent un grand nombre de "cycles" de méthylation par le sulfate de méthyle à basse température ( 0-2°C ) et tentent parfois d'achever la méthylation par l'iodure de méthyle (voir p. 43 )

### III - METHYLATION PAR LE DIAZOMETHANE

La réaction de méthylation des hydroxyles par le diazométhane ( HOUGH et THEOBALD) (96) s'écrit :





Ce procédé séduisant ne trouve cependant que des applications très limitées dans la chimie des glucides à cause des résultats extrêmement inconstants auxquels il conduit. Il a été appliqué à la méthylation des polyosides et à la méthylosidation des oses et des oligosides.

#### 1° - Méthylation des polyosides

Le diazométhane (\*) méthyle préférentiellement les groupes hydroxyles des composés qui présentent un caractère acide. La méthode convient donc particulièrement bien à la méthylation des polysaccharides riches en acides uroniques, comme les acides alginiques (LUCAS et STEWART) (97) ou les pectines (DEUEL et coll. (98) et VOLLMERT (99) ). En règle générale, le diazométhane permet des estérifications quantitatives mais les étherifications sont toujours partielles. Les sucres non réducteurs et les polysaccharides sont méthylés partiellement et au hasard. L'accessibilité des groupes hydroxyles du polymère est fondamentale : c'est ainsi que plusieurs cycles au diazométhane, appliqués au coton anhydre provoquent une méthylation maximale de 6,5 p.100 seulement (CROON)(100) mais le coton mercerisé se méthyle, dans les mêmes conditions, à 14,8 p.100 (HEAD) (101) .

L'eau, le méthanol, le cuivre, le bore amorphe, les alcalis sont des catalyseurs de la réaction.

#### Procédé de HEAD (102)

HEAD a appliqué le protocole expérimental suivant à la méthylation de la cellulose par le diazométhane.

Le coton est traité pendant 10 heures à reflux par une solution de soude à 2 p.100 . On le lave ensuite à l'eau et on le sèche sous pression réduite sur anhydride phosphorique.

A un mélange maintenu à 0°C de 2,5 ml d'eau et 100 ml d'éther anhydre contenant du diazométhane à la concentration 0,5 M on ajoute 1 g de coton traité par la soude. Le flacon est bouché par un caoutchouc muni d'un tube capillaire court et maintenu pendant une semaine à 0°C . On lave ensuite le coton à l'éther sec et sous air sec. On le traite finalement pendant 1 heure par une solution d'acide acétique à 10 p.100 et on le sèche sous pression réduite.

---

(\*) - Le diazométhane est préparé extemporanément, à partir de la N-nitroso-N-méthyl urée, par la méthode de ARNDT (103)

Six traitements identiques sont réalisés, pour obtenir finalement 14,9 p.100 de groupes méthoxy, soit un degré de substitution de 0,84 p.100 .

## 2° - Méthylosidation des oses et des oligosides

Le diazométhane a été utilisé par KUHN et coll. (104) pour réaliser la méthylosidation d'oses et d'oligosides. Le mode opératoire est le suivant, appliqué à la N-acétylglucosamine :

2 g de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose sont dissous dans 25 ml d'eau et 100 ml de méthanol. On maintient la solution à 0°C et on traite avec du diazométhane obtenu à partir de 20 g de N-nitroso-N-méthylurée en solution dans 200 ml d'éther. Un dégagement important d'azote se produit et la solution se décolore en revenant progressivement à la température ordinaire en une nuit.

Le résidu obtenu par évaporation sous pression réduite est dissous dans 20 ml de méthanol et quelques gouttes d'eau. Une nouvelle méthylation est réalisée en une nuit, avec une solution étherée de diazométhane, préparée à partir de 8 g de N-nitroso-N-méthylurée. Le produit séché sous vide est dissous dans une quantité minimale de méthanol sec (environ 10 ml) et on ajoute lentement de l'éther sec pour obtenir un précipité persistant (environ 6 volumes).

Le précipité est purifié par une recristallisation dans le n-butanol et par deux recristallisations dans l'éthanol absolu. On obtient du  $\beta$ -D-méthyl-N-acétyl-glucosaminide pur ( $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$ ) après chromatographie sur charbon (DARCO - G 60) suivant le procédé décrit par WHISTLER et DURSO (105) .

## CONCLUSIONS

L'emploi du diazométhane est à réserver essentiellement à la méthylosidation des oses et à la méthylation des polyosides acides. Dans ce dernier cas, la réaction reste, toutefois, partielle.

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous pouvons conclure de cet exposé détaillé que le nombre important de techniques proposées montre assez les difficultés que l'on rencontre dans la méthylation des glucides. Si la perméthylation des oligosides se réalise d'une manière relativement aisée, le résultat est bien différent dans le cas des molécules plus importantes et plus complexes de polysides où l'on se heurte, généralement, à des problèmes liés à des empêchements stériques ou à la labilité de certains glucides et l'on peut affirmer qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode générale satisfaisante de perméthylation .

Toutefois, une méthylation poussée ou totale d'un glucide peut être réalisée à la condition d'associer les méthodes au sulfate de méthyle et à l'iodure d'argent. La première, plus douce, stabilise la molécule glucidique et permet sa dissolution dans l'iodure de méthyle et dans les solvants organiques utilisés au cours des méthylations. La seconde, plus brutale, mais plus efficace, achève - en principe - la méthylation du glucide. Cependant, on ne peut acquérir, en aucun cas, la certitude que la perméthylation a été réalisée et les résultats fournis par les méthodes de méthylation des glucides doivent donc être interprétés avec la plus grande prudence. En outre, on effectuera systématiquement, au cours des différentes étapes de la méthylation, le dosage des groupes "méthoxy" (\*). La stabilisation du taux de ces derniers signalera, en effet, la fin de la méthylation sans toutefois préciser d'une manière certaine si celle-ci est complète.

Ce mémoire était en cours de mise en page quand est paru un article de WALLENFELS, BECHTLER, KUHN, TRISCHMANN et EGGE (105 bis) dans lequel sont décrits de nouveaux procédés de méthylation des glucides. Nous les avons fait figurer dans l'Appendice n° 2 (page 96) .

---

(\*) - Voir "Appendice n° 1" de la page suivante .

APPENDICE n° 1  
\*\*\*\*\*

METHODES DE DOSAGE DES GROUPEMENTS "METHOXY"

Le dosage des groupements "méthoxy" est d'une importance fondamentale dans la détermination du taux de substitution des fonctions hydroxylées des glucides en cours de méthylation. En effet, seule la constance du nombre des groupements "méthoxy" permet de conclure que la méthylation est maximale, sans qu'il soit possible, toutefois, d'acquiescer la certitude qu'elle soit totale.

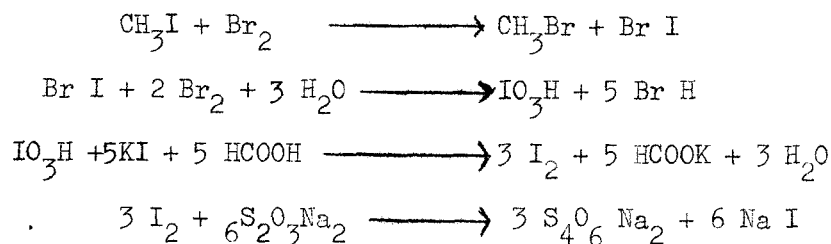
Le dosage des groupements "méthoxy" a fait l'objet d'une revue générale de LAVER et WOLFROM (106) .

PRINCIPE DES METHODES

Les groupements "méthoxy" sont réduits en iodure de méthyle par l'acide iodhydrique qui est ensuite dosé par l'un des procédés suivants :

1 - L'iodure de méthyle est entraîné par un courant de gaz carbonique et donne, par barbottage dans une solution de nitrate d'argent, un précipité d'iodure d'argent que l'on pèse.

2 - L'iodure de méthyle est entraîné dans une solution de brome et l'acide iodique formé est dosé par iodométrie. Les schémas des réactions sont les suivants:



On voit que 6 molécules d'hyposulfite de sodium correspondent à un groupement "méthoxy".

Ce principe a été appliqué par VIEBÖCK et BRECHER (107) à la mise au point d'une microméthode de dosage des groupements "méthoxy" .



3 - Une modification au principe précédent a été apportée par HOFFMAN et WOLFROM (108) pour éviter d'éventuelles dégradations en milieu acide des glucides méthylés .

#### PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE HOFFMAN et WOLFROM

##### 1°- Matériel

L'appareil décrit par HOFFMAN et WOLFROM (109) (figure 14, page 58) est le plus généralement utilisé.

##### 2°- Réactif

###### a - Solution d'acide iodhydrique

150 ml d'acide iodhydrique (  $d^4 = 1,5$  ), additionés de 3 ml d'acide hypophosphoreux à 50 p.100, sont distillés dans un appareil en verre, sous un courant lent de gaz carbonique. Le distillat passant à 127°C est recueilli par fractions de 10 ml dans des tubes en verre Pyrex qui sont immédiatement soudés au chalumeau. L'acide iodhydrique, dont la densité atteint alors 1,7, peut être conservé, à basse température, pendant plusieurs semaines.

###### b - Solution de lavage

La solution de lavage est obtenue en mélangeant, à parties égales, une solution aqueuse de sulfate de cadmium à 5 g p.100 ml et une solution aqueuse d'hyposulfite de sodium à 5 g p.100 ml. Le précipité jaune qui apparaît n'altère pas les propriétés de la solution.

###### c - Gaz carbonique

Le gaz carbonique commercial doit passer sur une colonne de sulfate de calcium (Drierite) avant d'être introduit dans l'appareil. Un excellent régulateur de débit est nécessaire.

###### d - Solution-piège

La "solution-piège" est obtenue en dissolvant 35 g d'acétate de potassium dans 350 ml d'acide acétique glacial auquel on ajoute ensuite 7 ml de brome dépourvu d'iode. Pour stabiliser la solution, il faut la conserver pendant une semaine environ à la lumière du jour ou pendant une nuit à la lumière d'une lampe de 250 watts .



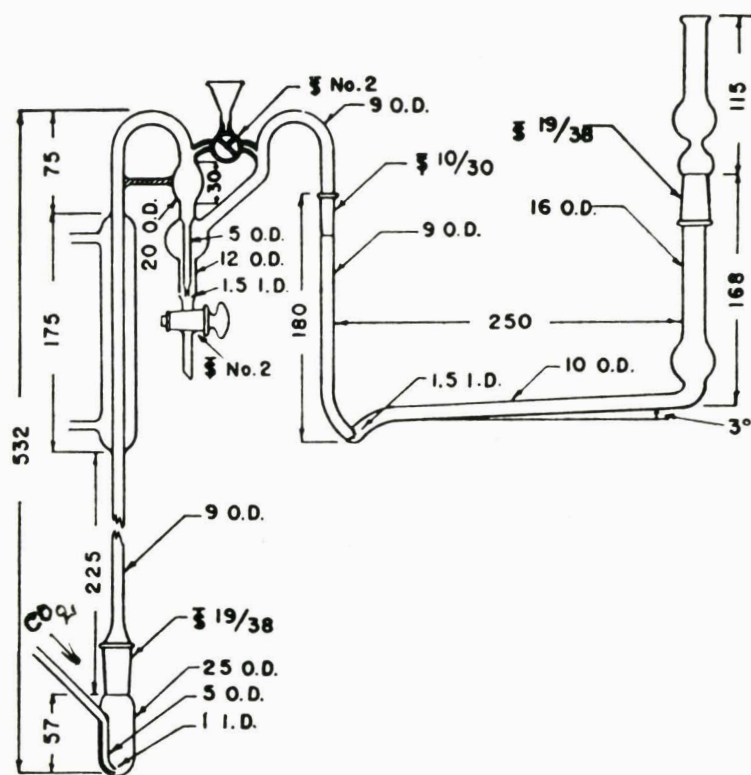


Figure 14

Appareil de HOFFMAN et WOLFROM (109)  
 pour la détermination des groupements "méthoxy".  
 Les dimensions sont exprimées en millimètres.

### 3°- MODE OPERATOIRE

On vérifie d'abord l'étanchéité de l'appareil en appliquant une faible pression de  $\text{CO}_2$  après avoir obturé le tube-piège par un faible volume d'eau: le niveau ne doit pas varier après plusieurs heures, une variation faible indiquant qu'une dissolution légère du gaz carbonique dans l'eau a eu lieu.

On fait ensuite passer pendant 10 minutes et après avoir éliminé l'eau, un courant lent de gaz carbonique. On introduit alors l'acide iodhydrique dans le réacteur en faisant passer un lent courant de gaz carbonique. 3 ml de la solution de lavage sont ensuite introduits par le robinet supérieur, que l'on ferme dans la position indiquée dans la figure. On chauffe ensuite à reflux, maintenant le passage du gaz carbonique pendant 20 minutes après avoir ramené la solution à la température ordinaire.

L'échantillon à analyser est pesé. S'il est solide, on utilise des cupules d'acide tartrique comme support (\*). S'il est liquide, on utilisera une micropipette tarée de 40 microlitres.

Quand l'acide iodhydrique est revenu à la température ordinaire, on arrête le passage du courant de gaz carbonique et on introduit 10 ml de la "solution-piège" dans la partie terminale de l'appareil. On projette l'échantillon à doser dans le réacteur et on attend environ 20 minutes pour obtenir une dissolution complète. On chauffe ensuite légèrement à reflux en maintenant un débit de gaz carbonique juste suffisant pour éviter les retours d'acide iodhydrique dans le tube d'arrivée.

Après une ébullition à reflux de 15 minutes, le débit de gaz carbonique est réglé à raison de 2 bulles par seconde dans la solution de lavage. On modifie ensuite la position du piège, en variant son inclinaison par rotation de l'ensemble sur son embout, de manière à prolonger pendant 5 à 7 secondes le contact des bulles avec la "solution-piège". Le chauffage est maintenu pendant 20 minutes puis le passage de l'eau dans le condenseur est arrêté et le chauffage et le barbotage sont prolongés pendant encore 15 minutes. La condensation doit se réaliser très nettement sur la partie du condenseur à air, ce qui correspond à un chauffage suffisant pour obtenir une réaction totale.

---

(\*) - Les cupules d'acide tartrique sont obtenues en passant dans de l'acide tartrique fondu une boucle en fil métallique. Par refroidissement, on obtient une cupule pelliculaire d'acide tartrique.

Après les 15 minutes de barbotage, le piège est démonté ; le réacteur est ramené à la température ordinaire et le passage du gaz carbonique est arrêté. L'acide iodhydrique du réacteur est conservé et peut être utilisé pour effectuer 4 ou 5 déterminations successives.

La "solution-piège" est introduite quantitativement dans un flacon de 250 ml. On ajoute 25 ml d'eau, 5 ml d'une solution aqueuse d'acétate de sodium à 25 g p.100 ml, puis goutte à goutte, de l'acide formique à 90 p.100 ( v : v ) en agitant, jusqu'à ce que la coloration du brome disparaisse. On bouche et on agite énergiquement pour augmenter la pression à l'intérieur du flacon, puis on ajoute 5 ml d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 10 p.100 ( v : v ) et environ 0,5 g d'iodure de potassium pur. L'iode libéré est dosé par une solution d'hyposulfite 0,1 N .

PROCÉDES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES OSES MÉTHYLÉS
---

Les procédés de séparation et d'isolement des oses méthylés ont été mis au point en tenant compte du comportement particulier de ces composés dont nous précisons donc les propriétés essentielles. Nous décrirons ensuite les procédés d'hydrolyse des polysaccharides méthylés et les méthodes de séparation et d'isolement des oses méthylés.

## I - PROPRIÉTÉS DES OSES MÉTHYLÉS

### A - PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

#### I - POUVOIR ROTATOIRE

Les pouvoirs rotatoires des oses méthylés présentent, en général, des valeurs caractéristiques. La simple glycosidation du glucose par le méthanol chlorhydrique fournit par exemple de l' $\alpha$ -méthylglucopyrannoside dont le pouvoir rotatoire spécifique est de  $+ 156^\circ$  à  $+ 158^\circ$  et du  $\beta$ -méthylglucopyrannoside dont le pouvoir rotatoire spécifique est de  $- 32^\circ$  (les valeurs correspondantes pour les glucoses  $\alpha$  et  $\beta$  sont respectivement de  $+ 113.04$  et  $-19.07$ ).

D'autre part, deux isomères méthylés d'un ose présentent généralement des valeurs de pouvoir rotatoire différentes : par exemple, le 2,3,4-triméthylglucose et le 2,3,6-triméthylglucose possèdent des pouvoirs rotatoires spécifiques qui sont respectivement  $+ 86^\circ$  et  $+ 67^\circ$ .

Ces propriétés optiques ont été largement utilisées pour l'identification de ces composés (voir p. 90) et nous avons rassemblé dans les tableaux I à V (p. 62 à 66) les valeurs des pouvoirs rotatoires spécifiques des principaux oses méthylés.

#### 2 - THERMOSTABILITÉ

Les méthylsides des oses et des oses méthylés présentent une thermostabilité remarquable. Leurs points de fusion sont très variables, mais, en général, leurs points d'ébullition se situent entre  $100$  et  $200^\circ\text{C}$ , ce qui permet leur séparation par distillation fractionnée ou par chromatographie en phase gazeuse.

TABLEAU I

Point de fusion (en °C) et pouvoir rotatoire spécifique  
(en solution aqueuse) des dérivés méthylés du D-glucose (BOURNE et PEAT)(110)

<u>Carbones substitués</u>	<u>Anoméries</u>	<u>P.F.</u>	<u><math>[\alpha]_D</math></u>
2	$\beta$ -D-Glu	+157 $\rightarrow$ +159	+12 $\rightarrow$ +66
3	$\alpha$ -D-Glu	+161 , +168	+104,5 $\rightarrow$ +55,5
	$\beta$ -D-Glu	+133,5 , +135	+31,9 $\rightarrow$ +55,1
4	D-Glu	Liquide	+53 $\rightarrow$ +61
5	D-Glu	id.	+10,6 (éthanol)
6	$\alpha$ -D-Glu	+143 , +145	+110 $\rightarrow$ +59,5
2 - 3	$\alpha$ -D-Glu	+85 , +87	+81,9 $\rightarrow$ +48,3
2 - 3	$\beta$ -D-Glu	+110 , +121	+ 6,5 $\rightarrow$ + 50,3 (acétone)
2 - 4	D-Glu	Liquide	-
2 - 6	D-Glu	Liquide	+58,3 $\rightarrow$ +63,3
3 - 4	D-Glu	+113	+64,9 $\rightarrow$ +94,8
3 - 6	$\alpha$ -D-Glu	+113 , +116	+102,5 $\rightarrow$ +61,5
4 - 6	$\alpha$ -D-Glu	+156 , +158	+110 $\rightarrow$ +64
5 - 6	D-Glu	Liquide	+4
2 - 3 - 4	D-Glu	-	Variable
2 - 3 - 5	D-Glu	Liquide	+17 $\rightarrow$ + 4,4
2 - 3 - 6	$\alpha$ -D-Glu	+121 , +123	+70
2 - 4 - 6	$\alpha$ -D-Glu	+123 , +126	+111 $\rightarrow$ +70 (méthanol)
3 - 4 - 6	$\alpha$ -D-Glu	+76 , +77	+91,9 $\rightarrow$ +77,4
3 - 5 - 6	D-Glu	Liquide	Variable
2 - 3 - 4 - 6	$\alpha$ -D-Glu	96	+92 $\rightarrow$ +84
2 - 3 - 5 - 6	D-Glu	Liquide	-7,2 $\rightarrow$ -11,1



TABLEAU II

Point de fusion (en °C) et pouvoir rotatoire  
spécifique (en solution aqueuse) des dérivés méthylés du  
D-galactose (MAHER) (111)

<u>Carbones substitués</u>	<u>Anoméris</u>	<u>P.F.</u>	<u><math>[\alpha]_D</math></u>
2	$\alpha$	+147 à+149	+53 → +86,2
3	$\alpha$	+144 à+147	+150,6 → +108,6
4	$\beta$	+207	-6,2 → +92
6	$\alpha$	+128	+144 → +77
2,3	-	Liquide	+80,9
2,4	$\beta$	+103	+22 → +85,6
2,6	$\beta$	+128 à+130	+46,8 → +87,5
3,4	-	+164 à+166	+95 → +117
4,6	$\alpha$	+131 à+133	+133 → +76,9 (éthanol)
2,3,4	$\alpha$	+80 à+86	+152 → +114
2,3,5	-	Liquide	-5 → -8
2,3,6	-	Liquide	+87
2,4,6	-	+102 à 105	+124 → +90,4
3,4,6	-	Liquide	-43
2,3,4,6	-	Liquide	-109,5
	$\alpha$	+72	+142 → +118
2,3,5,6	-	Liquide	-21,5

TABLEAU III

Point de fusion (en °C) et pouvoir rotatoire  
spécifique (en solution aqueuse) des dérivés méthylés du  
D-mannose (ASPINAL)(112), de la D-glucosamine (JEANLOZ)(113)  
et de la D-galactosamine (JEANLOZ)(114)

<u>Nature de l'Ose</u>	<u>Carbones substitués</u>	<u>Anoméris</u>	<u>P.F.</u>	<u>[<math>\alpha</math>] D</u>
<u>Mannose</u>	2	-	+136 à+137	+7 → +4,5
	4	-	+127 à+128	+34 → +22,6
	6	-	-	+15,3(chloroforme)
	2,3	-	liquide	+6 (méthanol)
	3,4	-	+107 à+109	+3
	4,6	-	-	+25
	2,3,4	-	liquide	+2
	2,3,6	-	liquide	+6
	2,4,6	$\alpha$	+90	+21 → +14
		$\beta$	+104 à+107	-5,7 → +19
	3,4,6	-	+101 à+102	+36 (méthanol)
	2,3,4,6	$\alpha$	liquide +49 à +50	+1,2 +11,5 → +2,5
	2,3,5,6	-	liquide	+39 → +43
<u>Glucosamine</u>	3	-	+215	+123
	6	-	+185 à+195	+92 → +68
	3,4	-	+200 à+205	+121
	3,4,6	-	+210	+49,2
<u>Galactosamine</u>	3	-	liquide	+119
	4	-	+178	-37
	6	-	+190	+107
	3,4	-	liquide	+108
	4,6	-	+190	+107
	3,4,6	-	+178	+152,5

TABLEAU IV

Point de fusion (en °C) et pouvoir rotatoire spécifique  
(en solution dans l'eau et dans divers solvants organiques) des  
dérivés méthylés du méthylglucoside (BOURNE et PEAT)(115)

Carbones substitués	Anomérisie	P.F.	$[\alpha]_D$	Nature du solvant
2	$\alpha$	+147 à 148	+155	Eau
	$\beta$	+97 à 98	-37,5	Eau
4	$\beta$	liquide	-	Eau
6	$\alpha$	liquide	+127,9	Eau
2 - 3	$\alpha$	+83 à 85	+150,2	Eau
	$\beta$	+62 à 64	-47,8	Chloroforme
2 - 4	$\alpha$	+79 à 81	+159 → +186	Acétone
	$\beta$	+124	-163 → -18,6	Eau
2 - 6	$\alpha$	liquide	+152 → +156	
	$\beta$	+50 à 52	-43,5	Chloroforme
3 - 4	$\beta$	+79 à 81	-11,9	Chloroforme
3 - 6	$\beta$	liquide	+55,4	Ethanol
4 - 6	$\alpha$	liquide	+157	Chloroforme
	$\beta$	+50 à 52	-28	Chloroforme
2 - 3 - 4	$\alpha$	liquide	-	-
	$\beta$	+92 à 95	-22,9 → -25,1	Méthanol
2 - 3 - 6	$\alpha$	-	+149	Méthanol
	$\beta$	+58 à 60	-48	Chloroforme
2 - 4 - 6	$\beta$	+70 à 71	-27,4	Chloroforme
3 - 4 - 6	$\beta$	+51 à 52	-20 → -16	Chloroforme
3 - 5 - 6	$\alpha$	liquide	+93	Méthanol
	$\beta$	liquide	-87	Méthanol
2 - 3 - 4 - 6	$\alpha$	liquide	+93	Méthanol
	$\beta$	liquide	-87	Méthanol

TABLEAU V

Point de fusion (en °C) et pouvoir rotatoire spécifique (en solution dans l'eau et dans divers solvants organiques) des dérivés méthylés du méthylgalactoside (BELL)(116) et du méthylmannoside (ASPINALL) (117)

<u>Nature de l'oside</u>	<u>Carbones substitués</u>	<u>Anomérisie</u>	<u>P.F.</u>	<u><math>[\alpha]_D</math></u>	<u>Nature du solvant</u>
<u>Méthylgalactoside</u>	2	$\alpha$	liquide	+180	Eau
		$\beta$	+131 à 132	+1,7	Eau
	3	$\beta$	liquide	+31,9	Eau
		$\alpha$	liquide	+210	Eau
	2,3	$\beta$	liquide	+23	Eau
		$\alpha$	+105	+142	Eau
	2,4	$\beta$	+165 à 166	0	Eau
		$\beta$	+73 à 75	-24	Chloroforme
	3,4	$\beta$	+102 à 103	-9,1	Chloroforme
		$\beta$	+140	-41,5	Chloroforme
	4,6	$\alpha$	+73 à 74	+163,9	Chloroforme
		$\beta$	+111 à 112	-40,9	Chloroforme
	2,3,4,6	$\alpha$	liquide	+190	Eau
		$\beta$	+48 à 49	+18,7	Eau
	<u>Méthylmannoside</u>	4,6	$\alpha$	liquide	+80,5
$\alpha$			liquide	+47	Eau
2,3,4,6		$\alpha$	+37 à 38	+42,9	Eau
		$\beta$	+36 à 37	-80	Eau

Les oses méthylés réducteurs, au contraire, dont les points de fusion sont, en général, supérieurs à ceux des méthylosides, sont difficilement vaporisables et très instables à la chaleur. Donc, seuls les méthylosides des oses méthylés pourront être soumis à la chromatographie en phase gazeuse sans courir le risque d'être dégradés.

Nous avons précisé dans les tableaux I à V (p. 62 à 66) les points de fusion de quelques dérivés méthylés des oses et des méthylosides.

### 3 - CARACTERES DE SOLUBILITE

Les méthylosides des oses et des oses méthylés sont, en général, peu solubles dans l'eau (1 g p.100 ml dans le cas des méthylglucosides) et très solubles dans les solvants organiques comme le chloroforme et l'éther éthylique . Au contraire, les oses méthylés acquièrent la propriété de se dissoudre dans l'eau, dans des proportions très variables, en gardant leurs caractères de solubilité dans les solvants organiques.

Ces propriétés sont bien illustrées par l'exemple suivant. Le méthylgalactoside, dont le groupement pseudoaldéhydrique est seul substitué, est pratiquement insoluble dans l'eau, tandis qu'il est soluble dans le chloroforme. Inversement, le perméthylgalactose, dont seul l'hydroxyle pseudoaldéhydrique reste libre, est soluble dans l'eau.

En pratique, il est toujours possible de réaliser une solution aqueuse des oses méthylés, bien que la solubilité varie, en principe, en raison inverse du degré de substitution des fonctions hydroxyles : la présence de l'hydroxyle semi-acétatique suffit à conserver à la molécule ses propriétés hydrophiles.

Il est important de signaler que les propriétés de solubilité des dérivés méthylés du mannose sont nettement différentes de celles des autres oses méthylés. En particulier, tous les dérivés méthylés du mannose sont plus solubles dans l'eau que dans les solvants organiques et cette propriété pose de graves problèmes d'extraction des solutions aqueuses de méthylmannoses par les solvants organiques (voir p.104).



#### 4 - CRISTALLISATION

Les caractères de solubilité précédents confèrent aux dérivés méthylés des glucides la propriété de cristalliser que l'on met à profit pour les isoler. Les perméthylsides cristallisent parfaitement dans les alcools comme le méthanol et l'éthanol et dans l'éther de pétrole ou l'acétone (\*).

La cristallisation aisée des dérivés méthylés des glucides est mise à profit pour préparer des composés purs dont on peut ensuite déterminer les principales constantes physiques (voir Tableaux I à V ; p.62 à 66) .

#### B - PROPRIETES CHIMIQUES DES OSES METHYLES

Du point de vue de leurs propriétés chimiques, le caractère prépondérant des éthers méthyliques des oses est, nous semble-t-il, leur "passivité chimique" remarquable due à la grande stabilité de la liaison éther.

##### 1 - STABILITE EN MILIEU ACIDE

La liaison "pseudo-éther" des méthylosides est très facilement hydrolysée par les acides dilués (HCl 1 à 2 N , à 100°C, pendant 1 à 2 heures). Les liaisons "éthers" sont nettement plus stables. Cependant, de nombreux auteurs se sont penchés sur le problème de la déméthylation des éthers méthyliques et de leur dégradation en milieu acide. FREUDENBERG et BOPPEL (118), CHANDA et coll. (119), CROON et coll. (120) ont par exemple étudié le pourcentage de déméthylation des dérivés di- et triméthylés de certains oses dans diverses conditions d'hydrolyse acide. Le tableau VI montre que des hydrolyses prolongées effectuées en milieu acide très concentré ne provoquent pas de déméthylation supérieure à 2 p.100 .

CROON (121) signale cependant qu'une dégradation appréciable affecte, en milieu acide, les oses diméthylés : par exemple, l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique à 2 p.100, à 100°C pendant 13 heures provoque 6 à 8 p.100 de dégradation des 2-3 diméthylxylose et diméthylglucose ; en outre, l'hydrolyse

---

(\*) - L'addition progressive d'eau aux solutions alcooliques de glucides méthylés accélère la cristallisation.

TABLEAU VI

Déméthylation de dérivés méthylés des oses dans diverses conditions  
d'hydrolyse acide

Solution d'hydrolyse	Conditions d'hydrolyse	Composés étudiés	p.100 de déméthylation	Références
HCl à 36 p.100 dans l'eau	+ 5°C	2,3,6-triméthylglucose	2 p.100	FREUDENBERG et BOPPEL (122)
HCl à 1 p.100 dans le méthanol		2,3-diméthylxylose 2,3,4-triméthylxylose	0,2 p.100 2 p.100	CHANDA et coll. (123)
HCl à 3 p.100 dans le méthanol	18 h	1,4-diméthylérythritol	1 à 3 p.100	GOLDSTEIN et coll. (124)
HCl à 2 p.100 dans l'eau	100°C; 13 h	2,3-diméthylxylose	8 p.100	CROON et coll. (125)
HCl à 2 p.100 dans le méthanol puis 0,5 N dans l'eau	100°C; 13 h  100°C; 8 h	2,3-diméthylxylose  2,3,6-triméthylglucose	1,7 p.100  0,9 p.100	- id -
SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> à 72 p.100 dans l'eau puis SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> à 12,4 p.100 dans l'eau	20°C; 0,5 h  100°C; 4 h	2,3-diméthylxylose	0,6 p.100	- id -
HCOOH à 98 p.100 puis SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 0,5 N dans l'eau	100°C; 6 h  100°C; 14 h	2,3-diméthylxylose	légère	- id -

brutale par l'acide formique à 98 p.100, à 100°C pendant 6 heures, suivie d'un traitement par l'acide sulfurique 0,5 N à 100°C pendant 14 heures, parvient à détruire jusqu'à 23 p.100 de 2,3-diméthylglucose.

Il est, cependant, important de faire remarquer que ces conditions d'hydrolyse ne sont pratiquement jamais appliquées puisqu'une action de l'acide chlorhydrique 2 N à 100°C pendant 1 à 2 heures suffit pour hydrolyser quantitativement un polyoside méthylé ou non (voir, à ce sujet, MONTREUIL et SCHEPPLER) (126) .

## 2 - STABILITE EN MILIEU ALCALIN

Nous avons effectué une étude de la stabilité, en milieu alcalin, des glucides méthylés, de telles expériences n'ayant pas encore été réalisées, à notre connaissance.

Nos essais ont porté sur le 2,3,4-triméthylglucose dont nous avons suivi la destruction par chromatographie quantitative sur papier.

La dégradation par les solutions de soude 1 N est de l'ordre de 2 p.100 à 20°C et atteint 10 à 12 p.100 à 37°C, après 4 heures de contact. Avec la soude 4 N à 37°C, la dégradation est de 10 p.100 au bout d'une heure et atteint près de 50 p.100 au bout de 4 heures. Les concentrations de soude inférieures ou égales à 0,5 N ne provoquent pas de dégradations appréciables après 4 heures à 20°C.

Les méthylsides sont, au contraire, très stables en milieu alcalin grâce au blocage de la fonction réductrice labile. C'est ainsi qu'une proportion inférieure à 1 p.100 de perméthyl-méthylglucoside est détruite après 12 heures de contact avec une solution de NaOH 10 N à 20°C .

Il est, à notre avis, très important de tenir compte de cette stabilité très relative des dérivés méthylés en milieu alcalin dans la pratique des opérations de méthylation par la méthode de HAWORTH. Le rendement est en effet lié au maintien du pH à des valeurs inférieures à 10 .

## 3 - PROCEDES DE DEMETHYLATION DES GLUCIDES METHYLES

La déméthylation des oses méthylés ne peut être réalisée que dans des conditions brutales : action de l'acide bromhydrique (HOUGH et coll. (127) ; HESS et NEUMANN (128) ) ou du trichlorure de bore (ALLEN et coll.(129) (voir plus loin ; p. 92) .

#### 4 - REACTIONS COLOREES DES OSES METHYLES

Les oses méthylés donnent des colorations avec les réactifs classiques à l'orcinol, à l'anthrone et au phénol sulfuriques ; à l'oxalate et au phtalate d'aniline. Les glycosides sont, en général, hydrolysés par le réactif au cours de la réaction et donnent, eux aussi, des colorations. Les isomères méthylés fournissent des colorations différentes suivant la position des hydroxyles restés libres sur la chaîne carbonée (voir p. 90) .

Les procédés de méthanolyse et d'hydrolyse des polyosides méthylés et les méthodes d'identification des méthylosides et des oses méthylés sont fondés sur les propriétés que nous venons de décrire : le polyoside méthylé sera, dans un premier temps, méthanolysé en méthylosides méthylés ou hydrolysé en oses méthylés dont l'identification sera effectuée dans un second temps.

## II - METHANOLYSE ET HYDROLYSE DES OSIDES METHYLES

### A - METHANOLYSE

L'oside perméthylé est traité à chaud par du méthanol contenant 1 à 5 p.100 d'acide chlorhydrique. Le méthanol est le plus couramment utilisé, car il présente l'avantage de fournir directement des méthylosides, utilisables pour l'analyse chromatographique en phase gazeuse ou pour la détermination des constantes physiques (voir p. 90). Une hydrolyse ultérieure des méthylosides obtenues par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique permettra d'obtenir des oses méthyles réducteurs, dont on effectue l'étude par chromatographie sur papier ou sur colonne ou encore par électrophorèse (voir p.76) .

D'autres alcools, comme l'alcool benzylique ou l'éthanol ont été parfois utilisés (COMBS et coll.) (130). Cependant, nous ne décrirons que la méthode classique d'hydrolyse par le méthanol chlorhydrique. Le procédé est d'application générale et fournit un mélange des méthylosides  $\alpha$  et  $\beta$ .

MODE OPERATOIRE

L'oside perméthylé est dissous à la concentration de 1 g p.100 ml dans du méthanol renfermant 1 à 5 p.100 d'acide chlorhydrique gazeux (\*). La solution est maintenue à l'ébullition à reflux au bain-marie pendant 6 à 12 heures, jusqu'à ce que le pouvoir rotatoire du mélange devienne constant. On refroidit et on neutralise par la baryte, le carbonate d'argent ou la soude. On désionise le milieu par élimination du précipité salin obtenu ou par un passage sur des colonnes de résines à échange d'ions dans le cas d'une neutralisation par la soude. On peut ensuite isoler le mélange des méthylosides par évaporation sous vide de la solution neutre. Les composés obtenus sont enfin purifiés par recristallisation dans le méthanol ou dans l'éthanol.

La méthanolyse est la seule méthode qui permette d'obtenir des méthylosides avec un bon rendement. Elle n'est cependant pas quantitative et ne convient donc pas pour des dosages effectués par chromatographie en phase gazeuse.

B - HYDROLYSE

La plupart des acides minéraux ont été utilisés pour obtenir des oses méthylés réducteurs à partir des polysaccharides perméthylés.

Selon ISBELL et coll. (131), l'acide formique à 90 p.100 à 100°C pendant 4 heures permet une hydrolyse complète des polysaccharides méthylés de haut poids moléculaire. Ces conditions sont recommandées par ISBELL pour éviter toute dégradation.

D'autres auteurs ont préféré utiliser des solutions d'acide sulfurique, en particulier : BREDERESCH et HAMBSCH (132) ( $\text{SO}_4\text{H}_2$  1 N ; 12 heures à reflux) ; KUHN, BAER et GAUHE (133) ( $\text{SO}_4\text{H}_2$  1 N ; 6 à 12 heures à reflux avec contrôles polarimétriques) ; COURTOIS et coll. (134) ( $\text{SO}_4\text{H}_2$  à 6 p.100 ; 5 heures au bain-marie bouillant). L'utilisation de l'acide sulfurique permet de neutraliser et

---

(\*) - Le méthanol chlorhydrique est obtenu en faisant barbotter dans du méthanol anhydre de l'acide chlorhydrique gazeux sec préparé par chauffage en milieu sulfurique d'un mélange de chlorure de sodium et d'acide chlorhydrique ( 1 : 1 )



de désioniser aisément le milieu par l'addition de baryte ou de carbonate de strontium, suivie d'une extraction acétonique ou chloroformique du surnageant, préalablement évaporé à siccité.

L'acide oxalique a été utilisé par HAWORTH et LEARNER (135) et par HAWORTH, HIRST et PERCIVAL (136). Les auteurs hydrolysent les polysaccharides méthylés en chauffant pendant 24 heures à 80°C une solution de 3 à 5 p.100 du composé dans le mélange méthanol/acide oxalique à 4 p.100 dans le rapport 3 : 1 (v:p). Le méthanol est ensuite éliminé sous pression réduite à 30-35°C et la solution aqueuse résiduelle (approximativement à 1 p.100 d'acide oxalique) est maintenue pendant 5 h à 80°C, jusqu'à ce que le pouvoir rotatoire demeure constant. Ce procédé est encore utilisé dans le cas de polysaccharides composés de résidus osidiques instables tels que les fructo-furannoses.

BELL (137) a décrit un procédé d'hydrolyse en milieu acético-chlorhydrique : la substance est dissoute dans le mélange de 5 parties d'acide acétique glacial et 10 parties d'une solution d'acide chlorhydrique à 5 p.100 que l'on maintient pendant 5 heures au bain-marie bouillant.

L'acide chlorhydrique concentré a été préconisé par HAWORTH et PERCIVAL (138). Une solution de polysaccharide méthylé (10 à 20 g p.100 ml) dans l'acide chlorhydrique concentré ( $d_4^{20}$  1,16) est maintenue à -15°C et saturée en gaz chlorhydrique sec. L'hydrolyse est ensuite poursuivie pendant 10 jours à la température ordinaire.

Nous avons personnellement recherché les meilleures conditions d'hydrolyse des osides méthylés en nous fondant sur les conclusions concernant la stabilité des oses méthylés en milieu acide (voir p.68) et sur les travaux de MONTREUIL et SCHEPPLER (139) à propos de l'hydrolyse quantitative des osides. Nous avons choisi, avec ces auteurs, de réaliser nos hydrolyses par des solutions d'acide chlorhydrique 1 à 2 N, au bain-marie bouillant pendant 1 à 2 heures. L'hydrolysate est purifié par un passage sur des colonnes d'échangeurs de cations (Dowex 50 ; forme acide) et d'anions (Duolite A-40 ; forme formiate). A la dilution utilisée, aucune perte de produit n'est à craindre et la purification est totale. D'autre part, aucune déméthylation ne peut survenir à cette concentration.

Pour les analyses chromatographiques la méthode est sûre et fournit des résultats parfaitement reproductibles. Par ce procédé on évite, en outre, des pertes appréciables de produits par adsorption, tel qu'il s'en produit dans le cas d'une désionisation par précipitation de l'agent d'hydrolyse sous la forme d'un sel insoluble.

### III - SEPARATION, IDENTIFICATION ET DOSAGE DES

#### DERIVES METHYLES DES OSES ET DES METHYLOSIDES

L'identification et le dosage des dérivés méthylés des oses et des méthylosides nécessitent une séparation préalable qui peut être réalisée par l'application des procédés suivants :

- A - Isolement par cristallisation, distillation ou extraction fractionnées.
- B - Séparation électrophorétique
- C - Séparation chromatographique

#### A - METHODES DE FRACTIONNEMENT

Les méthodes d'isolement par cristallisation, distillation ou extraction fractionnées s'appliquent essentiellement aux méthylosides méthylés qui sont plus stables que les oses méthylés et plus solubles dans les solvants organiques et dont le point d'ébullition est plus bas que celui des oses méthylés correspondants.

Nous nous limiterons à l'exposé des principes généraux des méthodes de fractionnement dont les modalités varient d'un polyside à un autre et qui doivent être adaptées à chaque cas particulier.

##### 1 - CRISTALLISATION FRACTIONNEE

Les méthylosides sont très solubles dans l'acétone, le chloroforme et la méthyl-éthyl-cétone. Ils sont moins solubles dans les alcools (méthanol,

éthanol), l'éther, l'éther de pétrole ou le benzène. En réalisant des mélanges de ces divers solvants, on peut aisément déterminer les conditions convenables de cristallisation des dérivés méthylés. C'est ainsi que les méthylglucosides, assez solubles dans le méthanol, cristallisent dans des solutions aqueuses d'éthanol de concentrations décroissantes. On peut ainsi séparer l' $\alpha$  et le  $\beta$ -méthylglucosides.

D'autre part, les dérivés méthylés sirupeux peuvent être fractionnés en utilisant l'acide acétique glacial comme solvant. Par des dilutions progressives de la solution acétique, on parvient à isoler les divers constituants.

La cristallisation fractionnée est surtout intéressante à appliquer à un mélange relativement simple de méthylglucosides et pour séparer les formes anomériques  $\alpha$  et  $\beta$ .

## 2 - DISTILLATION FRACTIONNEE

La méthode la plus séduisante consiste à utiliser une colonne de WIDMER, sous une pression de  $1 \times 10^{-3}$  mm de mercure. En réalisant des paliers de température, on peut suivre le fractionnement par l'évolution des pouvoirs rotatoires et des indices de réfraction des composés recueillis. On parvient ainsi à isoler des dérivés méthylés purs et à séparer les formes  $\alpha$  et  $\beta$  de chaque méthylglucoside. Cependant, la méthode n'est applicable qu'à des quantités élevées de substances. En outre, il est difficile d'éviter des déméthylations et des dégradations par pyrolyse et le rendement est toujours imparfait.

## 3 - EXTRACTION FRACTIONNEE

L'extraction fractionnée s'applique essentiellement aux oses méthylés que l'on extrait de leurs solutions aqueuses à l'aide des solvants organiques les plus variés. On réalise de cette manière, tout au plus un fractionnement de base assez grossier qui permet, cependant, d'obtenir parfois des "familles" de dérivés méthylés.

## B - METHODES ELECTROPHORETIQUES

Depuis que COLEMAN et MILLER (140) ont observé que la migration électrophorétique du glucose et du maltose pouvait être réalisée dans les

solutions boratées, le principe général de la méthode de séparation des oses par électrophorèse consiste à former un complexe ionisé de l'acide borique avec les fonctions  $\alpha$ -glycoliques des oses (voir p.15) .

La méthode a été appliquée avec succès à la séparation des éthers méthyliques, en mettant à profit les différences qui peuvent se manifester dans le nombre des fonctions  $\alpha$ -glycols restées libres dans les molécules d'oses méthylés.

La séparation électrophorétique est réalisée sur papier dans des tampons boratés alcalins.

FOSTER (141) a décrit une méthode d'électrophorèse sur papier et étudié les mobilités électrophorétiques de dérivés méthylés divers dans un tampon boraté 0,05 M de pH 10 sur papier Whatman n° 1 (FOSTER et STACEY)(142) et sur papier Whatman n° 3 MM (FOSTER)(143). Le tableau VII (page 77) indique les mobilités de quelques oses méthylés.

La soude 0,1 N a également été utilisée par LEWIS et SMITH (144) sur papier Whatman n° 4 (20 à 25 volts/cm à 20°C). Selon ces auteurs, cette méthode permet de séparer le 2,3,6- du 2,4,6-triméthylglucose de façon satisfaisante ( $M_{\text{Rib}} = 0,71$  et 0,66) (\*)

Nous n'avons, quant à nous, jamais obtenu de séparation satisfaisante des 2,3,4- et 2,3,6-triméthylglucoses, quels que soient les papiers utilisés (papiers Whatman n° 1,3 et 4, papier d'Arches), les conditions de voltage (de 10 à 40 v/cm) et de température (+20°C et +4°C) .

L'électrophorèse ne fournit donc pas encore de résultats satisfaisants. Elle semble cependant intéressante pour séparer les oses méthylés des oses non méthylés car les mobilités électrophorétiques sont très différentes .

#### C - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

La chromatographie sur colonnes, la chromatographie sur papier et en couche mince et la chromatographie en phase gazeuse ont été appliquées à l'isolement, à l'identification et au dosage des dérivés méthylés des oses et des méthylsides.

---

(\*) -  $M_{\text{Rib}}$  indique la mobilité des composés par rapport à celle du ribose

TABLEAU VII

Comportement électrophorétique de dérivés  
méthylés du glucose et du galactose

Dérivés	$M_{\text{Glc}}$ (*)
2,3,4,6-Me-glucose	0
2,3,4 - Me-glucose	0
2,4 - Me - glucose	0,048
2,3 - Me - glucose	0,12
2 - Me - glucose	0,23
3,4 - Me - glucose	0,31
2 - Me - galactose	0,32
3,5,6 - Me - glucose	0,71
3 - Me - glucose	0,82
6 - Me - glucose	0,82

(\*) -  $M_{\text{Glc}}$  = Migration électrophorétique, déterminée par rapport à celle du glucose, de divers dérivés méthylés en tampon boraté de pH 10 (papier Whatman 1) (d'après FOSTER et STACEY) (145)



1 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNES

La plupart des supports habituellement employés dans la chromatographie d'adsorption des oses ont été appliqués à la séparation des oses méthylés.

L'utilisation de colonnes de gel de silice a permis, en particulier, à BELL (146) d'obtenir une séparation des dérivés di-, tri- et tétraméthylés du glucose. L'élution est réalisée en deux temps : les dérivés tétraméthylés sont d'abord élués par le chloroforme pur, puis les dérivés triméthylés, par un mélange de chloroforme et de n-butanol (1:1). Les dérivés diméthylés restent adsorbés sur la colonne et sont déplacés par l'acétone.

BELL et PALMER (147) ont réalisé de la même façon le fractionnement des divers dérivés méthylés du fructose.

L'Alumine a également permis à JONES (148), à NORBERG et coll.(149) et à WISLICEUS (150) d'obtenir une résolution satisfaisante des dérivés di-, tri- et tétraméthylés du glucose et des méthylglucosides, par élution avec des mélanges d'éther sulfurique et d'éther de pétrole. BOISSONNAS (151) a obtenu une bonne séparation d'hexitols méthylés sur des colonnes d'alumine, l'élution étant réalisée avec des mélanges de benzène et de chloroforme.

HOUGH (152) a effectué une séparation chromatographique des divers groupes de dérivés méthylés sur des colonnes de poudre de cellulose par élution, à chaud, avec un mélange de pétrole lampant et de n-butanol (60:40).

GEERDES et coll. (153) ont obtenu de meilleures séparations sur des colonnes d'hydrocellulose, préparée par traitement de la poudre de cellulose par l'acide phosphorique. L'élution des dérivés méthylés est effectuée à 30°C par le passage de l'azéotrope du mélange méthyléthylcétone / eau .

La méthode classique de chromatographie des oses sur charbon de WHISTLER et DURSO (154) a été appliquée à la séparation des isomères méthylés du glucose par WHELAN et MORGAN (155) et a été modifiée par LINDBERG et WICKBERG (156) pour tenter de réaliser une séparation plus poussée des isomères triméthylés. Les auteurs utilisent des colonnes contenant un mélange de Charbon et de Celite (1:1),

en appliquant dans un premier temps un gradient continu de concentration en éthanol variant de 1 à 60 p.100. Ils obtiennent ainsi une bonne séparation en groupes des dérivés di-, tri- et tétraméthylés du glucose. La résolution des 2,3,6- et 2,3,4-triméthylglucose est ensuite obtenue par chromatographie sur une deuxième colonne de Charbon-Célite avec un gradient continu de méthyléthylcétone croissant de 2,5 à 5 p.100 .

Dans tous les cas, l'éluion des dérivés méthylés des oses est suivie par les variations du pouvoir rotatoire des solutions effluentes ou par l'emploi des réactifs classiques des sucres réducteurs (réactif de MOLISCH ; réactif au nitrate d'argent ammoniacal).

Pour les détails techniques, nous renvoyons aux articles originaux cités dans le texte et aux revues générales de BINKLEY (157), de WHISTLER et BEMILLER (158), LEMIEUX (159) et SMITH (160). Il nous paraît, en effet, superflu par souci de clarté, de donner le détail des procédés opératoires concernant ces méthodes car, d'une façon générale, on peut considérer qu'elles ne présentent d'intérêt que dans la séparation de quantités importantes des divers groupes de dérivés méthylés d'un même ose. Elles ne permettent pas de séparer les isomères méthylés d'un même groupe et encore moins les dérivés méthylés provenant d'un mélange de plusieurs oses. Cependant, l'expérience nous montre que ces méthodes, sans se suffire à elles-mêmes, offrent un intérêt certain dans le fractionnement des dérivés méthylés des oses. Elles conduisent à un bon fractionnement de base, prélude à l'utilisation d'autres méthodes dont l'application sera facilitée par la simplification de composition des mélanges obtenus.

## 2 - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER (\*)

Nous avons rassemblé dans le tableau VIII (p. 80) les compositions des principaux systèmes-solvants qui ont été utilisés par différents auteurs pour séparer les oses méthylés. Nous pouvons en distinguer cinq groupes suivant la nature du solvant organique principal : n-butanol, benzène, méthyléthylcétone, collidine (\*\*), solvants divers.

---

(\*) - Revues générales : DEDONDER (161) ;

(\*\*) - La collidine doit subir le traitement préalable suivant : ajouter 10 ml de brome par litre de collidine. Agiter régulièrement pendant 4 à 5 heures. Filtrer et ajouter de l'hyposulfite de sodium cristallisé, sous agitation, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de précipitation. Filtrer. Abandonner 24 heures sur soude anhydre. Filtrer. Distiller le surnageant en recueillant la fraction moyenne (P.E. + 172°C). Le distillat doit être incolore.

TABLEAU VIII

Systèmes-solvants utilisés dans la chromatographie sur papier des dérivés méthylés des oses et des osides .

n°	Systèmes - solvants (*)	Conditions de chromatographie(**)	Applications	Références
1	n-BOH saturé d'eau	W <sub>1</sub> D 37°C	Oses méthylés	HOUGH et coll.(162)
2	n-BOH/EtOH/eau(4:1:5)	W <sub>1</sub> D	Oses méthylés	HOUGH et coll.(163 et HASPINALL et coll.(163bis)
3	n-BOH/EtOH/eau(5:1:4)	W <sub>1</sub> D	Oses méthylés	HIRST et JONES (164)
4	n-BOH/EtOH/eau(41:11:19)	W <sub>1</sub> D	Méthylsides et oses méthylés	HOUGH et coll.(165)
5	n-BOH/EtOH/eau(10:3:5)	W <sub>1</sub> D	Oses méthylés	BOUVENG et LINDBERG(166)
6	n-BOH/EtOH/AmOH/eau(4:1:0,1:4,9)	W <sub>1</sub> D	Isonères di- et tri-méthylés	HIRST et JONES (167)
7	n-BOH/Pyr/eau(6:4:3)	W <sub>1</sub> D	6-désoses méthylés	Mac LEENAN(168)
8	n-BOH/Pyr/eau(10:3:3)	W <sub>1</sub> D	Oses méthylés	LEECH (169)
9	Benz/EtOH/eau(39:10:3)	W <sub>1</sub> D	Oses méthylés.Isonères triméthylés Méthylgalactoses	WICKSTROM et coll.(170) et HASPINALL et coll.(170bis)
10	Benz/EtOH/eau(170:50:15)	W <sub>2</sub> D		
11	Benz/AcEth/EtOH/eau(4:1:1:0,5)	-		
12	Benz/SO <sub>4</sub> Me <sub>2</sub> (20:1)	-	Oses méthylés	BOUVENG (171)
13	MEC saturée d'eau	W <sub>1</sub> D	Isonères tri-et tétra-méthylés	BOOGS et coll.(172)
14	MEC/eau (10:1)	W <sub>1</sub> A	Isonères tri- et tétra-méthylés	BOOGS et coll.(173)
15	MEC/eau (89:11)	W <sub>1</sub> A	Oses méthylés	LEECH (174)
16	Azéotrope MEC/eau	W <sub>1</sub> D	Oses méthylés	GOLDSTEIN et coll.(175)
17	Coll saturée d'eau	W <sub>1</sub> A	Isonères triméthylés	PARTRIDGE (176)
18	Coll/AcEth/eau (2:5:5:)	W <sub>1</sub> A	Isonères tri- et tétra-méthylés	PARTRIDGE (177)
19	AcEth/AcCOOH/eau(9:2:2)	-	Oses méthylés	LEECH (178)
20	EtOH/AcCOOH/eau (85:5:10)	-	Oses méthylés	LEECH (179)
21	n-Octane/IsoPOH/solution aqueuse d'ammoniaque à 10 p.100(50:25:2)	W <sub>1</sub> (***)A	Tri- et tétraméthyl-oses	PETEK et TO DONG (180)
22	Iso-octane/IsoPOH/solution aqueuse d'ammoniaque à 10 p.100 (65:25:2)	W <sub>1</sub> (***)A ou D	- id -	- id -
23	Isoam/AcCOOH/eau(4:1:5)	W <sub>1</sub> A	Oses triméthylés	TINELLI (181)
24	2-Butanone/eau (10:1)	W <sub>1</sub>	Méthylmannoses et méthylgalactoses	HAMILTON et coll.(181 bis)



Nous avons employé la plupart de ces systèmes-solvants à la séparation des oses méthylés provenant d'un hydrolysats de lactose partiellement méthylé et contenant les isomères suivants : 4-méthylgalactose et 6-méthylglucose, 3,4- , 4,6- et 2,6-diméthylgalactoses, 2,3- diméthylglucose, 2,4,6- et 2,3,6-triméthylgalactoses, 2,3,6-triméthylglucose et 2,3,4,6-tétraméthylgalactose . Parmi tous ces solvants, celui de HIRST et JONES (182) (n-butanol/éthanol/ammoniaque/eau (40:10:1:49) ; papier Whatman n° 1 ; chromatographie descendante 24 à 36 heures à 20°C) est de beaucoup le plus satisfaisant et le plus pratique pour réaliser une séparation d'un mélange complexe d'oses méthylés. Cependant, la figure 15 (p.82) montre que de nombreuses taches se superposent et que la méthode n'est intéressante que pour obtenir une séparation en groupes des isomères di- , tri- et tétraméthylés. En éluant les zones correspondantes, on recueillera à partir d'un mélange complexe les groupes d'oses mono- , di- , tri- et tétraméthylés dont la séparation sera réalisée avec d'autres systèmes-solvants.

A l'aide d'hydrolysats de lactose et de mélibiose perméthylés, nous avons recherché le système-solvant susceptible de nous donner une séparation satisfaisante des 2,3,4- et 2,3,6-triméthylglucoses. Le système-solvant n° 6 de HIRST et JONES (183) (figure 16 ; p. 83) ne donne pas une séparation absolument nette et reproductible : les deux taches restent, en général, associées et se chevauchent sur la moitié de leur surface.

On voit, au contraire, que le système-solvant n° 24 de TINELLI (184) donne une séparation plus satisfaisante (figure 16) mais il faut déposer des doses très faibles ( 5 µg de chaque substance pour obtenir la dissociation des deux taches.

Enfin, avec les systèmes-solvants n° 21 et 22 de PETEK et TO DONG (185) à base d'octane, on parvient à la même conclusion.

Dans certains cas, la chromatographie bidimensionnelle apporte des résultats intéressants. Par exemple, la combinaison des systèmes-solvants 6 et 14 permet de séparer les 2,3,4- et 2,3,6-triméthylglucoses.

En conclusion de notre étude, nous avons retenu les systèmes-solvants suivants :

1 - le système-solvant n° 6 de HIRST et JONES (186) pour l'analyse préliminaire d'un mélange complexe d'oses méthylés et pour la séparation en groupes d'isomères mono, di-, tri- et tétraméthylés.

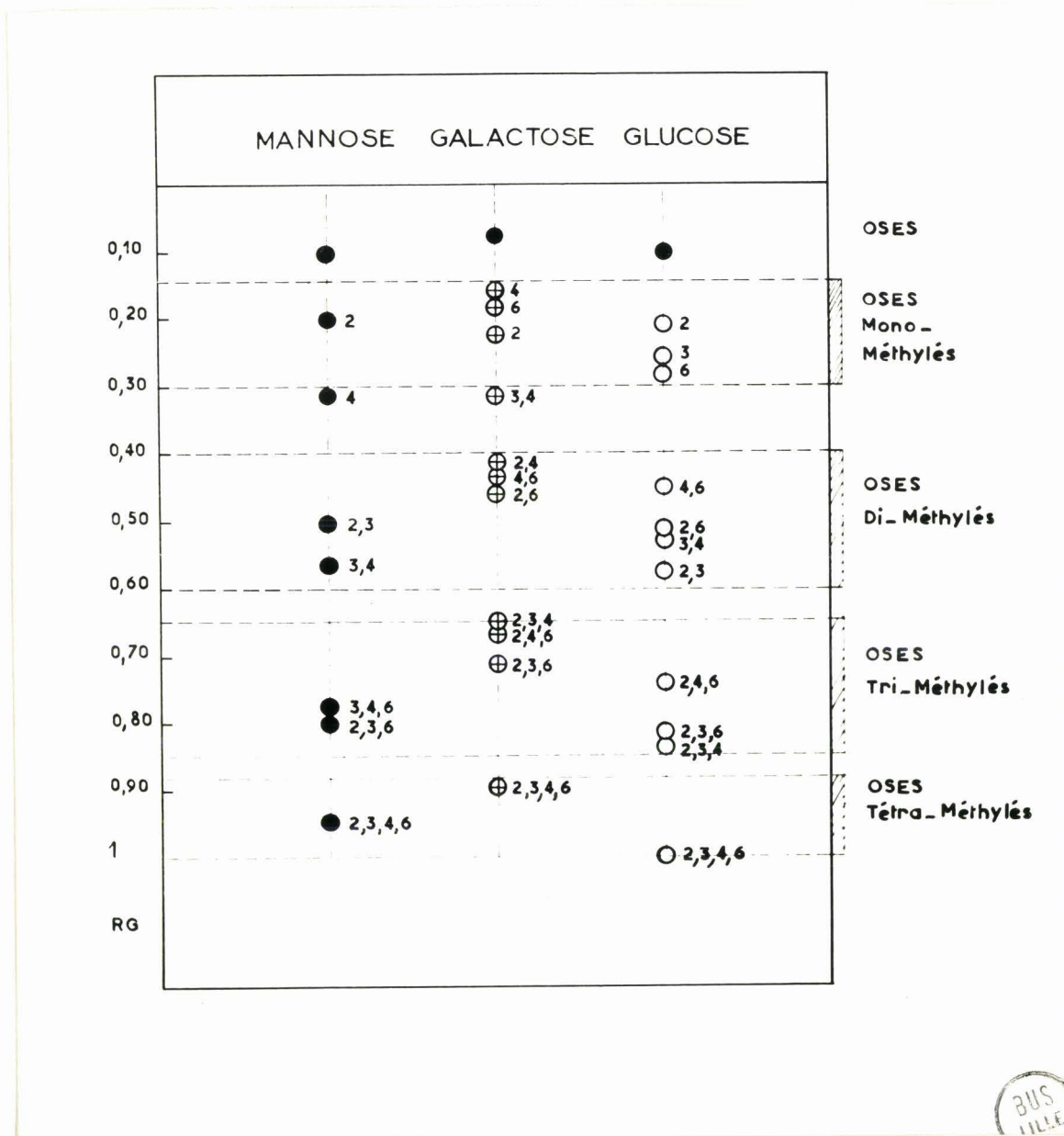


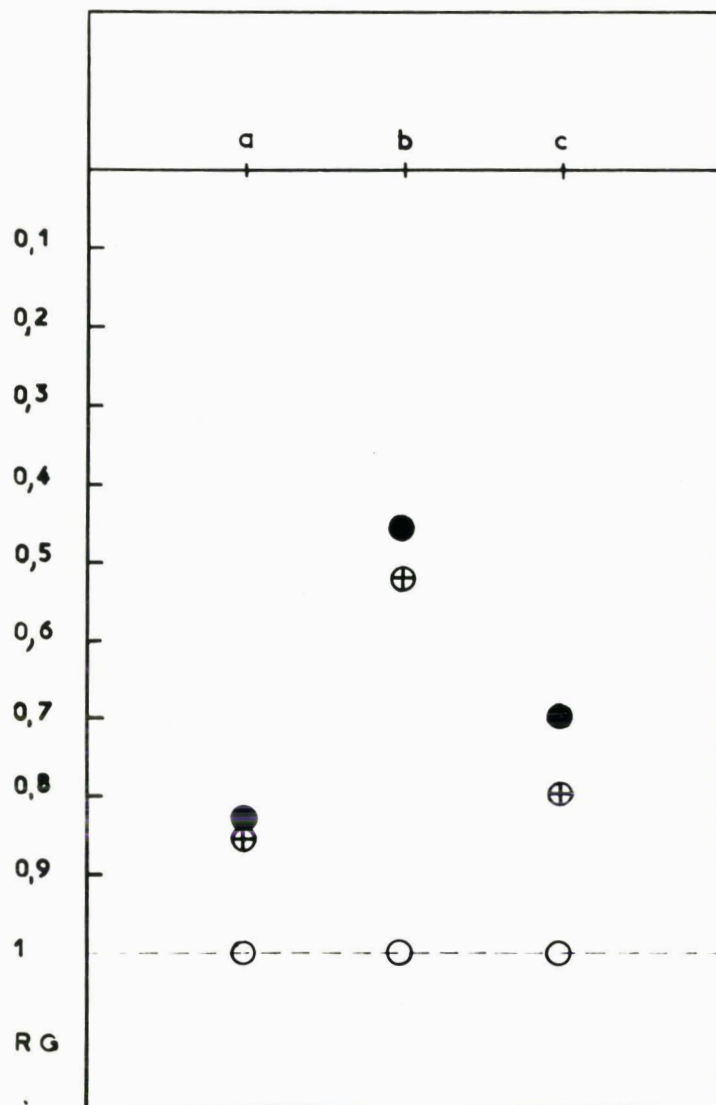
Figure 15

Répartition des isomères méthylés du mannose,  
du galactose et du glucose dans le système-solvant de  
HIRST et JONES (186 bis)

( n-butanol/éthanol/ammoniaque/eau :  
40 : 10 : 1 : 49 ) .







- 2,3,6-triméthyl glucose
- ⊕ 2,3,4-triméthyl glucose
- 2,3,4,6-tétraméthyl glucose



Figure 16

Comportement chromatographique des 2,3,4- et 2,3,6-triméthyl-glucoses dans différents systèmes-solvants .

- a - n-butanol/éthanol/ammoniaque/eau (40:10:1:49) (HIRST et JONES) (187)
- b - n-octane/isopropanol/solution aqueuse d'ammoniaque à 10 p.100 (50:25:2) (PETEK et TO DONG) (188) sur papier imprégné de chlorure d'ammonium (voir Tableau VIII ; p.80)
- c - alcool isoamylique/acide acétique/eau(4:1:5) (TINELLI) (189) .

2 - les systèmes-solvants de PETEK (190) et de TINELLI (191) qui donnent de bons résultats dans la séparation d'isomères méthylés. Cependant, l'étude systématique du comportement des isomères méthylés des principaux oses reste à faire qui permettrait de tirer un meilleur parti de ces systèmes-solvants.

On voit donc que la chromatographie sur papier n'est pas encore parvenue à résoudre parfaitement le problème de la séparation des oses méthylés. C'est pourquoi, nous avons recherché une solution éventuelle à ces problèmes en nous intéressant aux procédés de chromatographie en couche mince et de chromatographie en phase gazeuse.

### 3 - CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

La technique récente de chromatographie en couche mince de STAHL (192) (Revue générale : AKHREM et KUZNETSOVA (193) ; APPLEWHITE et al. (194) ; BOBBITT (195) ; DEMOLE (196) ; DOMINGUEZ (197) ; EULER et coll. (198) ; RANDEKATH (199) ; STAHL (200) ; TRUTER (201) ) a été appliquée à la séparation des oses par BERGELSON et coll. (202), LEDERKEMER et DEFERRARI (203), PASTUKA (204), PREY, SCHERZ et BANCHER (205), RAGAZZI et VERONESE (206), SCHWEIGER (207), STAHL et KALTENBACH (208), WASSERMAN et HANUS (209) et ZHDANOV et coll. (210) et aux dérivés méthylés des oses par DEFERRARI, DE LEDERKREMER, MATSUHIRO et SPROVIERO (211), GEE (212), HAY, LEWIS et SMITH (213), PREY, BERBALK et KAUSZ (214) et TATE et BISHOP (215) .

GEE (216) emploie le Silicagel G 7789 MERCK à 5 p.100 d'amidon pour séparer les dérivés méthylés du saccharose. Le même auteur (217) a récemment effectué une étude de la séparation des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  des formes pyraniques et furanniques de méthylsides de glucides divers (arabinose, fructose, galactose, glucose, mannose, xylose, maltose, cellobiose, mélibiose, saccharose) et d'éthers méthyliques d'oses .

La séparation est effectuée sur gel de silice (Silicagel G) au moyen des systèmes-solvants : éther/toluène (1:1) ou méthyl-éthylcétone/toluène (1:1). La révélation est réalisée par une solution aqueuse d'acide sulfurique à 5 p.100, à 110°C pendant 20 minutes.

Selon GEE, les anomères  $\alpha$  sont plus rapides que les anomères  $\beta$  dans le cas du mannose et de l'arabinose, mais c'est l'inverse dans le cas du glucose, du galactose et du xylose. Les formes furanniques du fructose, de l'arabinose et du galactose sont plus rapides que les formes pyraniques et inversement pour le glucose, le mannose et le xylose.

HAY et coll.(218) préconisent la révélation des dérivés méthylés par l'acide sulfurique concentré (chauffage prolongé à 120°C) et, si des fonctions OH sont encore libres, par le permanganate de potassium à 5 p.100 dans la soude normale (chauffage à 100°C). L'auteur propose une méthode de dosage colorimétrique des osides méthylés, par la méthode au phénol sulfurique de DUBOIS et SMITH (219).

PREY, BERBALK et KAUSZ (220) utilise le Silicagel G de MERCK et un tampon boraté pour séparer divers dérivés méthylés du fructose et du glucose.

Nous avons rassemblé dans le tableau IX les principales caractéristiques de quelques systèmes-solvants destinés à la chromatographie en couche mince des dérivés méthylés des oses.

Les premières applications que nous avons réalisées ont été très satisfaisantes et nous effectuons actuellement une étude systématique des conditions de séparation en couche mince de mélanges d'éthers méthyliques divers.

#### 4 - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (\*)

La propriété que possède les méthylosides et les méthylosides méthylés de distiller sans se décomposer (voir p. 61) ont permis d'appliquer la chromatographie en phase gazeuse à leur séparation. Mac INNES et coll.(221), BISHOP et COOPER (222) et KIRCHER (223) ont, les premiers, décrit des procédés de chromatographie en phase gazeuse de méthylosides méthylés. Depuis la méthode s'est largement répandue et des résultats encourageants ont été obtenus. Ils ont fait l'objet des revues générales de BURCHFELD et STORRS (224) et de BISHOP (225).

---

(\*) - Ce travail de recherches techniques et bibliographiques a été réalisé en collaboration avec M. Michel MONSIGNY, Assistant, à qui nous adressons nos plus vifs remerciements.

TABLEAU IX

Chromatographie en couche mince des dérivés  
méthylés des oses

n°	Systèmes - solvants (*)	Support	Applications	Références
1	Toluène/AcEth/EtOH 95°C (10:5:5)	Silicagel G	Dérivés méthylés du saccharose	GEE (226)
2	Toluène/Ether éthylique (1:2)	- id -	Méthylsides perméthylés	GEE (227)
3	Toluène/MEC (1:1)	- id -	Méthyloligosides perméthylés	- id -
4	Benz/EtOH/eau/AmOH (200:47:15:1)	- id -	Méthylsides	HAY et coll. (228)
5	n BOH/AcCOOH/Ether éthyl/eau (9:6:3:1)	- id -	Oses peu substitués	- id -
6	n BOH/AcCOOH/eau (2:1:1)	- id -	Oses acides et dérivés	- id -
7	MeOH/Acétone/eau (4:5:1)	Silicagel G + acide borique	Dérivés méthylés du glucose et du fructose	PREY, BERBALK et KAUSZ (229)
8	EtOH/acétone/eau (4:5:1)	0,1 M	- id -	- id -
9	n POH/acétone/eau (4:5:1)		- id -	- id -
10	n BOH/AcCOOH/eau (4:5:1)		- id -	- id -
11	n BOH/eau (9:1)		- id -	- id -
12	Ether de pétrole		- id -	- id -
13	n BOH/éter de pétrole (1:9)		- id -	- id -
14	MEC/AcCOOH/MeOH (3:1:1)		- id -	- id -

(\*) - AcEth = acétate d'éthyle ; EtOH = éthanol ; MEC = méthyléthylcétone ;  
Benz = benzène ; AcCOOH = acide acétique ; MeOH = méthanol ;  
n POH = n-propanol ; n BOH = n-butanol .

L'analyse des dérivés méthylés des méthylosides est très fine puisque les anomères  $\alpha$  et  $\beta$  des formes pyraniques et furaniques sont aisément séparés (\*) (BAXTER et PERLIN (230); BISHOP et COOPER (231) ).

La chromatographie en phase gazeuse des méthylosides méthylés obéit aux lois générales suivantes :

1°- l'anomère  $\beta$  précède l'anomère  $\alpha$ , à condition que l'hydroxyle du carbone 2 soit en position équatoriale. Si ce dernier n'est pas substitué et s'il se trouve en outre en position trans par rapport à l'hydroxyle semi-acétalique, l'anomère  $\alpha$  possède un volume de rétention plus faible que celui de l'anomère  $\beta$  (KLEIN et BARTER) (232) .

2°- les temps de rétention varient en raison inverse du degré de substitution: les méthylosides diméthylés succèdent, par exemple, aux dérivés triméthylés, ces derniers suivant les dérivés tétraméthylés.

Les principaux procédés de chromatographie en phase gazeuse des méthylosides méthylés décrits jusqu'à présent sont les suivants.

KIRCHER (233) recommande l'emploi du polyester succinique du butane-1,4-diol, d'Apiezon M, d'hydroxyéthylcellulose perméthylée ou d'amidon perméthylé comme phase liquide stationnaire et le chromosorb W ou la Célite 545 comme support inerte. La température est comprise entre 150 et 220°C et le débit du gaz vecteur est de 50 à 180 ml/min (l'hélium ou l'argon sont recommandés). L'auteur a obtenu d'excellentes résolutions du mélange des tri- et tétra-O-méthyl-méthyl-D-osides du xylose, de l'arabinose, du mannose, du galactose et du glucose avec l'hydroxyéthylcellulose perméthylée fixée sur du Chromosorb W .

Le comportement des triméthyl-méthylglucosides (2,3,4- , 2,3,6- , 2,4,6- et 3,4,6 ) et du 2,3,6-triméthyl-méthylmannoside a été étudié par BISHOP et COOPER (234) avec le polyester succinique du butane-1,4-diol déposé sur de la brique pilée.

GEE et WALKER (235) ont plus récemment précisé que la brique pilée provoquait souvent des adsorptions irréversibles et les auteurs conseillent l'emploi du Chromosorb W (mesh 60-80) avec l'ester succinique du diéthylèneglycol (\*)- Les dérivés méthylés du mannose offrent un cas particulier. En effet, la méthyl-oxidation de cet ose et de ses dérivés méthylés conduit quantitativement à l'anomère  $\alpha$  (BISHOP) (236) .



ou du néopentylglycol ou le Carbowax 20 M comme phase liquide. Une séparation satisfaisante des dérivés méthylés du glucose, du fructose et de quelques diholosides (saccharose, mélibiose) a été obtenue par les auteurs.

JONES et PERRY (237) ont amélioré les séparations en mêlant au support des billes de verre qui présentent l'avantage de faciliter le passage du gaz dans la colonne.

YAMAKAWA et al. (238) sont parvenus à une bonne résolution à 235°C du mélange des 2,3,4- et 2,3,6-triméthyl-méthylgalactosides et du 2,3,6-triméthyl-méthylglucoside avec le polyester adipique du diéthylène-glycol fixé sur Chromosorb.

Récemment, ASPINALL (239) a étudié le comportement de nombreux méthyl- osides méthylés à des degrés divers, sur des colonnes de polyester succinique du butane -1,4-diol à 175° ou de polyphényle éther (m-bis-m-phénoxy) benzène à 200°C .

Nous avons, en ce qui nous concerne, abordé ce problème en recherchant des conditions opératoires qui permettraient une séparation convenable du mélange des dérivés méthylés du glucose, du galactose, du mannose et de la N-acétylglucosamine. Ces oses entrent, en effet, dans la composition du groupement prosthétique de la plupart des glycoprotéides naturels.

Notre étude a porté dans un premier temps sur les conditions de séparation des isomères tri- et tétraméthylés de ces oses. On voit, dans la figure 17 (p.89) qu'il est possible d'obtenir une séparation convenable des principaux dérivés perméthylés du mannose, du galactose et du glucose. Ces résultats préliminaires sont actuellement complétés par une étude systématique de la résolution des divers isomères tétra-, tri-, di- et monométhylés de chacun de ces oses, pris séparément ou en mélange. Il apparaît, d'ores et déjà, des zones d'interférences comme dans le cas de la chromatographie sur papier. Il semble donc que nous allons nous heurter aux mêmes problèmes que ceux que nous avons rencontrés avec la chromatographie sur papier. Cependant, les travaux actuellement en cours nous permettent d'espérer qu'une solution satisfaisante sera trouvée dans un avenir proche.

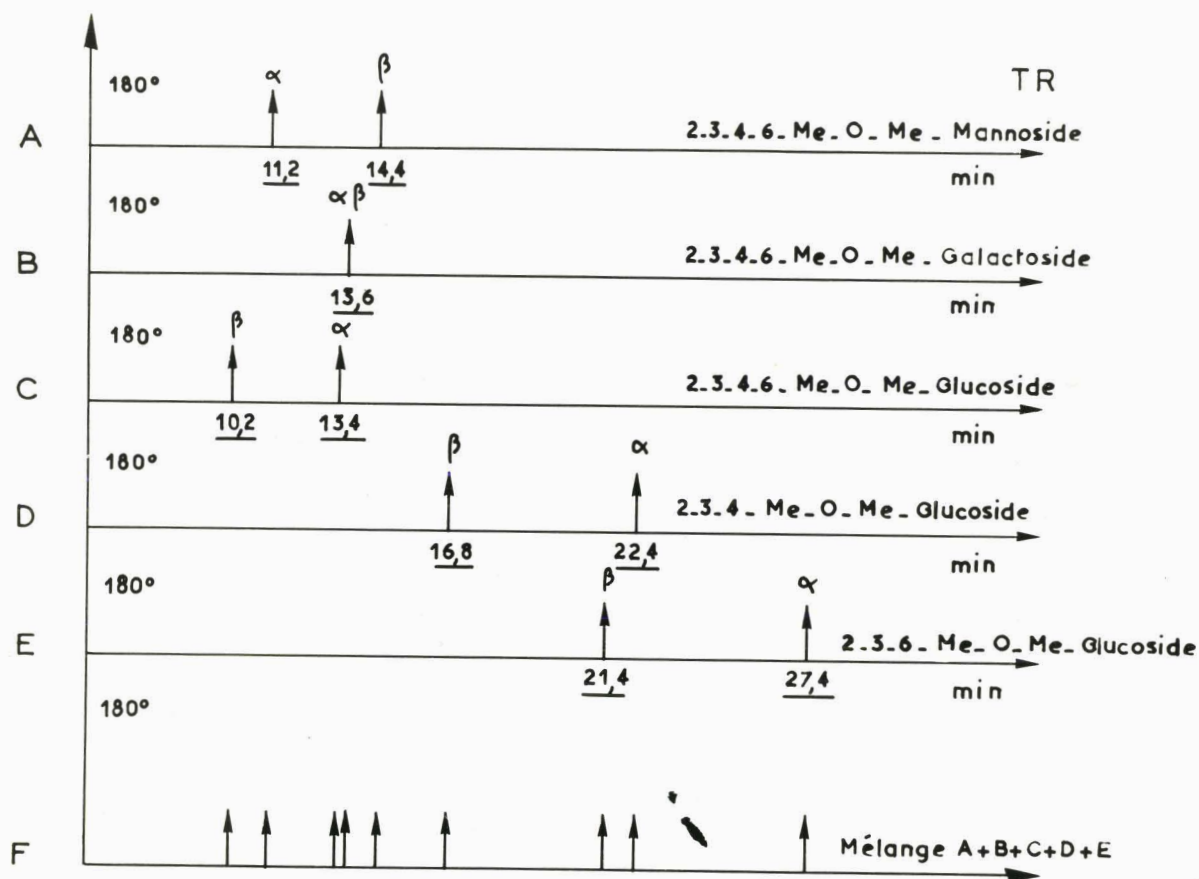


Figure 17

Séparation chromatographique en phase gazeuse de méthyl-méthylglycosides réalisée dans les conditions suivantes : chromatographe SHANDON, type 360; détecteur à ionisation de flamme ; support : Chromosorb W (mesh 60-80) à 20 p.100 d'Apiezon M/ Chromosorb W à 20 p.100 de polyester succinique .du butane-1,4-diol/billes de verre à 0,1 p.100 d'Apiezon M (1:1:2) ; colonne de cuivre de 4 mm/150 mm ; gaz vecteur : hydrogène/azote (3:1) ; débit : 30 ml/min ; température : 200°C .

## CONCLUSIONS

Cette brève revue générale des résultats obtenus jusqu'à présent dans la séparation et l'isolement des oses méthylés permet de préciser qu'une étude très poussée reste à faire dans ce domaine. Elle promet d'être longue mais très fructueuse. Il s'agit, en effet, de rechercher, en s'aidant des procédés actuels, une méthode susceptible de réaliser une séparation parfaite des nombreux isomères méthylés des oses. L'inertie chimique de ces composés, leurs configurations moléculaires très proches, rendent le problème difficile à résoudre et nous sommes convaincu que, seule, l'association de plusieurs méthodes permettra d'y apporter une solution.

## IV - METHODES COMPLEMENTAIRES

### A - IDENTIFICATION DES OSES METHYLES

#### 1 - DETERMINATION DES CONSTANTES PHYSIQUES

Dans le cas particulier et rare où l'on parvient à isoler un dérivé méthylé par l'application d'un des procédés physiques d'isolement que nous avons décrits précédemment (voir p. 74 ), il sera aisément identifié par la détermination de son point de fusion, de son pouvoir rotatoire spécifique (Tableaux I à V ; p.62 à 66) ou encore de son indice de réfraction. Précisons cependant que toutes les techniques physiques d'isolement et d'identification ne sont jamais rigoureusement quantitatives et ne sont pas utilisables en microméthode.

Au cours d'une séparation par chromatographie sur colonne, la détermination systématique des indices de réfraction ou des pouvoirs rotatoires de chaque fraction permettra de tracer la courbe d'élution et d'identifier les produits élués. La détermination ultérieure des points de fusion de chaque substance isolée apportera la confirmation de sa pureté et de sa nature.

#### 2 - REVELATIONS SPECIFIQUES

Les oses méthylés réducteurs sont révélés, dans les mêmes conditions que leurs homologues non méthylés, par le réactif au phtalate ou à l'oxalate

d'aniline de PARTRIDGE (240). HOUGH, JONES et WADMAN (241) ont signalé, dès 1950, que les oses dont le carbone 4 est méthylé, donnent une coloration rose avec ce réactif. Les oses méthylés dont la fonction hydroxyle du carbone 4 est restée libre prennent une coloration brune classique. Cette particularité est parfois très intéressante pour faire la discrimination entre deux isomères 2,3,4- et 2,3,6-triméthylés qui ont pratiquement le même comportement chromatographique, comme c'est le cas pour le 2,3,4-triméthylglucose (coloration rose) et le 2,3,6-triméthylglucose (coloration brune) qui migrent pratiquement à la même place dans le système-solvant n-butanol/éthanol/ammoniaque/eau de HIRST et JONES (242).

Il est, d'autre part, possible d'identifier les oses méthylés sur le carbone 2 en utilisant le réactif de WALLENFELS (243) au triphényltétrazolium (TTC) en milieu sodique (pulvérisation du chromatogramme par un mélange à parties égales d'une solution aqueuse à 2 p.100 de TTC et de soude 1 N suivie d'une exposition de 20 min à 40°C dans une atmosphère saturée de vapeur d'eau, d'un lavage à l'eau et d'un séchage à 25°C). Les oses donnent une coloration rouge sombre, tandis que les oses méthylés en C<sub>2</sub> donnent une coloration rose (BELL et DEDONDER) (244).

Les oses méthylés non réducteurs peuvent être révélés par le réactif au naphtorésorcinol/acide chlorhydrique de FORSYTH (245) et les cétohexoses méthylés par le réactif classique à l'urée-chlorhydrique de DEDONDER (246).

L'identification chromatographique des isomères méthylés se fera plus sûrement encore par référence à des témoins, grâce à la détermination des R<sub>F</sub> ou des R<sub>TMG</sub> par rapport au 2,3,4,6-tétraméthylglucose.

### 3 - DETERMINATION DES VOLUMES ET TEMPS DE RETENTION EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

L'identification des dérivés méthylés est réalisée, en chromatographie en phase gazeuse, grâce à la détermination des volumes (V<sub>R</sub>) et des temps (T<sub>R</sub>) de rétention des composés. On utilise, en général, un témoin interne de 2,3,4,6-tétraméthyl-méthylglucoside qui permet d'exprimer un volume ou un temps de rétention relatif et de rendre les résultats plus comparatifs.

#### 4 - PROCEDES DE DEMETHYLATION

A cause des imperfections des méthodes de séparation, il sera parfois indispensable de faire retour, par déméthylation, à l'ose initial de manière à réaliser l'identification des dérivés méthylés et à doser avec précision en faisant appel aux techniques classiques de dosage colorimétrique des oses.

Deux méthodes efficaces de déméthylation ont été décrites : l'une utilise l'acide bromhydrique (HESS et NEUMANN (247) et HOUGH, JONES et WADMAN (248) ) ; l'autre fait appel au trichlorure de bore en présence de chlorure de méthylène (ALLEN, BONNER, BOURNE et SAVILLE) (249) .

##### a - Méthode de déméthylation par l'acide bromhydrique

5 à 10 mg de sucres méthylés et 1 ml d'une solution d'acide bromhydrique à 48 p.100 (p:p) sont maintenus en tube scellé, au bain-marie bouillant, pendant 5 minutes. Après avoir dilué à 10 ml, on neutralise par le carbonate d'argent et on filtre après 15 minutes d'agitation en présence de charbon actif. Les dernières traces d'argent sont éliminées par un barbottage d'hydrogène sulfuré suivi d'une filtration sur charbon. Le filtrat est concentré et analysé. On obtient, en général, les homologues méthylés inférieurs mêlés à l'ose de départ. La déméthylation n'est donc pas quantitative.

##### b - Méthode de déméthylation par le trichlorure de bore

La méthode, appliquée par ALLEN et coll. (250) au cas des oses, est celle qu'utilisèrent GERRARD et LAPPERT (251) pour les hexitols.

300 à 500 mg de trichlorure de bore redistillés sont introduits dans un tube. On porte à  $-70^{\circ}\text{C}$  et on introduit 10 mg d'oses méthylés et 1 à 2 ml de chlorure de méthylène. Le tube est de nouveau scellé et maintenu à  $-70^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes. On ramène ensuite à la température ordinaire et on évapore sous vide pendant une nuit en présence d'un déshydratant. On ajoute ensuite 5 ml d'un mélange de méthanol et d'eau (1:1) pour décomposer l'excès de réactif et on évapore sous vide.

Les auteurs ne signalent pas de dégradations pour les aldoses, mais le fructose est modifié. En général, on obtient l'ose initial, mais la déméthylation n'est jamais rigoureusement quantitative.



Une modification à cette technique, apportée par TINELLI (252) permet de parvenir à une déméthylation totale : le mélange est maintenu pendant 20 minutes à  $-70^{\circ}\text{C}$ , puis pendant 24 heures à la température ordinaire.

Bien que la méthode se prête difficilement à des applications quantitatives, elle est très intéressante pour identifier un mélange d'oses méthylés dont les comportements chromatographiques sont identiques. L'éluion des taches obtenues par chromatographie sur papier avec le système-solvant n° 6 de HIRST et JONES (voir p. 80) permet, par exemple, d'identifier, après déméthylation, les éthers diméthylés du glucose, du galactose et du mannose dont les valeurs de  $R_G$  sont identiques.

## 5 - OKYDATION PERIODIQUE

Connaissant le mécanisme de la réaction d'oxydation periodique des fonctions  $\alpha$ -glycols, on conçoit aisément qu'il peut être intéressant, dans certains cas, d'étudier la cinétique d'oxydation periodique d'un ose méthylé dans la molécule duquel subsistent un ou des fonctions  $\alpha$ -glycoliques.

## B - DOSAGE DES OSES METHYLES

Le dosage des oses méthylés est extrêmement délicat car, si les techniques de dosages elles-mêmes n'offrent aucune difficulté - et les procédés classiques à l'anthrone et à l'orcinol sulfuriques sont parfaitement applicables - elles sont cependant difficilement utilisables à cause des imperfections des méthodes de séparations quantitatives des dérivés méthylés et de l'absence des composés purs de référence destinés à la préparation des solutions-témoins. Aussi les résultats apportés jusqu'à présent par les auteurs sont-ils très approximatifs. A cet égard, la chromatographie en phase gazeuse est destinée à rendre les plus grands services.

Cependant, dans la mesure où l'on possède des composés purs de référence, les méthodes classiques de dosage des oses par chromatographie sur papier sont applicables aux oses méthylés.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES
-----------------------

L'étude des méthodes de méthylation et des procédés de séparation et d'identification des oses et des osides méthylés nous permet donc de tirer les conclusions suivantes :

1 - Les nombreuses modifications apportées à la méthode originale d'HAWORTH au sulfate de méthyle, puis les techniques qui se sont développées à partir du procédé à l'iodure de méthyle de PURDIE et IRVINE, enfin, les tentatives d'association de ces deux méthodes suffisent à justifier une étude critique poussée des techniques proposées en affirmant a priori qu'il n'existe pas encore, à l'heure actuelle, de méthode générale de méthylation des osides. Il s'agit donc de choisir parmi tous les procédés qui ont été proposés, celui ou ceux qui seront applicables avec le plus d'efficacité à l'exploration de la structure des glucides. D'autre part, il devient nécessaire actuellement d'étendre l'application de la méthode de méthylation à l'étude de la structure du groupement prosthétique des glycoprotéides. Notre travail personnel a été orienté en fonction de cette dernière préoccupation

La conclusion essentielle que nous pouvons tirer des résultats obtenus par les auteurs et par nous-même est que la perméthylation d'un glucide doit être commencée en appliquant un procédé dérivé de la méthode originale de HAWORTH au sulfate de méthyle et terminée en tirant parti de l'action méthylyante plus énergique de l'iodure de méthyle.

2 - Parmi les procédés modernes de séparation, d'isolement et d'identification des constituants glucidiques, tous ont été - ou commencent à être - appliqués à l'étude des éthers méthyliques. Nous avons fait le point des résultats acquis. Nous pouvons affirmer, d'une part, qu'il n'existe pas encore de procédé général de séparation et d'identification des dérivés méthylés des glucides et, d'autre part, que la solution à ce problème sera apportée par la combinaison de différentes méthodes comme l'électrophorèse et la chromatographie sur colonne, sur papier et en phase gazeuse. Ce dernier procédé serait, d'ailleurs, le plus

sensible et le plus séduisant. L'utilisation de chromatographes en phase gazeuse préparatifs permettrait, en outre, d'isoler les dérivés méthylés des glucides à l'état pur et en quantités suffisantes pour que soit possible l'application des "anciennes" méthodes d'identification, comme la détermination d'un point de fusion ou d'un pouvoir rotatoire.

Ayant été amené fortuitement à appliquer le "procédé de perméthylation des glucides" pour tenter de résoudre l'énigme de l'allolactose du lait de Femme (voir p. 107), nous en avons découvert les problèmes et nous nous attachons à présent à les étudier de façon systématique. Les quelques travaux personnels qui sont nés de cette étude et dont nous nous proposons, à présent, d'exposer les résultats, ne représentent, à nos yeux, qu'une introduction à un ensemble de recherches à effectuer dans le domaine si attachant de la chimie des glucides.

APPENDICE n° 2  
\*\*\*\*\*

PERMETHYLATION DES OSIDES ET SEPARATION  
QUANTITATIVE DES DERIVES METHYLES DES OSES

par WALLENFELS, BECHTLER, KUHN, TRISCHMANN et  
EGGE (252 bis)

Les auteurs ont fait une étude comparée des procédés de méthylation d'oses et d'osides (oligo- et polysides) par l'iodure de méthyle et l'oxyde de baryum et par le sulfate de méthyle et la baryte dans le diméthylsulfoxyde. Dans certains cas, la méthylation est totale après un seul "cycle". Les méthyl-osides sont ensuite séparés par chromatographie en phase gazeuse.

PROCEDES DE METHYLATION

- I - Iodure de méthyle-oxyde d'argent
  - a- dans la diméthylformamide (DMF)
  - b- dans le diméthylsulfoxyde (DMS)
- II - Iodure de méthyle - BaO<sub>2</sub> et (ou) Ba(OH)<sub>2</sub>
  - a- dans la diméthylformamide
  - b- dans le diméthylsulfoxyde
  - c- dans le mélange: diméthylformamide + diméthylsulfoxyde
- III - Sulfate de méthyle - BaO<sub>2</sub> et (ou) Ba(OH)<sub>2</sub>
  - a- dans la diméthylformamide
  - b- dans le mélange: diméthylformamide + diméthylsulfoxyde.
- IV - Sulfate de méthyle et soude .

Le choix de la méthode dépend de la nature du composé à méthyler (50 mg à 20 g) :

- 1 - L'insolubilité des glucides dans la DMF nécessite leur méthylation préalable par le sulfate de méthyle et la soude (Procédé IV) suivie d'une méthylation suivant II b ou II c .
- 2 - Dans de nombreux cas, applications du procédé III b
- 3 - La méthylation des oses et des glucides acétylés est effectuée suivant III a .

ETUDE CRITIQUE

Plusieurs cycles de méthylation suivant HAWORTH ne conduisent pas au perméthyllactose. Seul le procédé IIIa (sulfate de méthyle -  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  dans la DMF) permet la perméthylation de cet oside en un temps, le procédé Ia étant jugé inefficace par les auteurs.

Nous étions parvenu à la même conclusion (voir p. 101) .

DOSAGE DES METHOXY

La quantité théorique de groupements méthoxy est- pour un oside - de 45,6 p.100 (p:p) .

Les auteurs utilisent l'appareil de VIEBOCK F. et SCHWAPPACH A. (Ber., 1930, 63, 2818) et appliquent le procédé de VIEBOCK F. et BRECHER C., (Ber., 1930, 63, 3207). Ils suivent aussi la disparition de la bande d'absorption à 2,8 - 2,9  $\mu$  des spectres infra-rouges.

CHROMATOGRAPHIE DES OSES ET METHYLOSIDES METHYLES

Les oses méthylés sont libérés par une hydrolyse acide classique et les méthylosides par un chauffage à 80 - 90°C dans du méthanol chlorhydrique (2 p.100 d'HCl) pendant 24 à 90 heures.

1°- Chromatographie sur papier

La chromatographie en phase inversée (WICKBERG B., Acta Chem. Scand., 1958, 12, 615) : papier imprégné de toluène et de diméthylsulfoxyde (5:1) ; phase mobile : éther isopropylique saturé en diméthylsulfoxyde ; chromatographie ascendante. Les auteurs parviennent à séparer les 2,3,4- et 2,3,6-triméthyl-glucoses et leurs anomères  $\alpha$  et  $\beta$ . La révélation par le phosphate d'aniline est suivie d'une élution des taches et d'un dosage colorimétrique.

2°- Chromatographie en phase gazeuse

La séparation des méthylosides méthylés par chromatographie en phase gazeuse est réalisée dans les conditions suivantes :



Support : billes de verre (  $d = 0,3$  mm)  
Phase active : hydroxyéthylcellulose partiellement méthylée  
Longueur des colonnes : 0,6 , 1,2 et 3 mm  
Température "programmée" entre 140 et 155°C (augmentation de 1,6°C p. min)  
Température d'injection : 270°C  
Température du détecteur : 280°C  
Phase mobile : hélium (21-22 ml p. min)  
Sensibilité du détecteur : 1

Les auteurs précisent enfin les temps de rétention de nombreux dérivés méthylés de la glucosamine et de la galactosamine (colonne de polyester succinique du butane-diol sur kieselguhr ; température variant de 200 à 250°C ; débit de l'hélium : 70 à 202 ml p. min ; temps de rétention variant de 15 à 120 min) .

TRAVAUX PERSONNELS

---



Dans le but de résoudre certains problèmes de structure posés par les glucides libres ou combinés, nous avons été amené à effectuer une étude critique des divers procédés de méthylation des sucres de manière à adopter une méthode capable de réaliser la perméthylation des glucides. Nous avons déjà exposé, dans les chapitres précédents, quelques uns des résultats que nous avons obtenus. (Voir p.36, 40, 42, 43, 50, 51) . Nous les rappellerons brièvement dans le premier paragraphe consacré à nos recherches personnelles en les accompagnant de la description de modifications que nous avons apportées à certains procédés de méthylation et de méthodes originales que nous avons été amené à mettre au point.

Nous exposerons ensuite les résultats auxquels nous ont conduit nos travaux sur l'allolactose du lait de Femme, sur les cérébrosides des rates normales et de maladie de GAUCHER et sur l'ovomucoïde.

## I - ETUDE CRITIQUE DES PROCÉDES DE PERMÉTHYLATION

### des OSIDES

Nous avons appliqué au lactose et au mélibiose les procédés de méthylation suivants :

- 1 - Méthode originale au sulfate de méthyle de HAWORTH (253) (voir p.35) .
- 2 - Méthode au sulfate de méthyle de KUHN, BAER et GAUHE (254) (voir p. 42) .
- 3 - Méthode originale à l'iodure de méthyle de PURDIE et IRVINE (255) (voir p.44).
- 4 - Procédé mixte au sulfate de méthyle et à l'iodure de méthyle.
- 5 - Procédé à l'iodure de méthyle, en présence de baryte de KUHN et TRISCHMANN (256) (voir p.51) .
- 6 - Procédé à l'iodure de méthyle, en présence d'oxyde d'argent et de diméthylformamide de KUHN, BAER et GAUHE (257) (voir p.50) .

Les extraits chloroformiques des solutions de perméthylation ont été soit méthanolysés (voir p.71 ) pour être ensuite soumis à la chromatographie en phase gazeuse (voir p.85 ), soit hydrolysés par l'acide chlorhydrique 2 N (voir p.72 ) pour être étudiés par chromatographie sur papier dans les systèmes-solvants de HIRST et JONES (258) (n-butanol/éthanol/ammoniaque/eau : 40:10:1:49), de PETEK et TO DONG (259) (octane/isopropanol/solution aqueuse d'ammoniaque à 10 p.100 (50:25:2) sur papier imprégné de chlorure d'ammonium) et de TIMELLI (260) (alcool isoamylique/acide acétique/eau)(4:1:5) .

#### I - PROCÉDE ORIGINAL de HAWORTH (261) au SULFATE DE METHYLE

L'application de la méthode originale de HAWORTH à la méthylation du lactose nous a conduit, après hydrolyse chlorhydrique, au mélange des dérivés méthylés suivants, séparés et dosés par chromatographie sur papier dans le système-solvant de HIRST et JONES :

4-méthylgalactose	- 1	2,3-diméthylglucose	10
6-méthylglucose	- 2	2,4,6-triméthylgalactose	2
3,4-diméthylgalactose	- 2	2,3,6-triméthylgalactose	20
4,6)	} dinéthylgalactose - 2	<u>2,3,6-triméthylglucose</u>	20
et 2,4)			
2,6-diméthylgalactose	- 2	<u>2,3,4,6-tétraméthylgalactose</u>	20

On voit que, à côté des deux dérivés de perméthylation (le 2,3,6-triméthylglucose et le 2,3,4,6-tétraméthylgalactose), on trouve une quantité équivalente de triméthylgalactose et de nombreux dérivés mono-et diméthylés du galactose et du glucose. Enfin, le rendement ne dépasse pas 50 p.100, par suite d'une dégradation de l'oside à 60°C et à 95°C en présence de la solution de soude à 30 p.100 et d'une perte de produits non méthylés au cours de l'extraction chloroformique .

#### TENTATIVE D'AMELIORATION

En tenant compte des observations de KUHN sur l'effet néfaste des températures trop élevées sur la stabilité des molécules, nous avons étudié la vitesse de substitution à 0°C , +4°C et +20°C . Les essais ont été réalisés

sur du galactose et du lactose. Après 5 additions de sulfate de méthyle (10 ml par gramme de galactose ; 20 ml par gramme de lactose) suivies chaque fois d'une agitation de 24 heures, en maintenant le pH à 10 - 12 par addition automatique d'une solution de soude 10 N au moyen d'un titrateur automatique (voir p.40), nous avons obtenu uniquement 0,1 à 0,5 p.100 de 6-méthylgalactose avec le galactose et la même proportion de 6-méthylgalactose et de 2,6-diméthylgalactose à partir du lactose. Même en effectuant dix cycles successifs de méthylation à température ordinaire, on ne parvient pas à méthyler totalement le galactose et le lactose. En effet, dans le cas du galactose, la chromatographie révèle l'existence de galactose non méthylé, de 6-méthylgalactose, de 2,6-diméthylgalactose et de 2,3,6-triméthylgalactose dans les proportions relatives : 100:10:5 et 1. Dans le cas du lactose, la chromatographie de l'hydrolysât montre la présence de galactose, de glucose, de 6-méthylgalactose, de 6-méthylglucose, de 2,6-diméthylgalactose, de 2,3-diméthylglucose et de 2,3,6-triméthylgalactose dans les proportions relatives : 100:100:10:1:5:1 et 1.

En conclusion, le procédé de HAWORTH ne réalise qu'une méthylation très partielle des oses et des osides.

## 2 - PROCÉDE de KUHN, BAER et GAUHE (262) AU SULFATE DE MÉTHYLE-SOUDE

Le procédé de KUHN, BAER et GAUHE au sulfate de méthyle-soude (voir p. 42) ne méthyle pas totalement le lactose. On caractérise, en effet, dans les hydrolysats, des quantités importantes de 2,3-diméthylglucose et de 2,3,4-triméthylgalactose. Ce procédé est cependant excellent pour réaliser la méthylation partielle d'un oside dont on achève la méthylation par un procédé à l'iodure de méthyle.

## 3 - PROCÉDE DE PURDIE ET IRVINE (263) A L'IODURE DE MÉTHYLE

Le procédé de PURDIE et IRVINE appliqué au lactose nous a conduit à l'identification, dans l'hydrolysât, des composés suivants : 6-méthylglucose, 2,3-diméthylglucose, 2,3,4-triméthylgalactose, 2,3,6-triméthylgalactose, 2,3,6-triméthylglucose et 2,3,4,6-tétraméthylgalactose dans les proportions relatives : 1:10:10:10:30:30.



Le procédé original de PURDIE et IRVINE ne permet donc pas d'obtenir une perméthylation totale.

#### 4 - PROCEDE MIXTE AU SULFATE ET A L'IODURE DE METHYLE (PROCEDE PERSONNEL)

Trois "cycles de méthylation" du lactose sont effectués dans les conditions suivantes : à 1 g de lactose en solution dans l'eau, on ajoute 24 ml de sulfate de méthyle et de la soude 10 N pour maintenir constamment le pH à 10 . La réaction est effectuée en 24 heures. Deux cycles identiques sont encore réalisés avec, chacun, 48 ml de sulfate de méthyle - avec addition continue de soude. L'extrait chloroformique de la solution est soumis à deux "cycles" de méthylation par l'iodure de méthyle à reflux ( 2 fois 20 ml/g de lactose) en présence d'oxyde d'argent (deux fois 12 g / g de lactose). L'hydrolysats du composé contient du 2,3-diméthylglucose, du 2,3,6-triméthylgalactose, du 2,3,6-triméthylglucose et du 2,3,4,6-tétraméthylgalactose dans les proportions 10:10:40:40 .

La méthylation est donc incomplète dans ces conditions, mais deux "cycles" supplémentaires à l'iodure de méthyle conduisent à une perméthylation totale.

#### 5 - PROCEDE DE KUHN et TRISCHMANN (264) A L'IODURE DE METHYLE-BARYTE

Nous avons appliqué le procédé de KUHN et TRISCHMANN (voir p.51) à la méthylation du lactose et du mélibiose. La composition des hydrolysats des deux osides méthylés est la suivante :

<u>LACTOSE</u>		<u>MELIBIOSE</u>	
3,4-diméthylgalactose	(traces)	4-méthylgalactose	15
2,3-diméthylglucose	15	2,3,4-triméthylgalactose	6
2,3,4-triméthylgalactose	6	2,3,6-triméthylgalactose	6
2,3,6-triméthylgalactose	6	2,3,4-triméthylglucose	30
2,3,6-triméthylglucose	30	2,3,4,6-tétraméthylgalactose	30
2,3,4,6-tétraméthylgalactose	30	+ 2,3,4,6-tétraméthylglucose	(traces)

On voit que la méthylation est incomplète et que, d'autre part, la présence de traces de tétraméthylglucose (alors que le glucose était totalement absent du produit de départ) est en faveur d'une dégradation du mélibiose par la baryte. Le procédé, séduisant par sa rapidité, n'en est pas moins imparfait.

6 - PROCEDE DE KUHN, BAER et GAUHE (265) A L'IODURE DE METHYLE, OXYDE D'ARGENT, DIMETHYLFORMAMIDE

Le procédé de KUHN, BAER et GAUHE (p. 50) à l'iodure d'argent en présence de diméthylformamide permet, au contraire, une perméthylation des oses (galactose, glucose, mannose, N-acétylglucosamine), des diholosides (lactose, mélibiose, mannose) et même des triholosides comme le raffinose. Nous voudrions cependant faire deux remarques à la suite de nos essais d'application de ce procédé.

Nous avons, en premier lieu, observé que les deux "cycles" à l'iodure de méthyle-oxyde d'argent, en présence de diméthylformamide, suivis de deux "cycles" à l'iodure de méthyle-oxyde d'argent à reflux, dans les proportions préconisées par les auteurs ( 8 ml d'iodure de méthyle par gramme de diholoside) laissent persister des traces de dérivés partiellement méthylés, seulement repérables à la lampe de WOOD après révélation par l'oxalate d'aniline. En augmentant la dose d'iodure de méthyle de 50 p.100 (12 ml / g de substance), on parvient à une perméthylation totale des diholosides. Pour les triholosides il convient d'employer 18 ml d'iodure de méthyle par gramme de substance, pour chaque "cycle" à reflux. On obtient alors, avec une excellente reproductibilité, une perméthylation.

Pour les détails techniques, nous renvoyons à la page 51 .

Notre deuxième remarque concerne le cas du mannose dont les dérivés méthylés présentent des propriétés de solubilité particulières (voir p. 67 ). Ils gardent, en effet, une solubilité importante dans l'eau, ce qui nécessite la suppression des lavages à l'eau pour ne pas perdre de substances : le problème se représentera pour le cas des glycoprotéides.

CONCLUSION

X

Le tableau/résumé de façon schématique les résultats que nous avons obtenus. Il apparaît donc que la seule méthode qui perméthyle les di- et triholosides est celle de KUHN, BAER et GAUHE (266) à l'iodure de méthyle-oxyde d'argent-diméthylformamide avec la modification indiquée ci-dessus (12 ml d'iodure

TABLEAU X

Répartition des oses méthylés dans les hydrolysats  
de lactose méthylié par divers procédés

Procédé de méthylation	Dérivés méthylés du galactose		Dérivés méthylés du glucose		
	2,3,4-triméthyl	2,3,6-triméthyl	2,3,4,6-tétraméthyl	6-méthyl	2,3,6-triméthyl
Sulfate de méthyle-soude de HAWORTH (267) (p. 35)	2 (*)	20	20	2	10
Sulfate de méthyle-soude de KUHN, BAER et GAUHE (268) (p. 42)	20	0	30	0	20
Iodure de méthyle-Ag <sub>2</sub> O de PURDIE et IRVINE (269) (p. 44)	10	10	30	1	10
Sulfate de méthyle-soude, puis iodure de méthyle-Ag <sub>2</sub> O : 1 cycle 2 cycles	0 0	10 0	40 +	0 0	10 0
Iodure de méthyle-Ba(OH) <sub>2</sub> de KUHN et TRISCHMANN (270) (p. 51)	6	6	30	0	15
Iodure de méthyle-Ag <sub>2</sub> O-diméthylformamide de KUHN, BAER et GAUHE (271) (p. 50) Modification de SEGARD (p. 104)	traces 0	traces 0	+	traces 0	traces 0

(\*) - On caractérise, en outre, du 4-méthylgalactose, les 2,4-, 2,6-, 3,4- et 4,6-diméthylgalactoses (1:2:2:2).

de méthyle par gramme de diholoside pour les deux derniers cycles à reflux ; 18 ml d'iodure de méthyle par gramme de triholoside). Nos essais font ressortir, en outre, l'action très lente du sulfate de méthyle, qui ne permet, en aucun cas, d'obtenir directement un produit perméthylé. La méthode de KUHN, BAER et GAUHE convient parfaitement à la perméthylation de molécules de poids moléculaire faible et son emploi est intéressant par sa rapidité et par le petit nombre de manipulations qu'elle nécessite. Nous l'utilisons actuellement systématiquement pour l'étude des osides de faible poids moléculaire et pour la préparation d'oses perméthylés.

La méthode mixte au sulfate de méthyle - iodure de méthyle conduit toutefois à des osides perméthylés mais à condition d'effectuer plusieurs "cycles" à l'iodure de méthyle.

## II - LA QUESTION DE L'ALLOLACTOSE DU LAIT DE FEMME

A la suite de travaux entrepris entre les années 1927 et 1933 sur les glucides du lait de Femme, M. POLONOVSKI et A. LESPAGNOL (\*) avaient décrit deux fractions glucidiques différentes du lactose. L'une, peu soluble dans le méthanol et lévogyre, fut appelée par les auteurs : GYNOLACTOSE. L'autre, très soluble dans le méthanol et dextrogyre, fut nommée : ALLOLACTOSE. Les auteurs émettent l'hypothèse que ce dernier sucre était un isomère  $\beta$ -1,6 du lactose, à cause de la similitude de ses propriétés avec celles du  $\beta$ -galactosido-1,6-glucose dont HELFERICH et coll. (272) venaient de réaliser la synthèse.

L'application des méthodes modernes de chromatographie sur papier et sur colonne permit, 20 années plus tard, à KUHN et coll. et à MONTREUIL et coll. (voir la revue générale de MONTREUIL) (273) de démontrer que le gynolactose était, en réalité, un mélange de 10 à 14 polyosides, constitués de galactose, glucose, fucose et N-acétylglucosamine. KUHN mit en évidence les propriétés physiologiques particulières de ces composés dont certains sont des facteurs de croissance spécifiques pour Lactobacillus bifidus. Ce bacille est présent dans la flore intestinale du nouveau-né et permet, en abaissant le pH de l'intestin par décomposition du lactose en acide lactique, une défense efficace vis-à-vis de nombreux germes pathogènes, comme les bacilles typhiques, sensibles aux pH acides. KUHN a établi que tous les polyosides possédant un reste de N-acétylglucosamine dans leur molécule présentaient une activité L.bifidus. MORGAN (274) et WATKINS et MORGAN (275) ont, en outre, démontré que certains polyosides du lait de Femme possédaient des propriétés de facteurs de groupes sanguins LEWIS (Le). Enfin, MONTREUIL et HOLLEMAN (276) et MONTREUIL et MULLET (277) ont montré que les polyosides constituant le gynolactose possédaient une composition identique à celle du groupement prosthétique de certains glycoprotéides du lait et un reste de lactose dans leur molécule et qu'ils étaient des produits du métabolisme intermédiaire de ces glycoprotéides, dont la synthèse du groupement polyosidique s'effectue par des réactions de transosylation sur le lactose.

---

(\*) - Voir les revues générales de MONTREUIL (278) et de SEGARD (279)



On voit donc que la connaissance parfaite de la composition et de la structure des polysides du lait de Femme a conduit à la découverte de "sites actifs" de molécules qui sont les supports d'activités biologiques intéressantes.

Cependant, si l'application des méthodes modernes a permis de trouver la solution de la plupart des problèmes posés par le gynolactose de POLONOVSKI et LESPAGNOL, ni KUHN ni MONTREUIL n'ont réussi à identifier l'allolactose dans le lait de Femme.

Nous avons repris les recherches sur l'allolactose en appliquant les procédés modernes d'analyse - en particulier les méthodes de chromatographie et de microperméthylation - à l'étude du lait de Femme entier et des fractions méthanoliques obtenues suivant le procédé de M. POLONOVSKI et A. LESPAGNOL. Les expériences suivantes nous ont conduit à des résultats négatifs et il ne nous a pas été possible de caractériser l'allolactose.

1 - Des chromatographies sur papier ont été effectuées dans des systèmes-solvants les plus divers, en particulier dans ceux qui séparent les isomères osidiques 1,4 et 1,6 : aucune tache correspondant à un diholoside autre que le lactose n'a pu être décelée.

2 - L'analyse par chromatographie sur papier des fractions glucidiques les plus solubles dans le méthanol - en particulier des fractions qui possèdent les propriétés physiques et chimiques de l'allolactose - révèle toujours la présence d'au moins trois constituants : le lactose et deux triholosides.

3 - Le pouvoir rotatoire spécifique de la fraction diholosidique du lait de Femme est exactement celui du lactose.

4 - L'hydrolyse de la fraction diholosidique du lait de Femme perméthylée par la méthode de KUHN, BAER et GAUHE (voir p. 50 ), fournit du 2,3,4,6-tétraméthylgalactose et du 2,3,6-triméthylglucose, à l'exclusion de tout autre dérivé méthylé du galactose ou du glucose, aussi bien par chromatographie sur papier que par chromatographie en phase gazeuse.

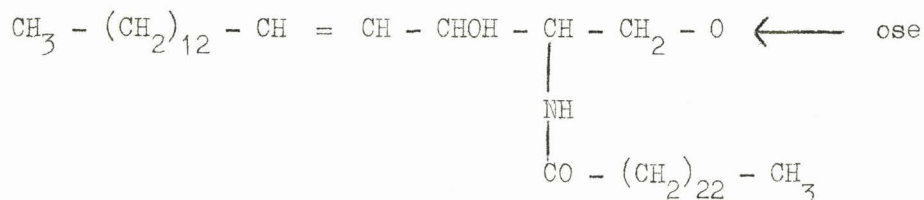
L'allolactose de POLONOVSKI et LESPAGNOL est donc, en réalité, un mélange de lactose et d'oligosides supérieurs et le  $\beta$ -galactosido-1,6-glucose ne préexiste pas dans le lait de Femme.

Ces résultats ont été exposés dans un mémoire (LESPAGNOL, MONTREUIL et SEGARD) (280) et dans notre Diplôme d'Etudes Supérieures (SEGARD) (281) .

### III - PERMETHYLATION DES CEREBROSIDES DE RATE

#### DE MALADIE DE GAUCHER

Les cérébrosides sont des glucosides et des galactosides des céramides qui sont elles-mêmes constituées de l'association, par une liaison amide, d'une molécule de sphingosine et d'une molécule d'un acide gras à longue chaîne carbonée comme les acides lignocérique et cérébronique, en  $C_{24}$ . La formule d'un cérébroside à acide lignocérique s'écrit donc de la manière suivante :



Suivant la nature de l'ose, on distingue les gluco- et les galacto-cérébrosides qui sont inégalement répartis dans les organismes animaux : le tissu nerveux ne renferme que des galactocérébrosides ; la rate normale contient à la fois des gluco- et des galactocérébrosides, avec, toutefois, une prédominance de ces derniers. Dans les rates de maladie de GAUCHER, les glucocérébrosides, au contraire, prédominent et parfois même les galactocérébrosides sont totalement absents.

C'est en 1882 que GAUCHER décrivit les lésions anatomo-pathologiques de la maladie qui devait porter son nom et qu'il considéra comme un épithélioma primitif de la rate. Près de trente ans après, l'étude biochimique amorcée par

les travaux d'EPSTEIN et de LIEB devait permettre de pénétrer le mécanisme intime de cette réticulopathie accumulative.

La splénomégalie de GAUCHER s'explique, en effet, par une accumulation de glucocérébrosides (CLAY et coll. (282) ; HALLIDAY et coll. (283) ; HOUCKE et MONTREUIL (284) ; KLENK et RENNKAMP (285) ; MONTREUIL (286) ; MONTREUIL, BOULANGER et HOUCKE (287) ; POLONOVSKI (288) ; WOOLF (289), qui représentent, généralement 10 p.100 du poids sec de l'organe, tandis que dans les rates normales, la proportion de cérébrosides totaux (galacto- et glucocérébrosides) n'excède pas 1 p.100. L'accumulation des cérébrosides est due à un trouble du métabolisme des glucocérébrosides. Dans la rate normale, en effet, les galacto- et les gluco- cérébrosides coexistent, mais les premiers prédominent (galactocérébrosides / glucocérébrosides = 3). Au contraire, les glucocérébrosides s'accumulent dans la rate de GAUCHER, vraisemblablement à cause de l'inhibition partielle ou totale d'une glucocérébrosidase ou de l'enzyme spécifique de la réaction de conversion réversible du glucose en galactose.

Nous avons toutefois recherché une éventuelle anomalie de structure des glucocérébrosides de rate de GAUCHER. En effet, l'absence de conversion de ces derniers en galactocérébrosides pouvait parfaitement s'expliquer par une modification des molécules de glucose (glucofurannose au lieu de glycopyrannose ou blochage de la fonction alcoolique du carbone 4 du glucose) qui aurait pu expliquer le blochage du processus de 4-épimérisation (4-waldénisation) qui transforme réversiblement le glucose en galactose.

C'est pourquoi nous avons réalisé la perméthylation des cérébrosides de rate de maladie de GAUCHER et étudié la nature de l'ose perméthylé.

Les cérébrosides ont été extraits suivant le procédé de KLENK et RENNKAMP (290) et de J. POLONOVSKI (291). Le composé obtenu renfermait 10 p.100 de glucose. Nous l'avons soumis à la perméthylation suivant divers procédés .

#### PERMETHYLATION DES CEREBROSIDES

##### 1° - PROCEDE AU SULFATE DE METHYLE

En nous inspirant du mode opératoire décrit par THANNHAUSER et coll. (292), nous avons utilisé le mélange de chloroforme et de méthanol (10:100) comme solvant. La méthylation a été effectuée de la manière suivante .

500 mg de cérébrosides sont dissous dans 100 ml du mélange chloroforme/méthanol (10:100). 5 additions de 10 ml de sulfate de méthyle sont effectuées à 24 heures d'intervalle et on ajoute de la soude 5 N à l'aide d'un titrateur automatique, sous agitation, de façon à maintenir le pH entre 7 et 10. On extrait au chloroforme et on lave à l'eau, puis on hydrolyse par 40 ml d'acide chlorhydrique 2 N à 100°C pendant 1 heure le résidu sec d'évaporation. On élimine la couche d'acides gras et on passe la phase aqueuse sur une colonne de Duolite A-40 (forme formiate). Le résidu sec est analysé par chromatographie sur papier.

Les résultats sont les suivants :

glucose	100
4,6-diméthylglucose	20
2,6-diméthylglucose	10
2,3,6-triméthylglucose	2

En réalisant un total de 25 cycles, on parvient à un méthylcérébroside qui donne du 2,3,4,6-tétraméthylglucose et des traces de 2,3,6-triméthylglucose.

A cause de la longueur du mode opératoire (25 à 30 jours), nous avons appliqué le procédé de KUHN, BAER et GAUHE à l'iodure de méthyle-diméthylformamide.

#### 2° - PROCEDE A L'IODURE DE METHYLE DE KUHN, BAER et GAUHE (293)

En appliquant rigoureusement le procédé opératoire décrit par KUHN, BAER et GAUHE (294) (voir p.50) avec des additions, à chaque cycle, de 8 ml d'iodure de méthyle pour 5 g de cérébroside, on obtient, après hydrolyse, du 2,3,4,6-tétraméthylglucose et il ne subsiste plus que des traces de triméthylglucose décelables seulement en lumière de WOOD.

#### CONCLUSIONS

Nous pouvons tirer de cette étude les conclusions suivantes :

1 - La méthode de KUHN, BAER et GAUHE (295) à l'iodure de méthyle-diméthylformamide convient parfaitement pour réaliser la perméthylation des cérébrosides.

2 - Les résultats que nous avons obtenus éliminent l'éventualité d'une modification structurale au niveau de l'ose lié à la sphingosine, dans le cas des cérébrosides de GAUCHER, car les cérébrosides de rate normale perméthylés donnent, après hydrolyse, du 2,3,4,6-tétraméthylgalactose et du 2,3,4,6-tétraméthylglucose.

L'accumulation des glucocérébrosides dans les rates de maladie de GAUCHER est donc bien provoquée par une carence de l'organe en glucocérébrosidase ou en glucose-4-épimérase.

#### IV - ETUDE SUR LA PERMETHYLATION DES GLYCOPROTEIDES

Les travaux que nous allons décrire ne concernent qu'une étude critique des conditions de méthylation de l'ovomucoïde, qui, sans apporter de résultats positifs, n'en demeure pas moins, à nos yeux, comme le prélude à une série de recherches tendant à perméthyliser les mucopolysides.

La première tentative de perméthylation directe d'un glycoprotéide remonte aux travaux de STACEY et WOOLLEY (296), en 1942. Les auteurs utilisaient le sulfate de méthyle et la soude et nous avons décrit leur mode opératoire à la page 43. L'interprétation des résultats avait conduit les auteurs à proposer un schéma de structure qui fut infirmé par les travaux de MONTREUIL, CHOSSON et SCHEPPLER (297) et de MONTREUIL, CHOSSON, SPIK, SEGARD et SCHEPPLER (298).

Le procédé de STACEY et WOOLLEY fut ultérieurement appliqué par BRAGG et HOUGH (299) qui tentèrent de pousser plus loin la méthylation en associant les procédés au sulfate et à l'iodure de méthyle. Les auteurs ont ainsi amélioré la méthylation de l'ovomucoïde sans toutefois parvenir à la certitude que cette dernière était complète.

Plus récemment, JEANLOZ (300) a décrit un procédé qui conduit à de meilleurs résultats à propos de l'orosomucoïde. Pour éviter des dégradations au cours de la réaction, la méthylation est réalisée à 0°C et les extractions en phase organique, causes de dénaturations supplémentaires de la copule protéique, sont remplacées par une dialyse (pour éliminer le sulfate de sodium formé au cours de la réaction).

L'auteur effectue cinq fois deux cycles de méthylation par le sulfate de méthyle en présence de soude à 40 p.100 (ajoutée en 8 heures et avec une agitation ultérieure pendant toute une nuit). Après deux cycles, on acidifie par l'acide acétique et on dialyse à 0°C. L'adialysable est lyophilisé et repris 2 fois par le sulfate de méthyle. Après les cinq séries de 2 cycles, le produit devient soluble dans les solvants organiques. On le traite alors trois fois par l'iodure de méthyle à reflux, en présence d'oxyde d'argent.

Ce mode opératoire respecte, selon l'auteur, l'intégrité structurale de la molécule et réalise une perméthylation qui est démontrée par la constance du taux des groupements "méthoxy".

Mettant à profit ces dernières conclusions, nous avons entrepris de méthyler l'ovomucoïde par un procédé identique. Les différents essais que nous avons réalisés sont les suivants :

1°- 10 cycles de méthylation à 0°C par le sulfate de méthyle.

1 gramme d'ovomucoïde est dissous dans 40 ml d'eau. On additionne de 20 ml de sulfate de méthyle et on agite à +4°C, en ajoutant de la soude 10 N de façon à maintenir constamment le pH entre 7 et 10. Quand ce dernier est constant, on prolonge encore l'agitation pendant 12 à 18 heures. Dix additions successives de sulfate de méthyle sont réalisées de cette manière. On dialyse ensuite pendant 4 jours contre de l'eau courante à 0°C et encore pendant 2 jours contre de l'eau distillée. Après avoir contrôlé l'absence d'ions "sulfate" dans l'adialysable, on le lyophilise.

On effectue ensuite une hydrolyse chlorhydrique et l'hydrolysate est purifié sur des colonnes de Dowex-50 et de Duolite A-40 (forme formiate). L'éluat contient les dérivés du galactose et du mannose. Le passage d'une solution ammoniacale (ammoniaque/eau) (5:95) sur la colonne de Dowex-50 déplace les dérivés de la glucosamine.



Par chromatographie sur papier des deux fractions (neutre et basique) on identifie, dans la fraction neutre, du galactose, du mannose et du 2,4- ou 2,6-diméthylgalactose (100:100:10) et dans la fraction basique, de la glucosamine.

Pour éliminer le sulfate de sodium du milieu réactionnel, nous avons tenté de "dessaler" les solutions par un passage sur des colonnes de Séphadex G-25 . Malheureusement les ions "sulfate" accompagnent le pic de l'ovomucoïde méthylé. Enfin, pour éviter l'étape assez longue de la dialyse, nous avons tenté d'extraire par le chloroforme le résidu lyophilisé après la fin de la réaction de méthylation, mais un partage a lieu entre la phase aqueuse et la phase organique et le rendement est mauvais. La dialyse est donc la seule méthode à appliquer pour éliminer le sulfate de sodium du milieu réactionnel.

En conclusion, dans le cas de l'ovomucoïde, 10 cycles de méthylation par le sulfate de méthyle à 0°C sont insuffisants pour réaliser une méthylation assez poussée pour que puisse être appliqué le traitement final à l'iodure de méthyle.

2°- 10 cycles de méthylation par le sulfate de méthyle à 0°C suivis de 50, 100, 150 et 300 cycles de méthylation par le sulfate de méthyle à la température ordinaire.

Pour augmenter la vitesse de la réaction, nous avons entrepris, après les 10 cycles de méthylation effectués à 0°C, de laisser remonter la température à +20°C et de continuer les additions de sulfate de méthyle à cette température. Une étude cinétique poussée jusqu'à 300 additions de sulfate de méthyle nous a conduit à des observations intéressantes.

On constate, en effet, que dès la 20ème addition on parvient à une constance de résultats qui sont les suivants :

galactose	100
mannose	100
2- ou 6-méthylgalactose	10
2,4- ou 4,6-diméthylgalactose	10

En tenant compte des résultats fournis par l'hydrolyse partielle et l'oxydation périodique de l'ovomucoïde, nous pouvons conclure que la perméthylation de la molécule n'est pas réalisée. En effet, plusieurs auteurs ont démontré

que le galactose se trouvait, dans l'ovomucoïde, en position terminale non réductrice et on doit donc s'attendre à trouver dans les hydrolysats d'ovomucoïde perméthylé du 2,3,4,6-tétraméthylgalactose.

### 3°- Méthylation par le procédé mixte au sulfate et à l'iodure de méthyle

L'ovomucoïde méthylé dans les conditions exposées dans le paragraphe précédent a été soumis à 10 cycles de méthylation par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent et de diméthylformamide. Seule apparaît une tache supplémentaire du 4-méthylmannose.

### CONCLUSIONS

L'étude que nous avons réalisée fait ressortir les difficultés que l'on rencontre dans la méthylation directe des glycoprotéides qui s'esquisse à peine, même après de nombreux cycles de méthylation. Ce résultat s'explique à la fois par une "déviation" de nombreux radicaux "méthyle" par les fonctions amines et amides - comme les liaisons peptidiques - présentes dans les molécules de protéines et par des empêchements stériques dus à un effet protecteur de la protéine vis-à-vis des groupements mucopolyosidiques. C'est pourquoi nous nous proposons à présent d'appliquer les procédés classiques de méthylation des polyosides à la "fraction glyco-aminoacide" de l'ovomucoïde récemment obtenue par hydrolyse pronasique par MONTREUIL, BISERTE et CHOSSON (301). La pronase permet, en effet, de débarrasser les glycoprotéides de la fraction protéique en ne laissant subsister - liés au groupement mucopolyosidique - que le ou les amino-acides attachés à ce dernier. Nous éviterons de cette manière l'effet protecteur de la protéine vis-à-vis du mucopolyoside.

CONCLUSIONS      GENERALES

---

Les recherches bibliographiques et les études critiques systématiques que nous avons effectuées à propos des procédés de perméthylation des glucides nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

1 - Il n'existe pas de procédé général de perméthylation des glucides et il est indispensable de rechercher la meilleure méthode en se fondant sur le dosage des groupements "méthoxy".

2 - Il est rare que la perméthylation d'un glucide puisse être réalisée en une seule opération. Généralement, il est nécessaire d'effectuer plusieurs cycles de méthylation. On utilisera d'abord le sulfate de méthyle, agent de méthylation peu puissant mais non brutal. On réalisera ainsi une méthylation suffisante du glucide pour permettre de le solubiliser dans des solvants organiques comme la diméthylformamide et de le traiter ensuite par l'iodure de méthyle, agent de méthylation efficace mais agressif, qui dégraderait le glucide natif mais qui respecte sa molécule dès que celle-ci est "stabilisée" par quelques groupements "méthoxy".

3 - Les méthodes d'identifications des oses méthylés et des méthylosides méthylés restent à mettre au point. Certes, de nombreux procédés chromatographiques ont été décrits mais ils ne sont applicables qu'à des cas simples comme, par exemple, celui d'un homopolyoside constitué par l'enchaînement d'un seul ose. La séparation chromatographique des isomères méthylés d'un même ose et des dérivés méthylés homologues d'oses différents est plus difficilement réalisable.

La méthode de choix sera la chromatographie préparative en phase gazeuse. Ce procédé permettra, non seulement l'interprétation des diagrammes chromatographiques mais aussi l'isolement des dérivés méthylés des oses en quantités suffisantes pour appliquer les procédés physiques d'identification de ces composés, comme la détermination de leur point de fusion et de leur pouvoir rotatoire spécifique.

4 - L'application de diverses méthodes de perméthylation des glucides libres ou combinés nous a permis

a - de démontrer que l'allolactose ne préexistait pas dans le lait de Femme ;

b - de prouver que, dans les cérébrosides de rate de maladie de GAUCHER, le glucose possédait une configuration moléculaire normale et que cette dyslipcoïdose était bien une "maladie enzymatique" par carence en cérébrosidase ou en 4-gluco-épimérase ;

c - de mettre en évidence les difficultés que l'on rencontre dans la perméthylation des glycoprotéides natifs et de poser en hypothèse de travail que la perméthylation des glyco-aminoacides obtenus par hydrolyse pronasique des glycoprotéides représentera le procédé de choix dans la détermination de la structure des mucopolyosides .



B I B L I O G R A P H I E

---

Les numéros entre parenthèses qui suivent les  
références correspondent à l'ordre d'apparition des  
citations dans le texte

- AKHREM A.A. et KUZNETSOVA A.I., Usp. Khim., 1963, 32, 823 (193)
- ALLEN S., BONNER T.G., BOURNE E.J. et SAVILLET N.M. Chem. Ind., 1958, 630 (129, 249, 250)
- APPLEWHITE T.H., DIAMOND M.J. et GOLDBLATT L.A., J. Am. Gil. Chemists Soc., 1961, 38, 609 (194)
- ARNDT F., Org.Synthesis, 1943, 2, 165 (103)
- ASPINALL G.O., Adv. Carb. Chem., 1953, 8, 217 (112, 117)
- ASPINALL G.O., J. Chem. Soc., 1963, 1676 (239)
- ASPINALL G.O., HIRST E.L. et NICOLSON A., J. Chem. Soc., 336, (1959), 1697 (53, 163 bis, 170 bis)
- BARKER G.R., in WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., Methods in Carbohydrate Chemistry, 2, 168, Acad. Press. New York, 1963 (7)
- BAXTER J.N. et PERLIN A.S., Can. J. Chem., 1960, 38, 2217 (230)
- BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.M., Analyst, 1954, 79, 201
- BELL D.J., Bromchem J., 1935, 29, 2031 (137)
- BELL D.J., Biochem J., 1937, 31, 1683 (137)
- BELL D.J., J. Chem. Soc., 1944, 473 (137, 146)
- BELL D.J., Adv. Carb. Chem. 1951, 6, 11 (116)
- BELL D.J. et DEDONDER R., in BELL D.J., Modern Methods of Plant Analysis, 1955, 2, 9 (244)
- BELL D.J. et PALMER, J. Chem. Soc. , 1949, 2522 (147)
- BERGELSON L.D., Doklady Akadg. Nank SSSR, 1962, 141, 84 (202)
- BINKLEY W.W., Adv. Carbohydr. Chem. USA, 1955, 10, 55
- BISHOP C.I., in GLICK D., Meth. Biochem. Anal., Interse Publ., 1962, 10, 1 (225, 236)



- BISCHOP C.T. et COOPER F.P., Can. J. Chem., 1960, 38, 388 (39, 222, 231, 235)
- BISHOP C.T. et COOPER F.P., Can. J. Chem., 1960, 38, 793 (61, 63, 231, 234)
- BOBBITT J.S., Rheinhold Co NY, 1963 (195)
- BOGGS L., CUENDET L.S., EHRENTHAL I., KOCH R. et SMITH F., Nature, 1950, 166, 520 (173)
- BOISSONNAS R.A., Helv. Chim. Acta, 1947, 30, 1689, 1703 (151)
- BOURILLON R. et MICHON J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 280 (21)
- BOURNE E.J. et PEAT S., Adv. Carb. Chem., 1950, 5, 145 (110, 115)
- BOUVENG H.O., Acta Chem. Scand., 1959, 13, 1869 (91, 171)
- BOUVENG H.O. et LINDBERG B., Acta Chem. Scand., 1958, 12, 1977 (166, 171)
- BRAGG P.D. et HOUGH L., Biochem J., 1961, 78, 11 (94, 299)
- BREDERESCH H., HAGELLOCH G. et HAMBSCH E., Chem. Ber., 1954, 87, 35 (87, 132)
- BURCHFELD H.P. et STORRS E.E., Biochemicae Applications of Gas Chromatography, Acad. Press., 1962, 596 (224)
- CHANDA H., J. Chem. Soc., 1950, 1287 (119, 123)
- CLAY A., MONTREUIL J., DUPONT A. et ADENIS L., Arch. Anat. Path., 1962, 10, 69 (282)
- COLEMAN G.H. et MILLER A., Proc. Iowa Acad. Sci., 1942, 49, 257 (140)
- COMBS E.E., MAC CLOSKEY C.M., SONDBERG R.L. et COLEMAN G.H., J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 276 (130)
- COURTOIS J.E., LE DIZET P. et PETEK F., Bull. Soc. Chim. Bio., 1959, 41, 1261 (66, 134)
- CROON I., Svensk. Papperstidn., 1959, 62, 700 (100)
- CROON E., HERRSTROM G., KULL F. et LINDBERG B., Acta Chem. Scand., 1960, 14, 1338 (120, 125)
- CROON I. et LINDBERG B., Svensk. Papperstidn., 1957, 60, 843 (120, 121, 125)
- DEDONDER R., C.R. Acad. Sc., 1950, 230, 997 (246)
- DEDONDER R., in LEDERER E. Monographie de Chimie Organique, Chromatographie en Chimie Organique et Biologique III, 2, 1, Masson Ed. Paris 1960 (161, 246)
- DEFERRARI J.O., MISCHNIK R., DE LEDERKREMER R.H., MATSUHIRO B. et SPROVIERO J.F., J. Chromatog., 1962, 9, 283 (211)



- DEMOLE E., J. Chromatog., 1958, 1, 24 ; 1959, 1, 1 ; 1961, 6, 2 (196)
- DEUEL H., HUBER G. et LEUENBERGER R., Hebv. Chim. Acta., 1950, 33, 1226 (98)
- DISCHE Z., in GLICK D., Methods Biochem Anal., 2, 213, Interscience Ed. N.Y. 1955 (17)
- DOMINGUEZ S.X.A., Rev. Soc. Quim. Mex., 1963, 7, 151 (197)
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F., Nature, 1951, 168, 167 ; Anal. Chem., 1956, 28, 350 (219)
- EGGE H., Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 1435 (92)
- ELSON L.A. et MORGAN W.T.J. , Biochem. J., 1933, 27, 1824 ; 1934, 36, 988 (15)
- EULER A.V., HASSELQUIST H. et LIMNELL I., Arkiv. Kemi., 1963, 21, 259 (198)
- FISCHER F.G. et NEBEL H.J., Z. Physiol. Chem., 1955, 301, 224 ; 1955, 302, 10 (30)
- FITTIG et BAEYER , 1868 - 1870 (4)
- FORSYTH W.G.C., Nature, 1948, 161, 238 (245)
- FOSTER A.B., Chem. Ind., 1952, 1050 (141, 143)
- FOSTER A.B., Adv. Carb. Chem., 1957, 12, 81 (141)
- FOSTER A.B., in WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., Methods in Carb. Chem., 1, 51, Acad. Press., 1962 (141)
- FOSTER A.B. et STACEY M., J. Appl. Chem., 1953, 3, 19 (142, 145)
- FREUDENBERG K. et BOPPEL H., Ber., 1938, 71, 2505 (73 , 80)
- FREUDENBERG K. et BOPPEL H., Ber., 1940, 73, 609 (118 , 122)
- FREUDENBERG K. et HIXON R.M., Ber., 1923, 56, 2119 (86)
- FREUDENBERG K., PLANKENHORN E. et BOPPEL H., Ber., 1938, 71, 2435 (78)
- FREUDENBERG K. et RAPP W., Ber., 1936, 69, 2041 (77)
- GARDELL S., in GLICK D., Methods Biochem. Anal., Inter Science Ed., 1958, 6, 289 (28)
- GARDELL S., HEIJKENSJOLD F. et ROCHNORLUND A., Acta Cham. Scand., 1950, 4, 970 (27)
- GEE M., J. Chromatog., 1962, 9, 278 (212, 216, 217, 226, 227)
- GEE M. et WALKER H.G. Jr., Chem. Ind., 1961, 829 (235)
- GEE M. et WALKER H.G. Jr., Anal. Chem., 1962, 34, 650 (235)



- GEERDES J.D., LEWIS B.A., MONTGOMERY R. et SMITH F., Anal. Chem., 1954, 26, 264
- GERRART W. et LAPPERS, M.F., J. Chem. Soc., 1952, 1486 (251)
- GOLDSTEIN I.J., HAMILTON J.K. et SMITH F., J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 6252  
(124, 175)
- GUNNER S.W., JONES J.K.N. et PERRY M.B., Chem. Ind., 1961, 255 (40)
- HALLIDAY N., DUEL H.J., TRAGERMAN L.J. et WARD W.E., J. Biol. Chem., 1940, 132, 171  
(283)
- HAMILTON J.K., PARTLOW E.V. et THOMPSON N.S., J. Chromat., 1962, 7, D.33 ;  
J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 451 (181 bis)
- HASPINALL G.O., HIRST E.L., PERCIVAL E.G.V. et WILLIAMSON I.R., J. Chem. Soc.,  
1953, 3184 (54, 163 bis, 170 bis)
- HAWORTH W.N., J. Chem. Soc., 1915, 107, 8 (41, 44, 45, 135, 253, 261)
- HAWORTH W.N., HIRST E.L. et PERCIVAL E.G.V., J. Chem. Soc., 1932, 2384 (136)
- HAWORTH W.N. et LEARNER A., J. Chem. Soc., 1928, 619 et 2681 (41, 44, 45, 135,  
253, 261 et 267)
- HAWORTH W.N. et PERCIVAL E.G.V., J. Chem. Soc., 1932, 2277 (62, 138)
- HAY G.W., LEWIS B.A. et SMITH F., J. Chromatog., 1963, 11, 479 (213, 218, 228)
- HEAD F.S.H., Trans. Textile Inst., 1952, 43, 1 (101, 102)
- HEIDELBERGER M. et AISENBERG A.C., Proceedings of the Fourth International Congress  
of Biochemistry - Vienne 1958 - Pergamon Press 1959, 1, 52 ;  
Proc. Nat. Acad. Sci., 1958, 39, 453 (3)
- HELFERICH B. et RAUCH H., Ber., 1926, 59, 2655 (272)
- HELFERICH B. et SPARMBERG C., Ber., 1933, 66, 806 (272)
- HESS K. et NEUMANN F., Ber., 1935, 68, 1371 (128, 247 (128, 247)
- HIRST E.L. et DUNSTAN S., J. Chem. Soc., 1953, 2332 (55)
- HIRST E.L. et JONES J.K.N., J. Chem. Soc., 1938, 496 (85, 86)
- HIRST E.L. et JONES J.K.N., Chromatographic Analysis. A discussion of the Faraday  
Society, 1949, 248 (164, 167, 182, 183, 186, 186 bis, 187, 242, 258)
- HIRST E.L. et PERCIVAL E.G.V., Revue générale
- HODGE J.E., KARJALO S.A. et HILBERT G.E., J. Amer. Chem. Soc., 1951, 73, 3312  
(74, 81)



- HOFFMAN D.O. et WOLFROM M.L., Anal. Chem., 1947, 19, 225 (109)
- HOUCKE E. et MONTREUIL J., Path. Biol., 1963, 11, 484 (284)
- HOUGH L., in GLICK D., Methods Biochem. Anal., 1, 205, Interscience Ed., New York, 1954 (152)
- HOUGH L., JONES J.K.N. et WADMAN W.H., Nature, 1948, 162, 448 ; J. Chem. Soc., 1949, 2511 (163)
- HOUGH L., JONES J.K.N. et WADMAN W.H., J. Chem. Soc., 1950, 1705 (127, 162, 163, 165, 241, 248)
- HOUGH L. et THEOBALD R.S., in WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., Methods in Carbohydrate Chemistry, 2, 162, Acad. Press, New York, 1963 (96)
- ISBELL H.S., FRUSH H.L., BRUCKNER B.H., KOWKABANY G.N. et WAMPLER G., Anal. Chem., 1957, 29, 1523 (131)
- JEANLOZ R.W., Adv. Carb. Chem., 1958, 13, 189 ; J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 555 (113, 114)
- JEANLOZ R.W., J. Chem. Soc., 1960, 106 (68, 69, 300)
- JEANLOZ R.W. et EYLAR E.H., Intern. Symp. Makromol., Sektion V-A,8, Wiesbaden, 1959 (68, 95, 300)
- JERMYN M.A. et ISHERWOOD F.A., Biochem J., 1949, 44, 402 (
- JONES J.K.N., J. Chem. Soc., 1944, 333 (148)
- JONES H.G., JONES J.K.N. et PERRY M.B., Can. J. Chem., 1962, 40, 1559 (237)
- KIRCHER H.W., Anal. Chem., 1960, 32, 1103 (227, 239)
- KIRCHER H.W., in WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., Methods in Carb. Chem., 1, 13, Acad. Press, New York, 1962 (223)
- KLEIN E. et BARTER C.J., Text. Res. J., 1961, 31, 486 (232)
- KLENK E. et RENNKAMP F., Phys. Chem., 1942, 273, 253 (285, 290)
- KUHN R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 297 (1)
- KUHN R. et BAER H.H., Chem. Ber., 1953, 86, 724 (104)
- KUHN R., BAER H.H. et GAUHE A., Chem. Ber., 1956, 89, 2519 (89, 257, 265, 266, 271, 293, 294, 295)
- KUHN R., BAER H.H. et GAUHE A., Chem. Ber., 1958, 91, 364 (65, 133, 254, 262, 268)



- KUHN R., BAER H.H. et SEELIGER A., Ann., 1958, 611, 236 (90)
- KUHN R., GAUHE A. et BAER H.H., Chem. Ber., 1955, 88, 1135 (33)
- KUHN R. et TRISCHMANN H., Chem. Ber., 1961, 94, 2258 (88, 256, 264, 270)
- KUHN R. et TRISCHMANN H., Chem. Ber., 1963, 96, 284 (50)
- KUHN R., TRISCHMANN H. et LOW I., Angew. Chem., 1955, 67, 32 (88, 256, 164, 270)
- KURIYAMA S., MIHARA K. et EGASHIRO S., J. Chem. Soc. (Japan), 1954, 57, 849 (49)
- KURIYAMA S., MIHARA K. et HORI R., J. Chem. Soc. (Japan - Ind. Chem. Sect.)  
1954, 57, 847 (49)
- LARSON E.D. et SMITH F., J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 429 (56)
- LAVER M. et WOLFROM M.L., in WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., Methods in Carb. Chem.  
1, 454, Acad. Press. Ed., New York (106)
- LEDERKEMER R.M. et DEFERRARI J.O., J. Org. Chem., 1962, 27, 2558 (203)
- LEECH J.G., Tappi, 1958, 41, 80 (169, 174, 178, 179)
- LEMIEUX R.U., in WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., Methods in Carb. Chem., 1, 45,  
Acad. Press. Ed., New York, 1962 (159)
- LESPAGNOL A., MONTREUIL J. et SEGARD E., C.R. Soc. Biol., 1960, 154, 130 (280)
- LEVY G.A. et MAC ALLAN A., Biochem. J., 1959, 73, 127 (29)
- LEWIS B.A. et SMITH F., J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 3929 (144)
- LINDBERG B. et WICKBERG B., Act. Chem. Scand., 1954, 8, 569 (156)
- LUCAS H.J. et STEWART W.T., J. Am. Chem. Soc., 1940, 62, 1070 (97)
- MAC INNES A.G., BALL D.H., COOPER F.P. et BISHOP C.T., J. Chromatog., 1958, 1, 556  
(221)
- MAC LENNAN H.P., SMITH D.W. et RANDALL H.M., Biochem J., 1960, 74, 3.p. (168)
- MAHER G.G., Adv. Carb. Chem., 1955, 10, 273 (111)
- MALAPRADE M.L., Bull. Soc. Chim. France, 1928, 43, 683 (6)
- MENZIES R.C. et CHRISTINA M., J. Chem. Soc., 1926, 937 (84)
- MONTREUIL J., Bull. Soc. Chem. Biol., 1949, 31, 1639 (25)
- MONTREUIL J., C.R. Acad. Sciences, 1954, 239, 510 (34)



- MONTREUIL J., 3ème Coll. Hôp. Saint-Jean, Bruges, 1955, 209, Hôp. Saint-Jean Ed., Bruges (286)
- MONTREUIL J., Coll. Intern. CNRS Gif/Yvette, juillet 1960 et Bull. Soc. Chim. Biol. 1960, 42, 1399 (273, 278)
- MONTREUIL J., BISERTE G., CHOSSON A. et SCHEPPLER N., C.R. Acad. Sciences, 1963, 256, 3372 (35, 297, 301)
- MONTREUIL J., BOULANGER P. et HOUCKE E., Bull. Soc. Chim. Biol., 1953, 35, 1125 (287)
- MONTREUIL J. et HOLLEMAN J., C.R. Acad. Sciences, 1956, 243, 1069 (276)
- MONTREUIL J. et MULLET S., C.R. Soc. Biol., 1959, 153, 1364 ; Bull. Soc. Chim. Biol. 1960, 42, 365 (277)
- MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 13 (10, 20, 26, 126, 139)
- MONTREUIL J. et SPIK G., Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille, Ed., 1963 (9, 11, 12)
- MONTREUIL J., SPIK G., CHOSSON A., SEGARD E. et SCHEPPLER N., C.R. Symp. Chrom. Bruxelles, 14-15 septembre 1962 (36, 298)
- MORGAN W.T.J., Naturwiss., 1959, 46, 181 (274)
- MUSKAT I.E., J. Am. Chem. Soc., 1934, 56, 693 (76, 79)
- MUSKAT I.E., J. Am. Chem. Soc., 1934, 56, 2449 (76, 79)
- NIAZI S. et STATE D., Cancer Res., 1948, 8, 653 (18)
- NORBERG E.J., AUERBACH A. et HIXON M.L., J. Am. Chem. Soc., 1945, 67, 342 (149)
- NORDAL et OISETH
- PARTRIDGE S.M., Biochem. J., 1948, 42, 238 ; Nature, 1946, 158, 270 (22, 24, 176, 177, 240)
- PASTUKA G., Z. Anal. Chem., 1961, 179, 355 (204)
- PERLIN A.S., Cereal. Chem., 1951, 28, 370 (57)
- PETEK F. et TO DONG, Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 1137 (180, 185, 188, 190, 259)
- POLONOVSKI J., Dipl. Et. Sup. Sciences, 1942, Paris ; Bull. Soc. Chim. Biol., 1943, 25, 44 (288, 291)



- PREY V., BERBALK H. et KAUSZ M., Mikrochimica Acta, 1962, 51, 449 (214, 220, 229)
- PREY V., SCHERZ H. et BANCHER E., Mikrochim. Ichnoanal Acta, 1963, 3, 567 (205)
- PURDIE T. et IRVINE J.C., J. Chem. Soc., 1903, 83, 1012 (42, 43, 70, 255, 263, 269)
- RAGAZZI E. et VERONESE, Farmaco Ed. Prat. Ital., 1963, 18, 152 (206)
- RANDERATH L., Verlag Chemie Weinheim, 1962 (199)
- REBENFELD L. et PACSU E., Text. Research J., 1954, 24, 941 (48)
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1940, 34, 931 (14)
- SCHLUBACH H.H. et SCHEFFLER A., Ann., 1954, 588, 192 (58)
- SCHWEIGER A., J. Chromatog., 1962, 9, 374 (207)
- SEGARD E., Diplôme d'Etudes Supérieures, Lille, 1961 (279, 281)
- SMITH F. et MONTGOMERY F., in GLICK D., Methods Biochem. Anal., 3, 158 ; Inter-science Ed., New York, 1956 (47, 160)
- STACEY M. et WOOLLEY J.M., J. Chem. Soc., 1942, 550 (93, 296)
- STAHL E., Chem. Z., 1958, 82, 323 (192, 200)
- STAHL E. et KALTENBACH U., J. Chromatog., 1961, 5, 351 (208)
- STAUB E.M. et TINELLI R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, 39, 65 (2)
- SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L., Nature, 1958, 181, 1154 (32)
- SWEELEY C.C., BENTLEY R., MAKITA M. et WELLS W.W., J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 1205 et 2497 (8)
- TATE M.E. et BISHOP C.T., Can. J. Chem., 1962, 40, 1043 (215)
- THANNHAUSER S.J., FELLIG J. et SCHMIDT G., J. Biol. Chem., 1955, 215, 211 (292)
- THOMPSON A. et WOLFROM M.L., in WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., Methods in Carbohy-drate Chemistry, 2, 215, Acad. Press Ed., New York, 1963 (38)
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1929, 215, 36 (13)
- TINELLI R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 357 (181, 184, 189, 191, 252, 260)
- TIPSON R.S., in WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., Methods in Carbohydrate Chemistry, 2, 150, Acad. Press Ed., New York, 1963 (75)



- TOLLENS, 1882, (5)
- TRUTTER E.V., Cleaver Hume Press Ltd. London, 1963, 205 (200)
- VAN CLEVE J.W., SCHAEFER W.C. et RIST C.E., J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 4435 (82)
- VIEBOCK F. et BRECHER C., Ber., 1930, 63, 3207 (52 , 107)
- VIEBOCK F. et SCHWAPPACH A., Ber., 1930, 63, 2818 (52)
- VOLLMERT B., Makromol. Chem., 1950, 5, 101 (99)
- WALLENFELS K., Naturwiss., 1950, 37, 491 (243)
- WALLENFELS K., BECHTLER G., KUHN R., TRISCHMANN H. et EGGE H., Angew. Chem.,  
International Edit. 2 , 1963, 515 (105 bis , 252 bis)
- WASSERMAN L. et HANUS H., Naturwiss., 1963, 50, 351 (209)
- WATKINS W.N. et MORGAN W.T.J., Nature, 1957, 180, 1038 (275)
- WERNER I. et ODIN L., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230 (19)
- WHELAN W.J. et MORGAN K., Chem. Ind., 1954, 78 (155)
- WHISTLER R.L. et BEMILLER J.N., in WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., Methods in Carbohydrate Chemistry, 1, 42, Acad. Press Ed., New York, 1962 (158)
- WHISTLER R.L. et CONRAD H.E., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 1673 (59, 67)
- WHISTLER R.L., CONRAD H.E. et HOUGH L., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 1668 (59)
- WHISTLER R.L. et DURSO D.F., J. Amer. Chem. Soc., 1950, 72, 677 (105, 154)
- WHITE G.F., MORRISON A.B. et ANDERSON E.G.E., J. Am. Chem. Soc., 1924, 46, 961 (71)
- WICKBERG B., Acta Chem. Sc., 1954, 8, 436 (60)
- WICKSTROM A.E., COURTOIS J.E. et LE DIZET P., Bull. Soc. Chim. France, 1956, 827 (170)
- WILLIAMSON A.W., J. Chem. Soc., 1852, 4, 229 (72)
- WISLICENUS W., Kolloid Z., 1942, 66 , 100 (150)
- WOLFROM M.L., BINKLEY W.W., SHILING L. et HILTON G.E., J. Am. Chem. Soc., 1951, 73  
3553 (83)

- WOLFROM M.L. et THOMPSON A., in WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., Methods in Carbohydrate Chemistry, 2, 211, Acad. Press Ed., New York, 1963 (37)
- WOOLF L.I., Biochem. J., 1954, 56, XVI (289)
- YAMAKAWA T., YOKOYAMA S. et HANDA N., J. Biochem., 1963, 53, 28 (238)
- ZEISEL S., Monatsch., 1885, 6, 989 (51)
- ZHDANOV U.A., DOROFEEENKO G.N. et ZELENSKAIA S.V., Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R., 1963, 146, 1332 (210)



I N D E X    D E S    M A T I E R E S

---

	<u>Pages</u>
<u>Allolactose</u>	107
<u>Chromatographie</u>	
- des oses neutres	22
- des oses méthylés	76
* sur colonne	78
* sur papier	79 , 97
- des osides méthylés	
* en couche mince	84
* en phase gazeuse	85 , 97
<u>Cérébrosides</u>	109
- méthylation par le sulfate de méthyle	110
- méthylation par l'iodure de méthyle	111
<u>Composition molaire des osides</u>	21
<u>Constantes physiques</u>	
- des méthyl-D-glucoses	62
- des méthyl-D-glucosides	65
- des méthyl-D-galactoses	63
- des méthyl-D-galactosides	66
- des méthyl-D-mannoses	64
- des méthyl-D-mannosides	66
- des méthyl-D-glucosamines	64
- des méthyl-D-galactosamines	64
<u>Cristallisation des dérivés méthylés</u>	68
<u>Cristallisations fractionnées des dérivés méthylés</u>	74
<u>Déméthylations</u>	70 , 92
<u>Diazométhane (méthylation par le)</u>	52

	<u>Pages</u>
<u>Dosages</u>	
- des oses neutres	20 , 22
- des osamines	20 , 22
- des acides uroniques	20 , 24
- des acides sialiques	20 , 24
- des groupements "méthoxy"	56 , 97
- des oses méthylés	93
<u>Electrophorèse des oses méthylés</u>	75
<u>Estérification des oses</u>	15
<u>Esters boratés</u>	15
<u>Esters acétiques</u>	15
<u>Etude critique des procédés de perméthylation</u>	100
<u>Formule des oses</u>	4
<u>Fractionnements physiques des méthylsides</u>	74
<u>Hydrolyse des osides méthylés</u>	72
<u>Identification des oses méthylés</u>	90
<u>Iodure de méthylé</u>	
procédé de PURDIE et IRVINE	44 , 102
procédés modifiés	44
méthylation des <u>méthylpolyosides</u>	45
méthylation des <u>oligosides</u>	48 , 104
méthylation du groupement mucopolysidique des <u>glycoprotéides</u>	51
<u>Méthanolyse</u>	71
<u>Méthylation (procédés)</u>	
* <u>par le sulfate de méthyle</u>	35 , 96
des polyosides natifs	37
des polyosides acétylés	38
des oligosides	41 , 101 , 102
du groupement mucopolysidique des glycoprotéides	43 , 112



* <u>par l'iodure de méthyle</u>	44 , 96
des polyosides	45
en présence d'oxyde d'argent	45
en présence de sodium	46
sous forme de "sels" de thallium	47
des oligosides	48
en présence de sodium	49
en présence de diméthylformamide	49 , 104
en présence de baryte	51 , 103
du groupement mucopolysidique des glycoprotéides	51
* <u>par le diazométhane</u>	52
des polyosides	53
des oligosides	54

Méthylation. Procédés de

FREUDENBERG et HIXON ( $\text{ICH}_3$ + sodium dans $\text{NH}_3$ liquide)	46
FREUDENBERG et HIXON ( $\text{ICH}_3$ + sodium dans l'éther anhydre)	49
HAWORTH ( $\text{SO}_4\text{Me}_2$ + soude)	35 , 101
HEAD (Diazométhane)	53
HIRST et JONES ( $\text{ICH}_3$ + sels de thallium)	47
KUHN et BAER (Diazométhane)	54
KUHN, BAER et GAUHE ( $\text{SO}_4\text{Me}_2$ + soude)	42 , 102
KUHN, BAER et GAUHE ( $\text{ICH}_3$ + $\text{Ag}_2\text{O}$ + diméthylformamide)	50 , 104
KUHN et TRISCHMANN ( $\text{ICH}_3$ + $\text{Ba}_2\text{O}$ + $\text{Ba}(\text{OH})_2$ )	51, 103
PURDIE et IRVINE ( $\text{ICH}_3$ + $\text{Ag}_2\text{O}$ )	44 , 102

<u>Ose terminal</u>	25
<u>Osidation (osylation)</u>	11
<u>Oxydation des oses en acides aldoniques</u>	6
<u>Oxydation periodique</u>	7 , 27 , 93
<u>Peracétylation (principe)</u>	29

<u>Perméthylation. Principe</u>	13, 29, 33
<u>Perméthylation. Procédés</u> (voir : Méthylation)	
<u>Points d'attache des liaisons osidiques</u>	27
<u>Propriétés physiques des oses méthylés</u>	61
<u>Purification des hydrolysats sur colonnes</u>	21
<u>Réactions colorées des oses méthylés</u>	71
<u>Réduction des oses</u>	9
<u>Séquence des oses (détermination de la)</u>	25
<u>Silylation</u>	13
<u>Solubilité des oses méthylés</u>	67, 104
<u>Stabilité des oses</u>	15
des oses méthylés	68, 70
<u>Structure des osides</u>	25
<u>Sulfate de méthyle</u>	35, 96
- méthylation des polyosides natifs	37
- méthylation des polyosides acétylés	38
- méthylation des oligosides	41, 101, 102
- méthylation du groupement prosthétique des glycoprotéides	43
<u>Systèmes-solvants</u>	
en chromatographie sur papier	80
en chromatographie en couche mince	86
<u>Teneur en oses totaux</u>	20
<u>Tosylation</u>	11
<u>Tritylation</u>	11

