

Exclu du prêt

50376  
1964  
9

50.376  
1964  
9

Mémoire présenté pour le Doctorat-ès-Sciences  
d'Etat par Madame Arlette ADAM-CHOSSON

LES PROCÉDES D'ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCOPROTEIDES  
APPLICATION A L'OVOMUCOIDE



## TABLE DES MATIERES

	Pages
<u>INTRODUCTION</u> .....	1
<u>GENERALITES</u> .....	4
I - Les glycoprotéides .....	5
A - Définition et terminologie .....	5
B - Répartition et importance des glycoprotéides .....	5
C - Les oses constituant les glycoprotéides .....	6
D - Structure des glycoprotéides .....	9
II - Les protéides du blanc d'oeuf .....	9
III - L'ovomucoïde .....	12
A - Historique de la découverte et de l'isolement de l'ovomucoïde .....	12
B - Propriétés physiques .....	15
C - Propriétés chimiques .....	16
D - Structure de l'ovomucoïde .....	18
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	
CHOIX D'UNE METHODE DE PREPARATION DE L'OVOMUCCOIDE, .	23
I - Préparation de l'ovomucoïde .....	23
A - Dénaturation par la chaleur .....	24
B - Dénaturation par l'acide trichloracétique .....	25
C - Dénaturation par le phénol .....	27

II - Etude chimique .....	27
A - Méthodes .....	27
B - Résultats .....	33
C - Discussion et conclusion .....	35
III - Etudes physiques .....	39
A - Ultracentrifugation .....	39
B - Etude électrophorétique .....	40
IV - Etudes immuno-électrophorétiques .....	47
V - Conclusions générales .....	48
<u>ETUDE DE LA STRUCTURE DE L'OVOMUCOÏDE</u> .....	51
Introduction .....	51
I - Exploration de la structure du groupement polyosidique de l'ovomucoïde .....	55
A - Etude cinétique de l'hydrolyse chimique de l'ovomucoïde .....	56
B - Isolement et étude de la structure d'oligosides présents dans les hydrolysats partiels de l'ovomucoïde .....	64
C - Conclusions générales à l'étude de la structure du groupement polyosidique de l'ovomucoïde .....	85
II - Point d'attache glucide-protéide dans l'ovomucoïde .....	87
Historique .....	87
Travaux personnels .....	94
A - Hydrolyses peptique, trypsique et chymotrypsique ... de l'ovomucoïde .....	94
B - Hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde .....	95
C - Détermination de la composition de glycoprotides $\alpha_4$ , $\beta$ et $\gamma$ .....	101

D - Détermination de la structure des glycoprotides β et γ .....	105
Discussion .....	115
Conclusions à l'étude du point d'attache glucide-protéine dans l'ovomucoïde.....	120
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u> .....	123
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	130



## INTRODUCTION

La chimie des glycoprotéides progresse continuellement. Elle est le fruit de nombreux travaux entrepris dans le monde entier en raison de l'importance de ces substances.

Longtemps, l'intérêt des glycoprotéides fut essentiellement clinique, mais depuis que l'on a reconnu la nature glycoprotéidique de la paroi bactérienne, de la substance fondamentale, des substances spécifiques des groupes sanguins, des anticorps, d'hormones et d'enzymes, l'intérêt des glycoprotéides est devenu, en outre, d'ordre biologique. Alors s'est posé le problème de leur spécificité et, par conséquent, le problème de leur structure.

Au moment où nous avons commencé nos recherches, nos connaissances de la chimie des glycoprotéides étaient encore très fragmentaires et la structure d'aucun d'entre eux n'était encore précisée. Longtemps les principales difficultés qu'ont rencontrées les chercheurs ont concerné la préparation de substances pures en quantité suffisante et l'absence de méthodes d'exploration de la structure des glycoprotéides. D'autre part, la dualité de la constitution des glycoprotéides complique singulièrement la question, en effet le problème posé par l'étude de la structure d'un glycoprotéide est triple:

- 1- quelle est la structure de la protéine ?
- 2- quelle est la structure du groupement mucopolysidique ?
- 3- quelle est la nature de la liaison mucopolyside-protéine ?

Nous avons abordé les deux derniers problèmes en choisissant comme substrat l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de poule. Les raisons qui ont motivé notre choix sont fondées sur l'importance à la fois historique, biologique et biochimique de ce glycoprotéide.

L'histoire de la découverte de l'ovomucoïde se confond avec celle des glycoprotéides. En effet, deux milieux biologiques riches en protéides ont de tout temps excité la curiosité des chercheurs: le sang et le blanc d'oeuf et les premiers résultats concernant la présence de glucides liés à des protéines ont été acquis dès le milieu du siècle dernier par leur étude. En outre, l'ovomucoïde fut le premier glycoprotéide dont on décrit la préparation et les propriétés.

Le rôle biologique de l'ovomucoïde est encore inconnu. Son activité antitrypsique pourrait cependant expliquer sa présence dans le blanc d'oeuf à un taux non négligeable puisqu'il représente environ 10 % des protéides totaux; il est possible en effet qu'il agisse comme un régulateur de l'activité enzymatique de l'embryon et il serait intéressant à cet égard de suivre son évolution au cours du développement de l'oiseau. En outre, bien que peu de travaux aient été réalisés sur ce sujet, il semble qu'il existe un ovomucoïde spécifique de l'oeuf de chaque espèce d'oiseau.

Du point de vue chimique l'ovomucoïde représente le matériel de choix pour l'étude des propriétés physicochimiques et de la structure des glycoprotéides. Sa préparation est en effet relativement aisée et on l'obtient rapidement avec des rendements élevés. La simplicité de sa composition en oses (galactose, mannose, N-acétylglucosamine, acide N-acétylneuraminique) et l'importance de la partie glucidique (25 % de l'ovomucoïde) facilitent l'étude du groupement polysidique.

A l'intérêt particulier de l'étude de la structure chimique de l'ovomucoïde s'ajoute un intérêt plus général. En effet, nous avons adopté à la suite de résultats acquis dans notre laboratoire et dans les laboratoires étrangers, l'hypothèse de travail qu'il existe un schéma général de structure des glycoprotéides, que les informations obtenues à propos de l'un d'eux pourront être étendues à d'autres glycoprotéides et que les méthodes d'exploration de la constitution mises au point pour l'un d'eux seront applicables à l'ensemble des glycoprotéides. Par exemple, le but poursuivi dans notre laboratoire est l'étude comparée de la structure des glycoprotéides isolés du sang, de l'urine et des tissus des individus sains et cancéreux. Des recherches ont été commencées sur l'ovomucoïde, glycoprotéide du sang; elles furent provisoirement abandonnées à cause de la difficulté d'obtenir de grandes quantités de plasma humain. En effet, le plasma ne renferme que 0,5 g d'orosomucoïde par litre et des quantités importantes étaient nécessaires pour mettre au point des techniques d'exploration inexistantes. Pour cette raison, l'intérêt du laboratoire s'est porté sur l'ovomucoïde qui présente de grandes analogies avec l'orosomucoïde: teneur élevée en oses, résistance aux agents de dénaturation des protéines comme la chaleur, l'alcool, l'acétone, l'acide trichloracétique, similitude de la composition en oses. Il n'était donc pas déraisonnable d'espérer que les procédés d'étude de la structure de l'ovomucoïde seraient applicables à l'orosomucoïde et que par exemple des fragments osidiques communs seraient identifiés dans ces deux composés. Nous verrons que des résultats acquis ultérieurement devaient

confirmer notre hypothèse.

Notre travail tout d'abord, a consisté à étudier les meilleures conditions d'isolement de l'ovomucoïde à partir de l'oeuf de poule. En effet, bien que de nombreuses méthodes aient été décrites, aucune ne paraissait à priori, satisfaisante car les résultats concernant les propriétés physicochimiques des différentes préparations d'ovomucoïde obtenues étaient loin d'être concordants. Nous avons donc appliqué d'une manière systématique toutes les méthodes qui ont été proposées jusqu'à présent et nous avons soumis les substances isolées à des études physiques, chimiques et immunologiques dont certaines n'avaient jamais été effectuées.

Après avoir fait le choix d'une méthode de préparation, nous avons commencé l'étude de la structure de l'ovomucoïde après avoir mis au point plusieurs procédés d'exploration de la constitution du groupement polysidique et de la nature du point d'attache glucide-protéine.

Dans le présent mémoire, après avoir donné quelques généralités concernant les glycoprotéides, en général, et l'ovomucoïde en particulier, nous préciserons successivement:

- 1- les résultats de notre étude critique des procédés de préparation de l'ovomucoïde et les raisons qui nous ont incitée à choisir la méthode d'isolement de Fredericq et Deutsch;
- 2- la composition en glucides de l'ovomucoïde;
- 3- les informations que nous avons tirées de l'exploration de la structure du groupement polysidique et de la nature du point d'attache glucide-protéine.

## G E N E R A L I T E S

Elles porteront essentiellement sur:

- I - LES GLYCOPROTEIDES
- II - LES PROTEIDES DU BLANC D'OEUF
- III - L'OVOMUCOIDE

## I - LES GLYCOPROTEIDES

---

### A - DEFINITION ET TERMINOLOGIE.

Les glycoprotéides (ou mucoprotéides) sont des hétéroprotéides dont le groupement prosthétique est de nature glucidique. Généralement ils résultent de l'association de protéines avec des polysides que l'on appelle mucopolysides pour les distinguer des polysides qui n'existent qu'à l'état "libre", comme l'amidon par exemple.

Cependant, certains de ces complexes renferment une proportion élevée de glucides et l'importance de la fraction protidique est alors très faible. C'est, par exemple, le cas des substances spécifiques de groupes sanguins ou de mucopeptides des membranes bactériennes. En outre, on isole de milieux naturels ou d'hydrolysats enzymatiques des glycoprotéides, des composés de très faible poids moléculaire dont certains ne renferment plus qu'un seul aminoacide associé parfois à un seul ose.

C'est pourquoi nous emploierons les termes de glycoprotéines (ou mucoprotéines), de glycopeptide (ou mucopeptide) et de glycoaminoacide (ou mucoaminoacide) pour désigner les produits de l'association d'un ose, d'un muco-oligoside ou d'un mucopolyside avec, respectivement une protéine, un peptide ou un acide aminé. Nous grouperons sous le nom de glycoprotides (ou mucoprotides) les trois groupes fondamentaux précédents.

### B - REPARTITION ET IMPORTANCE DES GLYCOPROTIDES.

L'intérêt que portent aux glycoprotéides les biochimistes, les biologistes et les médecins ne cesse de s'accroître au fur et à mesure que se précisent le rôle biologique et le comportement pathologique de ces substances.

La répartition des glycoprotéides est très large puisqu'ils sont présents dans les tissus animaux et végétaux et chez les microorganismes où ils jouent les rôles les plus divers.

La substance fondamentale qui emplit, dans le tissu conjonctif,

les mailles du réseau de fibres glycoprotéidiques d'élastine, de réticuline et de collagène, renferme une proportion importante de mucopolysides acides associés par des liaisons ioniques à des protéines ou à des mucoïdes.

De nombreuses hormones sont de nature glycoprotéidique, comme les gonadotrophines hypophysaires (hormone lutéinisante LH, hormone de stimulation du follicule FSH, hormone chorionique, hormone de la gestation), l'hormone thyroïdienne hypophysaire TSH. La thyroglobuline, précurseur de l'hormone thyroïdienne, est un glycoprotéide.

Des enzymes, comme la choline-estérase, la lactase, l'entérokinase, la ribonucléase B sont des mucoïdes.

De nombreux glycoprotéides entrent dans la constitution des membranes cellulaires et jouent un rôle important dans des phénomènes immunitaires: les antigènes spécifiques des groupes sanguins A, B et 0, présents dans la paroi des hématies humaines, sont des glycoprotéides. Des mucoïdes sont présents dans les membranes, les parois et les capsules bactériennes.

Les liquides biologiques sont généralement très riches en glycoprotéides: mucines, urine, lait, sang. Tous les protéides de ce dernier - mise à part la sérumalbumine - sont des mucoïdes. Parmi eux, nous nous bornerons à citer les anticorps, l'orosomucoïde, la sidérophiline et la céruléoplasmine, formes de transport, respectivement du fer et du cuivre, les haptoglobines, la cytochromophile, la prothrombine et le fibrinogène, ces deux derniers jouant un rôle fondamental dans la coagulation sanguine.

A l'importance biologique des glycoprotéides, s'ajoute l'intérêt clinique. En effet, par exemple, le taux de certains séromucoïdes varie dans de larges proportions dans des cas pathologiques comme le cancer, la tuberculose, le rhumatisme articulaire aigu. L'étude des mucoïdes plasmatiques peut apporter des renseignements précieux concernant le diagnostic ou l'évolution thérapeutique d'une affection.

## C - LES OSES CONSTITUANT LES GLYCOPROTEIDES.

Il n'entre pas dans notre intention de traiter en détail de la chimie des glycoprotéides, de la chimie de la protéine en particulier, et

nous nous bornerons à rappeler que cette dernière résulte de l'enchaînement d'acides aminés unis les uns aux autres par des liaisons peptidiques.

Nous nous étendrons, au contraire, plus longuement sur la chimie des constituants du groupement polyosidique.

Les oses qui entrent dans la composition des mucopolyosides appartiennent à quatre groupes bien distincts:

- les oses "neutres" qui ne possèdent pas de groupements polaires;
- les acides uroniques porteurs d'une fonction acide;
- les osamines qui possèdent une fonction amine;
- les acides sialiques ou acides neuraminiques, de structure plus complexe.

1 - Les oses "neutres":

Les oses "neutres" les plus répandus dans les molécules de glycoprotéides sont des aldohexoses: D-galactose, D-mannose et D-glucose; des aldopentoses: D-xylose, L-arabinose (<sup>X</sup>); des désoxyhexoses: L-fucose, L-rhamnose; des bis-désoxyhexoses(<sup>XX</sup>): ascarylose, tyvélose, abéquose.

2 - Les acides uroniques:

L'acide D-glyuuronique et l'acide L-iduronique sont des constituants des glycoprotéides animaux. Les acides D-galacturonique et D-mannuronique n'ont été caractérisés, jusqu'à présent, que dans des polyosides d'origine végétale et dans des mucopolyosides bactériens.

3 - Les osamines:

Les osamines constituant les glycoprotéides sont essentiellement la D-glucosamine (2-amino-2-désoxyglucose) et la D-galactosamine (2-

---

<sup>X</sup> Le D-arabinose est plus rare. On le trouve par exemple, dans certains polyosides ou mucopolyosides du bacille de Koch.

<sup>XX</sup> Des bis-désoxyhexoses comme l'abéquose et le tyvélose ont été caractérisés dans des polyosides bactériens.

amino-2-désoxygalactose). La D-mannosamine (2-amino-2-désoxymannose) n'a pas encore été caractérisée dans les molécules glycoprotéidiques, mais elle entre dans la constitution des acides sialiques. La D-talosamine ferait partie de la molécule d'un acide chondroïtrine-sulfurique. La D-fucosamine la D-fructosamine et la D-gulosamine ont été isolées récemment à partir de divers glycoprotéides, ainsi que le dérivé N-acétylé d'un acide amino-uronique.

Dans les mucopolysides, les osamines existent sous la forme "neutralisée" de dérivés N-acétylés.

L'acide muramique, constituant de certains mucopolysides de Bactéries, peut être classé parmi les osamines, bien que son métabolisme semble le rattacher aux acides sialiques. Il s'agit, en effet, de la 3,0- $\alpha$ -carboxyéthyl-D-glucosamine. L'acide muramique est N-acétylé dans les mucopolysides.

#### 4 - Les acides sialiques (ou neuraminiques):

Les acides sialiques ou neuraminiques sont des nonoses (oses à 9 atomes de carbone). Selon la nomenclature de Blix et al (1), ce sont des dérivés de substitution de l'acide neuraminique que l'on peut considérer, lui-même, comme le résultat de la condensation aldolique d'une molécule d'acide pyruvique avec une molécule de D-mannosamine (Kuhn et Brossmer)(2). La coexistence, dans leurs molécules, d'une fonction amine et d'une fonction acide en fait des acides nonulosaminiques.

Jusqu'à présent, les acides sialiques suivants ont été isolés:

- a) L'acide N-acétylneuraminique caractérisé pour la première fois dans la mucine sous-maxillaire du Mouton et appelé, pour cette raison, acide sialique de type ovin (acide sialique O). C'est le seul acide sialique dont l'organisme humain soit capable de réaliser la biosynthèse.
- b) L'acide N-glycolylneuraminique ou acide sialique de type porcin (acide sialique P) coexiste avec l'acide N-acétylneuraminique dans les glycoprotéides du Porc.
- c) L'acide N<sub>F</sub>O-4-diacétylneuraminique ou acide sialique de type équi (acide sialique E).
- d) L'acide N<sub>F</sub>O-4,7-triacétylneuraminique ou acide sialique de type bovin (acide sialique B).

La plupart des mucoïdes d'origine animale renferment un ou

plusieurs acides sialiques et la présence de ce(s) composé(s) en quantité importante ; comme c'est le cas dans les sialomucoïdes (l'orosomucoïde, par exemple), confère à ces composés des propriétés particulières: la solubilité est augmentée, le point isoélectrique est abaissé, le comportement électrophorétique est modifié, la réaction à l'acide periodique-fushsine de Schiff est très intense (Montreuil et Biserte (3), Paquin et Percheron (4)). La caractérisation et l'isolement des sialomucoïdes en sont facilités.

#### D - STRUCTURE DES GLYCOPROTIDES.

Au moment où nous avons entrepris nos travaux, seule la détermination de la structure de l'ovomucoïde avait fait l'objet des recherches de Stacey et Woolley (5) qui avaient proposé, en 1942, un schéma structural (voir p. 21 ).

Depuis, de nombreux travaux ont été réalisés dont nous préciserons les résultats dans notre discussion (voir p. 115).

#### II - LES PROTEIDES DU BLANC D'OEUF.

Il n'entre pas dans notre intention de décrire en détail les nombreux protéides qui ont été, jusqu'à présent, caractérisés ou isolés de l'oeuf des Oiseaux. Nous renvoyons, sur ce sujet, aux revues générales de Romanoff et Romanoïff (6), de Warner (7), de Montreuil (8) et de Biserte (9). Nous nous sommes bornée à préciser leurs principales propriétés physiques, chimiques et biologiques qui sont en outre résumées dans les Tableaux I et II.

L'ovalbumine, découverte par Hofmeister (10) en 1890, est le principal constituant protéidique du blanc d'oeuf puisqu'elle représente 60 à 70 % des protéides totaux. Il s'agit d'un glycoprotéide de poids moléculaire 45.000, renfermant 1,8 % d'oses (mannose) et 1,4 % d'osamines (N-acétylglucosamine). L'ovalbumine cristallisée se dissocie en électrophorèse en trois constituants A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub> dont les propriétés physico-chimiques sont actuellement bien connues.

La conalbumine, découverte en 1900 par Osborne et Campbell (11) est un holoprotéide d'un poids moléculaire de 87.000. Elle possède la remarquable propriété de complexer des métaux (2 atomes par molécule de conalbumine) comme le fer, le cuivre, et le zinc.

TABLEAU I

Protéides du blanc  
d'oeuf

	<u>% des protéines totales</u>	<u>Propriétés particulières</u>
<u>Glycoprotéides</u>		
Ovalbumine	60 à 60,5	
Ovomucoïde (ovomucoïde $\alpha$ de Meyer)	9,2 à 14	Inhibe les trypsines
Ovomucine (ovomucoïde $\beta$ de Meyer)	1,1 à 1,9	Inhibe l'hémagglutination des hématies par le virus de Influenza type B.
Globuline G <sub>2</sub>	4,6	
Globuline G <sub>3</sub>	4,3	
Avidine	0,1	Facteur antibiotine
Ovoglycoprotéine	?	
<u>Holoprotéides</u>		
Conalbumine	9 à 16,8	Complexe les métaux
Lysozyme (globuline G <sub>1</sub> )	2,8 à 3,7	Lyse les bactéries.

Le lysozyme, découvert par Fleming (12) en 1922, est un holoprotéide cristallisable de poids moléculaire 14.800. Sa dénomination est liée à son pouvoir de lyse des bactéries. On a récemment démontré que son action lytique était liée à son activité muramidase et qu'elle s'expliquait par une hydrolyse des mucopolysaccharides présents dans la paroi bactérienne et par une destruction de cette dernière. La structure complète du lysozyme a été précisée par Jollès et coll.

L'avidine est un glycoprotéide isolé en 1941 par Eakin, Snell et Williams (13). Elle existe sous trois formes: l'avidine A (P. M. 68.000) de nature glycoprotéidique, l'avidine XA produit de l'association de l'avidine A avec un glycoprotéide acide, l'avidine NA (P. M. 66.000) complexe insoluble dans l'eau, d'avidine A et d'acide désoxyribonucléique. L'avidine possède la propriété de se complexer avec la biotine.

L'ovomucoïde (ovomucoïde  $\beta$  de Meyer) a été décrite pour la première fois par Eichholz (14). C'est un glycoprotéide (P. M. 7,6.10<sup>6</sup>) précipité du blanc d'oeuf par dilution à l'eau.

Les chalazes sont elles aussi de nature glycoprotéidique.

Des globulines G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> et G<sub>3</sub> ont été caractérisées par Hektoen et Cole (15) et par Longsworth et coll. (16). La globuline G<sub>1</sub> a été identifiée au lysozyme, quant aux globulines G<sub>2</sub> et G<sub>3</sub>, il s'agit de glycoprotéides contenant du mannose et une hexosamine.

Récemment, Ketterer (17) a décrit l'ovoglycoprotéide qui n'est pas précipitable par l'acide trichloracétique et dont la composition en oses est la suivante: hexoses 13,6 % (galactose + mannose), osamines (13,8 % ) acide sialique (3 % ).

Des enzymes ont été mis en évidence dans le blanc d'oeuf: tributyrinase, catalase, peptidases, trypsine.

L'ovomucoïde (pseudopeptone de Neumeister, ovomucoïde  $\alpha$  de Meyer) qui fait l'objet de notre étude est un glycoprotéide dont nous exposerons à présent en détail les propriétés après avoir toutefois, esquissé l'historique de sa découverte.

Nous avons rassemblé dans le Tableau II quelques résultats personnels (Jakubczak, Adam, Montreuil (18)) concernant la composition en glucides de glycoprotéides solubles et insolubles du blanc d'oeuf.

TABLEAU II - Composition en oses (calculée pour 10 moles de mannose) de divers glycoprotéides de l'oeuf de poule.

	Galactose	Glucose	Mannose	Fucose	Glucosamine	Galactosamine	Acides sialiques	Acide glycuronique
Ovalbumine	0	0	10	0	11	0	0	0
Ovomucoïde	2	0	10	0	20	0	2	0
Ovomucine	20	0	10	0	36	4	10	0
Chalazes	10	0	10	0	33	3	2,5 <sup>x</sup>	0
Membranes <sup>xx</sup>	5	5	10	8	15	3	0	0
Coquilles								
Protéides insolubles	13	7	10	16	20	30	12	16
Protéides solubles	20	0	10	5	32	16	12	15
Cuticule <sup>xxx</sup>	17	7	10	13	28	22	20	0

<sup>x</sup> Acides N-acétyl-, N,O-diacétyl- et N,O-triacétylneuraminique: 20:1:1. Dans les autres glycoprotéides, seul l'acide N-acétylneuraminique a été identifié.

<sup>xx</sup> Il s'agit de la membrane qui tapisse la face interne de la coquille de l'oeuf.

<sup>xxx</sup> La "cuticule" recouvre la face externe de la coquille de l'oeuf. On l'élimine facilement par action de l'EDTA (sel disodique de l'acide éthylènediaminetétracétique).

### III - L'OVOMUCOÏDE

#### A - HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE ET DE L'ISOLEMENT DE L'OVOMUCOÏDE.

La découverte de l'ovomucoïde est classiquement attribuée à Mörner (1894) (19), cependant nos recherches bibliographiques nous conduisent, sans ambiguïté, à conférer l'antériorité de cette découverte à Neumeister (20) qui, dès 1890, non seulement caractérisait mais isolait le pseudopeptone du filtrat de solutions de blanc d'oeuf portées à l'ébullition et en décrivait les principales propriétés qui sont celles de l'ovomucoïde.

Cependant, quel que soit l'"inventeur" de l'ovomucoïde de nombreux travaux sur les protéides de l'oeuf avaient précédé les siens et lui avaient ouvert la voie.

Vers la fin du siècle dernier on croyait encore que le blanc d'oeuf ne contenait qu'une seule protéine mais bientôt, l'hétérogénéité de sa composition fut démontrée.

En 1873, Bechamp (21) caractérisa en effet trois protéides distincts: deux sont précipitables par l'éthanol dilué, tandis que le troisième reste en solution. L'existence de ce dernier composé fut vérifiée plus tard par Mörner (22), Eichholz (23), Osborne et Campbell (24) et Langstein (25) et l'on sait à présent qu'il s'agissait de l'ovomucoïde.

L'année suivante, Gautier (26) démontrait que le blanc d'oeuf renfermait deux protéides non coagulables par la chaleur. Nous avons vérifié que dans certaines conditions de l'ovalbumine accompagnait l'ovomucoïde dans les filtrats de solutions de blanc d'oeuf portées à l'ébullition.

En 1888-89, Corin et Berard (27), qui avaient précédemment signalé la présence d'une "peptone" dans le blanc d'oeuf fractionnent ce dernier et y trouvent cinq protéides qu'ils appellent albumines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  et ovoglobulines  $\alpha$  et  $\beta$ .

En 1892, Hewlett (28) reprend et critique les travaux de Haycraft et Duggan (29), eux-mêmes inspirés de ceux de Halliburton (30)

concernant la précipitation des protéines sériques par la chaleur. Hewlett a effectuée une étude systématique des conditions de fractionnement des protéides de l'oeuf par la chaleur et caractérise au moins trois composants.

En 1894, Mörner (31) décrit trois méthodes de préparation d'un "mucoïde" du blanc d'oeuf, fondées sur la précipitation par l'alcool ou par les sels neutres du filtrat d'une solution de protéides de l'oeuf préalablement portée à l'ébullition. A ce protéide non dénaturable par la chaleur, Mörner donnait le nom d'ovomucoïde. Cependant dès 1890, Neumeister (32) avait décrit la préparation d'une pseudopeptone différente disait l'auteur de l'ovalbumine et de l'ovoglobuline et obtenue par un procédé inspiré par les travaux de Gorin et Berard. Le principe de la préparation de la pseudopeptone de Neumeister est le suivant: la solution aqueuse de blanc d'oeuf acidifiée par l'acide acétique est portée à l'ébullition. Le filtrat est saturé avec du sulfate d'ammonium. Le précipité formé est dissous dans l'eau et la solution obtenue dialysée; la pseudopeptone est précipitée par addition d'éthanol.

Plusieurs méthodes fondées sur le même principe furent ensuite décrites par différents auteurs: Eichholz (33), Osborne et Campbell (34), Longsworth, Cannan et Mac Innes (35), Hektoen et Cole (36), Werner et Odin (37).

En 1934-1936, la présence dans le blanc d'oeuf d'un inhibiteur de la trypsine fut démontrée par Balls et Swenson (38) et par Meyer et coll. (39). Seulement, onze ans plus tard, Lineweaver et Murray (40) identifièrent l'inhibiteur trypsique à l'ovomucoïde, et leurs travaux leur donnèrent l'occasion de décrire une nouvelle méthode de préparation de l'ovomucoïde. Ces auteurs avaient en effet observé que l'activité antitrypsique se trouvait en totalité dans le filtrat de défécation acétono-trichloracétique du blanc d'oeuf d'où il était aisé de le précipiter par l'addition d'acétone. La substance obtenue possède toutes les propriétés de l'ovomucoïde de Mörner. Fredericq et Deutsch (41) adoptèrent le principe de la défécation trichloracétique suivie d'une précipitation par l'éthanol de l'ovomucoïde.

En 1950, Forsythe et Foster (42) ont décrit une technique de fractionnement éthanolique des protéides de l'oeuf fondée sur le principe de la méthode de fractionnement des protéides sériques de Cohn et coll. (43). Le procédé fournit malheureusement des préparations très hétérogènes et la "fraction IV" contient l'ovomucoïde accompagné de nombreux autres protéides.

L'application à l'isolement de l'ovomucoïde des méthodes modernes de chromatographie sur des colonnes d'échangeurs d'ions n'a fait

l'objet , jusqu'à présent, que d'un très petit nombre de travaux dont les résultats ne sont pas satisfaisants, mais il est hors de doute qu'elles seront plus largement utilisées dans un avenir proche.

## B - PROPRIETES PHYSIQUES.

### 1 - Solubilité :

L'ovomucoïde est très soluble dans l'eau et ses solutions aqueuses sont très stables. Il n'est pas précipité par l'ébullition ni par l'acide trichloracétique. Il est précipité de ses solutions aqueuses par le sulfate d'ammonium à saturation, par 4 volumes d'acétone à pH 3, 5, ou par l'éthanol avec une concentration finale en alcool de 42 %.

### 2 - Comportement électrophorétique :

Les préparations d'ovomucoïde sont hétérogènes en électrophorèse libre. Dans un tampon véronal de pH 8,6 et de force ionique 0,1, l'ovomucoïde de Fredericq et Deutsch donne deux pics (44). En réduisant la force ionique à 0,01, cinq pics sont visibles à des pH variant de 4 à 8,6 (Bier et al) (45). Le constituant principal, isolé par électrophorèse préparative possède une activité antitrypsique égale à celle de l'ovomucoïde résiduel.

Ces résultats ont été confirmés par l'étude en électrophorèse de zone de l'ovomucoïde de Jutisz et coll. (46).

Le comportement électrophorétique de l'ovomucoïde est une énigme. Il est difficile en effet de conclure à l'hétérogénéité de cette substance car les diagrammes d'ultracentrifugation révèlent toujours l'existence d'un seul constituant à des pH variant de 1,4 à 11,6 (Alderton et Fevold (47), Bier, Duke, Gibbs et Nord (48), Young (49)).

### 3 - Poids moléculaire :

L'ovomucoïde préparé selon le procédé de Fredericq et Deutsch possède une constante de sédimentation :  $S_{20w}$  de 2,8 et une constante de diffusion :  $D_{20w}$  de 8. Son volume spécifique partiel :  $V_{20}$  est de 0,685. On en déduit que son poids moléculaire est de 27.000 (Fredericq et Deutsch (50)). Ce résultat concorde avec la valeur de 28.800 déterminée par la mesure de la pression osmotique (Lineweaver et Murray) (51).

#### 4- Point isoélectrique:

Le point isoélectrique de l'ovomucoïde possède une valeur de 3,9 (Fredericq et Deutsch) (52).

#### C - PROPRIETES CHIMIQUES.

La nature glycoprotéidique de l'ovomucoïde ne fut admise qu'en 1898 par Eichholz (53).

La présence de glucides liés aux protéides du blanc d'oeuf avait été démontrée par Pavy en 1894 (54): l'hydrolyse sulfurique détache en effet du coagulum des protéides de l'oeuf dénaturé par la chaleur, une substance qui réduit la liqueur de Fehling et donne l'osazone du glucose (PF: 189-212). Pavy classa ces protéides parmi les glucosides conformément à l'opinion déjà exprimée en 1885 par Krukenberg (55).

En 1896, Krawkow (56) obtint lui une osazone de point de fusion 182-185° à partir des hydrolysats de blanc d'oeuf coagulés par la chaleur mais conclut que le glucide n'était pas du glucose, que l'osazone n'était qu'un artéfact et que " le résultat obtenu était sans importance du point de vue du métabolisme des glucides".

Cependant, Eichholz en 1898 (57) impressionné par les résultats de Pavy et par ceux de Schutzenberger (58) qui avait observé la présence d'une substance réductrice non azotée dans les produits de décomposition des protéides, reprit les travaux de Krawkow et identifia la glucosazone par son point de fusion dans les produits d'hydrolyse sulfurique d'une préparation d'ovomucoïde. A la suite de l'identification de la glucosamine et d'acide sulfurique dans les produits d'hydrolyse de l'ovomucoïde l'hypothèse fut émise que ce dernier contenait un mucopolysaccharide acide associé par une liaison ionique labile à une protéine, mais elle fut infirmée dès 1900 par Levene (59). On admit donc que le groupement polyosidique était neutre et constitué d'osés et d'osamines mais aucune preuve ne pouvait être apportée qu'il fut lié à une protéine. Les préparations d'ovomucoïde pouvaient donc parfaitement résulter du mélange d'un polyoside et d'une protéine.

En 1929, seulement Levene et Mori (60) démontrèrent que les glucides sont énergiquement liés à la protéine et que seule une hydrolyse sodique réalisée à chaud selon le procédé de Fraenkel et Jellinek (61) peut

dissocier la combinaison, et les auteurs conclurent "that this result indicates the existence of an intimate union between protein and polysaccharide, one more intimate than that of the ions of an ionizable salt".

Actuellement la nature glycoprotéidique de l'ovomucoïde est définitivement établie. En effet, il ne peut s'agir d'un mélange de polysides et de protéines dont la séparation serait aisée en appliquant les méthodes modernes d'analyse chromatographique ou électrophorétique. L'étude chimique de chacune des deux fractions des glycoprotéides a fait l'objet de nombreuses études et nous nous proposons à présent d'exposer rapidement l'historique concernant la connaissance chimique de la fraction glucidique et de la fraction protéique.

#### 1- Chimie du groupement polyosidique:

Bien que l'ovomucoïde ait été isolé dès 1894, sa composition glucidique en particulier ne fut connue que 50 ans plus tard.

La glucosamine, grâce à ses propriétés particulières, fut identifiée dès 1896 par Weydeman (62) dans les produits d'hydrolyse alcaline de l'ovomucoïde, puis par Zanetti (63) accompagnée, précisait l'auteur, d'acide sulfurique dans les hydrolysats chlorhydriques. Ces résultats furent confirmés par Langstein (64) en 1903 qui infirmait en outre, la présence d'acide sulfurique, et par Oswald (65) en 1910. Plus tard, la présence de la glucosamine fut définitivement établie grâce à l'application des méthodes modernes d'analyse.

La détermination de la nature des oses fut plus longue et plus délicate. Certes, très tôt, la phénylglucosazone avait été identifiée dans les produits de l'action de la phénylhydrazine sur des hydrolysats acides d'ovomucoïde, mais ce résultat ne permettait pas de conclure à la présence de glucose; en effet, glucose, mannose, fructose, glucosamine et mannosamine fournissent la même osazone. L'existence du mannose fut démontrée pour la première fois en 1927 par Fraenkel et Jellinek (66) qui l'identifièrent par sa phénylhydrazone, à côté de la glucosamine caractérisée sous la forme de chlorhydrate. En 1929, Levene et Mori (67) confirmèrent ce résultat.

Le galactose fut trouvé dans les hydrolysats d'ovomucoïde par Sørensen (68) en 1934, puis par Stacey et Woolley, en 1940-1942 (69). Cependant, en 1945, Meyer infirmait la présence de galactose et attribuait à la fraction glucidique de l'ovomucoïde la composition suivante: mannose-acétyl-glucosamine (1:1) (70).

Mais l'application de méthodes de coloration spécifiques et des techniques modernes d'analyse chromatographique ont définitivement établi que les oses constituant l'ovomucoïde étaient le galactose, le mannose et la N-acétylglucosamine. A ces composés est venu récemment s'ajouter l'acide N-acétylneuraminique.

Nous avons rassemblé dans le Tableau III, classés par ordre chronologique, les résultats de différents auteurs concernant la composition en glucides de l'ovomucoïde. On constatera que ces résultats sont assez discordants et cette observation a été à l'origine de notre étude critique des méthodes de préparation et de détermination de la composition de l'ovomucoïde.

## 2 - Chimie de la fraction protéique.

La composition en acides aminés de l'ovomucoïde a été déterminée par Lewis et al (90). Elle est précisée dans le Tableau IV.

L'acide aminé N-terminal est l'alanine (0,64 à 0,94 molécules/molécule d'ovomucoïde de poids moléculaire 28.000) (Fraenkel-Conrat et Porter (91)).

L'acide aminé C-terminal est la phénylalanine (0,8 molécules /molécule d'ovomucoïde) (Penasse et al (92), Turner et Schmerzler (93)). Ces résultats sont en faveur de l'existence d'une seule chaîne peptidique dans la molécule d'ovomucoïde.

## D - STRUCTURE DE L'OVOMUCOÏDE.

Après avoir infirmé l'hypothèse d'une association ionique acide mucoïtine sulfurique-protéine dans l'ovomucoïde, Levene et Suarez (95) et Levene et Mori (96) proposèrent en 1929 le schéma structural résultant de l'association de la protéine avec des unités polyosidiques constituées par le triholoside: glucosamine-dimannoside. Meyer (97) corrigea cette conception en proposant le schéma d'un diholoside du mannose et de la glucosamine.

A la suite d'expériences de méthylation Stacey et Woolley (98) attribuèrent au groupement polyosidique la structure suivante (figure 1).

TABLEAU III

Composition en glucides de l'ovomucoïde selon différents auteurs.

	Glucides (%)	Oses (%)	Osamines (%)	Acide sialique (%)	Oses Osamines	Composition en moles <sup>x</sup>
Hofmeister, 1898	(71) 15					
Seemann, 1898	(71a) 29,4					
Langstein, 1900	(71b) 10,5					
Willanen, 1906	(71c) 20					
Pavy, 1907	(71d) 21,7					
Samuely, 1911	(71e) 34,9					
Neuberg et Schenkel 1912	(71f) 24					
Izumi, 1925	(71g) 26,3		12,28			GlcNHAc
Needham, 1927	(71h) 11,5					
Levene et Mory, 1929	(71i)				0,5	Man, GlcNHAc (1:2)
Sørensen, 1934	(71j)	9,2				Gal, Man (1:3)
Karlberg, 1936	(71k) 23,7	10,2	13,5		0,76	
Masamune et Hoshino 1936	(71l) 25	12,5	12,5		1	
Hesselvik, 1938	(72) 12,5					
Hewitt, 1938	(73)	10,5	9,5		1,1	Gal, Man
Gurin et Hood, 1939	(74) 25	12,5	12,5		1	
Stacey et Woolley, 1940-1942	(75)				0,57	Gal, Man, GlcNHAc (1:3:7)
Meyer, 1945	(76) 22 à 26	10	12 à 16			Man, GlcNHAc (1:1)
Guirard et al. (1946)	(77) 23,7	10,2	13,5		0,75	
Linsleeve, Murray, 1947	(78) 21,6					
Frédéricq, Deutsch, 1949	(79) 26,7	9,7	17		0,57	Gal, Man, GlcNHAc (2:7:9)
Dixon, 1955	(80)	10	9,2		1,09	" (1:3:10)
Gottschalk et Ada, 1956	(81)	5,7	14,1	2	0,4	" (1:3, 3:7)
Odin, 1958	(82)	8,6-9	14-15	1	0,60	
Rhodes et al., 1960	(83)			0,5		
Feeney et al., 1960	(84)			0,7		
Bragg et Hough, 1961	(85)	8	12,3	0,65	0,65	" (1:3,7:7,2)
Hartley, Jevons, 1962	(86)					" (1:3,5:7)
Chatterjee et al., 1962	(87)	5,7	14,6	0,40		" (1:4,7:14)
Harbon, 1963	(88)	8,8	13	0,9	0,68	" (1:3:6)
Montreuil, Biserte, Chosson, 1963	(89)	8,8	14,2	0,8	0,62	" (1:5:9)

<sup>x</sup> Gal: galactose, Man: mannose, GlcNHAc: N-acétylglucosamine.

TABLEAU IV

Composition en acides aminés de l'ovomucoïde  
(Lewis et al) (94).

	en %	en résidus/ molécule
Acide aspartique	13,0	28
Acide glutamique	6,5	13
Alanine	2,3	7
Glycine	3,8	15
Valine	6,0	15
Leucine	5,1	11
Isoleucine	1,43	3
Proline	2,72	7
Phénylalanine	2,91	5
Tyrosine	3,18	5
Tryptophane	0,3	0,4
Sérine	4,2	11
Thréonine	5,5	13
Cystine/2	6,7	8
Cystéine	-	-
Méthionine	0,95	2
Arginine	3,7	6
Histidine	2,15	4
Lysine	6,0	12
Azote amidé	(21)	(1,0)

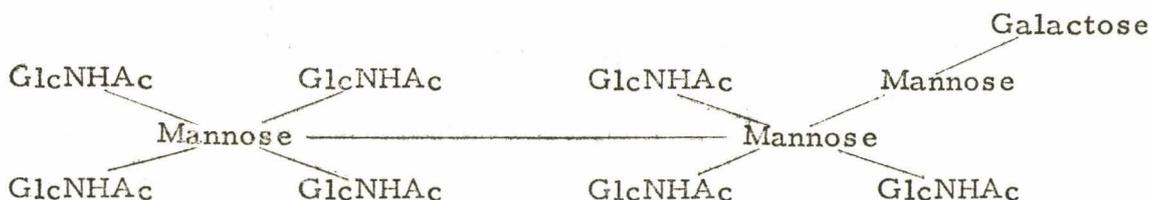


Figure 1

Schéma de structure du groupement polyosidique de l'ovomucoïde proposé par Stacey et Woolley (1940-1942).

En 1961, Bragg et Hough (99) ont repris les expériences de méthylation des auteurs précédents, en appliquant, en outre, la méthode d'hydrolyse ménagée et le procédé d'oxydation par l'acide periodique à l'isolement et à l'étude de la structure d'osides. Ils n'ont pu démontrer le schéma de Stacey et Woolley mais ils ont, cependant, confirmé la réalité de certains motifs structuraux en identifiant par exemple le 2, 3, 4, 6-tétraméthylgalactose, un mannobiose et une mannosylglucosamine. Nous verrons cependant plus loin que nos résultats concernant la composition en oses de l'ovomucoïde et sa constitution ne sont nullement en accord avec le schéma proposé par Stacey et Woolley.

Quand nous avons entrepris nos travaux en 1960, notre connaissance de la structure de l'ovomucoïde était on le voit bien vague. En outre, des discordances se manifestaient entre les résultats concernant sa composition en glucides et il devenait indispensable de la préciser une fois pour toutes. En effet, l'étude de la structure d'une substance ne peut se concevoir que si sa composition molaire est parfaitement connue. Il est, en effet, évident que l'interprétation des résultats fournis par l'étude des produits d'hydrolyse partielle lors de la reconstitution du "puzzle moléculaire" serait différente suivant qu'elle serait faite sur la base des rapports molaires galactose, mannose, N-acétylglucosamine 1:3:7 (Stacey et Woolley (100)), 1; 3, 7:7, 2 (Bragg et Hough(101)) ou 1:5:10 (résultats personnels). Aussi, notre premier but fut-il d'effectuer l'étude critique des différentes méthodes d'isolement de l'ovomucoïde décrites jusqu'à présent et de préciser la composition en oses et les principales caractéristiques physico-chimiques des préparations obtenues.

T R A V A U X  
P E R S O N N E L S

-----

# CHOIX D'UNE METHODE DE PREPARATION DE L'OVOMUCOÏDE

---

## I - PREPARATION DE L'OVOMUCOÏDE.

Nous avons exposé dans la Partie historique le principe des méthodes d'isolement de l'ovomucoïde qui ont été décrites. Leur nombre élevé laisse présager à quel point elles sont imparfaites. Le but que nous nous sommes fixé a été d'appliquer ces méthodes à la préparation de l'ovomucoïde de l'oeuf de poule et d'effectuer systématiquement l'étude physique, chimique et immunoélectrophorétique des différents échantillons obtenus.

Nous nous sommes proposé, en effet, de réaliser une étude critique des méthodes d'isolement et de vérifier, en particulier, l'homogénéité et l'intégrité chimique de l'ovomucoïde obtenu de différentes manières.

Les procédés de préparation de l'ovomucoïde sont tous fondés sur la grande stabilité de la molécule de ce glycoprotéide due à sa richesse en glucides (25 % des glucides totaux). L'ovomucoïde, en effet, n'est dénaturé ni par la chaleur, ni par l'acide trichloracétique, ni par l'éthanol, ni par l'acétone. A cet égard, ses propriétés sont voisines de celles de l'orosomucoïde, séromucoïde acide  $\alpha_1$  du sang humain.

Les différentes méthodes d'isolement suivant les procédés de dénaturation des protéides de l'oeuf autres que l'ovomucoïde que nous avons effectuées sont les suivantes:

### A - Dénaturation par la chaleur

- 1- Procédé de Neumeister
- 2- Procédés de Mörner
- 3- Procédé de Werner et Odin
- 4- Procédé de Longsworth et coll.

B - Dénaturation par l'acide trichloracétique

- 1- Procédé de Fredericq et Deutsch
- 2- Procédé de Lineweaver et Murray

C - Dénaturation par le phénol par une adaptation personnelle du procédé de Michon.

## A - DENATURATION PAR LA CHALEUR.

### 1 - Procédé de Neumeister (102)

Le blanc d'oeuf est additionné de 3 volumes d'eau distillée, ajusté à pH 6 avec de l'acide chlorhydrique 2 N, et porté à l'ébullition pendant 5 minutes sous agitation. Le filtrat est saturé en sulfate d'ammonium à pH 4,6. Le précipité obtenu est dissous dans de l'eau distillée, dialysé et lyophilisé. La poudre obtenue est dissoute dans l'eau distillée et la solution est additionnée de 5 volumes d'éthanol absolu.

Le précipité est denouveau dialysé et lyophilisé.

100 ml de blanc d'oeuf fournissent 0,6 g d'ovomucoïde de Neumeister.

### 2 - Procédés de Mörner:

#### a) Premier procédé:(103)

Le blanc d'oeuf est porté à l'ébullition dans des conditions identiques aux précédentes. Le filtrat est précipité après concentration de moitié par de l'éthanol absolu. Le précipité recueilli par centrifugation au bout de 30 minutes est soumis à une nouvelle précipitation alcoolique (4 heures de contact à  $-8^{\circ}$ ). Le précipité final est dialysé et lyophilisé.

On obtient à partir de 100 ml de blanc d'oeuf 0,5 g d'ovomucoïde de Mörner I.

#### b) Deuxième procédé (104):

Le filtrat d'ébullition du blanc d'oeuf traité dans les mêmes conditions que précédemment est saturé en sulfate de sodium à pH 7,5 et porté à l'ébullition pendant 2 minutes. Le précipité gommeux formé est traité par l'eau distillée. Le filtrat est précipité par 5 volumes d'éthanol absolu (4 heures de contact à  $+20^{\circ}$ ), et le précipité est dialysé et lyophilisé.

Le rendement est de 0,05 g d'ovomucoïde de Mörner II pour 100 ml de blanc d'oeuf.

3 - Procédé de Werner et Odin (105):

Le blanc d'oeuf dilué avec 4 volumes d'eau est ajusté à pH 4,7 avec de l'acide chlorhydrique 1 N et maintenu à l'ébullition pendant 3 à 4 heures sous agitation dans un appareil muni d'un réfrigérant à reflux. Le filtrat est concentré par lyophilisation au sixième de son volume et précipité par 6 volumes d'éthanol à -15°. Après un contact de 4 heures à -8°, on recueille un précipité qui est soumis deux fois encore au même fractionnement éthanolique. Le précipité final est dialysé et lyophilisé.

On isole 300 mg d'ovomucoïde de Werner et Odin à partir de 100 ml de blanc d'oeuf.

4 - Procédé de Longsworth et coll. (106):

Le blanc d'oeuf dilué au demi avec de l'eau distillée est précipité par du sulfate d'ammonium (concentration finale: 133 g pour 2 litres) à pH 4,6. Le filtrat est saturé en sulfate d'ammonium et, après un contact d'une nuit, on recueille un précipité qui est dissous dans de l'eau et porté à l'ébullition pendant 15 minutes. Le filtrat est dialysé, concentré et précipité à pH 4,4 et à 0° par deux volumes d'éthanol.

Le précipité obtenu est dialysé et lyophilisé. 100 ml de blanc d'oeuf fournissent 0,04 g d'ovomucoïde de Longsworth.

B - DENATURATION PAR L'ACIDE TRICHLORACETIQUE.

1 - Procédé de Fredericq et Deutsch (107):

Le procédé est illustré par la figure 2

2 - Procédé de Lineweaver et Murray (108):

Le blanc d'oeuf est traité par un volume d'une solution acétonique d'acide trichloracétique (1 volume de solution aqueuse d'acide trichloracétique 0,5 M + 2 volumes d'acétone) sous agitation constante à la température ordinaire. Après un contact de 20 minutes on élimine le précipité par filtration. La solution abandonnée à 0° pendant une nuit est

1 volume de blanc d'oeuf homogénéisé  
ajusté à pH 3,5 ( $H_2SO_4$  N)  
+ 1 volume de solution aqueuse de trichlor-  
acétate de Na à 10% (p:v) ajusté à pH 3.  
pH final ajusté à 3,5 -  
Repos une nuit à température ordinaire  
Filtrer sur Büchner

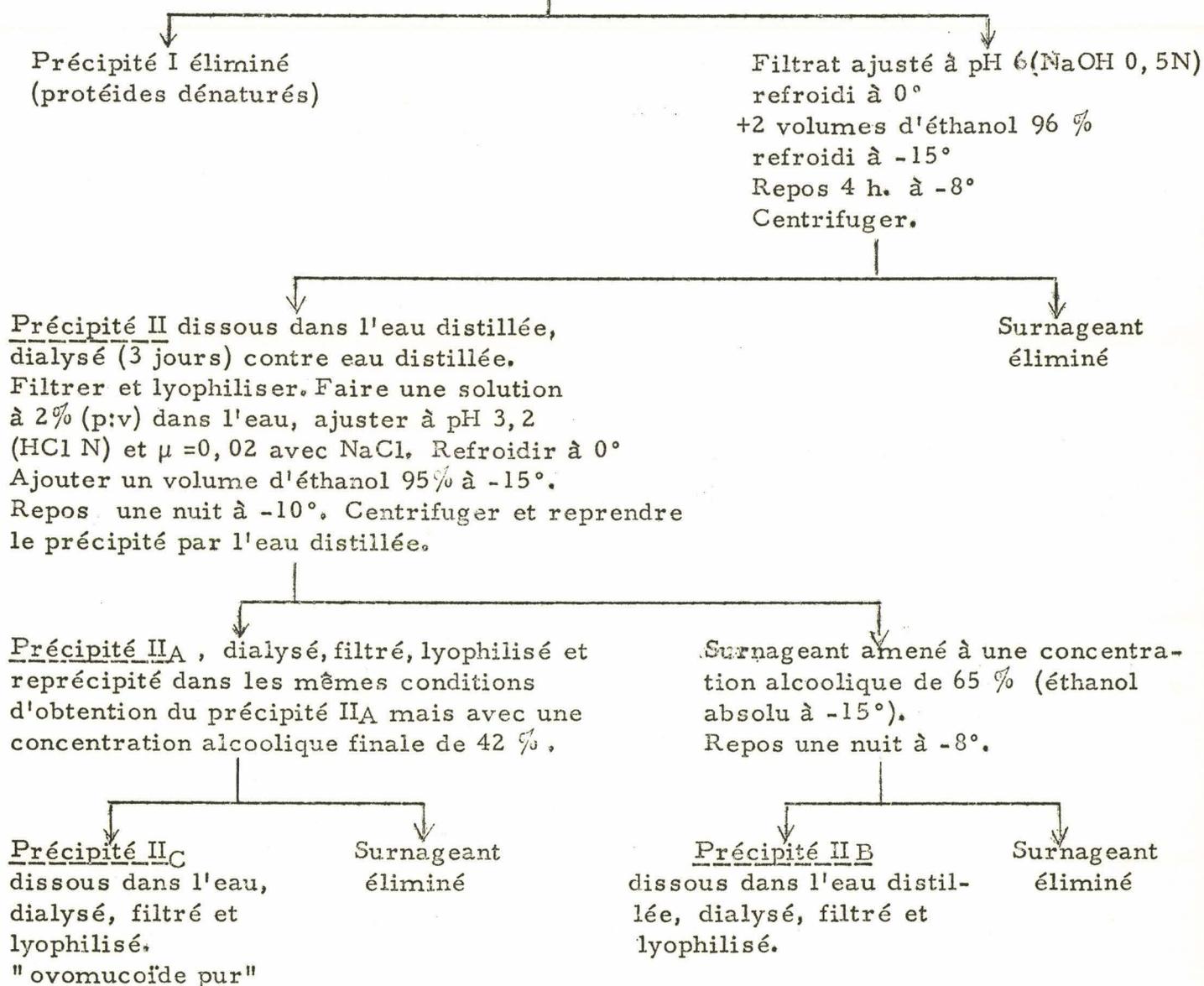


Figure 2

Isolement de l'ovomucoïde de Fredericq et Deutsch (107)

(Rendement : 0,73 g d'ovomucoïde II<sub>C</sub> et 3,85g d'ovomucoïde II<sub>B</sub> pour 1200 ml de blanc d'oeuf).

Le précipité II constitue l'ovomucoïde "brut".

débarassée éventuellement du précipité formé et additionnée de 2, 25 volumes d'acétone. Le précipité est dialysé et soumis de nouveau à une précipitation acétonique. Le produit obtenu est dialysé et lyophilisé.

Le rendement d'ovomucoïde de Lineweaver et Murray est de 0,5 g pour 100 ml de blanc d'oeuf.

## C - DENATURATION PAR LE PHENOL.

Michon (109) a décrit une méthode de préparation de l'orosomucoïde par dénaturation des protéides plasmatiques par le phénol. L'orosomucoïde est précipité du filtrat phénolique par le sulfate d'ammonium. Il est ensuite purifié par un fractionnement éthanolique.

Nous avons tenté d'appliquer ce procédé à l'ovomucoïde dont les caractères de solubilité sont ceux de l'orosomucoïde. Le mode opératoire que nous avons suivi est illustré par la figure 3.

Les différentes préparations obtenues ont été soumises aux méthodes classiques de l'analyse chimique, physique et immunoélectrophorétique en vue de déterminer leur degré de pureté.

## II - ETUDE CHIMIQUE.

Nous nous sommes essentiellement attachée à l'étude de la fraction glucidique des préparations d'ovomucoïde que nous avons effectuées. Nous en avons déterminé la teneur en oses, osamines et acide sialique, et après les avoir identifiés, nous avons précisé les rapports molaires de chacun des oses.

### A - METHODES.

#### 1- Dosage colorimétrique des oses totaux.

Les glucides neutres totaux ont été déterminés par la méthode à l'orcinol sulfurique de Tillmans et Philippi (110), modifiée par Rimington (111).

Les osamines totales ont été dosées après une hydrolyse effectuée par l'acide chlorhydrique 4 N pendant 4 heures, à 100°, par

150 ml de blanc d'oeuf  
+ 150 ml d'eau distillée  
+ 60 g de NaCl

Ajouter goutte à goutte sous agitation, 375 ml de phénol à 5%  
Maintenir l'agitation 12 h. à température ordinaire - Centrifuger.

Précipité éliminé  
(Protéides dénaturés)

Surnageant

Dialyser contre eau courante 2 j. puis contre eau distillée 2 j. Filtrer - Lyophiliser et dissoudre la poudre obtenue dans 50 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 3,8 (ac. acétique) - Ajouter goutte à goutte 1,5 volume de sulfate d'ammonium 4 M. Maintenir 4 h. à 4° - Centrifuger.

Précipité éliminé

Surnageant

Saturer en sulfate d'ammonium et laisser reposer 12 h. à 4°. Centrifuger.

Précipité dissous dans 100 ml d'eau distillée, dialysé (3 j.) filtré, lyophilisé.  
Dissoudre la poudre obtenue dans 50 ml de tampon acétate de Na 0,02 M, pH 4,65. Ajouter du chlorure de Na 0,04 M - Ajouter 1 volume d'éthanol à 0° - Centrifuger

Surnageant éliminé

Précipité éliminé

Surnageant. Ajuster la concentration alcoolique à 80%. Centrifuger.

Précipité dialysé et lyophilisé (0,22 g)

Surnageant éliminé.

Figure 3

Préparation de l'ovomucoïde par le phénol  
(adaptation de la méthode de Michon (109)).

la méthode d'Elson et Morgan (112).

La teneur en acides sialiques a été précisée par l'application de la méthode à la diphénylamine de Werner et Odin (113).

## 2- Identification et dosages chromatographiques et électrophorétiques des glucides.

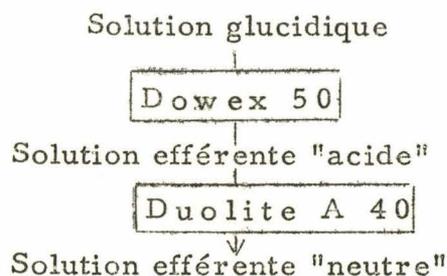
### a) Oses neutres:

Nous avons identifié et dosé les oses entrant dans la constitution de l'ovomucoïde en appliquant le mode opératoire décrit par Montreuil (114) et par Montreuil et Scheppler (115).

#### Principe:

L'identification et le dosage individuel des glucides ont été effectués par chromatographie sur papier après purification des solutions à étudier; en effet, la présence d'ions minéraux, en particulier, provoque des "trainées" et rend impossible la lecture des chromatogrammes. Il convient donc d'en débarrasser les solutions glucidiques obtenues par hydrolyse acide des glycoprotéides.

Cette "démminéralisation" est réalisée par le passage successif sur des colonnes de résine à échange de cations (Dowex 50, forme acide), puis d'anions (Duolite A 40, forme formiate). Le mode opératoire est illustré par le schéma suivant:



Le mode opératoire que nous avons suivi comporte plusieurs étapes:

- hydrolyse de l'ovomucoïde
- purification de l'hydrolysat
- chromatographie des oses
- dosage des oses.

### Mode opératoire:

- Hydrolyse de l'ovomucoïde: 125 mg d'ovomucoïde sont hydrolysés par 15 ml d'acide chlorhydrique 2 N pendant 2 heures, à 100°.
- Purification de l'hydrolysate: l'hydrolysate est passé successivement sur une colonne de Dowex 50 (forme H<sup>+</sup>) (25 x 2 cm), puis une colonne de Duolite A 40 (forme formiate) (25 x 2 cm). Le liquide effluent est évaporé à siccité. Le résidu est repris par 1 ml d'eau distillée et soumis à l'analyse chromatographique sur papier (10 à 25 µlitres sur papier Whatman n°1 ou 15 à 30 µlitres sur papier Whatman n°3).
- Chromatographie des oses: La chromatographie est effectuée dans le solvant de Partridge (116): n-butanol, acide acétique, eau (4:1:5) pendant 2 jours. Après séchage, des chromatogrammes à température ordinaire, les oses sont révélés par le réactif à l'oxalate d'aniline de Partridge<sup>x</sup> (117). Les oses donnent des taches brunes sur fond blanc.
- Dosage des oses: le dosage est effectué selon le mode opératoire décrit par Montreuil (118) dont le principe est le suivant: les oses réduisent en milieu alcalin le ferricyanure de potassium en ferrocyanure. 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.

### b) Osamines:

Les hexsamines sont d'abord libérées du groupement polyosidique par une hydrolyse chlorhydrique (HCl 4 N, pendant 4 heures, à 100°). L'acide chlorhydrique est éliminé par dessiccation sous vide en présence de soude. La séparation chromatographique des osamines n'étant pas satisfaisante, nous les avons identifiées par les procédés de Gardell, Heijkensjold et Rochnorlund (120) et de Gardell (121). Le dosage est effectué suivant la méthode décrite par Gardell (123).

---

x

Solution aqueuse d'acide oxalique à 2,5 % 3 volumes

Solution éthanolique d'aniline à 2 % 2 volumes

Le mélange est pulvérisé sur les chromatogrammes. Les oses sont révélés après un séjour de 5 à 10 minutes à l'étuve à 105°.

#### Méthode de désamination de Gardell et al (124):

- Principe: La glucosamine et la mannosamine d'une part, la galactosamine d'autre part, sont désaminées à chaud par la ninhydrine respectivement en arabinose et en lyxose qui sont aisément identifiés par chromatographie.
- Mode opératoire: Le résidu sec de l'évaporation de l'hydrolysate chlorhydrique d'ovomucoïde correspondant à 4-5 mg d'osamine est traité à 100° pendant 30 minutes par deux ml d'une solution de ninhydrine (ninhydrine 0,48 g dans 100 ml de citrate de sodium 0,1 M, pH 4,7). La solution est purifiée par passage sur Dowex 50 et Duolite A 40 (20 x 1,8 cm); le liquide effluent est chromatographié dans le solvant de Partridge (voir page 30) ( $R_g$  par rapport au glucose: arabinose 1,2, lyxose 1,4) et dans le solvant de Jermyn et Isherwood (125): pyridine-acétate d'éthyle-eau (1:2:2) ( $R_f$  de l'arabinose 0,23, du lyxose 0,30). Les pentoses sont révélés à l'oxalate d'aniline (voir page 30).

#### Méthode de chromatographie sur colonne de Gardell (126):

- Principe: les osamines sont identifiées par chromatographie sur des colonnes d'échangeurs de cations (Dowex 50).
- Mode opératoire: le résidu sec d'une partie aliquote de l'hydrolysate chlorhydrique de l'ovomucoïde correspondant à 1 mg d'osamines totales est repris par 0,25 ml d'acide chlorhydrique 0,3 N. La solution est déposée au sommet d'une colonne de Dowex 50, grain 200-400 (40 x 0,7 cm) préalablement activée par l'acide chlorhydrique 4 N et lavée avec 100 ml d'acide chlorhydrique 0,3 N. Les osamines sont déplacées par une solution d'acide chlorhydrique 0,3 N. Des fractions de 1 ml sont recueillies toutes les 20 minutes à l'aide d'un collecteur de fractions dans des tubes jaugés à 15 ml et les osamines sont dosées par la méthode d'Elson et Morgan. Les courbes de concentration sont tracées, la glucosamine et la mannosamine constituent le premier pic d'élution qui est suivi de celui de la galactosamine.

#### Méthode électrophorétique de Foster (127):

- Principe: Les osamines préalablement libérées par une hydrolyse chlorhydrique sont réacétylées par le procédé de Levvy et Mac Allan (128) sous la forme de N-acétylosamines qui sont aisément séparées par électrophorèse sur papier et dosées colorimétriquement par la méthode de Reissig, Strominger et Leloir (129).

- Mode opératoire:

Hydrolyse chlorhydrique: les osamines sont libérées par une hydrolyse chlorhydrique classique (voir plus haut) et l'acide chlorhydrique est éliminé par lyophilisation.

Réacétylation: le résidu est repris par 1 ml de soude 1 N puis par 75  $\mu$ l d'anhydride acétique. Après un contact de 20 minutes à la température ordinaire au cours duquel on agite de temps en temps la solution est évaporée à siccité. Le résidu est repris par 4 ml de méthanol et la solution est passée sur des petites colonnes d'échangeurs d'anions (Duolite A 40, forme formiate) Le liquide effluent est évaporé à siccité.

Electrophorèse: le résidu est repris par l'eau et soumis à une électrophorèse sur papier d'Arches n° 304 en tampon borate 0,025 M de pH 9,2 (12 volts/cm, 4 heures). La révélation est effectuée avec le réactif d'Elson et Morgan modifié par Partridge (130).

Dosage: à 0,7 ml de solution de N-acétylosamine (20 à 40  $\mu$ g), on ajoute 0,5 ml d'une solution de tétraborate de potassium 0,7 M de pH 9,2. On porte au bain-marie bouillant pendant 3 minutes en tubes bien bouchés, puis après refroidissement on ajoute 6 ml de réactif au para-diméthylaminobenzaldéhyde (solution à 10 % de p-diméthylaminobenzaldéhyde dans l'acide acétique à 12,5 % d'acide chlorhydrique 10 N, diluée au 1/10 au moment de l'emploi avec de l'acide acétique). Les tubes sont agités, bouchés et maintenus pendant 20 minutes à 37°. Après refroidissement, les absorbances sont déterminées à 585 m $\mu$ .

c) Acides sialiques:

Principe:

Les liaisons des acides sialiques sont très fragiles en milieu acide. Ces composés seront donc libérés aisément par une hydrolyse sulfurique douce, ils seront ensuite purifiés sur un échangeur de cations puis identifiés par chromatographie sur papier.

Mode opératoire:

- Hydrolyse des liaisons "sialyl": 100 mg d'ovomucoïde sont traités par 20 ml d'acide sulfurique 0,1 N à 80° pendant 1 heure. L'hydrolysat est neutralisé par l'eau de baryte et le précipité de sulfate de barium est éliminé par centrifugation.

- Purification des hydrolysats: le surnageant est passé sur des colonnes d'échangeurs de cations (Dowex 50, forme H<sup>+</sup>, 5 x 1 cm) puis d'anions (Dowex 1 x 8, forme formiate, 5 x 1 cm). L'échangeur d'anions est lavé soigneusement à l'eau distillée, les acides sialiques en sont alors élués par le passage d'environ 20 ml d'acide formique 0,38 N. L'éluat est lyophilisé.
- Identification des acides sialiques par chromatographie sur papier: le résidu précédent est repris par 0,1 ml d'eau distillée et 10 à 20 µlitres sont soumis à une chromatographie sur papier Whatman n° 3 dans le solvant de Svennerholm et Svennerholm (131) (n-butanol, n-propanol-HCl 0,1 N, 1:2:1) pendant 24 heures; les acides sialiques sont révélés par le réactif de Svennerholm et Svennerholm (132)<sup>x</sup>.

## B - RESULTATS.

### 1 - Identification des glucides constituant l'ovomucoïde.

L'application des méthodes précédentes nous a permis d'identifier dans l'ovomucoïde les glucides suivants:

galactose  
mannose  
glucosamine  
acide N-acétylneuraminique

### 2 - Dosage des glucides constituant l'ovomucoïde.

#### a) Composition en glucides totaux:

Nous avons rassemblé dans le Tableau V nos résultats concernant la composition en oses, osamines et acides sialiques des différentes préparations d'ovomucoïde que nous avons obtenues.

---

<sup>x</sup> 0,5 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde et 5 g d'acide trichloracétique dissous dans 20 ml d'éthanol à 50 % sont additionnés de 60 ml de n-butanol. Le mélange est pulvérisé sur le chromatogramme qui est maintenu à 105° pendant 20 minutes. Les acides sialiques apparaissent en violet sur fond jaune.

TABLEAU V

Composition en glucides de préparations  
d'ovomucoïde obtenues par différentes  
méthodes (en %).

Méthodes	Agent de dénaturation	Cses	Csamine	Acide sialique	Oses/ Osamine	Oses/ ac. sialique
NEUMEISTER (133)	chaleur	8,6	14,73	1,61	0,584	5,34
MORNER I (134)	chaleur	8,92	15,21	1,61	0,586	5,54
MORNER II (135)	chaleur	10,12	15,20	3,08	0,665	3,28
LONGSWORTH <u>et al</u> (136)	chaleur	9,17	14,57	2,08	0,630	4,40
WERNER et ODIN (137)	chaleur	9,47	16,16	1,02	0,586	9,28
LINEWEAVER et MURRAY (138)	ATCA <sup>x</sup>	8,74	15,36	1,14	0,570	7,67
FREDERICQ et DEUTSCH (139)	ATCA					
Ovomucoïde "brut"		8,5	14	0,90	0,600	9,40
Fraction II b		9,7	16,81	0,78	0,577	12,40
Fraction II c (ovomucoïde "pur")		8,46	13,27	0,93	0,630	9,10
MICHON (adaptée) (140)	Phénol	8,90	14,78	1,20	0,600	7,41

<sup>x</sup> Acide trichloracétique.

On voit que la teneur en oses et en osamines subit peu de variations d'une préparation à l'autre et le rapport oses/osamine est assez constant. Au contraire, la teneur en acide sialique varie dans de grandes proportions selon le mode opératoire. Elle est plus élevée dans les ovomucoïdes préparés par ébullition surtout si cette dernière est effectuée en présence de sulfate d'ammonium ou de sodium comme c'est le cas dans les méthodes de Longsworth et coll. et de Mörner II.

b) Détermination des rapports molaires des oses:

L'application des méthodes chromatographiques et électrophorétiques de dosage des oses que nous avons décrites plus haut (voir page 29) nous a permis de déterminer la composition en oses neutres, glucosamine et acide N-acétylneuraminique de diverses préparations d'ovomucoïde.

Nous avons rassemblé nos résultats dans le Tableau VI.

C - DISCUSSION ET CONCLUSION.

1 - La nature des oses constituant l'ovomucoïde est, à présent, définitivement établie. En dehors du galactose, du mannose, de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique, nous n'avons pu caractériser aucun autre glucide bien que Masamune (141) et Roseman et Daffner (142) aient signalé la présence de galactosamine (glucosamine/galactosamine = 2).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Sørensen, Hewitt, Stacey et Woolley, Dixon, Gottschalk et Ada, Odin, Bragg et Hough, Hartley et Jevons, Chatterjee et Montgomery et Harbon.

2 - Les proportions de glucides varient d'une préparation à l'autre. Elles sont relativement faibles en ce qui concerne les oses neutres (de 8,46 à 10,12 %) et les osamines (de 13,27 à 16,86 %). Au contraire, elles sont très importantes en ce qui concerne les acides sialiques dont la teneur oscille entre 0,78 % dans la fraction II b de l'ovomucoïde de Fredericq et Deutsch préparé dans des conditions relativement douces par fractionnement éthanolique à -15° du filtrat de défécation trichloracétique du blanc d'oeuf (voir page 26) et 3,08 % dans l'ovomucoïde de Mörner (préparation du type II) (voir page 24) obtenu par ébullition en présence de sulfate de sodium à saturation suivie d'une précipitation par l'éthanol à + 20°.

TABLEAU VI

Composition en oses, en osamine et en  
acide sialique de préparations d'ovomucoïde  
obtenues par différentes méthodes (en moles).

Méthodes	Galactose	Mannose	N-acétyl- glucosamine	Acide N-acétyl- neuraminique
NEUMEISTER (143)	1	4,2	8,9	0,6
MORNER I (144)	1	4,3	9	0,57
MORNER II (145)	1	4,3	8	0,84
LONGSWORTH <u>et al.</u> (146)	1	3,5	7,1	0,6
WERNER et ODIN (147)	1	5,2	10	0,40
LINEWEAVER et MURRAY (148)	1	5,1	10,6	0,48
FREDERICQ et DEUTSCH(149)				
Ovomucoïde "brut"	1	5,2	10	0,40
Fraction II b	1	5,1	10,5	0,30
Fraction II c (ovomucoïde "pur")	1	4,8	9,2	0,40
MICHON adaptée (150)	1	5	10	0,49

Ces résultats peuvent être interprétés de la manière suivante: nous démontrerons plus loin que les préparations d'ovomucoïde sont hétérogènes et contiennent trois glycoprotéides dont l'un est l'ovoglycoprotéide de Ketterer (151) plus riche en glucides neutres (13,6 %) et en acide sialique (3 %) que l'ovomucoïde (9 % d'oses neutres et 0 à 1 % d'acide sialique). On peut admettre que l'ovoglycoprotéide de Ketterer est plus stable que les autres glycoprotéides vis-à-vis des agents de dénaturation grâce à sa teneur élevée en acide sialique. Les préparations d'ovomucoïde seraient donc d'autant plus riches en ovoglycoprotéide de Ketterer (et par conséquent en acide sialique et en oses neutres) que les méthodes de dénaturation des protéides du blanc d'oeuf seraient plus brutales. Nos résultats sont en faveur de cette hypothèse puisque les préparations obtenues par des méthodes "douces" (ovomucoïdes de Fredericq et Deutsch, de Werner et Odin, de Lineweaver et Murray) sont aussi celles qui possèdent les teneurs les plus faibles en oses et en acide sialique. Au contraire, les méthodes les plus drastiques (ébullition en présence de sels minéraux, puis précipitation par l'éthanol à + 20°) fournissent des préparations plus riches en oses et en acide sialique (procédé de Mörner II, voir page 24 et de Longsworth et coll., page 25).

3 - Nous avons établi la composition en oses neutres de l'ovomucoïde qui posait une énigme car jusqu'à présent l'accord n'était pas réalisé à ce sujet. Le Tableau III montre en effet que le rapport mannose/galactose varie de 3 à 4 suivant les auteurs. Or, nos résultats nous conduisaient toujours à une valeur du rapport de 5 pour l'ovomucoïde de Fredericq et Deutsch. Cette discordance pouvait s'expliquer par le fait que les auteurs utilisaient toujours des ovomucoïdes obtenus par ébullition, c'est pourquoi nous avons effectué notre étude comparative de la composition d'ovomucoïdes préparés de différentes manières. Les résultats que nous avons rassemblés dans le Tableau VI nous permettent de tirer les conclusions suivantes:

- a) les rapports molaires des oses constituant les différents ovomucoïdes varient dans de larges proportions. On peut cependant distinguer deux groupes de préparations suivant la valeur du rapport mannose/galactose qui est voisin de 4 dans le premier et de 5 dans le second. Au premier groupe se rattachent les "ovomucoïdes" obtenus par des procédés brutaux de dénaturation (ébullition en présence ou en l'absence de sels minéraux suivie d'une précipitation par l'éthanol à + 20°: méthodes de Neumeister, de Mörner I, de Mörner II, de Longsworth et al.) . Au second groupe, appartiennent les "ovomucoïdes"

isolés par des procédés de dénaturation relativement doux.

Ce résultat confirme l'hypothèse que nous avons déjà évoquée plus haut (voir page 37) selon laquelle les préparations d'ovomucoïde renfermeraient d'autant plus d'ovoglycoprotéide de Ketterer que le procédé d'isolement a été plus dénaturant. Or, nous verrons plus loin que nous avons mis en évidence dans les "ovomucoïdes" la présence d'un glycoprotéide dont les caractéristiques sont celles de l'ovoglycoprotéide de Ketterer (avec un rapport mannose/galactose = 3).

- b) Mis à part les ovomucoïdes préparés selon Neumeister, Mörner Longsworth et al., le rapport mannose/galactose des autres ovomucoïdes est toujours égal à 5. Ce résultat est en désaccord avec ceux des autres auteurs qui trouvent généralement un rapport égal ou voisin de 3: Sprensen (152): 3, Stacey et Woolley (153): 3, Gottschalk et Ada (154): 3, Odin (155): 3, 3, Bragg et Hough (156): 3, 7, Harbon (157): 3. Ils se rapprochent de ceux de Chatterjee et Montgomery (158) qui ont trouvé une valeur du rapport égale à 4, 7.

Cette discordance pouvait s'expliquer à priori soit par une imperfection de notre méthode de dosage chromatographique des oses constituant les glycoprotéides, soit par la nature de l'hydrolyse acide (chlorhydrique dans notre étude, sulfurique dans celle des autres auteurs).

Après avoir éliminé la première éventualité en effectuant une nouvelle étude critique de notre méthode d'analyse, nous avons étudié la composition en oses d'ovomucoïdes soumis à une hydrolyse cinétique par l'acide chlorhydrique 1 N et 2 N et par l'acide sulfurique 2 N. Quelles que soient les conditions d'hydrolyse nous avons toujours trouvé un rapport mannose/galactose égal à 5.

- c) Sur la base d'un poids moléculaire de 27.000 (Fredericq et Deutsch, 159) de la teneur en glucides totaux et de la détermination de leur rapport molaire nous avons calculé qu'une molécule d'ovomucoïde contenait :

2 molécules de galactose  
10 molécules de mannose  
20 molécules de N-acétylglucosamine  
1 molécule d'acide N-acétylneuraminique.

4 - Cependant, cette détermination ne vaut pas pour tous les ovomucoïdes car l'examen du Tableau VI montre que le rapport molaire des oses varie

dans de très larges proportions suivant les préparations. Ce résultat laisse présager que celles-ci sont hétérogènes.

Les études physiques et immunoélectrophorétiques devaient confirmer cette hypothèse.

### III - ETUDES PHYSIQUES.

#### A - ULTRACENTRIFUGATION.

Des échantillons d'ovomucoïde préparé par différentes méthodes ont été soumis à l'ultracentrifugation dans le double but de déterminer leurs constantes de sédimentation et leur degré de pureté.

Trois mesures de la constante de sédimentation ont été effectuées à des concentrations d'ovomucoïde de 2,5 mg, 5 mg et 7,5 mg par ml de chlorure de sodium à 9 g par litre d'eau. La constante de sédimentation à 20° a été calculée par extrapolation à une dilution infinie.

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau VII. Ils peuvent être résumés de la manière suivante:

- dans tous les cas les diagrammes d'ultracentrifugation révèlent la présence d'un seul pic. Cependant, l'homogénéité des préparations n'est qu'apparente. En effet, les pics sont toujours asymétriques montrant l'existence d'un composant plus "lourd" dans les préparations obtenues par des procédés brutaux de dénaturation. La figure 4 est à cet égard démonstrative.
- les constantes de sédimentation varient dans de larges proportions d'un ovomucoïde à l'autre. Les valeurs que nous avons obtenues se situent entre celles de 2,8 obtenue par Fredericq et Deutsch (160) et Chatterjee et Montgomery (161), et celle de 2 obtenue par Harbon (162).
- les valeurs les plus élevées sont obtenues avec les ovomucoïdes préparés par les procédés les plus dénaturants comme l'ébullition en présence de sels minéraux.

---

<sup>x</sup> Les déterminations ont été réalisées à la Station Centrale d'Ultracentrifugation du CNRS de Paris par Madame Wurmser-Filitti que nous remercions vivement.

Ce résultat confirme l'hétérogénéité des préparations. Il montre en outre que la composition de ces dernières ne peut être définie et que les quantités relatives des différents constituants des "ovomucoïdes" sont très variables.

- ces résultats viennent confirmer les conclusions que nous avons tirées des dosages des glucides totaux (voir page 37) et de la détermination des rapports molaires des oses (voir page 38): l'ovoglycoprotéide de Ketterer dont la constante de sédimentation est de 2,47 (Ketterer, 163) est présent en plus grande proportion dans les préparations obtenues par des moyens brutaux de dénaturation. Ainsi s'explique la valeur plus élevée des constantes de sédimentation des ovomucoïdes obtenus par ébullition (méthode de Neumeister, de Werner et Odin) ou par précipitation acétonique (Lineweaver et Murray).

## B - ETUDE ELECTROPHORETIQUE.

Nous avons soumis les différentes préparations d'ovomucoïde à l'électrophorèse en veine liquide et à l'électrophorèse de zone en gélose et en gel d'amidon.

### 1 - Méthode électrophorétique:

#### a) Electrophorèse de zone:

L'analyse électrophorétique des préparations d'ovomucoïde est compliquée par la difficulté de révéler des composés difficilement dénaturables et qui se dissolvent dans les solutions de réactifs. Les colorations spécifiques ne sont applicables qu'après une dénaturation poussée obtenue en maintenant les électrophorégrammes sur papier à 100°, pendant plusieurs heures et les électrophorégrammes en gélose dans l'éthanol absolu ou dans l'acétone pendant une à deux heures. Toutefois, l'application de la méthode de révélation des glycoprotéides par l'acide periodique - fuchsine de Schiff - reste négative ou faiblement positive quels que soient les procédés de dénaturation utilisés. Ce résultat peut s'expliquer soit par la structure même des groupements polyosidiques dans lesquels les points d'attache des liaisons osidiques interdisent l'oxydation par l'acide periodique, soit par la pauvreté en acide sialique des composés. On sait, en effet, que la coloration développée par le réactif à l'acide periodique, fuchsine de Schiff - est essentiellement donnée par les acides sialiques présents dans les molécules de glycoprotéides (Montreuil et Biserte (164), Pacquin et Percheron (165)).

TABLEAU VII

Constantes de sédimentation à 20°  
de différentes préparations d'ovomucoïde.

Procédés de préparation	$S_{20_w}$
-----	-----
NEUMEISTER	2,4
WERNER et ODIN	2,3 à 2,4
LINEWEAVER et MURRAY	2,35
FREDERICQ et DEUTSCH II <sub>c</sub>	2,35
FREDERICQ et DEUTSCH II <sub>b</sub>	2,27

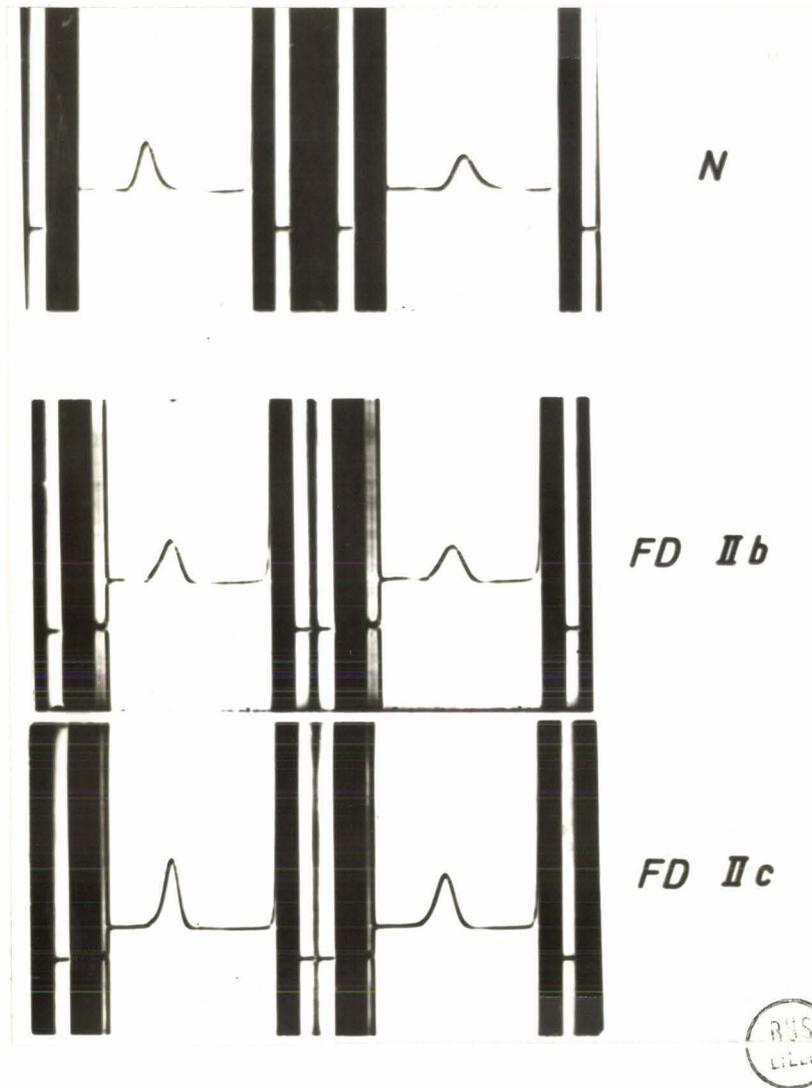


Figure 4

Diagrammes d'ultracentrifugation de préparations d'ovomucoïde

N: préparation selon Neumeister (ébullition puis précipitation par l'éthanol à + 20°) (voir page 24): asymétrie de la branche droite du pic.

FD II<sub>b</sub>; FD II<sub>c</sub>: préparation selon Fredericq et Deutsch (fractionnement par l'éthanol à -15° du filtrat de défécation trichloracétique) (voir page 26): asymétrie de la branche gauche du pic.

L'électrophorèse sur papier ne nous a pas apporté de résultat satisfaisant et nous avons essentiellement appliqué les méthodes classiques d'électrophorèse en gélose (tampon véronal de pH 8,2, 4 à 5 volts/cm pendant 2 à 3 heures) et d'électrophorèse en gel d'amidon vertical selon Smithies (166) (tampon discontinu de Foulk: préparation de gel avec un tampon tris-citrique 0,076 M, pH 8,65, migration effectuée dans le tampon de Lush (167) : borate 0,3 M, pH 8,80.

b) Electrophorèse en veine liquide<sup>x</sup>:

Le comportement électrophorétique des préparations d'ovomucoïde a été étudié à l'aide de l'appareil d'électrophorèse en veine liquide AMINCO dans les conditions expérimentales suivantes:

concentration : 150 mg dans 10 ml de tampon  
tampon : véronal pH 8,6 de force ionique 0,1

Les mesures de mobilité électrophorétique ont été effectuées sous une intensité de 15 mA en frontière ascendante à + 1 heure et à + 2 heures, et en frontière descendante à + 1 heure.

Elles sont exprimées en  $\text{cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ seconde}^{-1} 10^{-5}$ .

2 - Résultats:

L'application des précédentes méthodes démontre l'hétérogénéité de toutes les préparations d'ovomucoïde (figures 5, 6 et 7). On caractérise en effet principalement en électrophorèse libre trois constituants dont les vitesses de migration électrophorétique sont les suivantes:

Composant 1	$3,2 \pm 0,2$
Composant 2	$3,8 \pm 0,2$
Composant 3	$4,9 \pm 0,3$

Dans toutes les préparations le composant 2 est le plus important et représente généralement 60 à 80 % des protéides totaux.

---

<sup>x</sup> Les déterminations des vitesses électrophorétiques ont été effectuées par Monsieur Y. Moschetto à qui nous adressons nos vifs remerciements.

Figure 5

Diagrammes d'électrophorèse en  
gélose de préparations d'ovomucoïde

- 1- "Ovomucoïde" de Longsworth et coll. (voir page 25)
- II<sub>b</sub> - "Ovomucoïde" II<sub>b</sub> de Fredericq et Deutsch (voir page 26)
- II<sub>c</sub> - "Ovomucoïde" II<sub>c</sub> de Fredericq et Deutsch (voir page 26)

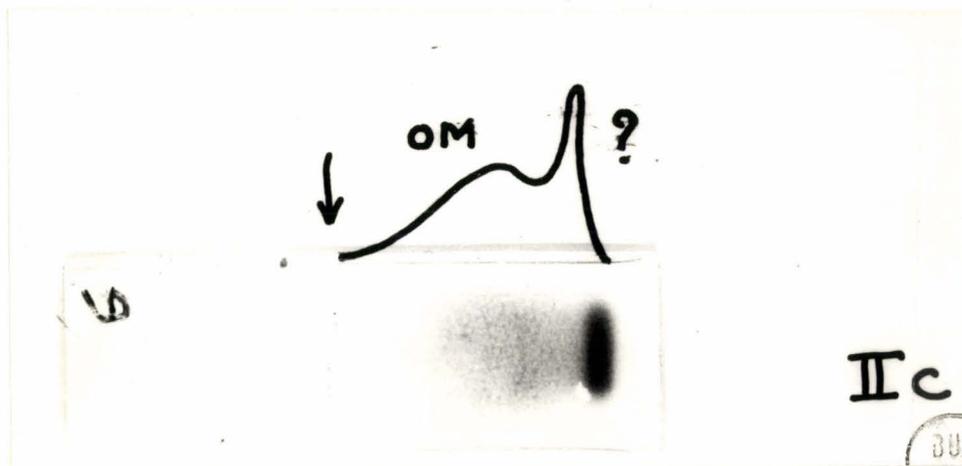
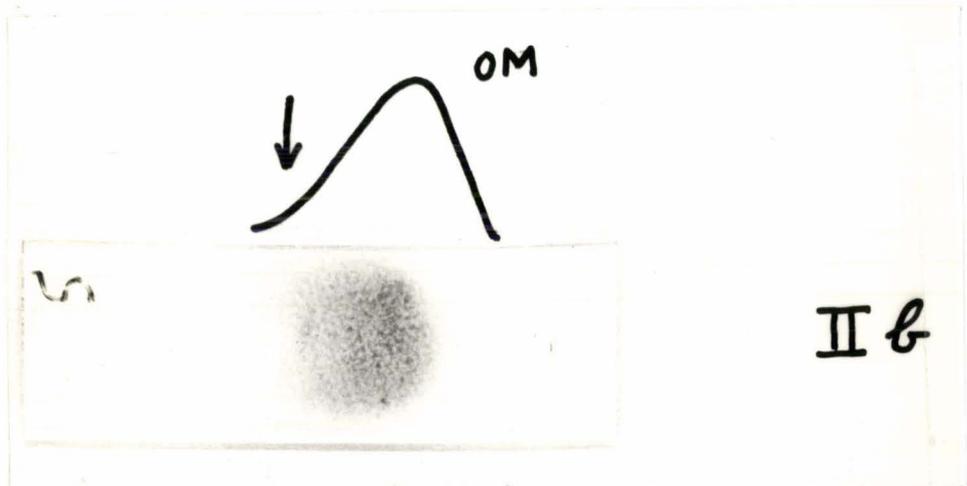
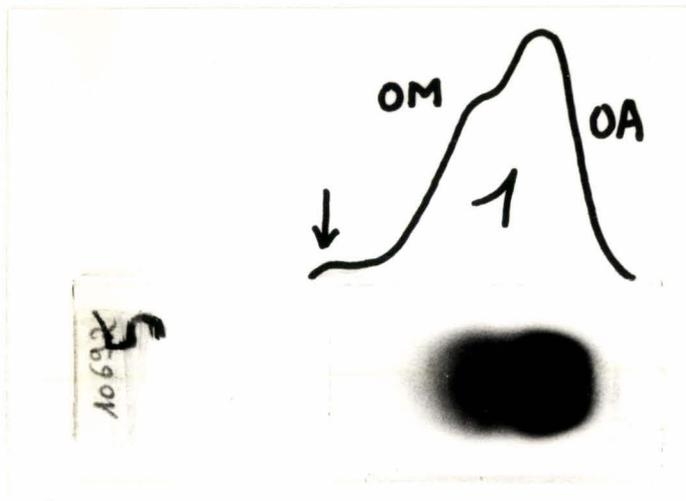
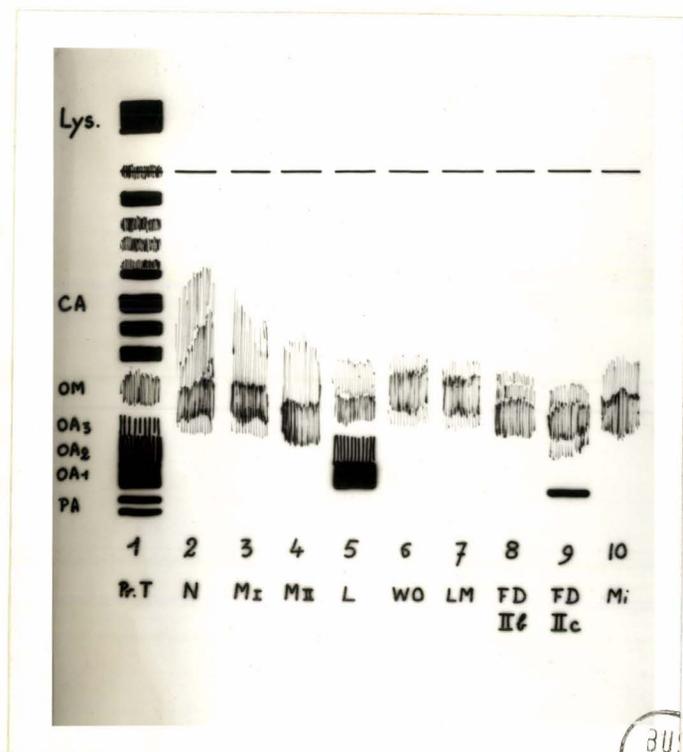


Figure 6

Electrophorèse en gel d'amidon  
vertical des protéides du blanc d'oeuf de  
poule et de diverses préparations d'ovomucoïde.

- 1 - Protéides totaux du blanc d'oeuf
- 2- Ovomucoïde de Neumeister
- 3- Ovomucoïde de Mörner I
- 4- Ovomucoïde de Mörner II
- 5- Ovomucoïde de Longsworth et al.
- 6- Ovomucoïde de Werner et Odin
- 7- Ovomucoïde de Lineweaver et Murray
- 8- Ovomucoïde de Fredericq et Deutsch (fraction II<sub>b</sub>)
- 9- Ovomucoïde de Fredericq et Deutsch (fraction II<sub>c</sub>)  
ovomucoïde "pur"
- 10 - Ovomucoïde préparé selon le procédé de Michon

Lys: lysozyme; CA: conalbumine; OM: ovomucoïde  
CA<sub>1</sub>, CA<sub>2</sub> et CA<sub>3</sub>: ovalbumines 1, 2 et 3; PA: préalbumines.



BU  
L1111

Figure 7

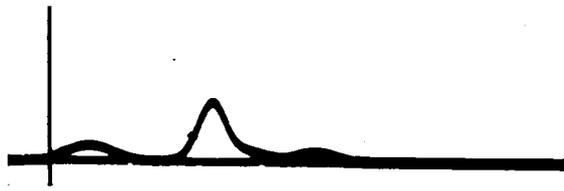
Diagrammes d'électrophorèse libre de  
préparations d'ovomucoïde

- I - "Ovomucoïde" de Longworth et coll. (voir page 25)
- II b- "Ovomucoïde" IIb de Fredericq et Deutsch (voir page 26)
- IIc- "Ovomucoïde" IIc de Fredericq et Deutsch (voir page 26)

Frontière ascendante; durée de l'électrophorèse:

A: 3,600 sec.; B: 7,200 sec.

1



Πb

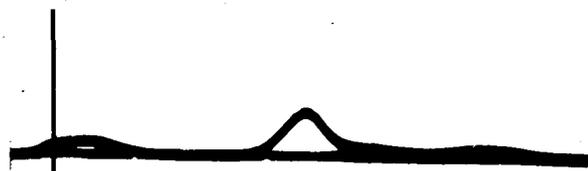


A

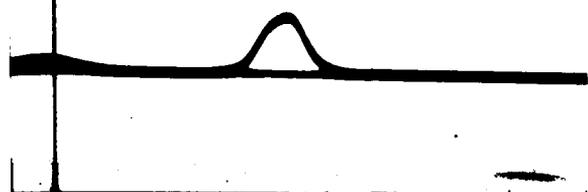
Πc



1



Πb



B

Πc



### 3 - Conclusions.

Nos résultats confirment l'hétérogénéité des préparations d'ovomucoïde déjà signalée par différents auteurs (voir page 15): Bier et al (168), Chatterjee et Montgomery (169), Dixon (170), Fredericq et Deutsch (171), Forsythe et Foster (172), Harbon (173), Jevons (174), Jutisz, Kaminski et Legault-Démare (175), Longsworth et al (176), Sharp et al (177).

## IV - ETUDES IMMUNOELECTROPHORETIQUES.

L'immunoélectrophorèse démontre sans ambiguïté l'hétérogénéité de toutes les préparations d'ovomucoïde.

### 1 - Méthode.

Nous avons appliqué la méthode classique, de diffusion en gélose selon les procédés de Scheidegger (178) et de Grabar et al (179).

### 2 - Préparation des immunsérums:

Les antisérums de lapin ont été préparés selon le mode opératoire suivant:

l'antigène est constitué par le mélange des protéides du blanc d'oeuf débarrassé de l'ovomucine par centrifugation de la solution de blanc d'oeuf diluée avec de l'eau distillée; le surnageant est filtré et lyophilisé.

La solution antigénique renferme 5 g de protéides totaux pour 100 ml de sérum physiologique; elle est stérilisée sur bougie. Les lapins reçoivent cette solution antigénique par voie intraveineuse et une solution diluée au demi avec l'adjuvant de Freud (9 ml d'huile de vaseline + 1 g de lanoline et 10 mg de BCG) par voie intramusculaire.

Les injections sont effectuées de la manière suivante:

- 1er jour: 1 ml de la solution antigénique à 5 % par voie intraveineuse  
10 ml de l'antigène de Freud par intramusculaire.
- 8ème jour: 1 ml de la solution antigénique par voie intraveineuse
- 15ème jour: 1 ml de la solution antigénique par voie intraveineuse
- 22ème jour: 1 ml de la solution antigénique par voie intraveineuse  
10 ml de l'antigène de Freud par voie intramusculaire

- 29ème jour: 1 ml de la solution antigénique par voie intraveineuse.

Après un repos d'un mois, le lapin subit un deuxième cycle d'injections identique.

Une semaine après la dernière injection, du sang est prélevé tous les trois jours et sa teneur en anticorps est déterminée par immunoélectrophorèse. Lorsque le nombre d'arcs est maximum, on prélève environ 40 ml de sang; le sérum obtenu est conservé à + 2°.

### 3 - Résultats:

Toutes les préparations d'ovomucoïde donnent au moins trois arcs de précipitation de vitesse de migration électrophorétique de préalbumine, de globuline  $\alpha_1$  et de globuline  $\beta_1$ . En outre, on caractérise parfois les arcs de l'ovalbumine et de la conalbumine.

La figure 8 représente le diagramme immunoélectrophorétique caractéristique d'une préparation d'ovomucoïde.

## V - CONCLUSIONS GENERALES.

De l'étude critique des différentes préparations d'ovomucoïde que nous avons effectuée du point de vue de la composition en glucides, de l'ultracentrifugation et du comportement électrophorétique et immunoélectrophorétique, nous pouvons tirer les conclusions suivantes:

- 1- Toutes les méthodes d'isolement de l'ovomucoïde qui ont été proposées jusqu'à présent fournissent des préparations hétérogènes. L'électrophorèse et l'immunoélectrophorèse révèlent en effet la présence, en proportions variables, d'au moins trois constituants de vitesse de migration électrophorétique de 3,2 ( $\pm 0,2$ ), 3,8 ( $\pm 0,2$ ), et 4,9 ( $\pm 0,3$ )  $\text{cm}^2 \text{volt}^{-1} \text{sec.}^{-1} 10^{-5}$ .
- 2- La nature de ces composés n'est pas connue. Toutefois, nous pensons que l'un d'eux, constituant majeur, serait l'ovomucoïde proprement dit et qu'un autre serait l'ovoglycoprotéide de Ketterer, à teneur élevée en acide sialique et dont les préparations d'"ovomucoïde" obtenues par ébullition seraient particulièrement riches.

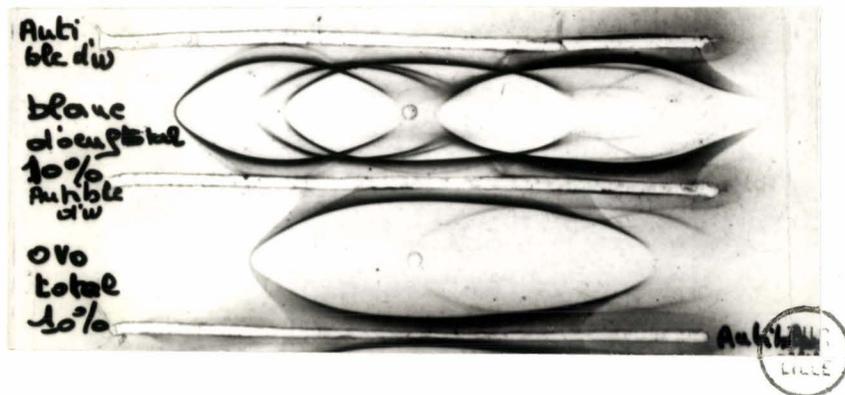


Figure 8

Diagramme immunoélectrophorétique d'une  
préparation d'ovomucoïde selon le procédé  
de Fredericq et Deutsch.

3- Toutes les tentatives d'isolement des constituants de l'ovomucoïde que nous avons faites ont échoué. Nous avons en effet appliqué en vain au fractionnement de l'ovomucoïde de Fredericq et Deutsch les procédés suivants:

- chromatographie sur Sephadex G25, G50, G75, G100 et G 200
- chromatographie sur DEAE-Sephadex
- chromatographie sur celluloses modifiées: DEAE-cellulose selon Chatterjee et Montgomery (180), Mandeles (181), Peterson et Sober (182) et Rhodes, Azari et Feeney (183), TEAE-cellulose selon Jevons (184), CM-cellulose selon Chatterjee et Montgomery (185) et Rhodes et al. (186), SE-cellulose.
- électrophorèse préparative en colonne de type Porath (voir aussi Jutisz et al (187)).

L'application de ces divers procédés conduit toujours pratiquement à des préparations qui donnent trois arcs de précipitation en immunoélectrophorèse.

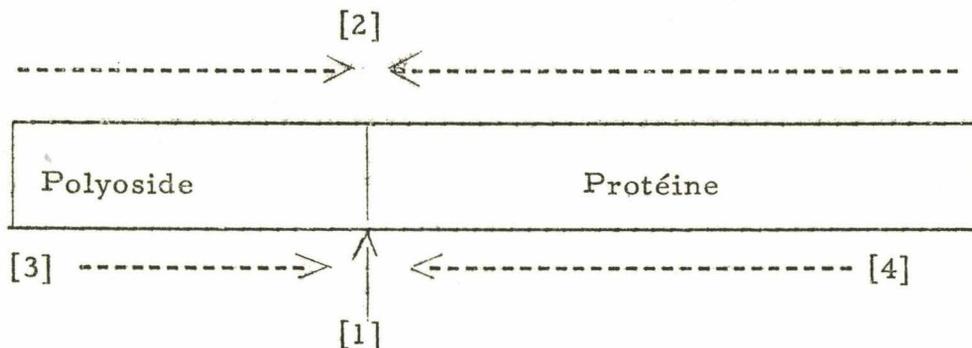
4- C'est pourquoi nous avons choisi finalement, comme matériel d'étude, "l'ovomucoïde" de Fredericq et Deutsch dont la préparation en grandes quantités est la plus aisée. En outre, comme les fractions II<sub>b</sub> et II<sub>c</sub> sont elles-mêmes hétérogènes, nous n'avons pas appliqué le fractionnement éthanolique du précipité II que nous avons directement utilisé pour l'exploration de la structure de l'ovomucoïde dont nous nous proposons à présent d'exposer les résultats.

ETUDE DE LA STRUCTURE DE  
L'OVOMUCOÏDE

INTRODUCTION

Nous nous sommes attachée à la fois à l'étude de la structure du groupement polyosidique et à la détermination de la nature de la liaison glucide -protéine, sans toutefois perdre de vue que notre matériel de départ était hétérogène et que notre travail visait plus à mettre au point des procédés généraux d'exploration de la structure des glycoprotéides qu'à préciser la constitution d'une entité chimique; cependant, nous pouvions espérer recueillir en outre quelques résultats qui nous permettraient de résoudre l'énigme de la nature des constituants glycoprotéidiques de l'"ovomucoïde". Il n'était pas déraisonnable en effet de penser que si la séparation des composés natifs était difficilement réalisable pour le moment, il n'en serait peut-être pas de même de leurs produits de dégradation.

Le problème de la structure d'un glycoprotéide peut être abordé de quatre manières différentes. Si, en effet, nous schématisons un glycoprotéide de la manière suivante (d'ailleurs erronée):

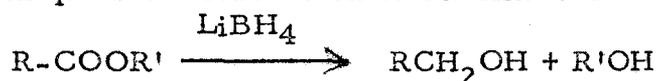


On voit que la dégradation peut être envisagée selon les types suivants:

### Dégradation du type 1:

Ces procédés permettent de dissocier la fraction glucidique de la fraction peptidique. L'apparition de fonctions nouvelles peut alors fournir des renseignements précieux sur les modalités de la liaison glucide-protéine. A ce type de dégradation, nous rattacherons:

a) le procédé de réduction des fonctions esters par le borohydrure de lithium qui s'effectue selon le schéma suivant:



Il a permis à Gottschalk, Murphy et Graham (188), Gottschalk et Murphy (189) et Murphy et Gottschalk (190) de démontrer que dans la mucine sous-maxillaire du mouton et du boeuf les acides aspartique et glutamique étaient liés par leur carboxyle  $\beta$  ou  $\gamma$  à la fonction réductrice de la N-acétylgalactosamine par une liaison ester, pour une proportion de 80 % des résidus diolsidiques. En effet, la réduction des mucines par le borohydrure de lithium fournit de l'homosérine et de l'acide  $\delta$ -hydroxy- $\alpha$ -aminovalérique.

Cette méthode a également permis à Jollès, Alais et Jollès (191) de démontrer l'existence d'une liaison ester de la phénylalanine dans le glycopeptide isolé de la caséine kappa par action de la présure.

b) Le procédé d'hydrolyse chimique des liaisons esters par les solutions alcalines diluées (application à la mucine sous-maxillaire par Gottschalk (192), Gottschalk et Murphy (193), Gottschalk, Murphy et Graham (194), Graham, Murphy et Gottschalk (195) - à l'ovomucoïde: Montreuil, Biserte et Chosson (196) avec mise en évidence d'une liaison ester de la cystine - à un glycoprotéide de l'orge par Hochstrasser (197), ester en 4 du xylose et de la L-alanine, - aux acides teichoïques, esters de ribitol-phosphate ou de glycérol-phosphate et d'acides aminés) - ou par l'hydroxylamine (application aux mucines sous-maxillaires qui confirme les résultats de l'hydrolyse alcaline - application aux mucines sous-maxillaires de mouton, à l'ovalbumine, à l'ovomucoïde par Harbon (198), Herman-Boussier, Harbon et Clauser (199) Harbon, Herman-Boussier et Clauser (200).

c) Le procédé d'hydrolyse enzymatique des O-séryl (ou -O-thréonyl) -N-acétylgalactosaminides par N-acétylgalactosaminidase tissulaire (Gottschalk communication personnelle).

### Dégradation du type 2:

Dans ce type de dégradation essentiellement réalisé par des agents chimiques d'hydrolyse, on attaque à la fois le groupement osidique et la protéine; on

obtient de cette manière des oses et des osides mêlés à des amino acides et à des peptides. En outre, une dégradation poussée peut conduire à une substance composée d'une molécule de glucide et d'une molécule d'acide aminé. Ce procédé que nous avons nous-même largement utilisé a été appliqué par de nombreux auteurs à l'exploration de la structure du mucopolysaccharide de divers glycoprotéides: orosomucoïde (Sonnet (201), Winzler (202), Jeanloz (203), Jeanloz et Eylar (204), Eylar et Jeanloz (205)) - fétuine (Spiro (206)) - ovomucoïde (Levene et Mori (207), Stacey et Woolley (208), Bragg et Hough (209), Tanaka (210), Chatterjee et Montgomery (211), Montreuil et Chosson (212), Chosson, Montreuil et Scheppler (213)) - ovalbumine (Lee et Montgomery (214)) -  $\alpha_2$ -glycoprotéine Ba du sérum humain (Schmid (215)) - fibrinogène (Mester (216)).

D'autre part, son application permet de préparer les complexes glucide-acide aminé (glycoaminoacide) soit à partir des glycoprotéides eux-mêmes (Masamune (217)): isolement d'un éther de la sérine et de la N-acétyllactosamine à partir d'une substance de groupe sanguin. - Bogdanov, Kaverneva et Andrejeva (218), Kaverzneva et Bogdanov (219) : isolement de l'asparaginyl-glucosamine à partir de l'ovalbumine). Soit à partir de glycoaminoacides ou de glycopeptides obtenus par hydrolyse enzymatique des glycoprotéides (ovalbumine: Yamashina, Ban I et Makino (220), Bogdanov, Kaverneva et Andrejeva (221)) - isolement de l'asparaginyl-glucosamine. - ovomucoïde: Tanaka (222) - DNP-aspartique-glucosamine : Montreuil, Biserte et Chosson (223) : asparaginyl-glucosamine, thréonyl-glucosamine et cystyl-glucosamine.

### Dégradation du type 3:

Cette méthode de dégradation met en oeuvre des osidases spécifiques. Elle a reçu peu d'applications en raison des imperfections des méthodes d'hydrolyse dues, en particulier, au défaut des préparations d'enzymes purs ou purifiés (galactosidases, mannosidases, osaminidases, etc...). Cependant, les neuraminidases ont été utilisées. Elles permettent de libérer une partie ou la totalité (Jeanloz avec une neuraminidase du pneumocoque I, communication personnelle) des acides sialiques qui se trouvent en position externe dans les molécules de sialomucoïdes. En outre, après l'élimination des acides sialiques, une galactosidase de Pneumococcus I (Jeanloz, communication personnelle) libère le galactose des mucopolysaccharides, démontrant ainsi que ce glucide se trouve alors en position "externe".

L'utilisation du lysozyme se place dans cette catégorie d'hydrolyse. Appliquée à l'étude de glycopeptides de parois bactériennes comme Micrococcus lysodeikticus (Ghuysen et Salton (224), Salton et Ghuysen (225)) elle a conduit d'une part à l'isolement de l'unité diholosidique de répétition,

(N-acétylglucosaminido-1,6-acide muramique) et d'autre part, à un glycopeptide formé d'une unité diholosidique unie par une fonction amide (que clive une amidase spécifique) entre l'acide muramique et l'alanine en position N-terminale dans la chaîne peptidique.

Dans ce type de dégradation il convient encore de ranger le procédé de Barker, Pardoe, Stacey et Hopton (226) fondé sur la dégradation récurrente du mucopolyoside de l'orosomucoïde par des enzymes adaptatifs excrétés par Rhodopseudomonas palustris (n° 3574), au fur et à mesure de l'apparition de nouveaux types de liaisons osidiques. On voit ainsi se libérer successivement, en fonction de leur position dans la molécule, l'acide sialique, le fucose, le galactose, la N-acétylglucosamine et deux oligosides formés de mannose et de N-acétylglucosamine.

Nous n'avons, personnellement, pas appliqué ce type de dégradation.

#### Dégradation du type 4:

La dégradation enzymatique de la fraction protéique représente la méthode de choix pour déterminer l'acide aminé impliqué dans la liaison glucide-protéine, car l'enzyme sera incapable de scinder la liaison non peptidique ose-acide amine et l'on obtiendra ainsi le groupement mucopolyosidique intact auquel demeure attaché le (ou les) amino acide qui l'unit à la chaîne peptidique.

Les enzymes les plus couramment utilisés sont: la pepsine, la trypsine, la chymotrypsine, la "pancréatinine" et la papaine, seules ou associées. La dégradation de la chaîne peptidique unie aux mucopolyosides est alors achevée avec une carboxy- ou une aminopeptidase. Les hydrolysats sont ensuite purifiés et fractionnés par chromatographie sur des résines échangeuses d'ions et des celluloses modifiées (DEAE, TEAE, SE ou CM-cellulose) ou des Sephadex, et par électrophorèse préparative sur papier ou sur colonne.

Ce procédé a été appliqué à l'étude des  $\gamma$ -globulines sériques (Rosevear et Smith (227), Nolan et Smith (228)), - de l'orosomucoïde (Weinfeld et Tunis (229), Winzler (230), Kamiyama et Schmid (231)) - de l'ovalbumine (Neuberger (232), Kaverzneva (233), Johansen, Marshall et Neuberger (234), Marks, Marshall et Neuberger (235), Nuenke et Cunningham (236), Cunningham, Nuenke et Nuenke (237), Cunningham, Clouse et Ford (238), Fletcher (239), Jevons (240), Lee et Montgomery (241)) - de l'ovomucoïde (Tanaka (242), Hartley et Jevons (243), Montgomery et Wu (244)) - du pleuro-mucoïde (Bourrillon et Michon (245), Bourrillon, Got et Meyer (246)).

Récemment, la découverte d'un enzyme extrêmement actif, la pronase, isolée de Streptomyces griseus par Nomoto et Narahashi (247) a singulièrement fait progresser nos connaissances sur la nature de la liaison glucide-protéine: en effet, la dégradation d'un glycoprotéide par la pronase conduit généralement d'emblée au glycoaminoacide. Utilisée pour la première fois par Tsujita et Akabori (248) pour l'étude de la taka-amylase, elle a été appliquée ultérieurement par Izumi, Makino et Yamashina (249) et Yamashina et Makino à l'étude de l'orosomucoïde et de l'ovalbumine. Depuis, l'utilisation de la pronase s'est généralisée et a été appliquée à de nombreux glycoprotéides: ovomucoïde (Montreuil, Biserte, et Chosson (250), Montreuil, Spik, Chosson, Segard et Scheppier (251), Marks, Marshall, Neuberger et Papkoff (252), Neuberger, et Papkoff (253), Montgomery et Wu (254), - ovalbumine (Fletcher, Marks, Marshall et Neuberger (255), Marks, Marshall, Neuberger et Papkoff (256)) - transferrine (Jamieson (257), Spik, Monsigny et Montreuil (communication personnelle)) -  $\gamma$ -globulines (Duquesne, Monsigny et Montreuil (communication personnelle)) - fibrinogène (Mester et al (258)) - céruléoplasmine (Jamieson (259)) - lactotransferrine (Got) (260)).

Les résultats qui ont été obtenus par l'application des procédés de dégradation protéolytique des glycoprotéides seront exposés dans l'introduction du Chapitre que nous consacrons plus loin au "Point d'attache glucide-protéine dans l'ovomucoïde" (voir page 87) et dans la Discussion de nos résultats personnels (voir page 115).

Dans nos recherches, nous avons essentiellement appliqué les types de dégradation 2 et 4 et nous exposerons donc successivement les résultats concernant:

- I - l'exploration de la structure du groupement polyosidique de l'ovomucoïde
- II- la détermination du mode de liaison polyoside-protéine dans l'ovomucoïde.

## I - EXPLORATION DE LA STRUCTURE DU GROUPEMENT POLYOSIDIQUE DE L'OVOMUCOÏDE.

Nous avons abordé le problème de la structure du groupement polyosidique de l'ovomucoïde en deux temps.

- 1 - Nous avons d'abord effectué une étude cinétique de l'hydrolyse de l'ovomucoïde par différents agents chimiques afin de déterminer les positions relatives des différents oses et de préciser les meilleures conditions

d'hydrolyse pour obtenir en grande quantité de nombreux polysides.

2 - Nous avons ensuite appliqué le mode opératoire que nous avons choisi à la préparation et à l'isolement des osides présents dans les hydrolysats d'ovomucoïde.

A - Etude cinétique de l'hydrolyse chimique de l'ovomucoïde.

1 - Méthodes.

Nous avons utilisé les agents d'hydrolyse suivants:

- acides acétique, formique, chlorhydrique et sulfurique
- résine échangeuse de cations (Dowex 50).

a) Hydrolyse acide:

Nous avons rapidement rejeté l'acide acétique, inefficace pour l'hydrolyse des liaisons osidiques et l'acide formique qui donne facilement des esters avec les glucides pour retenir seulement les acides sulfurique et chlorhydrique.

Notre mode opératoire est le suivant:

les hydrolyses d'ovomucoïde sont effectuées (en solution à 3 g pour 100 ml d'acide) à 80° et à 100° pendant des temps variant de 1 minute à 8 heures, avec les agents d'hydrolyse suivants:

- HCl à pH 1,6
- HCl 0,1 N, 1 N et 2 N
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N et 0,5 N

Après refroidissement, les hydrolysats sont dialysés à 4° pendant 4 jours, contre de l'eau distillée (4 à 5 volumes) renouvelée chaque jour. Les fractions dialysables sont rassemblées, concentrées et leur teneur en hexoses, en glucosamine et en acide N-acétylneuraminique est déterminée en appliquant les méthodes colorimétriques que nous avons décrites plus haut. Elles sont ensuite purifiées par un passage successif sur des échangeurs de cations et d'anions (voir page 29) et la fraction "neutre" est soumise, après concentration, à la chromatographie sur papier dans différents systèmes solvants.

Les fractions adialysables sont analysées du point de vue de leur teneur en hexoses et en glucosamine; elles sont ensuite concentrées et

leur composition en glucides est déterminée suivant le mode opératoire décrit plus haut: hydrolyse acide, purification sur échangeurs d'ions, chromatographie quantitative sur papier.

b) Hydrolyse par une résine polystyrène sulfonée:

Nous avons effectué des hydrolyses cinétiques de l'ovomucoïde par une résine insoluble polystyrène sulfonée (Dowex 50 X 8 - mesh 25-50, forme acide)<sup>x</sup>. Le mode opératoire est le suivant:

500 mg d'ovomucoïde en solution dans 100 ml d'eau sont maintenus à 100° sous agitation en présence de 50 ml de résine humide. Des prélèvements sont effectués à des temps déterminés et les hydrolysats sont directement soumis à l'analyse chromatographique.

2 - Résultats.

Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants:

- a) Comme dans le cas de nombreux glycoprotéides, les liaisons sialyl sont hydrolysées sélectivement par l'acide sulfurique 0,1 N à 80° en 60 minutes.
- b) quel que soit le type d'hydrolyse effectuée à 100°, le galactose apparaît le premier sur les chromatogrammes suivi rapidement par la N-acétylglucosamine. Le mannose est libéré beaucoup plus tardivement (Tableau VIII, page 60). En outre, une tache apparaît elle aussi dès le début de l'hydrolyse et disparaît très rapidement (figure 9), sa vitesse de migration chromatographique est légèrement supérieure à celle du galactose, nous ne l'avons pas encore identifiée.

Ces résultats sont illustrés dans les figures 9 et 10; ils sont confirmés par le tracé des courbes de libération des oses dosés par chromatographie (figure 11).

- c) Au fur et à mesure que l'hydrolyse se poursuit la fraction adialysable s'appauvrit en galactose et en glucosamine. Après un temps variable suivant les conditions d'hydrolyse, elle ne contient plus que du mannose et de la N-acétylglucosamine (figure 12).

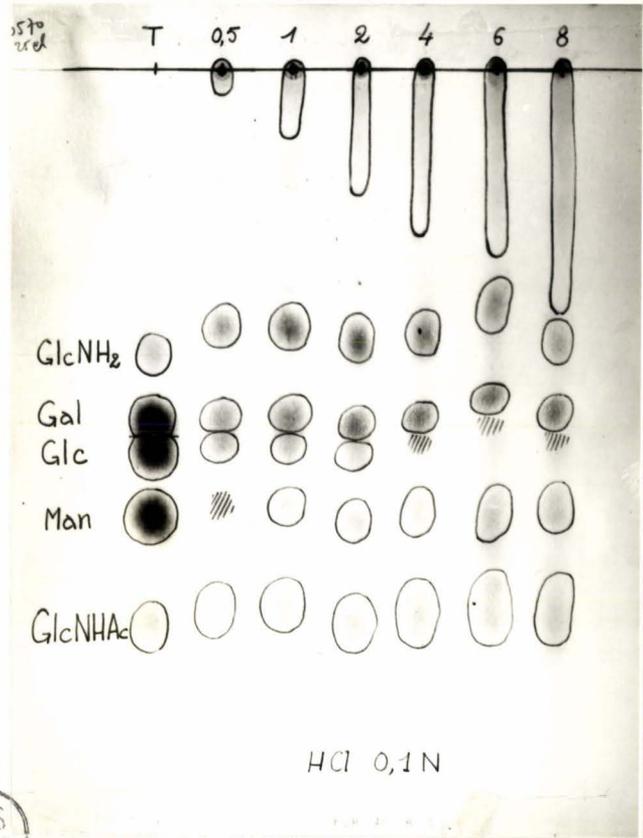
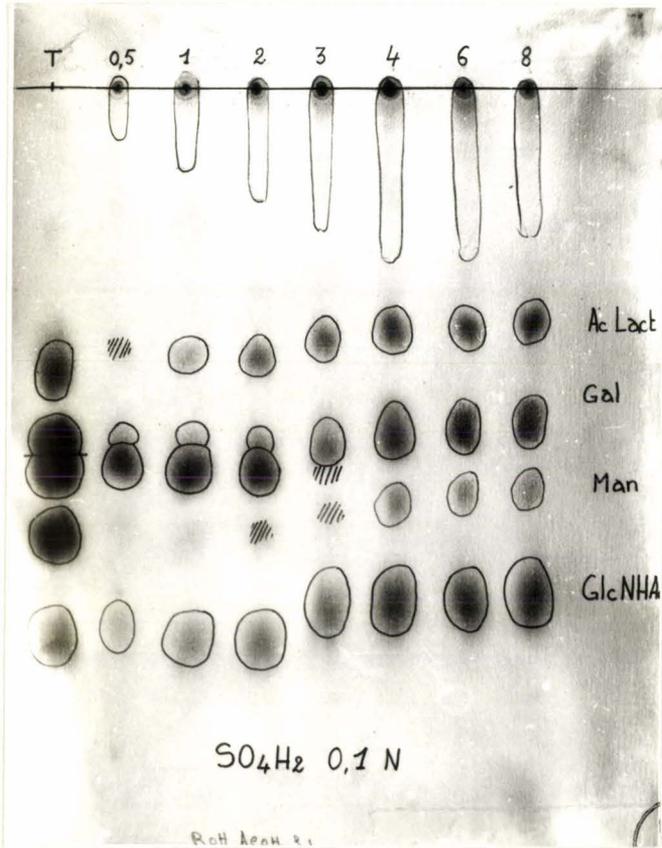
---

<sup>x</sup> la forme acide d'un échangeur de cations polystyrène sulfoné est obtenue par le passage d'acide chlorhydrique 3 N (500 ml pour 50 à 100 ml de résine) suivi d'un lavage soigneux à l'eau distillée jusqu'à pH 6 (environ 6 litres d'eau pour 50 à 100 ml de résine).

Figure 9

Chromatographie de la fraction dialysable d'hydrolysats d'ovomucoïde effectuée par  $H_2SO_4$  0,1 N et HCl 0,1 N à  $100^\circ$  (système solvant: n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5), révélation par l'oxalate d'aniline) Les nombres indiquent en heures ou en minutes la durée de l'hydrolyse. Les chiffres romains désignent les osides (voir Tableau IX, page 72).

Gal: galactose, Man: mannose, GlcNHAc: N-acétylglucosamine, Ac.Lact :  
*N-acétyllactosamine*



U.S.  
LILLE

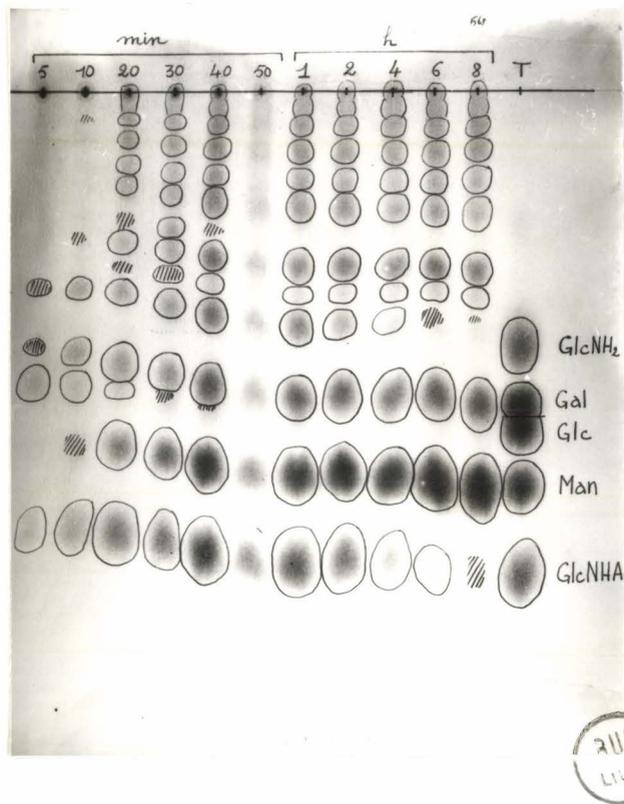


Figure 10

Chromatographie de la fraction dialysable d'hydrolysats d'ovomucoïde effectués par le Dowex 50.

(voir légende figure 9).

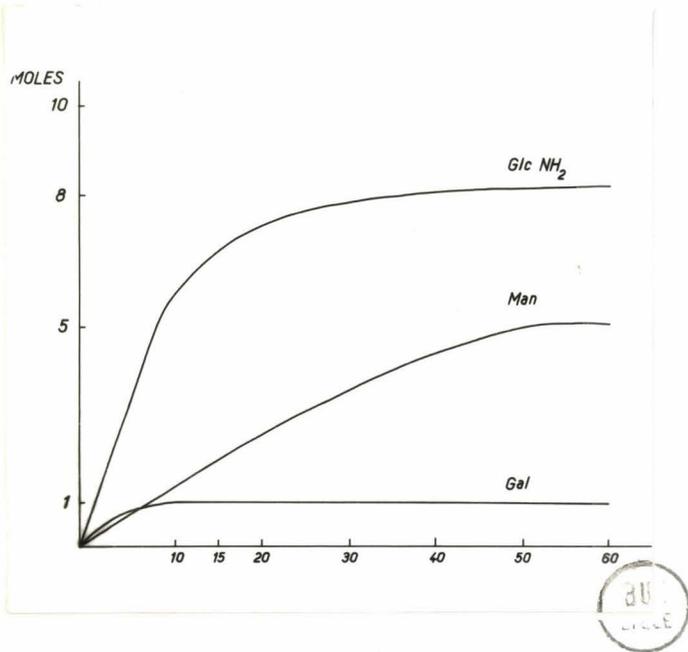
TABLEAU VIII

Délais d'apparition (en minutes)  
des oses et d'osides dans des hydrolysats  
divers d'ovomucoïde.

Agent d'hydrolyse	Gal	Man	GlcNHAc	LactNHAc	Man → Man	Man → Man → GlcNHAc
HCl pH 1,6	60	90	180	480		
HCl 0,1 N	30	60	45	60	480	
HCl 1 N	5	5	8	10	15	40
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 N	30	30	45	120		
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 N	10	10	15	20	90	90
Dowex 50	5	5	10	10	20	40

LactNHAc : N-acétyllactosamine

a



b

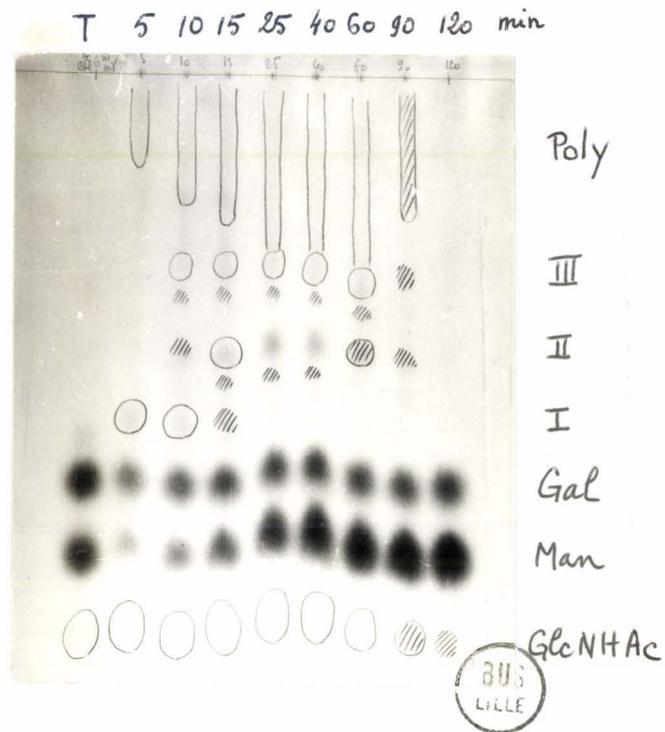


Figure 11

- a) Courbes de libération des oses au cours d' une hydrolyse de l'ovomucoïde par HCl 1 N, à 100°.
- b) Chromatogramme du même hydrolysats.

I: N-acétyllactosamine, II: mannobiose, III : mannotriose.  
Poly: osides supérieurs.

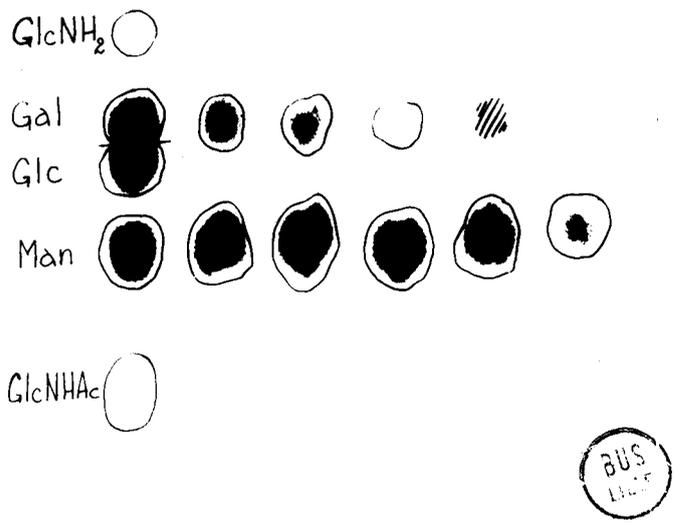
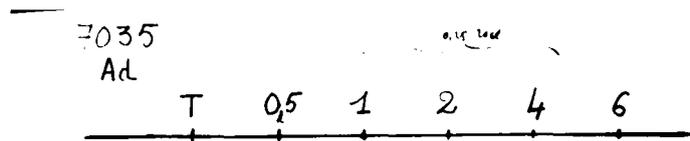


Figure 12

Chromatographie d'un hydrolysat  
chlorhydrique (fraction adialysable, HCl 0,1 N, 100°)

Les chiffres indiquent en heures la durée de l'hydrolyse.

- d) L'hydrolyse acide libère principalement des oses et peu d'oligosides. Seule parmi ceux-ci la N-acétyllactosamine apparaît dès le début de l'action des acides.

L'existence dans la partie supérieure du chromatogramme d'une traînée d'osides, qui s'allonge au fur et à mesure que se poursuit l'hydrolyse montre que la libération des oses laisse au début de l'hydrolyse un oside de poids moléculaire relativement élevé qui reste au point de départ et dont la "dépolymérisation" ultérieure se manifeste par une intensification de l'effet de traînée.

- e) L'hydrolyse par la résine polystyrène sulfonée donne des résultats identiques en ce qui concerne les oses mais elle fournit, contrairement à l'hydrolyse acide, de nombreux oligosides en quantité élevée (figure 10). Parmi ceux-ci la N-acétyllactosamine (oside I, voir Tableau IX) et le galactosidomannose (oside II, voir Tableau IX) apparaissent dès le début de l'hydrolyse.

### 3 - Conclusions.

Les observations précédentes nous permettent de tirer les conclusions suivantes:

- a) L'hydrolyse acide dégrade progressivement les mucopolysides en libérant préférentiellement les oses. Elle sera donc appliquée à la détermination des positions relatives des oses dans les molécules de polysides.
- b) Au contraire, le procédé d'hydrolyse par les résines polystyrène sulfonées permet d'obtenir de nombreux oligosides; il représente donc la méthode de choix pour préparer en grande quantité les osides et pour explorer la structure intime des molécules de mucopolysides.

Il semble, à l'examen du Tableau IX, dans lequel nous avons précisé la composition des osides, que les résines polystyrène sulfonées coupent préférentiellement les liaisons N-acétylglucosaminidyles. En effet, la plupart des osides libérés par leur action possèdent la N-acétylglucosamine en position terminale.

- c) Apparaissant dès le début de l'hydrolyse, l'acide sialique, le galactose, une fraction importante de la N-acétylglucosamine se trouvent en position "externe" par rapport à un noyau plus résistant composé de mannose et de N-acétylglucosamine.

Bragg et Hough (261) ont obtenu des résultats identiques en étudiant la cinétique d'hydrolyse de l'ovomucoïde par un échangeur de cations

(Amberlite IR-120, forme acide): le galactose est totalement libéré en une heure, tandis que l'hydrolyse quantitative des liaisons mannosyles nécessite 48 heures.

Toutefois, la libération tardive d'une partie des osamines n'implique pas forcément que ces molécules se trouvent en position "interne". En effet, elle pourrait s'expliquer par la résistance plus grande des liaisons glucosaminidyles provoquée par l'apparition d'un proton au voisinage de ces liaisons, consécutive à la désacétylation de la fonction acétamido et à l'apparition d'une fonction  $\text{NH}_3^+$  (Foster, Horton et Stacey (262)).

En outre, l'apparition précoce de la N-acétyllactosamine et du galactosidomannose suggère que ces osides se trouvent en position "externe" et que des chaînes mucopolyosidiques pourraient bien commencer par les séquences  $\text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-4} \text{GlcNHAc} \rightarrow$  et  $\text{Gal} \rightarrow \text{Man} \rightarrow$ . Ce résultat est à rapprocher de ceux de Jeanloz (263) pour l'orosomucoïde, de Spiro (264) pour la fétuine et de Jayle et al (265) pour l'haptoglobine. Ces auteurs ont en effet proposé des schémas de structure de ces différents glycoprotéides dans lesquels les chaînes osidiques commencent par l'enchaînement  $\text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-4} \text{GlcNHAc}$ .

## B - Isolement et étude de la structure d'oligosides présents dans les hydrolysats partiels de l'ovomucoïde.

L'application des méthodes classiques d'isolement et d'exploration de la structure des osides déjà mises en oeuvre par Montreuil (266) dans l'étude des osides du lait de femme, nous a permis d'isoler, à partir des hydrolysats partiels d'ovomucoïde par le Dowex 50, environ 20 oligosides et de déterminer la composition de 15 d'entre eux.

Nous décrivons successivement:

- 1- le protocole de l'hydrolyse de l'ovomucoïde par l'échangeur de cations polystyrène sulfoné Dowex 50
- 2- les procédés que nous avons appliqués à l'isolement des oligosides
- 3- les méthodes d'exploration de leur structure
- 4- les résultats que nous avons obtenus.

## 1 - Hydrolyse partielle de l'ovomucoïde par le Dowex 50:

Nous avons exposé les raisons qui nous ont fait choisir le Dowex 50 comme agent d'hydrolyse de l'ovomucoïde: il fournit, en effet, des quantités importantes d'osides. L'étude cinétique que nous avons réalisée nous a permis de fixer à 60 minutes la durée de l'hydrolyse, dans ces conditions on obtient une quantité maximale d'osides.

Le mode opératoire est le suivant:

5 g d'ovomucoïde dissous dans 1 litre d'eau distillée, sont hydrolysés pendant une heure à 100° sous agitation continue, par 400 ml de Dowex 50 (Mesh 20-50), forme acide, (voir page 57). L'hydrolysate est recueilli par filtration et la résine est introduite dans une colonne, puis lavée avec 500 ml d'eau distillée. Les eaux de lavage sont jointes au filtrat et la solution obtenue est concentrée sous pression réduite.

Le fractionnement des osides est ensuite effectué.

## 2 - Fractionnement des osides:

### a) Méthodes:

Nous avons appliqué, parfois en les combinant, les procédés de fractionnement suivants:

- chromatographie préparative sur papier
- chromatographie préparative sur colonne de cellulose
- chromatographie sur colonne de charbon Celite selon Whistler et Durso (267)
- électrophorèse préparative sur papier.

### Chromatographie préparative sur papier:

Nous nous bornerons à exposer le principe de ce procédé classique. La solution d'osides est déposée en un trait continu sur toute la largeur d'une feuille de papier Whatman n°3<sup>x</sup>. La chromatographie est effectuée à l'aide de systèmes solvants qui donnent rapidement de bonnes résolutions des osides:

---

<sup>x</sup> l'épaisseur relativement importante du papier Whatman n°3 permet de déposer jusqu'à 100 mg de glucides sur un chromatogramme.

- solvant n°1: n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5) (Partridge (268)) 6 jours
- solvant n°2: pyridine-acétate d'éthyle-eau (1:2:2) (Jermyn et Isherwood (269))  
1 jour.
- solvant n°3: n-butanol-éthanol-eau (40:11:19) (Hough, Jones et Wadman(270))  
5 jours.

Après un séchage du chromatogramme à l'air ambiant, deux bandes latérales sont découpées et révélées pour repérer l'emplacement des bandes de migration des osides. Celles-ci sont découpées dans la partie non révélée du chromatogramme et éluées à l'eau distillée par la méthode de Dent (271). L'éluat est recueilli dans une capsule contenant un mélange de toluène et de chloroforme, évaporé à sec et soumis à des contrôles d'homogénéité chromatographiques ou électrophorétiques dans différents systèmes solvants ou dans différents tampons.

#### Chromatographie sur colonnes de cellulose:

Nous avons utilisé le dispositif de chromatographie "chromax LKB" constitué par un cylindre de cellulose de 40 x 5 cm.

1 à 2 g de glucides totaux sont dissous dans 20 ml du système solvant utilisé ultérieurement pour la chromatographie (n-butanol-éthanol-eau (40:11:19)). La solution est déposée au sommet de la colonne et la chromatographie effectuée par le passage lent du solvant (0,5 à 1 ml par minute). La solution efférente est recueillie à l'aide d'un collecteur de fractions. Chacune de celles-ci est évaporée à siccité et soumise à la chromatographie sur papier dans l'un des systèmes solvants précédemment décrits. Les fractions correspondant à chacun des osides sont rassemblées.

#### Chromatographie sur des colonnes de charbon-Célite:

Whistler et Durso ont décrit en 1950 (272), une méthode de chromatographie d'adsorption des oses et des osides sur des colonnes de charbon-Celite. L'éluion des glucides est réalisée par le passage successif, d'eau (éluion des oses) et de solutions aqueuses d'éthanol de concentration croissant de 1,5 à 50%. Utilisé par les auteurs pour étudier les glucosanes provenant de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon, ce procédé a, depuis, reçu de nombreuses applications, comme par exemple, le fractionnement des oligosides du lait de femme (Kuhn et al (273)) et des hydrolysats partiels de glycoprotéides divers comme l'orosomucoïde (Eylar et Jeanloz (274)), l'ovalbumine (Johansen, Marshall et Neuberger (275)), les substances spécifiques des groupes sanguins (Schiffman, Kabat et Leskowitz (276)) ou la fétuine (Spiro (277)).

### Préparation de la colonne de charbon-Celite:

Le charbon (Activit 50XL) est lavé plusieurs fois à l'eau distillée par décantation pour éliminer les particules trop fines. Il est traité en colonne par l'acide chlorhydrique concentré puis par l'eau distillée jusqu'à neutralité; il est enfin séché à l'air libre.

La Celite (n°535) est lavée plusieurs fois par décantation avec de l'eau distillée et séchée à l'air libre.

Le mélange à poids égaux de charbon et de celite est introduit sous forme d'une pâte épaisse dans une colonne de verre puis lavé deux à trois jours avec de l'eau distillée de manière à bien tasser le support chromatographique.

### Chromatographie:

Une solution aqueuse de glucides à 1 % est appliquée au sommet de la colonne (150 ml de charbon-Celite pour 1 g de glucides). Les glucides sont alors déplacés par le passage, sous pression hydrostatique, des solutions suivantes:

- eau : élution des oses et beaucoup plus tardivement des N-acétylosamines.
- éthanol à
  - 1,5 % : élution des diholosides
  - 3,5 % : élution des triholosides
  - 5 % : élution des tétraholosides
  - 7,5 % : élution des pentaholosides
- 10, 25 et 50 %: élution des osides supérieurs.

Le liquide effluent (2 à 3 litres pour chacune des solutions de désorption) est recueilli par fractions de 100 ml qui sont évaporées à siccité et étudiées par chromatographie sur papier. Les fractions correspondant à chaque glucide sont rassemblées.

### Electrophorèse sur papier:

Les oses neutres forment en milieu alcalin des complexes avec l'acide borique et ses sels; ils se comportent alors comme des anions. Cette propriété est mise à profit dans l'électrophorèse préparative des osides.

Notre mode opératoire est identique à celui que nous avons décrit à propos de la chromatographie préparative sur papier (page 65). Les résultats sont généralement plus satisfaisants car la migration s'effectue d'une façon plus régulière mais cette méthode donne rarement des bonnes résolutions des osides.

L'électrophorèse est réalisée en tampon borate de potassium à 1 % (pH 9,2). Les solutions d'éluion sont purifiées par un passage sur un échangeur de cation (Dowex 50 qui retient les ions potassium). Le liquide effluent est évaporé à siccité et l'acide borique est éliminé du résidu sec sous la forme d'un complexe volatil qu'il forme avec le méthanol (le résidu sec est repris plusieurs fois consécutives avec du méthanol et évaporé par un courant d'air)(Zill et al(278).

### 3- Procédés d'exploration de la structure des osides:

La détermination de la constitution d'un oside nécessite deux étapes:

- a) la détermination de la composition en oses
- b) la détermination de la séquence des oses dans sa molécule.

#### a) Détermination de la composition en oses des osides:

La détermination en oses neutres totaux et en osamines est réalisée en appliquant les méthodes de dosages colorimétriques que nous avons décrites plus haut (voir page 27 ): les oses neutres par l'orcinol sulfurique et les osamines par la méthode d'Elson et Morgan (voir page 30). La composition molaire en oses des osides est précisée par chromatographie quantitative sur papier des hydrolysats chlorhydriques préalablement purifiés (hydrolyse par HCl 2 N à 100°, pendant 1 heure 1/2; élimination de l'acide chlorhydrique par lyophilisation de l'hydrolysat dont la concentration en acide chlorhydrique est amenée à 0,4 N (Biserte et Moschetto, communication personnelle), chromatographie dans les systèmes solvants 1 ou 2 et détermination des rapports molaires par la méthode au ferricyanure (voir page 29)).

#### b) Détermination de la structure des osides:

La détermination de la structure d'un oside pose un triple problème:

- celui de la nature de l'ose réducteur et de son dosage qui permet de préciser le poids moléculaire de l'oside,
- celui de la séquence des oses,
- celui du point d'attache et de la nature de la liaison glucosidique.

#### Identification et dosage de l'ose réducteur:

L'identification et le dosage de l'ose terminal sont réalisés par réduction de la fonction semi-acétalique par le borohydrure de potassium ou de sodium. Un chromatogramme quantitatif de l'hydrolysat chlorhydrique et un dosage colorimétrique des oses et des osamines effectués avant et après la réduction par le borohydrure permettent d'identifier et de doser l'ose porteur

de la fonction réductrice. On détermine de cette manière le poids moléculaire de l'oside. Le mode opératoire est le suivant:

la réduction des osides est effectuée en solution aqueuse pendant 15 à 18 heures à 4° par le borohydrure de potassium (rapport borohydrure/substrat = 10). Les dosages colorimétriques "comparatifs" des oses et des osamines sont effectués sur la solution initiale et la solution réduite. - les prélèvements des parties aliquotes de la solution d'osides destinées au dosage colorimétrique et à la détermination chromatographique des rapports molaires des oses sont effectués avant la mise en contact avec le borohydrure car le dégagement gazeux qu'elle entraîne rend impossible un prélèvement volumétrique ultérieur.<sup>x</sup> - La solution réduite destinée à l'identification de l'hexitol formé et à la détermination chromatographique des rapports molaires des oses résiduels est purifiée, (Dowex 50: élimination du potassium; méthanol: élimination de l'acide borique sous forme de borate de méthyle, voir page 68), hydrolysée (HCl 2 N, 1 heure 30 à 100°) et chromatographiée. Les hexitols sont identifiés par électrophorèse en tampon borate de potassium suivie d'une révélation par le réactif au nitrate d'argent alcalin de Trevelyan, Proctor et Harrison (279)<sup>xx</sup> ou à la vanilline de Godin (280)<sup>xxx</sup>. Les hexo-<sup>xxxx</sup>saminitols peuvent également être révélés par un réactif à la ninhydrine.

---

<sup>x</sup> Le borate de potassium diminue la coloration donnée par les osamines avec le réactif d'Elson et Morgan; son interférence est éliminée par l'introduction de témoins de la solution d'osides renfermant la même quantité d'agent réducteur préalablement détruit par quelques gouttes d'HCl.

<sup>xx</sup> A 1 ml d'une solution aqueuse saturée de nitrate d'argent on ajoute 200 ml d'acétone et quelques gouttes d'eau pour dissoudre le précipité blanc formé. Les chromatogrammes sont trempés dans cette solution, séchés à température ordinaire, puis trempés dans la solution suivante: 5 ml de solution aqueuse de soude à 40 % dans 200 ml d'éthanol;

<sup>xxx</sup> Solution éthanolique de vanilline à 1 % + 1 volume de solution aqueuse d'acide perchlorique à 3 %. Le mélange est pulvérisé, les polyols apparaissent en bleu après un chauffage à 85°, pendant 5 minutes.

<sup>xxxx</sup> Une solution à 1 g de ninhydrine pour 1 litre de butanol à 10 % d'acide acétique est pulvérisée. Les hexosaminitols apparaissent en violet après un chauffage de 5 minutes à 100°.

### Oxydation periodique:

Principe: l'oxydation periodique des fonctions  $\alpha$ -glycols présentes dans les glucides est susceptible de fournir des renseignements précieux sur la structure des osides.

Nous avons appliqué la technique spectrophotométrique décrite par Glick, Chen et Zilliken (281) dans laquelle la consommation de periodate est suivie à 310  $m\mu$ . La diminution de l'absorbance est due à la réduction de l'acide periodique qui absorbe l'U. V. en acide iodique qui ne l'absorbe pas (Marinetti et Rouser (282)).

### Réactifs:

- Solution d'osides ou de glycoprotéides 0,01 M
- Solution de m-periodate de sodium 0,086 M
- Solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M à pH 5.

Mode opératoire: l'oxydation est effectuée à + 2° pour empêcher la "suroxydation" et à l'obscurité pour éviter la destruction du periodate par la lumière.

A 0,5 ml de la solution glucidique sont ajoutés successivement 0,6 ml de solution de periodate et 3 ml de solution tampon, puis 0,9 ml d'eau distillée. L'absorbance est déterminée à 310  $m\mu$  à des intervalles de temps de plus en plus espacés au fur et à mesure que l'oxydation se prolonge, par exemple, toutes les 15 minutes, puis toutes les 30 minutes, et enfin toutes les heures. L'oxydation d'un diholoside est totale au bout de 5 heures; celle d'un glycoprotéide peut durer plus d'une semaine. Quand l'oxydation est terminée, l'excès de periodate est détruit par l'addition d'éthylène-glycol. L'iodate et les produits d'oxydation acides ou basiques formés sont retenus sur des colonnes de Dowex 50 et de Duolite A 40 et le polyoside oxydé, présent dans le liquide effluent peut être étudié quant à sa composition en oses.

Dosage de l'aldéhyde formique: il est parfois intéressant de doser le formaldéhyde formé au cours de l'oxydation car sa présence implique l'existence dans la substance initiale, d'une fonction alcoolique primaire, voisine d'une autre fonction hydroxyle. Nous avons utilisé la méthode à l'acétylacétone décrite par Guthrie (283) dont le principe est le suivant:

l'acétylacétone donne avec le formaldéhyde un composé jaune qui est dosé par spectrophotométrie. Le réactif est constitué de 2 ml d'acétylacétone de 150 g d'acétate d'ammonium et de 3 ml d'acide acétique, la solution est complétée à 1 litre avec de l'eau distillée. Le mode opératoire est le suivant:

à la solution d'oxydation periodique, ne renfermant pas plus de 25 µg de formaldéhyde par ml on ajoute un volume égal de réactif à l'acétylacétone. La coloration se développe à la température du laboratoire et à l'obscurité. Son absorbance est déterminée à 412 mµ au bout de 30 minutes.

Nous avons observé, dans ces conditions, qu'une molécule de lactose et de thréonine consomment respectivement 3 et 2 molécules de periodate.

#### Hydrolyse partielle des osides:

Le procédé de l'hydrolyse ménagée cinétique est parfaitement applicable aux osides isolés des glycoprotéides. Les conditions sont celles que nous avons décrites à propos de l'ovomucoïde lui-même (voir page 56): hydrolyse cinétique par l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique à des concentrations variables suivie d'une purification sur échangeur d'anions puis d'une chromatographie sur papier.

En outre, l'isolement des osides "inférieurs" et la détermination de leur composition et de leur structure permet parfois d'élucider le problème de la constitution de l'oside qui leur a donné naissance.

#### Méthylation des osides:

Les quantités d'osides que nous avons obtenues ne nous ont pas permis d'appliquer les procédés de perméthylation des osides, seuls susceptibles de permettre la détermination de la structure complète d'un oside. L'application même de la chromatographie en phase gazeuse n'a pu être réalisée, faute de connaître le temps de rétention des dérivés partiellement méthylés du galactose, du mannose et de la N-acétylglucosamine.

#### 4- Résultats.

L'emploi de la méthode d'hydrolyse par un échangeur de cations, l'association des méthodes chromatographiques et l'application des procédés d'exploration de la structure des osides que nous avons décrits plus haut nous ont permis d'isoler et d'étudier la composition et la structure de quinze osides (Chosson, Montreuil et Scheppler (284)). Nous avons rassemblé dans le Tableau IX les schémas de composition ou de structure de ces osides et précisé leur comportement en chromatographie sur papier (rapport des distances de migration de l'oside et du galactose).

Nous nous proposons à présent de décrire en détail les résultats que nous avons obtenus à propos de chacun d'eux.

TABLEAU IX

Composition en oses , schémas de structure et comportement chromatographique d'osides isolés de l'hydrolysate de l'ovomucoïde par un échangeur de cations.

Désignation des glucides	Systèmes solvants <sup>*x</sup>		Composition et schémas de structure des osides
	1	2	
I	0,85	0,75	Gal p-β-1,4→GlcNHAc (N-acétyllactosamine)
II	0,80	0,75	Gal → Man
III	0,63	-	Man-1,4(?)→Man
IV	0,68	0,65	Man-1,3(?)→Man
V	0,70	0,60	Man → GlcNHAc
VI	0,70	0,60	GlcNHAc → Man
VII	0,50	-	Man → (Man → Man)
VIII	0,48	0,37	Man-1,3→Man-1,3(ou 1,4)→GlcNHAc
IX	0,42	0,30	(Man, GlcNHAc) → Man
X	0,38	0,40	Gal → Man → GlcNHAc
XI	0,30	0,30	Gal → GlcNHAc → Man
XII	0,09	-	Man → (Man → Man) → GlcNHAc
XIII	0,13	0,05	(Man, Man, GlcNHAc) → GlcNHAc
XIV	0,14	0,11	(Man, Man, GlcNHAc) → Man
XV	0,05	0,05	Man, GlcNHAc (Man → Man) → GlcNHAc

\*x Système solvant n°1: n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5); système solvant n°2: pyridine-acétate d'éthyle-eau (1:2:2).

## Oside I : N-acétyllactosamine.

### Préparation et isolement :

Au cours des études cinétiques de l'hydrolyse de l'ovomucoïde par les acides dilués ou par les échangeurs de cations, nous avons observé que l'oside I était présent dans tous les hydrolysats dès le début de l'hydrolyse, et que l'acide sulfurique 0,1 N (à 100°) le détachait presque sélectivement de l'ovomucoïde en quelques minutes, la quantité d'oside étant maximale au bout de 6 heures (figure 9 page 58). On obtient, dans ces conditions, au lieu d'un mélange complexe d'osides, comme dans le cas de l'hydrolyse par un échangeur de cations, un hydrolysat de composition simple ne contenant que des oses, des osides "lourds" et de la N-acétyllactosamine que l'on isole aisément par chromatographie préparative sur papier et sur colonne de cellulose (voir pages 55 et 66) ou sur colonne de charbon Celite (voir page 66) (la N-acétyllactosamine est éluée par le passage d'éthanol à 7,5 %<sup>x</sup>).

### Structure de l'oside I:

L'oside I a été identifié à la N-acétyllactosamine (4-O-β-D-galactopyranosido-2-déoxy-2-acétamidoglucopyranose) de la manière suivante:

- a) le galactose et la glucosamine sont dans un rapport équimoléculaire
- b) la chromatographie de l'hydrolysat de l'oside réduit par le borohydrure de potassium (voir page 68) révèle la présence de galactose seul.
- c) la méthode spectrophotométrique de mesure de l'oxydation périodique de Marinetti et Rouser, appliquée par Glick, Chen et Zilliken à la N-acétyllactosamine, montre qu'une molécule de diholoside est oxydée par deux molécules d'acide periodique. L'hydrolyse du diholoside oxydé fournit la glucosamine seule.
- d) le diholoside ne donne pas la réaction "directe" d'Elson et Morgan.
- e) maintenu pendant 5 minutes à 100° en présence de carbonate de sodium 0,05 N, il ne fournit pas de chromogène.

---

<sup>x</sup> La présence de N-acétylosamine dans un oside retarde son élution des colonnes de charbon-Celite par rapport à un oside de même taille mais constitué uniquement d'oses neutres. Les N-acétylosamines elles-mêmes sont déplacées par l'eau longtemps après les oses neutres.

Ces deux réactions impliquent un blocage de la fonction alcoolique en 4 de la N-acétylglucosamine. En effet, par chauffage en milieu alcalin, les N-acétylosamines se dégradent en donnant 3 chromogènes qui ont été identifiés par Stanley (285) et par Kuhn et Kruger (286) (figure 13). On voit que ces chromogènes se forment par déshydratation de la N-acétylosamine à partir de sa forme furanose. La formation de chromogène n'est donc possible que si la fonction hydroxyle en 4 de la N-acétylosamine est libre. La connaissance de ce mécanisme est très importante du point de vue de l'étude de la structure d'un polyoside dans lequel une N-acétylosamine occupe la position terminale réductrice:

- si la N-acétylhexosamine est substituée en 4, la formation de chromogène sera impossible.
- si la N-acétylosamine est substituée en 3, la formation de chromogène sera très rapide, on aura tout d'abord passage à la forme furanique (possible puisque la fonction hydroxyle en 4 est libre), puis passage au chromogène par rupture de la liaison osidique; en effet, les liaisons osidyl 1, 3-N-acétylosamine sont très labiles en milieu alcalin.
- si la N-acétylosamine est substituée en 6, la formation d'un chromogène est possible et le reste de la molécule osidique demeure attaché au chromogène.

Dans ces deux cas (substitution en 3 et en 6), les chromogènes formés pourront se condenser avec un réactif au p-diméthylamino-benzaldéhyde .

Les polyosides possédant une N-acétylosamine en position terminale réductrice dont la fonction hydroxyle en 4 est libre, formeront des chromogènes par chauffage en milieu alcalin et donneront "directement" une réaction positive avec le réactif d'Elson et Morgan.

- f) le comportement chromatographique du diholoside est identique à celui de la N-acétyllactosamine précisé par Spiro (287) dans le système solvant: n-butanol-éthanol-eau (10:1:2):  $R_{Gal} = 0,51$ . Il donne en outre les colorations caractéristiques de la N-acétyllactosamine avec les réactifs à l'oxalate d'aniline et à la benzidine trichloracétique (Bacon (288))<sup>x</sup>.

---

<sup>x</sup> Benzidine 0,5 g, acide acétique 10 ml, solution d'acide trichloracétique à 40 % 10 ml, éthanol 80 ml. Le mélange est pulvérisé, les oses sont révélés après un chauffage de 10 minutes à 100°. Il donne une coloration brune, jaune ou verte suivant l'emplacement de la liaison osidique(6, 4, 3).

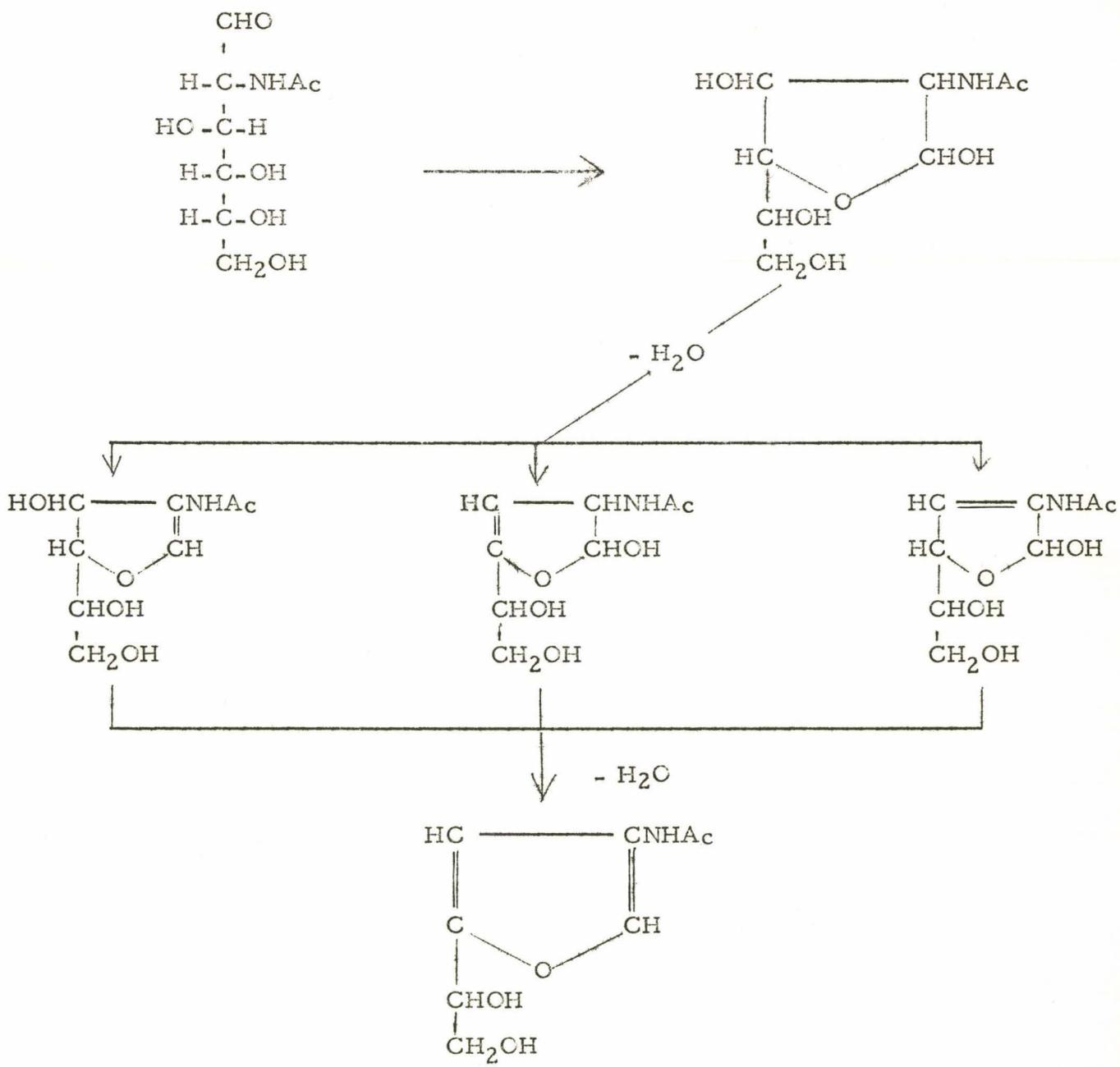
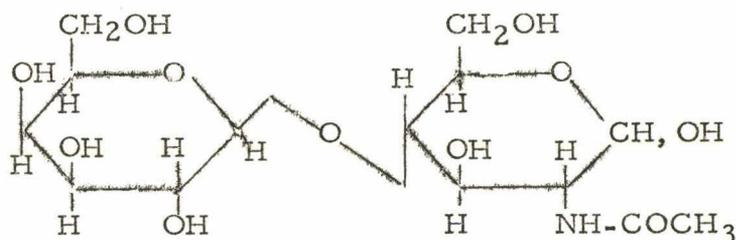


Figure 13

Mécanisme de formation des chromogènes à partir des N-acétylhexosamines d'après Stanley(285) et Kuhn et Kruger (286).

L'oside I est donc bien la N-acétyllactosamine et répond à formule suivante:



L'ensemble des propriétés de la N-acétyllactosamine est résumé dans le Tableau X (page 77).

#### Discussion:

La présence de N-acétyllactosamine dans l'ovomucoïde et les modalités de sa libération sont très importantes à deux titres:

- a) il est intéressant de rapprocher nos résultats de ceux qui ont été obtenus par d'autres auteurs avec différents glycoprotéides. Nous verrons plus loin (voir page 124 ), en effet, que la N-acétyllactosamine a été caractérisée dans de nombreux mucopolysides, comme ceux des substances spécifiques des groupes sanguins, de la mucine gastrique de porc, de l'acide kératosulfurique, de l'orosomucoïde et de la fétuine. Elle semble donc être un chaînon commun à de nombreux glycoprotéides et nous étendrons cette notion pour poser en hypothèse que la N-acétyllactosamine pourrait bien être un constituant commun à la plupart des glycoprotéides contenant du galactose et de la N-acétylglucosamine.
- b) La libération immédiate de la N-acétyllactosamine au cours de l'hydrolyse de l'ovomucoïde implique qu'elle se trouve en position "externe" par rapport au reste de la molécule osidique. Un résultat analogue a été obtenu par les auteurs qui ont caractérisé ce diholoside dans les glycoprotéides. Dans les schémas de structure de mucopolysides proposés jusqu'à ce jour (voir page 64 ) la N-acétyllactosamine est toujours placée en position terminale non réductrice dans les chaînes mucopolysidiques.

TABLEAU X

Propriétés comparées des  $\beta$ -galactosido-  
1,3 - 1,4 - 1,6-N-acétylglucosamines  
(d'après Glick (289)) et de l'oside I isolé de  
l'ovomucoïde

	Gal- $\beta$ -1,3- GlcNHAc	Gal- $\beta$ -1,6- GlcNHAc	Gal- $\beta$ -1,4- GlcNHAc	Oside I
R <sub>Gal</sub> dans le solvant de Spiro <sup>x</sup>	0,60	0,37	0,51	0,50-0,51
Colorations avec le réactif à la benzidine	vert	brun	jaune	jaune
Formation de chromogène				
-avec CO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> 0,025 N à 20° pendant 10 minutes.	+	0	0	0
-avec CO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> 0,05 N à 100° pendant 5 minutes.	+	+	0	0
Réaction d'Elson et Morgan "directe".	+	+	0	0

<sup>x</sup> n-butanol-éthanol-eau (10:1:2).

## Osido II : galactosido-mannose.

### Préparation et isolement :

L'osido II possède le même comportement chromatographique sur papier que la N-acétyllactosamine, mais cette dernière, à cause de la présence dans sa molécule de N-acétylglucosamine, est éluée plus tardivement des colonnes de charbon-Celite. C'est pourquoi l'osido II a été isolé par chromatographie sur colonne de charbon-Celite. Il est élué par le passage d'une solution éthanolique à 5 %.

### Structure de l'osido II :

L'osido II a été identifié à un galactosidomannose de la manière suivante:

- a) le galactose et le mannose sont en proportions équimolaires,
- b) la chromatographie de l'hydrolysat de l'osido préalablement réduit par le borohydrure de potassium révèle la présence du galactose seul.

La faible quantité d'osido II dont nous disposons ne nous a pas permis de pousser plus loin l'étude de sa structure.

### Discussion :

L'osido II, comme la N-acétyllactosamine, apparaît dès le début de l'hydrolyse et se trouve donc, lui aussi, en position "externe" dans les chaînes mucopolyosidiques.

## Osido III : mannosido-mannose (mannobiose).

### Préparation et isolement:

L'osido III est libéré au cours de l'hydrolyse par le Dowex 50. Il a été isolé par chromatographie préparative sur papier ou sur colonne de charbon-Celite d'où il est élué par l'éthanol à 3 %.

### Structure de l'osido III :

L'osido III est un mannosidomannose, en effet:

- a) l'hydrolyse acide fournit uniquement du mannose.
- b) l'hydrolyse du composé préalablement réduit par le borohydrure de potassium montre la disparition d'une molécule de mannose sur deux.
- c) l'oxydation periodique conduit à un résultat anormal puisque 3,5 molécules d'acide periodique sont consommées par molécule de mannobiose.

### Discussion:

a) Le mannosido-mannose est l'un des osides les plus abondants dans les hydrolysats partiels d'ovomucoïde. Il est aussi un des constituants constants des osides supérieurs que nous avons étudiés par hydrolyse ménagée.

Bragg et Hough (290), en 1961, ont eux aussi isolé un mannobiose des produits de l'hydrolyse ménagée de l'ovomucoïde par l'acide sulfurique 1 N pendant 6 heures à 100°, mais ils n'ont pas étudié la structure de ce composé.

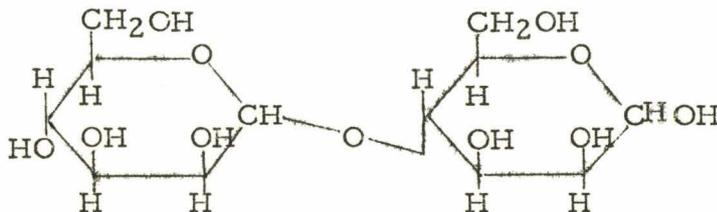
b) L'oxydation periodique d'une molécule de mannosido-mannose se fait avec consommation de 3,5 molécules de periodate, or, suivant Aspinall-Rashbrook et Kessler (291) l'oxydation du mannosido-1,4-mannose réclame quatre molécules d'acide periodique. En outre,

- nous avons caractérisé la présence de formaldéhyde dans les solutions d'oxydation, ce qui exclut la position en 6 de la liaison osidique,

- l'hydrolyse alcaline par la soude 0,01 N à 100° pendant 2 heures est sans action ce qui exclut la possibilité d'une liaison osidique en 3 (Corbett et Kenner (292))

- le mannosido-mannose a la même mobilité que le mannose en électrophorèse en tampon borate de pH 9,2 et l'on sait que ce sont essentiellement les fonctions -OH en 1 et 2 qui agissent sur la mobilité électrophorétique (Foster (293)). Le carbone 2 du mannosido-mannose serait donc libre.

Nous pensons donc pouvoir conclure que l'oside III serait un mannosido-1,4-mannose et répondrait à la formule suivante:



### Oside IV :

L'analyse chromatographique des hydrolysats partiels de certains osides montre la présence d'une tache de mannobiose qui se situe au-dessous de celle de l'oside III. La présence de cet oside isomère expliquerait l'anomalie des résultats que nous obtenons dans l'oxydation periodique des préparations de mannosido-mannose.

Des études sont actuellement en cours pour tenter d'isoler ce dimannose.

isomère auquel pourrait être attribuée, compte-tenu de sa mobilité chromatographique qui exclut une liaison osidique 1,6, la formule provisoire d'un mannosido-1,3-mannose.

Osides V et VI : Mannosido-N-acétylglucosamine  
N-acétylglucosaminido-mannose

Ces deux osides ont les mêmes comportements chromatographique et électrophorétique. Ils ont été obtenus en mélange par chromatographie préparative sur papier. La présence de ces deux isomères a cependant pu être démontrée de la façon suivante:

- a) Le mannose et la N-acétylglucosamine sont en proportion équimoléculaire
- b) La réduction par le borohydrure de potassium fait disparaître la moitié des glucides initiaux (mannose + N-acétylglucosamine) et la chromatographie de l'hydrolysate de l'oside réduit révèle la présence de mannose, de glucosamine, de mannitol et de glucosaminitol.

Nos résultats confirment ceux de Levene et Mori (294) qui, en 1929, isolèrent des produits d'hydrolyse de l'ovomucoïde un diholoside du mannose et de la N-acétylglucosamine qui, après réduction, fournit du mannitol, il correspond donc à l'oside VI que nous décrivons: N-acétylglucosamine-mannose. En outre, Bragg et Hough (295) caractérisèrent en 1961 dans les hydrolysats acides d'ovomucoïde une mannosyl-N-acétylglucosamine vraisemblablement identique à notre oside V.

Oside VII : mannosido-1,3(?)-(mannosido-1,4-mannose); (mannotriose).

Préparation et isolement :

L'oside VII est présent en faible quantité dans les hydrolysats d'ovomucoïde par le Dowex 50, probablement à cause de la labilité plus grande de la liaison 1,3 puisque le mannosido-1,4-mannose, relativement plus stable, est très abondant. L'oside VII a été préparé par chromatographies successives sur colonne de cellulose, sur charbon-Celite et sur papier.

Structure :

L'oside VII serait un mannosido-1,3(?)-(mannosido-1,4-mannose). En effet:

- il est composé uniquement de mannose
- la réduction par le borohydrure de potassium fait disparaître 1/3 du mannose
- l'hydrolyse partielle fournit l'oside III, et l'oside IV en faible proportion ainsi que du mannose (figure 14, page 81).

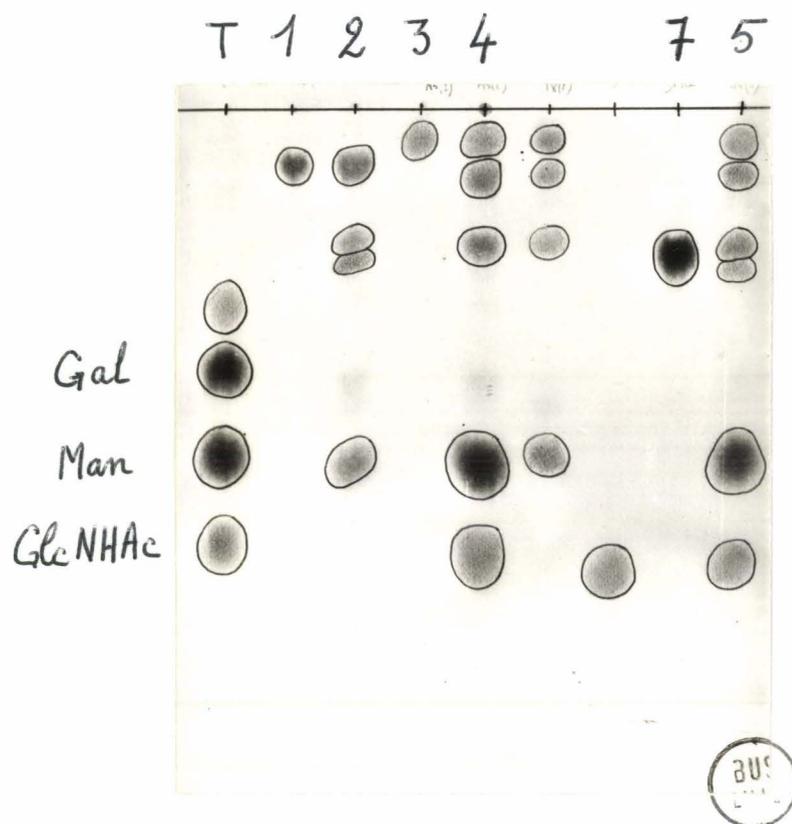


Figure 14

Chromatographie d'hydrolysats partiels effectués par l'acide sulfurique 0,05 N de différents osides préparés à partir de l'ovomucoïde.

Gal: galactose, Man: mannose, GlcNHAc: N-acétylglucosamine  
 1: trimannose (oside VII), 2: hydrolysats partiel de l'oside VII, 3: oside XV,  
 4: hydrolyse partielle de l'oside XV, 5: hydrolysats partiel de l'oside XII,  
 7: mannoïose.

Oside VIII : Mannosido-1, 3-mannosido-1, 3(ou 4)-N-acétylglucosamine:

Préparation et isolement:

L'oside VIII est isolé des hydrolysats d'ovomucoïde par le Dowex 50 en quantité assez importante: chromatographie sur colonne de cellulose puis sur charbon-Celite d'où il est élué par l'éthanol à 10 %.

Structure:

L'oside VIII est composé de mannose et de N-acétylglucosamine (2:1)

- La réduction par le borohydrure de potassium fait disparaître la glucosamine, elle occupe donc la position terminale réductrice.
- L'hydrolyse partielle fournit un mannosido-mannose.
- L'oxydation periodique s'accompagne d'une consommation de deux molécules de periodate par molécule d'oside et l'hydrolyse de l'oside oxydé révèle encore la présence de mannose et de glucosamine.

Nous proposons donc le schéma de structure suivant:



Discussion:

Ce résultat confirme celui de Levene et Mori (296) qui, en 1929, isolaient un triholoside constitué de mannose et de glucosamine (2:1) par hydrolyse partielle de l'ovomucoïde.

Oside IX :

L'oside IX est un isomère de l'oside VIII dont il se distingue par la nature de l'ose réducteur. En effet, la réduction par le borohydrure de potassium fait disparaître la moitié du mannose.

Nous proposons pour cet oside le schéma suivant:

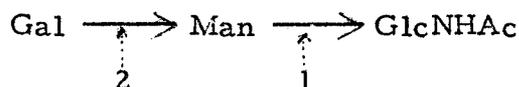


Oside X : galactosido-mannosido-N-acétylglucosamine:

L'oside X est isolé dans les mêmes conditions que précédemment (chromatographie sur colonne de cellulose ou de charbon-Celite, suivie d'une purification par chromatographie sur papier).

Structure :

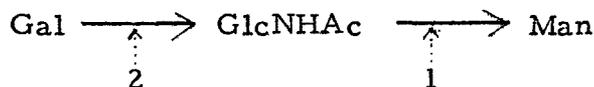
- a) L'oside X est composé de galactose, de mannose et de N-acétylglucosamine en proportion équimoléculaire.
- b) La réduction par le borohydrure de potassium fait disparaître la molécule de N-acétylglucosamine.
- c) Les faibles quantités d'oside dont nous disposons ne nous ont pas permis de poursuivre plus loin son étude. Cependant, en tenant compte de la position "externe" du galactose dans l'ovomucoïde, de l'isolement à partir de l'ovomucoïde d'un galactosido-mannose (oside II - coupure en 1) et d'une mannosido-N-acétylglucosamine (oside V - coupure en 2), nous pouvons poser en hypothèse que l'enchaînement des oses se fait conformément au schéma suivant:



Oside XI : galactosido-N-acétylglucosaminido-mannose:

L'oside XI est composé de galactose, de mannose et de N-acétylglucosamine en proportions équimoléculaires. Il s'agit donc d'un isomère de l'oside X dont il se distingue par la nature de l'ose réducteur qui est ici le mannose.

Isolé en trop faible quantité ce composé n'a pu être étudié quant à sa structure, mais l'isolement à partir des hydrolysats partiels de l'ovomucoïde de N-acétyllactosamine (oside I - coupure en 1) et de N-acétylglucosaminido-mannose (oside VI - coupure en 2) nous permet de donner le schéma hypothétique de structure suivant:

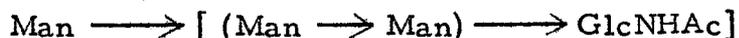


Oside XII :

L'oside XII est composé de mannose et de N-acétylglucosamine (3:1). Cette dernière étant en position réductrice terminale.

L'hydrolyse partielle acide fournit du mannose, de la N-acétylglucosamine et un mannosido-mannose (figure 14, page 81).

Le schéma général de structure est donc le suivant:



Oside XIII :

L'oside XIII est composé de mannose, de N-acétylglucosamine (2:2). Une des molécules de glucosamine est en position terminale réductrice.

Le schéma général de structure est donc le suivant:



Oside XIV :

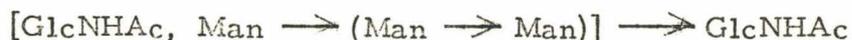
L'oside XIV est un isomère de l'oside XII mais il possède un résidu de mannose en position terminale réductrice. Il correspond au schéma de structure suivant:



Oside XV :

L'oside XV est composé de mannose et de N-acétylglucosamine dans le rapport molaire 3:2. Une molécule de N-acétylglucosamine se trouve en position terminale.

L'hydrolyse acide partielle fournit de la N-acétylglucosamine, du mannose, un mannobiose et le mannotriose. Le schéma provisoire de structure suivant est donc proposé:



5 - Discussion et conclusions:

Le fractionnement des hydrolysats de l'ovomucoïde par le Dowex 50 nous a permis d'isoler plusieurs osides dont les modalités de la libération et l'exploration de la structure nous ont amenée à tirer les conclusions suivantes:

- a) la plupart des osides possèdent une N-acétylglucosamine en position terminale. Ce résultat s'explique par la labilité plus grande des liaisons N-acétylglucosaminidyles qui contraste avec la stabilité des liaisons glucosaminidyles. Le Dowex 50, en respectant les groupements "acétamido" (Painter et Morgan (297)), favorise la libération d'osides porteurs d'une molécule de N-acétylglucosamine en position terminale réductrice.
- b) La détermination de la séquence des oses montre qu'il n'existe pas d'unité

de répétition dans l'ovomucoïde et que l'enchaînement des oses se fait au hasard.

- c) L'isolement d'un mannobiose et d'un mannotriose est en faveur de l'existence dans les mucopolyosides de l'ovomucoïde d'un "noyau" formé essentiellement de mannose sur lequel viendraient se "brancher" des molécules de N-acétylglucosamine; ainsi s'expliquerait la libération préférentielle des N-acétylglucosamines en position "externe" qui apparaissent dès le début de l'hydrolyse, tandis que le mannose apparaît plus tardivement ainsi que le mannobiose et le mannotriose (voir figure 11, page 61).
- d) Nous avons identifié la N-acétyllactosamine et le galactosidomannose parmi les produits de l'hydrolyse de l'ovomucoïde, et démontré que ces diholosides apparaissaient dès le début de l'hydrolyse de l'ovomucoïde, ils se trouvent donc en position "externe" par rapport au reste de la molécule et pourraient bien constituer l'extrémité terminale non réductrice des chaînes osidiques. Dans ces conditions, le galactose serait en position terminale. L'apparition du galactose dès le début de l'hydrolyse et sa disparition du mucopolyoside oxydé par l'acide periodique (voir page 108) sont en faveur de cette conception. Bragg et Hough (298) et Chatterjee et Montgomery (299) obtiennent un résultat analogue par oxydation periodique de l'ovomucoïde. Il est intéressant, à cet égard, de signaler que Stacey et Woolley (300) et Bragg et Hough (301) ont identifié le 2, 3, 4, 6-tétraméthylgalactose parmi les produits de l'hydrolyse de l'ovomucoïde méthylé.
- e) Les résultats que nous avons obtenus ne nous permettent pas de réassocier les osides que nous avons isolés car ces derniers proviennent de la dégradation de trois glycoprotéides différents dont chacun est d'ailleurs, vraisemblablement constitué par plusieurs unités polyosidiques différentes.

### C - Conclusions générales à l'étude de la structure du groupement polyosidique de l'ovomucoïde.

Les études que nous avons réalisées sur les modalités de l'hydrolyse chimique de l'ovomucoïde et sur la structure des osides que nous avons isolés des hydrolysats partiels de ce dernier, nous pouvons tirer les conclusions suivantes:

- 1- L'hydrolyse acide dégrade progressivement, par récurrence, les molécules des mucopolyosides. Elle libère donc préférentiellement des oses dont les positions relatives peuvent être ainsi déterminées.

En outre, ce type d'hydrolyse clive les liaisons N-acétyllactosaminidyles en libérant dès le début de l'action de l'acide de la N-acétyllactosamine dont la position "externe" dans la molécule de mucopolyside est ainsi démontrée.

- 2- L'hydrolyse par le Dowex 50 (résine polystyrène sulfonée) en respectant les fonctions "acétamido" de la N-acétylglucosamine coupe préférentiellement les liaisons osidiques particulièrement labiles de cette dernière, ainsi s'explique la présence, dans les hydrolysats partiels d'ovomucoïde, de nombreux osides porteurs d'une N-acétylglucosamine en position terminale réductrice.
- 3- L'étude cinétique de la libération des oses et des osides permet de conclure à la présence de la N-acétyllactosamine et du galactosido-mannose en position "externe" au commencement de la chaîne polyosidique. La libération du galactose dès le début de l'hydrolyse et sa disparition totale par oxydation périodique sont en faveur de ce détail de structure.

L'apparition précoce d'une quantité importante de glucosamine implique l'existence de branchements riches en ce glucide. Le mannose, au contraire, ainsi qu'une partie de la N-acétylglucosamine, se trouvent en position plus "interne" et font partie de la fraction plus stable de la molécule.

- 4- L'étude de la structure des osides conduit à la conclusion de l'existence d'un "noyau" de mannotriose sur lequel viennent se greffer des enchaînements galacto-N-acétylglucosaminidyles et galactosido-mannosido-N-acétylglucosaminidyles, et un certain nombre de molécules de N-acétylglucosamines.
- 5- Bien que la reconstitution du "puzzle" dont l'hydrolyse partielle de l'ovomucoïde nous a fourni les pièces nous soit interdite par le fait que l'ovomucoïde est en réalité un mélange de trois glycoprotéides et que l'origine de chacun des osides ne peut être précisée, nous pouvons cependant envisager l'existence de séquences osidiques telles que:



sur lesquelles viendraient se "brancher" des molécules de N-acétylglucosamine

Nos conclusions, dans leurs principes généraux, rejoignent les conceptions de Stacey et Woolley (302) à propos de la structure du polyside de l'ovomucoïde. En comparant, en effet, le schéma proposé par les auteurs (figure 1, page 21) avec nos propres résultats, on observe une certaine similitude de structure générale: galactose en position externe, présence de séquences

galactosido-mannose, N-acétylglucosaminido-mannose et mannobiose, et N-acétylglucosamines branchées. Toutefois, dans les détails, nos résultats ne sont pas en faveur du schéma de Stacey. Dans notre conception en effet, une partie seulement des N-acétylosamines se trouve en position "externe", en outre, le galactose n'est pas directement attaché au mannobiose, enfin le schéma de Stacey ne rend pas compte de la formation d'osides possédant une N-acétylglucosamine en position terminale réductrice.

## II - POINT D'ATTACHE GLUCIDE - PROTEINE DANS L'OVOMUCOÏDE.

Avant d'exposer nos travaux concernant les modalités de l'attache du groupement mucopolysidique avec la chaîne peptidique dans l'ovomucoïde, nous nous proposons de tracer un bref historique de la question d'un point de vue très général:

### HISTORIQUE

La grande stabilité des mucoïdes suggère que la liaison polyside-protéine est de nature covalentielle.

Les travaux de Masamune (303) semblaient démontrer qu'il s'agissait d'une liaison éther puisque l'auteur avait isolé un éther de la sérine et de la N-acétyllactosamine parmi les produits de l'hydrolyse chimique d'une substance de groupe sanguin.

Depuis, plusieurs auteurs ont montré l'existence de liaisons esters et de liaisons acylosidiques entre les acides aminés et les oses du groupement polysidique. Le principe des méthodes utilisées est généralement le suivant: le glycoprotéide est hydrolysé par des protéases diverses comme la pepsine, la trypsine, la papaïne, ou la pronase, et les glycopeptides sont isolés par chromatographie sur échangeurs d'ions et purifiés par chromatographie sur papier ou par électrophorèse préparative.

Les recherches ont principalement porté sur les mucines sous-maxillaires, les globulines immunes, le séromucoïde acide  $\alpha_1$  du plasma humain (orosomucoïde), l'ovalbumine, l'ovomucoïde et les mucopeptides bactériens.

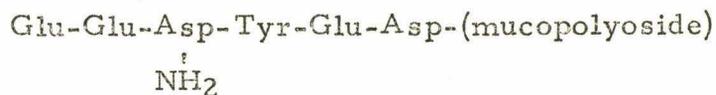
## 1- Structure des mucines sous-maxillaires.

La structure des mucines sous-maxillaires a été élucidée par Gottschalk *et al* (Gottschalk et Murphy (304), Gottschalk, Murphy et Graham (305), Murphy et Gottschalk (306), Gottschalk et Graham (307), Graham *et al.* (308)

Les mucines sous-maxillaires sont des macromolécules d'un poids moléculaire de  $1 (\pm 0,2) \cdot 10^6$ . Le groupement polyosidique est constitué par 800 unités diholosidiques ( $\alpha$ -sialyl-2,6-N-acétylgalactosamine) dont 82 % sont unies avec l'acide aspartique et l'acide glutamique par des liaisons esters (rompues facilement par les alcalis dilués, l'hydroxylamine<sup>x</sup> et le borohydrure de lithium (voir page 52)); les autres unités sont attachées par des liaisons stables à la sérine et à la thréonine, et récemment Gottschalk (communication personnelle) a démontré par l'étude des produits de l'hydrolyse pronasique que la liaison de la N-acétylgalactosamine avec la sérine et la thréonine était de nature O-séryl et O-thréonyl-N-acétylgalactosaminidyle. Ce résultat a été obtenu par l'emploi de N-acétylgalactosaminidase spécifique.

## 2- Glycoprotides des $\gamma$ -globulines.

Les premiers travaux sur les glycopeptides ont été effectués par Rosevear et Smith (309) sur les  $\gamma$ -globulines humaines. Par hydrolyse, papainique suivie d'une purification sur des colonnes de Dowex 50 x 8, de précipitations alcooliques et d'une électrophorèse de zone sur colonne d'amidon, ces auteurs ont isolé trois glycopeptides contenant le groupement polyosidique intact (galactose, mannose, fucose, osamines, acides sialiques 3:5:2:6:1). L'emploi d'exopeptidases leur permit de dégrader progressivement la chaîne peptidique et d'obtenir finalement un glycoaminoacide renfermant seulement de l'acide aspartique; Rosevear et Smith proposèrent le schéma de structure suivant:



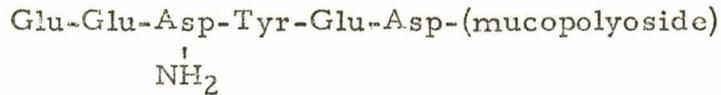
Ce résultat a été confirmé par Nolan et Smith (310) qui, en outre, ont étudié les glycopeptides produits par hydrolyse papainique des  $\gamma$ -globulines du lapin et du boeuf et isolés par chromatographie sur des colonnes de Sephadex G-25, G-50 et de DEAE-cellulose. L'étude de la structure des glycopeptides montre

---

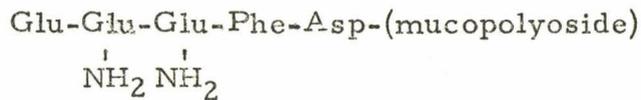
<sup>x</sup> Ce résultat n'a pas été confirmé par Harbon, Herman-Boussier et Clauser (308a).

que la séquence des acides aminés varie avec l'origine des  $\gamma$ -globulines, mais que, dans tous les cas, l'acide aspartique est attaché à la molécule mucopolysidique. Les auteurs ont proposé le schéma de structure glycopeptidique suivant:

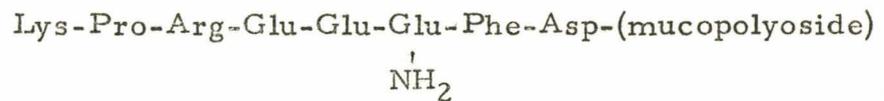
Homme  
-----



Lapin :  
-----



Boeuf :  
-----



Rothfus et Smith (311) ont isolé par hydrolyse partielle d'un glycopeptide obtenu par hydrolyse papainique de  $\gamma$ -globulines humaines, un fragment ne renfermant plus que de la glucosamine, de l'acide aspartique et de l'acide glutamique (2:1:1).

### 3- Glycoprotides de l'orosomucoïde.

L'orosomucoïde est un séromucoïde du plasma humain qui est caractérisé par sa stabilité vis-à-vis des agents de précipitation des protéides (acides perchlorique, trichloracétique et sulfosalicylique; alcools; ébullition). Cette propriété est due à sa teneur élevée en glucides (oses neutrés: 15 à 17 %, osamines 12,5 %, acides sialique 10 à 12 %). Il fait l'objet de recherches actives du point de vue de la structure du groupement glucidique et des modalités de la liaison polyside-protéine.

Ce dernier problème a été abordé avec les protéases classiques. Yamashina (312) montra d'abord que l'orosomucoïde résistait à l'action de la trypsine mais que l'élimination de l'acide sialique levait l'inhibition de l'enzyme.

L'emploi de la pepsine (Weinfeld et Tunis (313)) conduit seulement

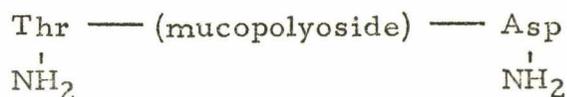
à un enrichissement en sucres de la fraction glycopeptidique. Izumi, Makino et Yamashina (314) et Yamashina et Izumi (315) ont précisé les premiers, en 1961-1962, la nature de l'attache de la protéine sur le mucopolyside dans la molécule d'orosomucoïde. Les auteurs hydrolysent l'orosomucoïde par la pronase et purifient l'hydrolysate sur des colonnes de SM-cellulose. Le glycopeptide est élué par le passage d'une solution de citrate de sodium 0,02 M à pH 3. Ses propriétés physico-chimiques sont les suivantes:

S<sub>20w</sub>                      0,75  
 poids moléculaire      2.800

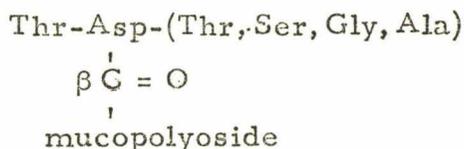
Composition  
 (en moles)

hexoses	8
glucosamine	6
fucose	1
acide aspartique	1
thréonine	1
ammoniaque	2

La composition du groupement polyosidique est identique à celle de l'orosomucoïde natif. L'application de la méthode de dinitrophénylation fournit à la fois l'acide DNP-aspartique et la DNP-thréonine, selon Yamashina, le schéma de structure du glycopeptide est le suivant:



En 1962-1963, ces résultats furent confirmés - sauf toutefois, en ce qui concerne l'attache de la thréonine - par Kamiyama et Schmid (316) qui isolèrent de l'hydrolysate protéasique (pepsine, papaine, chymotrypsine et pronase) de l'orosomucoïde, un glycopeptide renfermant encore plusieurs acides aminés pour lequel ils proposèrent le schéma suivant:



#### 4- Glycopeptides de l'ovalbumine.

Les glycopeptides de l'ovalbumine ont fait eux aussi l'objet de recherches actives.

L'ovalbumine est un glycoprotéide du blanc d'oeuf contenant uniquement du mannose et de la N-acétylglucosamine (2 % et 1,2 % soit respectivement 5 et 3 résidus par molécule d'ovalbumine). Utilisant comme agent protéolytique la pronase, Yamashina et Izumi (317) et Yamashina et Makino (318) sont parvenus en 1962 à dégrader profondément la molécule d'ovalbumine et à isoler par chromatographie sur TEAE-cellulose un glycoprotide ne contenant plus que de l'acide aspartique. Ces résultats venaient confirmer ceux que d'autres auteurs avaient obtenus au cours de leurs études sur des hydrolysats peptiques, tryptiques ou papainiques de l'ovalbumine, et qui avaient proposé les schémas de structure glycopeptide suivants:

Tyr-Asp-(mucopolyside)(Leu-Ser-Thr)-Val

(Johansen, Marshall et Neuberger, 1958, 1961 (319)).

Mucopolyside -(Asp, Leu)- Jevons 1958 (320)

Mucopolyside-Asp-(polypeptide) Nuenke et Cunningham, 1961(321)

Glu-Lys-Tyr-Asp-(mucopolyside)-Leu-Thr-Ser-Val-Leu

(Lee et Montgomery, 1962 (322)).

Fletcher, Marks, Marshall et Neuberger (323) ont récemment confirmé ce dernier schéma (1963).

##### 5 - Glycopeptides de l'ovomucoïde.

Nous décrirons en détail dans le paragraphe consacré à la discussion de nos travaux, les résultats obtenus par d'autres auteurs (Tanaka (324); Hartley et Jevons (325); Beeley et Jevons (326); Marks, Marshall, Neuberger et Papkoff (328); Neuberger et Papkoff (327); Chatterjee et Montgomery (329); Montgomery et Wu (330)).

##### 6 - Glycopeptides bactériens.

Les glycopeptides (ou mucopeptides) des parois bactériennes ont fait l'objet de nombreux travaux qui ont permis d'élucider la structure de certains d'entre eux.

Ghuysen et Salton (331) ont étudié la structure des mucopeptides des parois de Micrococcus lysodeikticus et démontré que la fraction polysidique constituée par l'enchaînement polysidique  $\beta$ -1, 4 d'unités diholosidiques:

$\beta$ -N-acétylglucosaminido-1,6-acide muramique (figure 15) (Salton et Ghuysen (332)) était unie à la chaîne peptidique par une liaison amide entre le carboxyle de l'acide muramique et la fonction amine de l'alanine (Ghuysen (333)). En effet, l'action du lysozyme (muramidase) libère les unités diholosidiques sauf la dernière qui reste fixée à l'acidoamine N-terminal de la chaîne peptidique et qui est détachée par une amidase spécifique, le groupe  $\alpha$ -aminé de l'alanine apparaît alors. Le schéma de structure proposé par Ghuysen (334) est illustré par la figure 15.

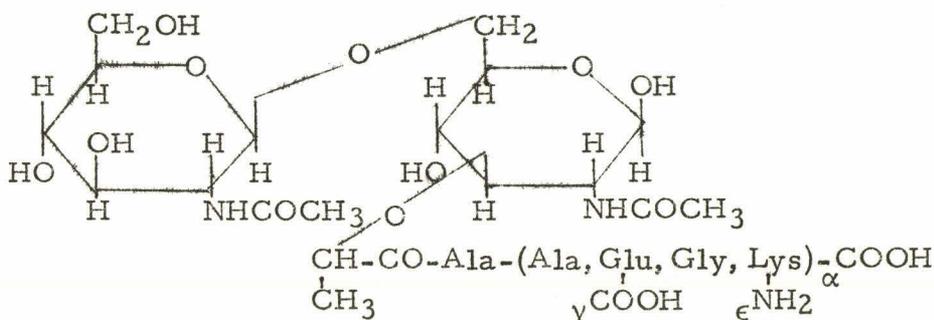
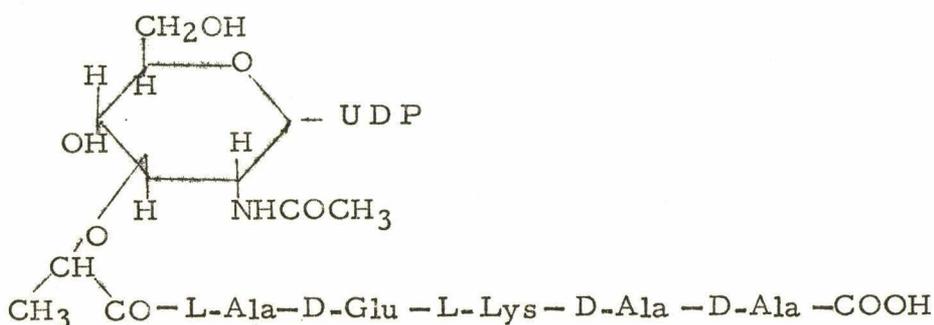


Figure 15

Le monomère est susceptible de se dimériser par l'intermédiaire de la fonction carboxylique libre de la lysine de l'une des molécules avec la fonction  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lysine de la deuxième molécule.

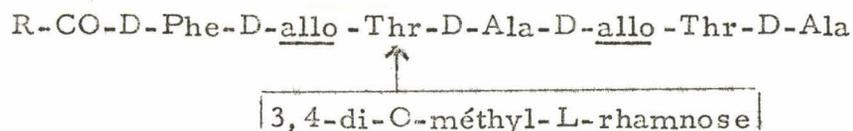
Park et Strominger (335) ont isolé de Staphylococcus aureus un nucléotide de transfert dans lequel on retrouve le même schéma:



Jollès, Nguyen-Trung-Luong-Cros et Lederer (336) ont préparé à partir de la cire D (peptidoglycolipide de parois de Mycobacterium tuberculosis) deux glycopeptides acides pour lesquels ils ont proposé le schéma suivant:

Acide diaminopimélique-COOH, (GalNHAc, Ara)  
 Ala-Glu-COOH, (Ara, Gal)

Chaput, Michel et Lederer (337) ont montré que le mycoside C<sub>2</sub> extrait de Mycobacterium avium était constitué de deux peptido-glycolipides ayant en commun la structure suivante:



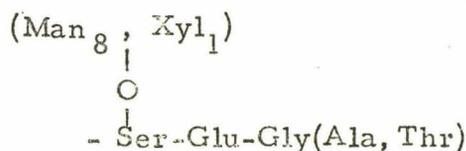
Le carboxyle C-terminal de la D-alanine est estérifié par l'hydroxyle semialdéhydrique du 6-desoxy-L-talose dans l'un d'eux, et par du 3-O-méthyl-6-desoxy-L-talose dans l'autre.

Dans les acides teichoïques des parois de Bacillus subtilis la D-alanine est fixée par une liaison ester sur le carbone 2 ou 3 du ribitol-5-phosphate.

#### 7 - Glycopeptides de glycoprotéides divers.

Les résultats obtenus jusqu'à présent à propos d'autres glycoprotéides sont encore très fragmentaires car ils portent sur des glycopeptides encore complexes. Ils concernent le pleuromucoïde, la transférine, le fibrinogène, la céruléoplasmine et la lactotransferrine (voir page 54).

Toutefois, par hydrolyse pronasique, Tsugita et Akabori (338) ont obtenu à partir de la taka-amylase un glycopeptide dont le schéma de structure est le suivant:



## TRAVAUX PERSONNELS

Nous avons d'abord entrepris de déterminer la nature du point d'attache glucide-protéine dans l'ovomucoïde à l'aide des enzymes classiques qui nous fournirent des glycopeptides complexes. Ultérieurement, ayant eu à notre disposition un échantillon de pronase<sup>x</sup> nous sommes parvenue à isoler, des hydrolysats d'ovomucoïde, trois glycoaminoacides dont nous avons tenté d'élucider la structure.

### A - HYDROLYSES PEPSIQUES, TRYPSIQUES et CHYMOTRYPSIQUES.

L'ovomucoïde étant un inhibiteur puissant de la trypsine, nous avons d'abord fait agir la pepsine, puis la trypsine dont l'activité n'était alors plus inhibée, et enfin la chymotrypsine.

#### 1 - Mode opératoire:

5 g d'ovomucoïde dissous dans 100 ml d'eau ont été soumis successivement à deux hydrolyses par la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine.

#### a) Hydrolyses:

L'hydrolyse pepsique est effectuée à pH 1,8 en présence de 50 mg de pepsine à 37°, pendant 24 heures. Le pH est alors ajusté à 8 avec de la soude et une hydrolyse est réalisée avec 50 mg de trypsine. Après 24 heures d'incubation à 37° on ajoute 50 mg de chymotrypsine et on maintient encore 24 heures à 37°. On effectue un deuxième cycle d'hydrolyses identique au premier.

L'hydrolysats est alors entièrement dialysable.

#### b) Purification des glycoprotides:

L'hydrolysats a été purifié par chromatographie sur papier dans le système solvant: n-butanol-acide formique-eau (75:15:10) (Jollès (339)),

---

<sup>x</sup> Nous remercions vivement le Professeur Yamashina pour les renseignements précieux qu'il nous a fournis et pour l'échantillon de pronase qu'il nous a fait parvenir. Nous remercions en outre la Firme Kaken Chemical Co de Tokyo pour son envoi gracieux de pronase.

Les glycopeptides restent au trait de départ, ils sont élués par l'eau. L'électrophorèse révèle la présence de trois composants qui ont été séparés par électrophorèse préparative en tampon pyridine-acide acétique de pH 3,9, sous 10 volts par cm, pendant 15 heures.

c) Composition des glycoprotides:

Les trois composants contiennent des oses dans les mêmes proportions molaires que l'ovomucoïde, ils renferment de nombreux aminoacides parmi lesquels l'acide aspartique prédomine.

2 - Conclusions.

L'hydrolyse de l'ovomucoïde par les protéases classiques fournit des glycoprotides encore riches en aminoacides. Elle nous apporta cependant, à l'époque, deux informations:

- a) les glycoprotides étaient riches en acide aspartique, celui-ci devait donc jouer un rôle important dans la liaison glucide-protéine.
- b) les glycopeptides étaient entièrement dialysables. Ce résultat était en faveur de l'existence de sous unités glucidiques d'un poids moléculaire maximum de 3.000 à 3.500.

Nous n'avons pas poussé plus loin nos recherches sur l'hydrolyse de l'ovomucoïde par les protéases classiques car nous avons reçu dans l'intervalle un échantillon de pronase.

B - HYDROLYSE PRONASIQUE.

Nous avons appliqué dans ses grandes lignes le mode opératoire décrit par Izumi, Makino et Yamashina (340) à propos de l'orosomucoïde en apportant toutefois quelques modifications et en adaptant le procédé au cas particulier de l'ovomucoïde.

1 - Mode opératoire:

a) Hydrolyse pronasique:

5 g d'ovomucoïde sont dissous dans 1 litre d'acétate de calcium

0,01 M de pH 8<sup>x</sup>; on ajoute 100 mg de pronase et on maintient la solution à 37° pendant 48 heures. Le pH est alors ajusté à 4,5 (acide acétique) et l'hydrolysats est concentré au 1/50ème de son volume initial. Le précipité qui se forme est éliminé par centrifugation et la solution est additionnée de 10 volumes d'éthanol, à 20°. Le précipité est recueilli par centrifugation après un repos de 60 minutes. Il est soumis à deux nouvelles hydrolyses pronasiques effectuées dans les mêmes conditions.

b) Purification des hydrolysats par défécation trichloracétique:

Le précipité final est dissous dans 50 ml d'eau et additionné d'un volume égal d'acide trichloracétique à 10 %. Après un repos d'une nuit à 0° le précipité est éliminé par centrifugation et la solution est purifiée par un passage successif sur un échangeur de cations (Dowex 50 x 8 mesh 20-50, forme acide, 40 x 2 cm), puis d'anions (Dualite A-40, mesh 20-50, forme formiate, 40 x 3 cm). Le liquide effluent et les eaux de lavage des colonnes (environ 500 ml) sont recueillis et lyophilisés. On a éliminé de cette manière des acides aminés, des peptides et l'acide trichloracétique<sup>xx</sup> sans perdre de glycopeptides.

c) Purification sur Sephadex G-25:

La poudre obtenue dissoute dans 2 ml d'eau distillée est soumise à un "tamisage moléculaire" sur une colonne de Sephadex G-25 (40 x 2 cm). Le déplacement des composés est réalisé par l'eau. Des fractions de 2 ml sont recueillies et leur teneur en oses est déterminée par la méthode au phénol sulfurique de Dubois et al. (341)<sup>xxx</sup>. Les fractions glucidiques sont rassemblées et lyophilisées (voir courbe de la figure 16, page 97). Elles sont hétérogènes en électrophorèse sur papier à pH 3,9.

---

<sup>x</sup> l'acétate de calcium est utilisé comme activateur. L'hydrolyse n'est pas réalisée en milieu tamponné par le borate de sodium comme dans la méthode originale car ce dernier gêne les purifications ultérieures. Le pH est maintenu constant à l'aide d'un pHstat.

<sup>xx</sup> le protocole expérimental de Yamashina prévoit une extraction par l'éther de l'acide trichloracétique, nous avons observé des pertes importantes en glycopeptides par ce procédé et avons préféré utiliser un échangeur d'anions

<sup>xxx</sup> 10 µl d'éluat sont introduits dans un tube à essai avec 1 ml d'eau distillée et 1 ml de solution aqueuse de phénol à 5 % (p/v). Après agitation on ajoute rapidement 5 ml d'acide sulfurique concentré. Après un repos de 30 min. l'intensité de la coloration champagne est déterminée à 490 mµ. La méthode est plus sensible que le procédé à l'orcinol sulfurique.

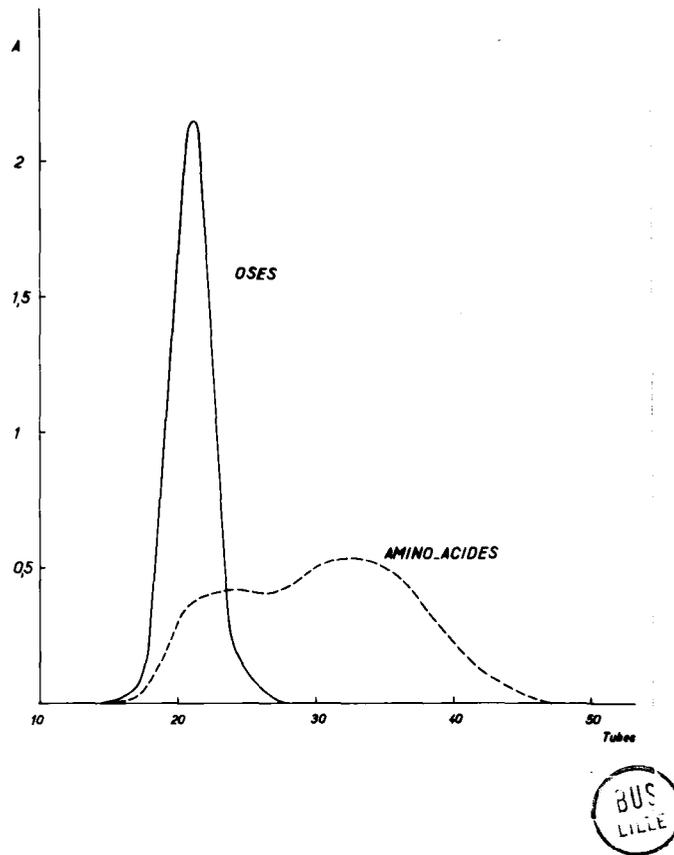


Figure 16

Courbe d'élution d'un hydrolysate pronasique d'ovomucoïde passé sur Sephadex G-25.

— : dosage des oses neutres  
 ---- : dosage des protides.

d) Chromatographie sur SE-cellulose:

250 mg de la préparation précédente sont dissous dans 2 ml d'eau distillée et soumis à la chromatographie sur une colonne de SE-cellulose Serva<sup>x</sup> (30 x 2 cm). Les oses neutres sont dosés dans chaque fraction de 5 ml. (méthode au phénol).

Le passage d'eau distillée fournit un premier pic ( $\alpha$ ) - qui parfois se dédouble - . Les solutions d'élution sont lyophilisées.

La chromatographie est ensuite poursuivie avec un tampon citrate de sodium 0,02 M de pH 3 qui déplace deux composés: pic  $\beta$  et pic  $\gamma$ . Les solutions correspondant à chacun des pics sont rassemblées et débarrassées du citrate de sodium par passage sur un échangeur de cations (Dowex 50 x 8, mesh 20-50, forme acide) puis d'anions (Duolite A-40, mesh 20-50, forme formiate). Les liquides neutres effluents sont lyophilisés . La figure 17 illustre ce procédé de fractionnement .

Les analyses chromatographiques et électrophorétiques des composés  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  montrent que ces deux derniers sont homogènes mais que la préparation  $\alpha$  est très hétérogène: elle fournit en effet 6 bandes en électrophorèse dont l'une est majeure ( $\alpha_4$ ), le composé correspondant est isolé par électrophorèse préparative sur papier.

e) Isolement du composé  $\alpha_4$  par électrophorèse préparative sur papier:

Le composé  $\alpha_4$  a été isolé par la méthode classique d'électrophorèse préparative sur papier (Macherey, MM 807 exempt de protides) en tampon pyridine-acide acétique de pH 3,9.

Le mode opératoire que nous venons de décrire est illustré par le schéma de la figure 18. On obtient finalement trois glycopeptides en proportions différentes suivant les préparations d'ovomucoïde. Le glycopeptide  $\beta$  est en proportion toujours plus importante (60 à 70 % des glycopeptides totaux). Les glycopeptides  $\alpha_4$  et  $\gamma$  représentent respectivement 20 à 25 % et 10 à 15 % des glycopeptides totaux.

---

<sup>x</sup> la SE-cellulose commerciale est lavée plusieurs fois à l'eau distillée par décantation puis introduite dans une colonne de chromatographie, elle est alors activée par l'acide chlorhydrique N (500 ml pour 25 g de SE-cellulose) et lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralité.

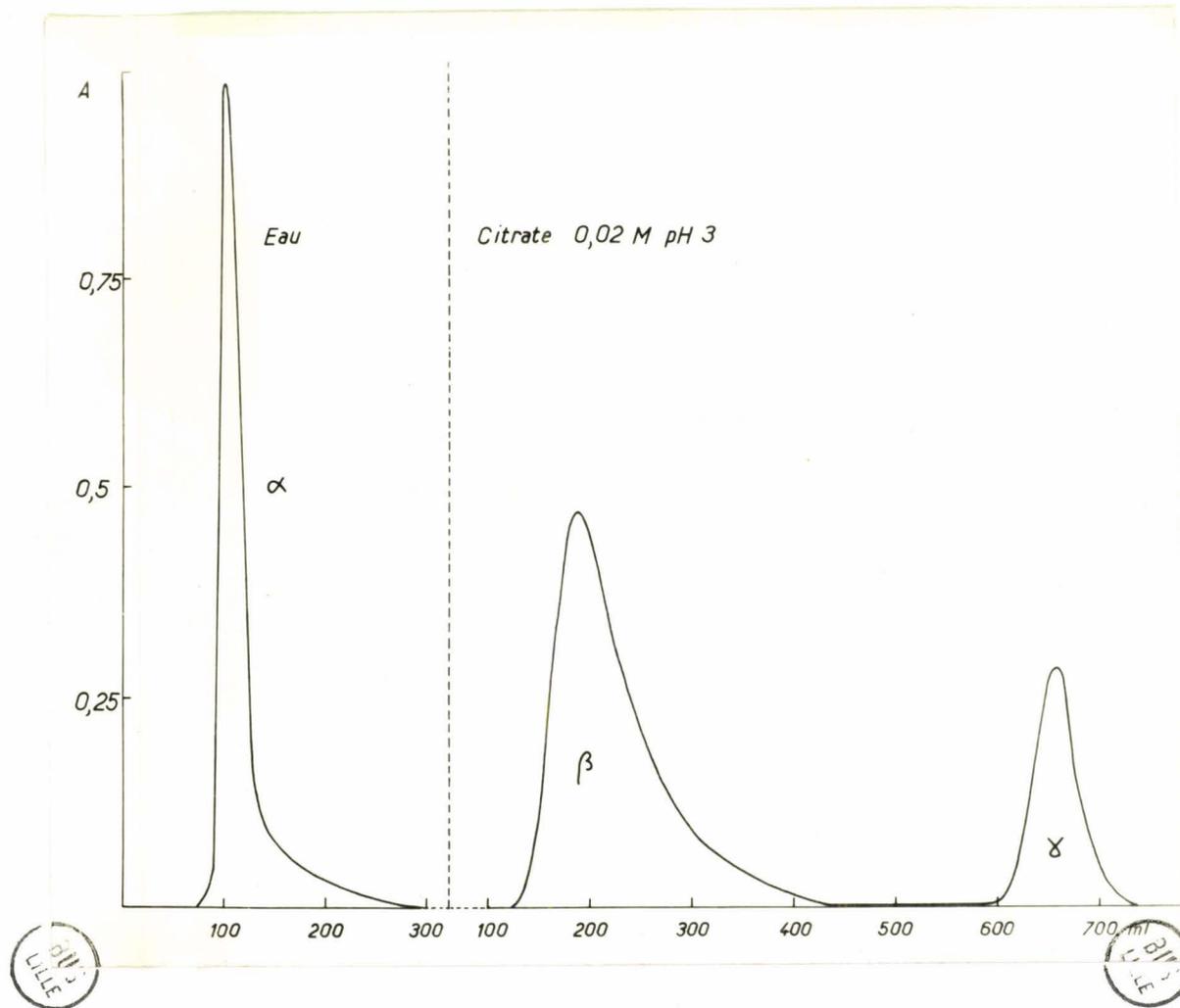


Figure 17

Fractionnement des glycoprotides de l'hydrolysat pronasique de l'ovomucoïde sur SE-cellulose.

En abscisse: volume d'effluent, en ordonnée: absorbance de la coloration donnée par le réactif des oses neutres au phénol sulfurique.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  : glycoprotides  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ .

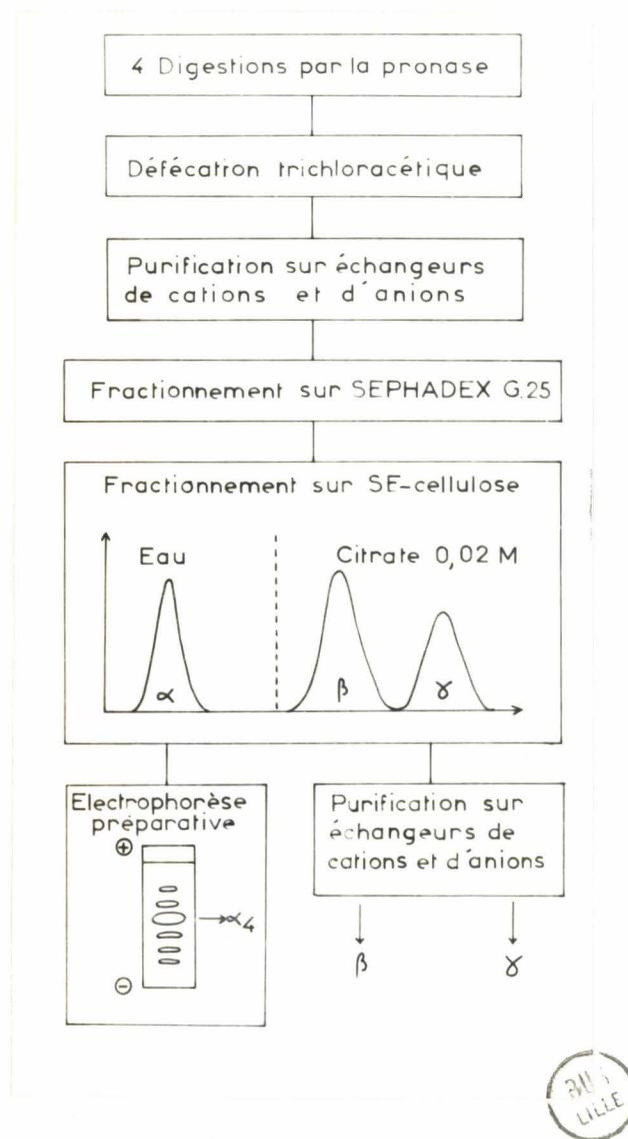


Figure 18

Schéma des procédés d'isolement des glycoprotides des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde.

## 2 - Résultats:

- a) Les dosages des oses, des osamines et des acides sialiques qui ont été systématiquement effectués sur chacune des fractions isolées, ont permis de suivre l'enrichissement des glycoprotéides en glucides. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau XI.
- b) Le mode opératoire que nous avons mis au point nous a permis d'isoler à partir de l'ovomucoïde trois glycoprotides. Dans le paragraphe suivant, nous préciserons leur structure et démontrerons qu'il s'agit de glycoaminoacides (voir page 115) que nous avons désignés par les lettres  $\alpha_4$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ .
- c) Seul le glycoprotide  $\alpha_4$  contient de l'acide sialique et il est remarquable d'observer que les rapports oses/osamines et oses/acide sialique sont identiques à ceux de l'ovoglycoprotéide de Ketterer (voir page 37).

## C - DETERMINATION DE LA COMPOSITION DES GLYCOPROTIDES $\alpha_4$ , $\beta$ , $\gamma$ .

### 1 - Méthodes.

Les oses et les osamines ont été dosés et identifiés suivant les procédés colorimétriques et chromatographiques que nous avons décrits plus haut (voir page 29 et suivantes).

Les acides aminés ont été libérés par une hydrolyse chlorhydrique (HCl 5,6 N, en tube scellé sous azote, à 100°, pendant 24 à 72 heures) et dosés à l'autoanalyseur Technicon ou par électrochromatographie selon le procédé décrit par Biserte et al. (342):

- sur des feuilles de papier Whatman n°1 ou de papier d'Arches n°404 sont déposées alternativement des quantités déterminées de l'hydrolysate (20  $\mu$ g de chaque aminoacide) et des solutions témoins de concentration croissante en acides aminés.

Après séparation des acides aminés (par électrophorèse ou par chromatographie), les feuilles sont séchées plusieurs jours à la température ordinaire et à l'abri des vapeurs d'ammoniaque. Elles sont alors révélées à l'obscurité par un réactif à la ninhydrine (ninhydrine à 1 g pour 100 ml d'une solution de tampon phosphate de sodium 0,01 M, pH 7 dans l'acétone (10:100)). Après un séchage de 60 minutes à la température ordinaire on laisse se développer la coloration par un séjour de 18 heures à 37°.

TABLEAU XI

Caractéristiques des préparations de glycoprotides  
après chacune des étapes de leur isolement.

Nature de la préparation	Composition en glucides (en %)			Oses/ osamine	Oses/ ac. sialique
	Oses	Osamine	Ac. sialique		
Ovomucoïde natif	8,2	14,2	0,9	0,62	9
Dernier précipité de l'hydro- lysate pronasique	16	27,5	2	0,58	8
Après purification sur résines échangeuses d'ions	24	40	2,7	0,60	8,9
Après passage sur Sephadex G-25	30	44	3,3	0,68	9
Glycoprotide $\alpha_4$	35	35	13	1	2,69
Glycoprotide $\beta$	28	45	0	0,62	-
Glycoprotide $\gamma$	30	45	0	0,66	-

Des surfaces de papier identiques englobant largement les taches d'acides aminés sont découpées et la coloration est extraite par 6 ml d'acétone contenant 1 ml d'acide acétique par litre. Les absorbances sont déterminées au bout de 20 minutes, à 575 m $\mu$ .

## 2 - Résultats.

La composition des glycoprotides  $\alpha_4$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  est précisée dans le Tableau XII:

TABLEAU XII

Composition molaire en glucides et en aminoacides des glycoprotides  $\alpha_4$ ,  $\beta$  et  $\gamma$

	$\alpha_4$	$\beta$	$\gamma$
Galactose	1	1	1
Mannose	3	5	5
N-acétylglucosamine	4	9	9
Acide N-acétylneuraminique	1	0	0
Acide aspartique	1	1	1
Thréonine	0	1	0
Cystine	0	0	1

Nous avons rassemblé dans la figure 19 les reproductions photographiques des chromatogrammes bidimensionnels des hydrolysats chlorhydriques des trois glycoprotides.

## 3 - Conclusions:

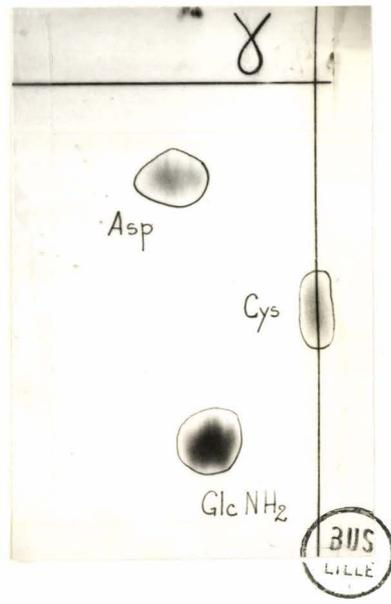
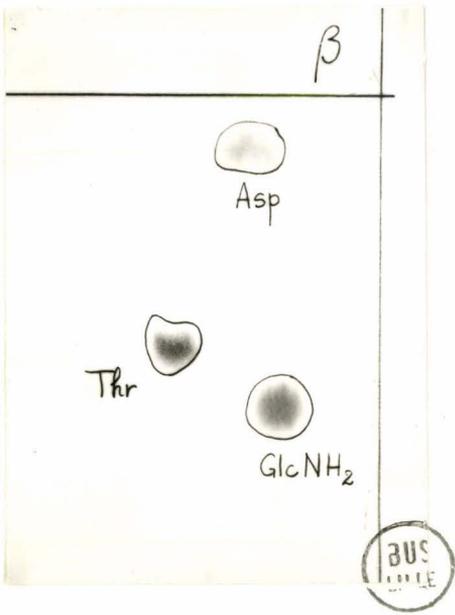
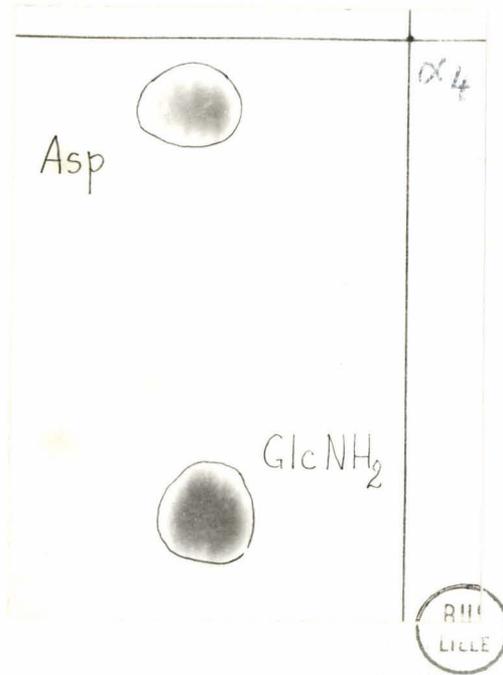
- a) Les glycoprotides  $\beta$  et  $\gamma$  possèdent des compositions en glucides identiques et ne renferment pas d'acide sialique. Ils diffèrent par la nature des deux acides aminés qui les constituent. Au contraire, le glycoprotide  $\alpha_4$  ne possède que de l'acide aspartique et sa composition en glucides est totalement différente de celle des glycoprotides  $\beta$  et  $\gamma$ : présence d'acide sialique, rapport molaire des oses différent.

Figure 19

Chromatographie bidimensionnelle des hydrolysats chlorhydriques  
des glycoprotides  $\alpha_4$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ .

Systèmes solvants: n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5)  
phénol saturé d'eau (atmosphère  $\text{NH}_3$  et HCN).

Révélation à la ninhydrine (solution à 1 g pour 1 litre de butanol à 1 %  
d'acide acétique.



b) Nous pouvons conclure à l'existence dans les préparations d'ovomucoïde de trois glycoprotéides présents dans des proportions variables. Le premier, le plus important (60 à 70 % des préparations) serait l'ovomucoïde proprement dit auquel correspondrait le glycoprotide  $\beta$ . Le second, le moins important (10 à 15 % des préparations) donnerait naissance au glycoprotide  $\gamma$  et posséderait donc une composition en glucides identique à celle de l'ovomucoïde. Il s'en distinguerait néanmoins par la nature des acides aminés impliqués dans la liaison glucide-protéine: acide aspartique et thréonine dans le cas de l'ovomucoïde, acide aspartique et cystine dans le cas du second glycoprotéide que l'on pourrait donc considérer comme un isomère de l'ovomucoïde. Peut-être s'agit d'un cas d'allotypie analogue à ceux qui ont été signalés à propos de la transferrine et de l'orosomucoïde. C'est pourquoi nous proposons le terme d'allo-ovomucoïde pour désigner ce glycoprotéide. L'ovomucoïde et l'allo-ovomucoïde ne renferment pas d'acide sialique. Quant au troisième glycoprotéide, il fournit le glycoprotide  $\alpha_4$ , il s'agirait de l'ovoglycoprotéide de Ketterer dont il possède la composition en glucides.

L'étude des glycoprotides présents dans les hydrolysats pronasiques apporte une confirmation aux résultats des analyses chimiques, électrophorétiques et immunoélectrophorétiques qui démontraient l'existence de trois constituants dans les préparations d'ovomucoïde.

#### D - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES GLYCOPROTIDES $\beta$ et $\gamma$ .

Les faibles quantités du glycoaminoacide  $\alpha_4$  dont nous disposions ne nous ont pas permis de déterminer sa structure<sup>x</sup>.

Nous nous sommes attachée essentiellement à l'étude de la structure des glycoprotides  $\beta$  et  $\gamma$ . En effet la question se posait de savoir si les deux aminoacides constituants étaient unis l'un à l'autre en un dipeptide ou s'ils étaient liés indépendamment l'un de l'autre sur le groupement polyosidique.

---

<sup>x</sup>Des études récentes (Monsigny, Adam-Chosson et Montreuil; résultats non publiés) montrent que dans le glycoprotide  $\alpha_4$  l'acide aspartique est lié à la N-acétylglucosamine. L'hydrolyse acide partielle fournit en effet du 2-amino-1- $\beta$ -(L-aspartamido-)-2-desoxy-D-glucose.

## 1 - Structure du glycoprotide $\beta$ .

### a) Détermination du groupement N-terminal:

Méthode (adaptée de Biserte et Osteux (343))<sup>x</sup>:

50 mg de glycoprotide sont dissous dans 10 ml d'une solution aqueuse de carbonate acide de sodium à 2 % (p/v). On ajoute 0,2 ml de dinitrofluorobenzène et on maintient sous agitation pendant une nuit à la température ambiante et à l'obscurité. La solution est ensuite acidifiée par 0,5 ml d'acide chlorhydrique concentré puis extraite plusieurs fois par 5 ml d'éther. La phase aqueuse décolorée est éliminée. La phase étherée a été soumise à l'analyse chromatographique bidimensionnelle dans les systèmes solvants: toluène -pyridine-monochlorhydrine de glycol-ammoniaque 0,8 M (5:15:3:3) (chromatographie ascendante) dans la première dimension; solution de phosphate de sodium 1,5 M de pH 6 (chromatographie descendante) dans la seconde dimension. On caractérise deux taches: l'une correspond au dinitrophénol, l'autre au DNP glycoprotide dont la vitesse de migration est identique à celle des acides DNP aspartique et glutamique. Une chromatographie séparative monodimensionnelle est donc réalisée dans le solvant à base de toluène. Elle permet de séparer le DNP-glycoprotide du dinitrophénol, puis de l'isoler en l'éluant du papier avec une solution de bicarbonate de sodium à 2 % (p/v), pendant 15 minutes à 50°. Après acidification de la solution, le DNP-glycoprotide est extrait par l'éther. Après évaporation le résidu sec est repris par environ 5 ml d'acide chlorhydrique 5,6 N et hydrolysé en tube scellé pendant 24 heures à 100°. L'hydrolysate refroidi est dilué de moitié avec de l'eau et extrait par l'éther puis par le mélange acétate d'éthyle -butanol secondaire (v/v). La phase étherée après sublimation du dinitrophénol est étudiée par chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes solvants précédents.

### Résultats:

L'application du protocole expérimental précédent permet d'identifier le DNP-aspartique et la DNP-thréonine.

Les deux aminoacides ne sont donc pas liés l'un à l'autre en un dipeptide mais sont attachés indépendamment l'un de l'autre sur le mucopolyside.

Le glycoprotide  $\beta$  est donc un glyco-aminoacide.

---

<sup>x</sup>Nous remercions très vivement le Professeur G. Biserte et Mademoiselle M. Th. Picqué qui ont effectué les déterminations.

b) Action des exopeptidases:

Ce résultat est confirmé par l'emploi de l'aminopeptidase et de la carboxypeptidase.

Méthode:

- Hydrolyse par l'aminopeptidase: nous avons appliqué la technique décrite par Takahashi (344): à 5 mg de glycoprotide dissous dans 0,5 ml de tampon tris-hydroxyméthylaminométhane 0,05 M de pH 8,5 et 5 mM en chlorure de magnésium employé comme activateur, on ajoute 0,5 ml d'une solution d'aminopeptidase contenant 0,1 à 1 mg d'enzyme dissous dans le même tampon et préactivé par un chauffage de 40 minutes à 40°. On maintient à 37° pendant 40 heures. L'hydrolysats est alors soumis à l'analyse chromatographique.
- Hydrolyse par la carboxypeptidase: nous avons utilisé la technique décrite par Spiro (345). Une solution de 2 g de glycoprotide pour 100 ml de tampon véronal 0,03 M de pH 8 contenant 1 % de chlorure de lithium comme activateur et hydrolysée par la carboxypeptidase (rapport enzyme/substrat = 2/25) à 37°, pendant 24 heures. L'hydrolysats est soumis à l'analyse chromatographique.

Résultats:

La carboxypeptidase ou l'aminopeptidase ne libère aucun aminoacide. Ce résultat confirme donc que l'acide aspartique et la thréonine ne sont pas unis en un dipeptide lié au groupement osidique.

c) Action des alcalis dilués:

Le glycoprotide  $\beta$  est stable vis-à-vis de la soude 0,01 N à 100° pendant 2 heures. Les acides aminés ne sont pas libérés<sup>x</sup> et se retrouvent intacts dans les hydrolysats chlorhydriques du glycoprotide.

Les acides aminés, et en particulier la thréonine ne sont donc pas liés par une fonction ester au polyoside.

---

<sup>x</sup> La thréonine est détruite en milieu alcalin. C'est pourquoi la recherche de l'acide aminé libre n'est pas démonstrative et qu'il est nécessaire de rechercher la thréonine restée attachée dans le glycoprotide.

d) Oxydation periodique:

Méthode:

L'oxydation periodique a été effectuée suivant la technique de Glick, Chen et Zilliken (346) (voir page 70). Le mode opératoire est le suivant: à 25 mg de glycoprotide  $\beta$  dissous dans 7 ml d'eau, on ajoute successivement 3 ml de m-periodate de sodium 0,086 M et 15 ml de tampon acétate de sodium de pH 5. La solution est maintenue à 4° et à l'obscurité. L'absorbance à 310 m $\mu$  est suivie pendant plusieurs jours. Elle se stabilise au bout de 50 heures mais on poursuit l'oxydation pendant 36 heures encore (figure 20). La solution est déminéralisée par un passage sur Dowex 50 et sur Duolite A-40 et sa composition est déterminée par la méthode classique de dosages colorimétriques et chromatographiques des oses et des acides aminés.

Résultats:

- 64  $\mu$ M de periodate ont été consommés soit 7,85 molécules par molécule de glycoprotide,
- la composition du glycoprotide oxydé, comparée à celle du glycoprotide intact est la suivante:

	G l y c o p r o t i d e	
	natif	oxydé
Acide aspartique	1	1
Thréonine	1	1
N-acétylglucosamine	10	5
Galactose	1	0
Mannose	5	3

Les résultats concernant les glucides ont été interprétés dans le chapitre consacré à la structure du polyside (voir page 85).

En ce qui concerne le problème du point d'attache glucide-amino-acide les résultats de l'oxydation periodique prouvent que, dans le glycoprotide  $\beta$ , la thréonine est liée au groupement polysidique par une liaison C-O-C. En effet, la thréonine dont les fonctions amine et alcool sont libres se comporte comme un  $\alpha$ -glycol et est oxydée par l'acide

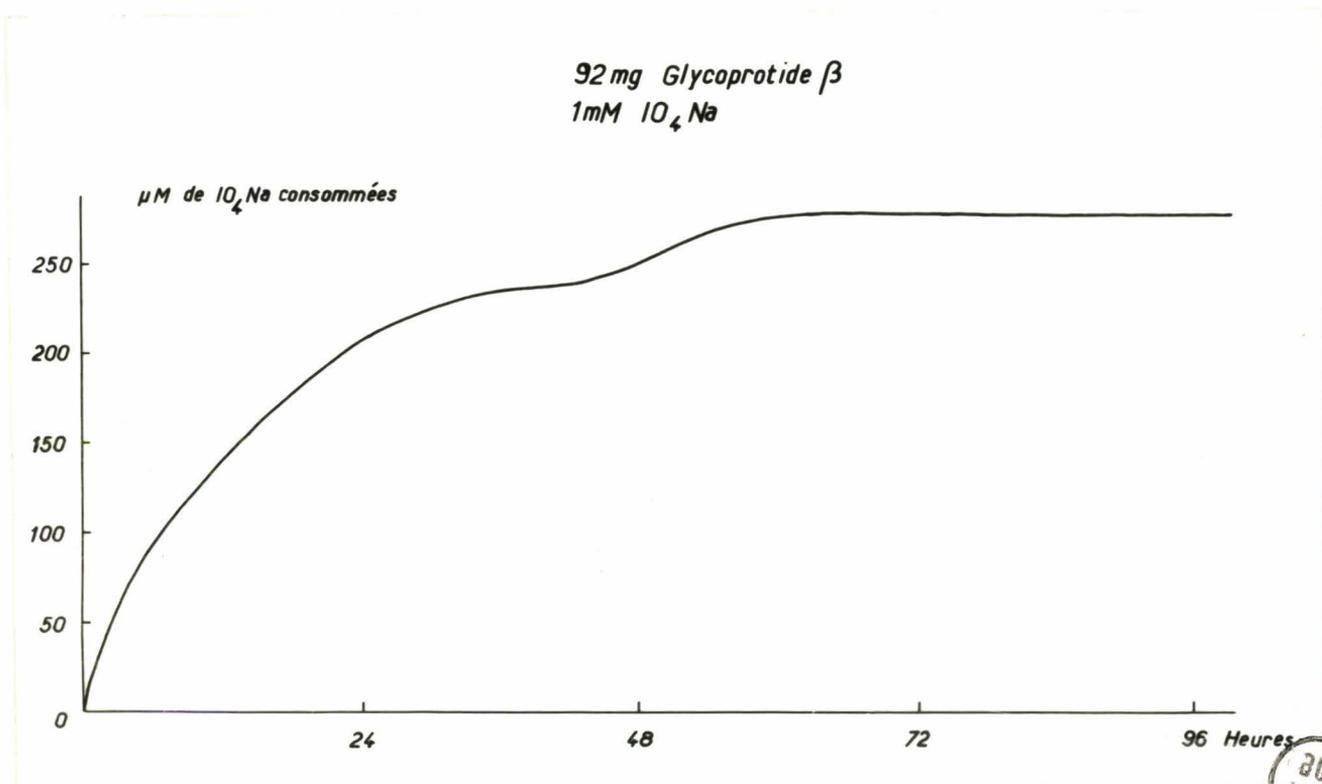


Figure 20

Courbe d'oxydation periodique du  
glycoprotide  $\beta$ .

periodique. Puisque la fonction  $\text{NH}_2$  de lathréonine est libre dans le glycoprotide  $\beta$  le fait qu'elle n'est pas oxydée par l'acide periodique implique que la fonction alcoolique est bloquée. Le groupement carboxylique de la thréonine est donc libre dans le glycoprotide  $\beta$ .

e) Hydrolyse acide partielle du glycoprotide  $\beta$ :

L'hydrolyse acide ( $\text{HCl}$  1,5 N,  $100^\circ$ , pendant 1 h. 30 ) du glycoprotide  $\beta$  nous a permis d'isoler un glycoaminoacide composé uniquement de glucosamine, d'acide aspartique et de thréonine, et un autre qui renferme en outre du mannose.

Méthode:

20 mg de glycoprotide  $\beta$  sont hydrolysés par 6 ml d'acide chlorhydrique 1,5 N à  $100^\circ$  pendant 90 minutes. L'acide chlorhydrique est éliminé par lyophilisation. L'électrophorèse de l'hydrolysât (tampon pyridine, pH 3,9) révèle la présence d'oses neutres, de glucosamine et de deux constituants ( $\beta_{\text{I}}$  et  $\beta_{\text{II}}$ ) à caractère basique, révélés par les réactifs à l'oxalate d'aniline et à la ninhydrine; leurs vitesses de migration par rapport à la glucosamine ( $M_{\text{G}}$ ) et aux substances neutres ( $M_{\text{N}}$ ) sont les suivantes

	$\beta_{\text{I}}$	$\beta_{\text{II}}$
	-----	-----
$M_{\text{G}}$	0,78	0,70
$M_{\text{N}}$	1,95	1,70

Nous avons isolé ces deux composés par électrophorèse préparative et nous avons déterminé leur composition et étudié la structure du glycoprotide  $\beta_{\text{I}}$ .

Composition des glycoprotides  $\beta_{\text{I}}$  et  $\beta_{\text{II}}$ :

L'application des méthodes colorimétriques et chromatographiques que nous avons décrites nous a permis d'attribuer aux glycoprotides  $\beta_{\text{I}}$  et  $\beta_{\text{II}}$  la composition suivante:

	$\beta_{\text{I}}$	$\beta_{\text{II}}$
	-----	-----
Acide aspartique	1	1
Thréonine	1	1
Glucosamine	2	2
Mannose	0	+

L'acide aspartique et la thréonine sont donc unis dans le glycoprotide  $\beta_I$  à des molécules de glucosamine. Seule, reste à préciser la nature des liaisons.

Structure du glycoprotide  $\beta_I$  :

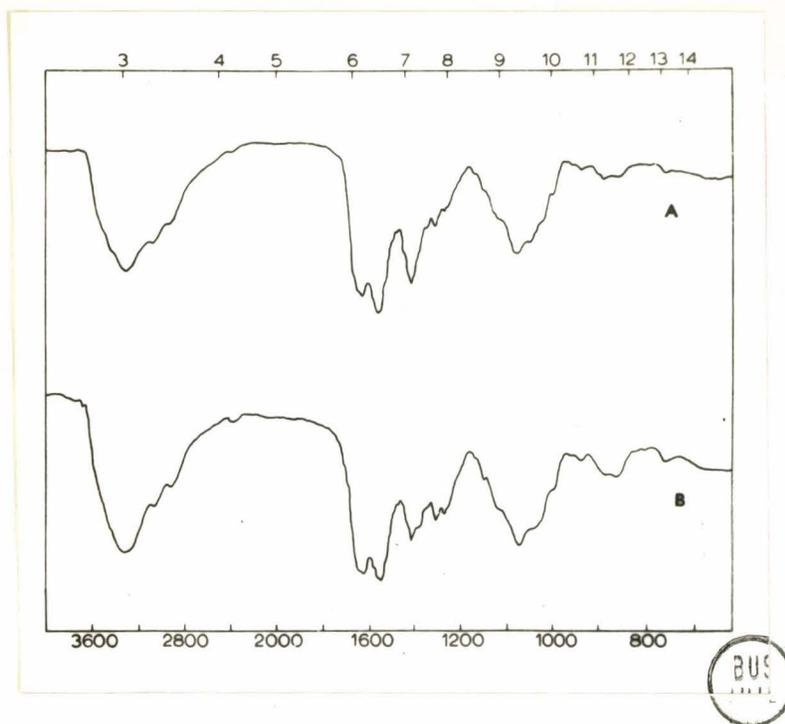
- le glycoprotide  $\beta_I$  ne possède pas de fonction réductrice. En effet, après action du borohydrure de potassium et hydrolyse du composé, on ne caractérise pas de glucosaminitol libre, et on retrouve intactes les deux molécules d'osamine.
- les fonctions amines des deux molécules de glucosamine sont libres: elles sont en effet diazotables.
- les spectres infrarouges sont analogues à ceux qui ont été décrits par Yamashina, Ban-I et Makino (347) et par Bogdanov, Kaverzneva et Andrejeva (348) pour le 2-acétamido-1- $\beta$ -(L- $\beta$ -aspartamido)-1,2-desoxy-D-glucose, à l'exception, toutefois, de la bande d'absorption à 1560-1508  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristique de la fonction "acétamido" puisque notre composé est désacétylé (figure 21). Le 2-amino-1- $\beta$ -(L- $\beta$ -aspartamido)-1,2-desoxy-D-glucose serait donc présent dans le composé  $\beta_I$ .

Il serait accompagné d'un complexe glucosamine-thréonine unies par une liaison C-O-C comme le démontrent les résultats de l'oxydation périodique (voir page 109). Comme la glucosamine n'est pas réductrice ce composé serait un O-thréonyl- $\beta$ -glucosaminide<sup>x</sup> (figure 22).

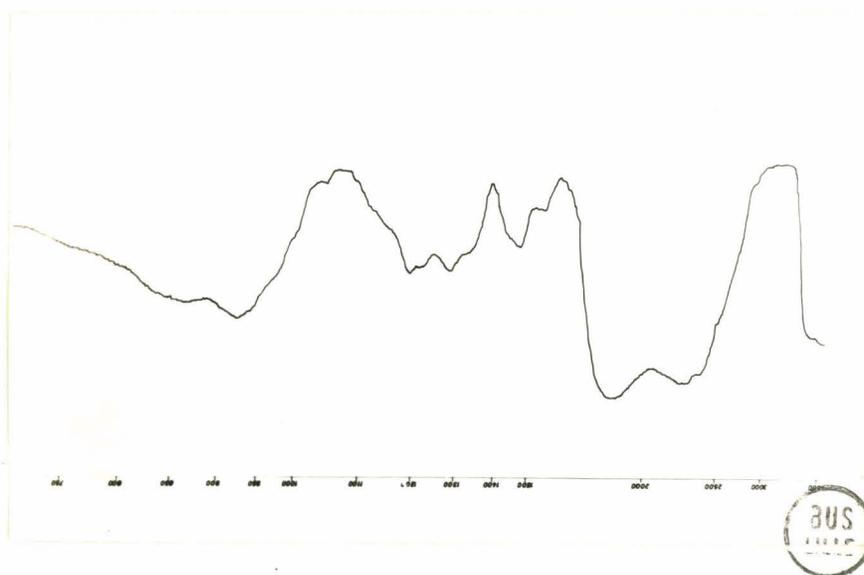
Il est intéressant à ce propos de rappeler que des liaisons O-thréonylosidiques ont déjà été mises en évidence dans le peptidoglycolipide de Mycobacterium avium (O-D-allo-thréonyl-3,4-di-O-méthyl-L-rhamnoside) (Chaput, Michel et Lederer (349)) (voir page 93) et dans la mucine sous-maxillaire ovine (O-thréonyl- $\beta$ -N-acétylgalactosaminide) (Gottschalk, communication personnelle) (voir page 88). Leur existence dans l'ovomucoïde avait été suggérée par Hartley et Jevons (350) et par Beeley et Jevons (351) (voir page 118).

---

<sup>x</sup> La bande d'absorption à 850-830  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique de liaisons  $\alpha$  n'est pas visible sur nos spectres infrarouges. Au contraire, la bande d'absorption à 900-880  $\text{cm}^{-1}$  de la liaison  $\beta$ -osidique est présente dans le spectre.



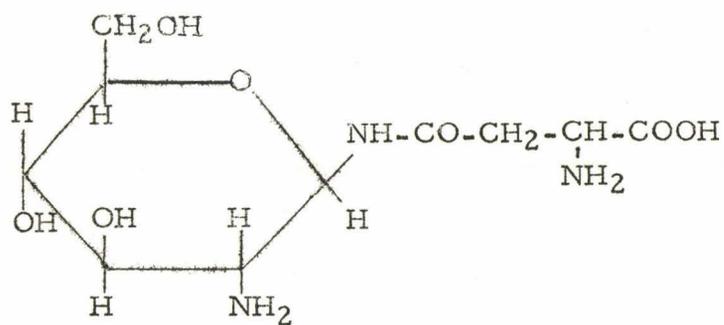
1



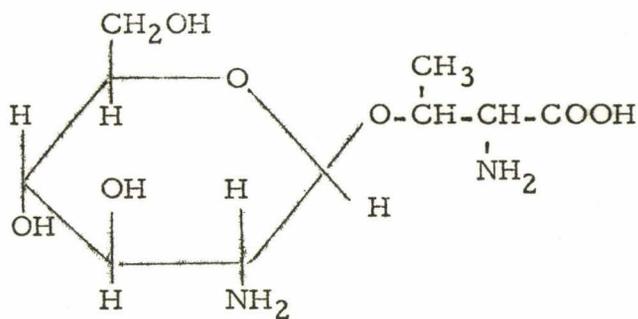
2

Figure 21.

- 1- Spectres infrarouges du 2-acétamido-1- $\beta$ (L- $\beta$ -aspartamido) 1,2-désoxy-D-glucose A) naturel, B) de synthèse. (Yamashina, Ban-I et Makino)
- 2- Spectre infrarouge du composé  $\beta_I$ .



2-amino-1-β(L-aspartamido)-1,2-desoxy-D-glucose



O-thréonyl-2-amino-β1,2-desoxy-D-glucose

Figure 22

Formule des deux constituants du glycoaminoacide β<sub>1</sub>.

f) Conclusions:

- 1- Les résultats précédents démontrent que le glycoprotide  $\beta$  isolé des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde est en réalité un mélange de deux glycoprotides. L'un possède un résidu de thréonine lié par une fonction 0-thréonyl-N-acétylglucosaminidyle au groupement osidique, l'autre possède un résidu d'asparagine attaché par sa fonction amide au carbone 1 de la N-acétylglucosamine en position terminale dans le mucopolyoside.
- 2- La fraction glucidique de l'ovomucoïde serait donc constituée non pas de deux chaînes osidiques renfermant 16 moles de glucides, mais par quatre chaînes renfermant probablement chacune 8 moles de glucides: deux seraient liées à la chaîne peptidique par de l'acide aspartique et deux par de la thréonine (voir figure 24 page 122).

2- Structure du glycoprotide  $\gamma$ .

a) Détermination du groupement N-terminal:

L'application de la méthode de dinitrophénylation que nous avons décrite plus haut fournit le DNP-aspartique et la di-DNP-cystine.

Comme dans le cas du glycoprotide  $\beta$ , les deux amino acides sont donc liés indépendamment l'un de l'autre au groupement osidique.

b) Action des alcalis dilués:

Le glycoprotide  $\gamma$  est très sensible à l'action de la soude diluée (soude 0,01 N à 100°): l'étude par électrophorèse sur papier de la cinétique de l'hydrolyse du glycoprotide montre que la libération de la cystine est importante dès la quinzième minute et qu'elle est totale au bout de trente minutes, au-delà de ce temps d'hydrolyse la cystine est dégradée et disparaît progressivement des électrophorégrammes.

La cystine est donc unie au groupement osidique par une liaison ester.

c) Hydrolyse acide partielle du glycoprotide  $\gamma$ :

L'hydrolyse acide partielle du glycoprotide  $\gamma$ , effectuée dans les conditions précisées plus haut (voir page 110) libère un composé qui possède les caractéristiques du 2-amino-1- $\beta$ -(L-aspartamido)-1,2-désoxy-D-glucose.

#### d) Conclusions:

Les faibles quantités de glycoprotide  $\gamma$  dont nous disposions ne nous ont pas permis de poursuivre plus loin notre expérimentation. Nous pouvons toutefois conclure à l'existence d'une liaison du type  $\beta$ -aspartamido- $\beta$ -N-acetylglucosaminide puisque nous avons caractérisé le 2-amino-1- $\beta$ -(L-aspartamido)-1,2-désoxy-D-glucose. La nature de l'ose sur lequel est greffée la cystine par une liaison ester n'est pas précisée et nous ne pouvons donner du glycoprotide  $\gamma$  qu'un schéma très général (figure 23, page 116). Nous pouvons néanmoins admettre que le glycoprotide  $\gamma$  -comme le glycoprotide  $\beta$ - est constitué par un mélange de deux unités osidiques contenant chacune 8 oses: l'une est liée à l'asparagine par la fonction réductrice d'un résidu de N-acétylglucosamine, l'autre à la cystine par une liaison ester contractée avec la fonction réductrice d'un ose neutre ou d'une osamine.

#### DISCUSSION :

Nous avons isolé des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde trois glycoaminoacides dont nous avons précisé la composition en glucides et en acides aminés et les modalités de l'attache de ces derniers sur les mucopolysides.

Les résultats que nous avons obtenus apportent la solution d'un problème que les travaux de certains auteurs parus antérieurement [Tanaka, 1961 (352), Hartley et Jevons, 1962 (353), Marks, Marshall, Neuberger et Papkoff, 1962 (354)] ou postérieurement [Neuberger et Papkoff (355), 1963, Chatterjee et Montgomery, 1963 (356), Montgomery et Wu, 1963 (357)] aux nôtres n'avaient pu élucider.

Tanaka (358) a isolé à partir des hydrolysats barytiques de l'ovomucoïde, par fractionnement éthanolique et par chromatographie sur des colonnes de charbon-Celite, quatre fractions glycoprotidiques riches en acide aspartique. Par exemple, la composition en pour cent de la fraction II<sub>1</sub> de Tanaka est la suivante:

Hexosamines	34,3 %
Hexoses	32,6
Acide aspartique	3,11
Glycocolle	0,48
Alanine	0,48

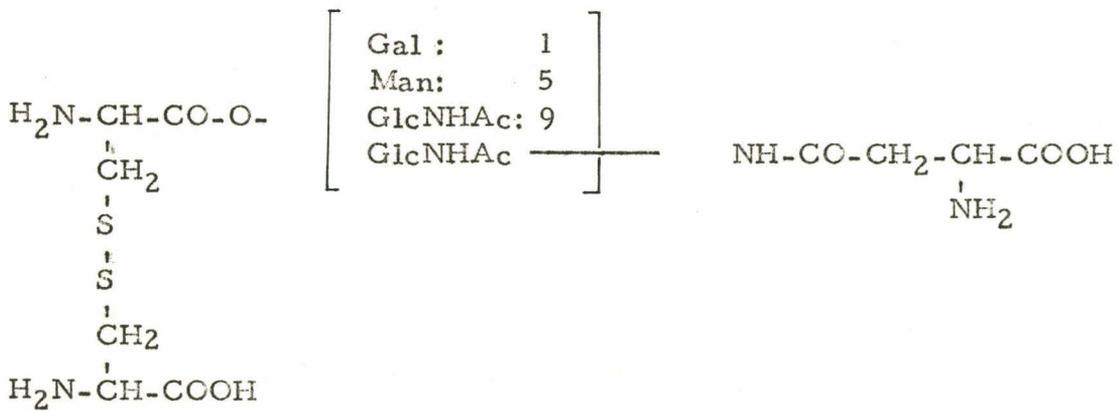
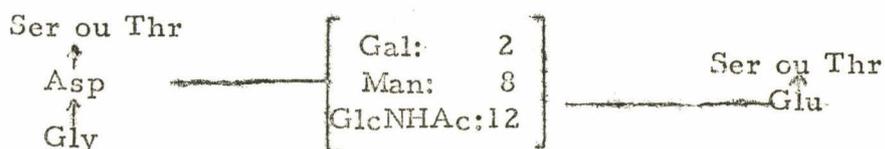


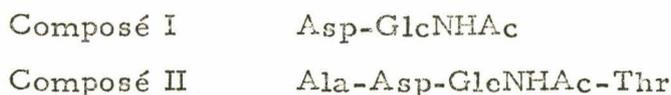
Figure 23

Schéma de structure provisoire du  
glycoprotide  $\gamma$

En traitant ensuite par la "pancréase" l'hydrolysât barytique, Tanaka (359) a isolé par chromatographie sur papier et sur des colonnes de charbon-Celite plusieurs glycoprotides pour deux desquels il propose les schémas suivants:



Enfin, par hydrolyse acide partielle des glycoprotides obtenus par hydrolyse barytique et pancréasique, Tanaka (360) obtient deux glycoprotides dont les schémas de structure sont les suivants:



Dans le composé I, le NH<sub>2</sub> de l'acide aspartique est libre, tandis que dans le composé II l'alanine est en position N-terminale. L'action de l'hydrazine a conduit l'auteur à l'hypothèse d'une liaison de l'osamine avec le β-carboxyle de l'acide aspartique.

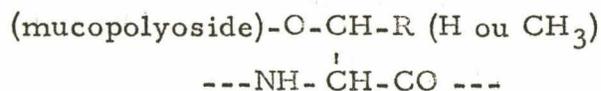
Les résultats de Tanaka sont encore fragmentaires mais ils démontrent l'existence, dans l'ovomucoïde, de liaisons de l'acide aspartique avec la glucosamine.

Hartley et Jevons (361) ont isolé par électrophorèse de zone des hydrolysats protéasiques (pepsine, trypsine, chymotrypsine) de l'ovomucoïde un glycopeptide dont la composition est la suivante:

Hexoses	5
Glucosamines	8
Acide aspartique	1
Thréonine	1
Glycocolle	1
Sérine	1
Alanine	1
Leucine	0,5

La dinitrophénylation fournit tous les DNP-aminoacides sauf ceux de la thréonine et de la sérine. Les auteurs tirent de leurs résultats les conclusions et hypothèses suivantes:

- le glycopeptide obtenu est hétérogène
- la thréonine ou la sérine assureraient la liaison du groupement polyosidique avec la protéine par l'intermédiaire de leur fonction  $\alpha$ -hydroxylée conformément au schéma suivant:



Beeley et Jevons (362) trouvent une confirmation à leur deuxième hypothèse dans les résultats fournis par l'étude de l'action des alcalis sur l'ovomucoïde natif et sur les glycopeptides. En effet, le pouvoir réducteur des glycopeptides hydrolysés est inférieur à celui de l'ovomucoïde. Selon les auteurs, ce résultat s'expliquerait par la présence dans la "fraction glycoaminoacide" de O-glucosides de la thréonine et de la sérine dont le groupement carboxylique libre stabiliserait la liaison osidique vis-à-vis des agents alcalins tandis que cette dernière serait plus labile dans l'ovomucoïde puisque les fonctions carboxyles des acides aminés sont engagées dans des liaisons peptidiques.

Les travaux de Jevons et al. sont donc en faveur de l'hypothèse des liaisons O-thréonyl ou O-séryl osidiques dans l'ovomucoïde, sans toutefois, en apporter la démonstration.

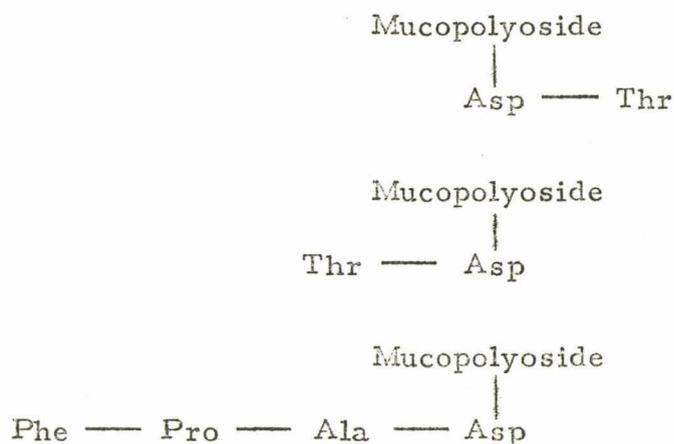
Marks, Marshall, Neuberger et Papkoff (363) obtiennent par digestion pronasique de l'ovomucoïde une fraction glycopeptidique qui contient 27 % d'hexoses et dont la composition en acides aminés est complexe:

Hexoses	6	Ac. glutamique	0,73
Glucosamines	10	Glycocolle	1,46
Ac. aspartique	4,98	Valine	0,20
Leucine	0,18	Phénylalanine	1,14
Thréonine	3,84	Proline	1,14
Sérine	1,25	Cystine	1,46

Par fractionnement sur Amberlite IRC-50 et sur DEAE-cellulose ils obtiennent trois glycopeptides contenant tous de l'acide aspartique. L'un d'eux contient en outre de la thréonine dont le groupement aminé est libre.

Selon Chatterjee et Montgomery (364) et Montgomery et Wu (365), l'ovomucoïde serait constitué de trois unités polyosidiques attachées à la protéine par la fonction amide de l'asparagine. Récemment, Montgomery et Wu (366) sont parvenus, comme nous-même, à la conclusion que l'ovomucoïde est hétérogène en isolant par "gel-filtration" (Sephadex G-25) et électrophorèse de zone (tampon acétique pH 2,5) quatre fractions dont les proportions relatives sont les suivantes: 1, 66, 23, 11. Les fractions II et III possèdent la même composition en glucides (galactose, mannose, N-acétylglucosamine:1, 4, 8). La fraction IV est plus riche en galactose et renferme en outre un résidu d'acide sialique. Leur composition en acides aminés est complexe. Toutefois elles sont riches en acide aspartique et en thréonine (environ 1 résidu pour 8 molécules d'osamine). La fraction III ne renferme que de l'acide aspartique.

La dinitrophénylation a conduit Montgomery et Wu à proposer les schémas de structure suivants; ils s'éloignent notablement des résultats obtenus par les auteurs précédents et par nous-même, en ce qui concerne l'attache de la thréonine.



CONCLUSIONS A L'ETUDE DU POINT D'ATTACHE  
GLUCIDE-PROTEINE DANS L'OVOMUCOÏDE.

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude du point d'attache glucide-protéine dans l'ovomucoïde sont les suivantes:

- 1- L'hydrolyse pronasique des préparations d'ovomucoïde conduit à l'isolement par chromatographie sur échangeurs d'ions et sur Sephadex, et par électrophorèse, à isoler trois glycoamino-acides:  $\alpha_4$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  dans les proportions relatives : 20 à 25 % , 60 à 70 % , 10 à 15 % .
- 2- Les glycoamino acides  $\beta$  et  $\gamma$  possèdent des compositions en glucides identiques (galactose, mannose, N-acétylglucosamine: 1, 5, 10), mais ils diffèrent par la nature des aminoacides: acide aspartique et thréonine (1, 1) dans le glycoaminoacide  $\beta$ ; acide aspartique et cystine (1, 1) dans le glycoaminoacide  $\gamma$ .

Le glycoamino acide  $\alpha_4$  ne renferme que de l'acide aspartique et sa composition en glucides est différente de celle des glycoprotides  $\beta$  et  $\gamma$  (galactose, mannose, N-acétylglucosamine, acide N-acétylneuraminique: 1, 3, 4, 1) et se rapproche de celle de l'ovoglycoprotéide de Ketterer (367) (voir page 11).

- 3- Ces derniers résultats associés à ceux que nous ont fourni les analyses physicochimiques et immunoélectrophorétiques (voir page 48) de l'ovomucoïde nous conduisent à la conclusion que les préparations d'ovomucoïde renferment trois glycoprotéides. L'un serait l'ovomucoïde proprement dit et correspondrait au glycoprotide  $\beta$ . Le second serait un "allo-ovomucoïde" de composition glucidique identique mais dont le point d'attache sur la protéine se ferait par l'acide aspartique et la cystine au lieu de l'acide aspartique et la thréonine; il conduirait au glycoprotide  $\gamma$ . Le troisième serait l'ovoglycoprotéide de Ketterer et fournirait le glycoamino acide  $\alpha_4$ .
- 4- Dans les trois glycoprotides nous avons caractérisé par hydrolyse partielle le chaînon 2-acétamido-1- $\beta$ -(L-aspartamido)1,2-desoxy-D-glucose qui représente l'un des points d'attache du mucopolyside avec la protéine. Ces résultats sont à rapprocher de ceux que d'autres auteurs ont obtenus à partir des substrats les plus divers (voir page 53). La liaison N-acétylglucosamine avec la fonction amide de l'asparagine semble donc représenter un mode d'attache "universel" des mucopolysides avec les protéines dans les glycoprotéides.

- 5- Nous avons mis, en outre, en évidence l'existence de deux autres types de liaison ose-acide aminé. Le premier est un ester de glucide et de cystine<sup>x</sup> et représente jusqu'à présent un exemple unique. Le second est un O-thréonyl N-acétylglucosaminide.
- 6- En considérant que les poids moléculaires des trois glycoprotéides présents dans l'ovomucoïde sont voisins de 28.000, nous pouvons poser en hypothèse que dans les trois cas, la fraction glucidique est constituée de sous-unités n'excédant pas 9 molécules d'oses. L'ovomucoïde renfermerait quatre unités de chacune huit oses; deux d'entre elles seraient unies à la protéine par l'acide aspartique, les deux autres par la thréonine (figure 24). On pourrait en outre admettre l'existence de ponts hydrogène unissant deux à deux les unités osidiques et de poser en hypothèse que les glucides jouent un rôle analogue à celui des ponts disulfure dans la détermination de la structure tertiaire et quaternaire des glycoprotéides.

L'allo-ovomucoïde posséderait quatre chaînes glucidiques, deux d'entre elles liées par l'acide aspartique et les deux autres par la cystine.

Enfin, l'ovoglycoprotéide de Ketterer serait constitué lui aussi de quatre chaînes osidiques toutes unies par l'acide aspartique à la protéine.

Les travaux sont actuellement en cours au laboratoire pour tenter de confirmer ces hypothèses.

---

<sup>x</sup> Dans un travail récent, Harbon (368), Herman-Boussier, Harbon et Clauser (369), Harbon, Herman-Boussier et Clauser (370) utilisant l'hydroxylamine pour rompre les liaisons ester n'ont pas apporté la confirmation de ce résultat.

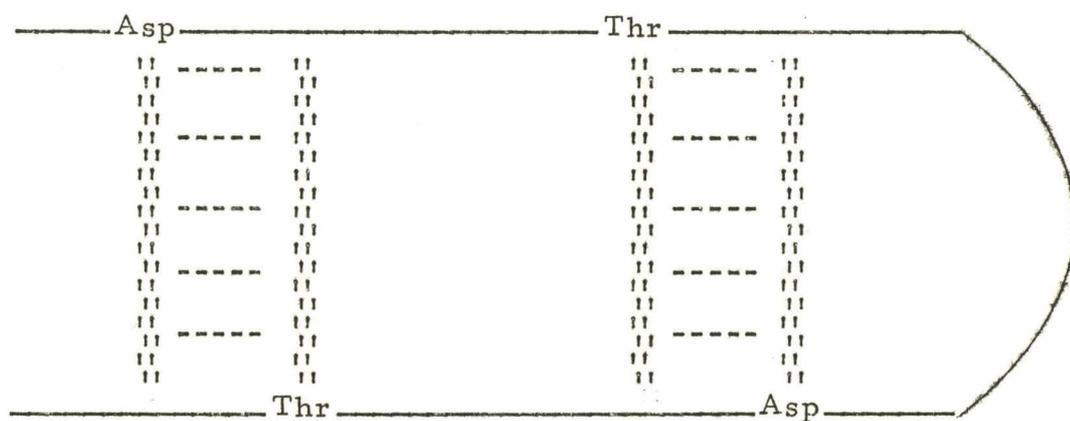


Figure 24

Schéma hypothétique proposé pour la structure  
de l'ovomucoïde

--- liaisons hydrogène  
 ||| chaîne polysidique  
 ||| chaîne protéique  
 ———



## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

De l'ensemble des résultats que nous avons obtenus au cours de notre étude sur l'ovomucoïde, nous tirons les conclusions suivantes:

- I - L'application de tous les procédés d'isolement de l'ovomucoïde décrits jusqu'à ce jour ne nous a pas permis d'isoler une entité physicochimique. Toutes les méthodes conduisent, en effet, à des préparations qui sont hétérogènes, à l'ultracentrifugation, à l'immunoélectrophorèse et à l'analyse chimique. Elles renferment trois constituants dans des proportions variables et les propriétés de l'"ovomucoïde" sont, en réalité, une "moyenne" de celles de ces trois composants.
- II - Tous les procédés que nous avons utilisés pour dissocier et identifier les constituants de l'ovomucoïde ont échoué. Cependant, l'hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde nous a conduite à l'isolement de trois glycopeptides différents. Actuellement, nous nous trouvons donc dans cette situation paradoxale de connaître la composition des groupements mucopolysidiques de trois glycoprotéides du blanc d'oeuf et leur point d'attache avec la protéine avant même d'être parvenue à isoler les glycoprotéides eux-mêmes.

D'après les résultats que nous avons obtenus, nous postulons que les préparations d'ovomucoïde renferment trois glycoprotéides dont les caractéristiques du groupement osidique sont les suivantes:

- 1- l'ovomucoïde proprement dit représente environ 70 % des glycoprotéides totaux. Il est constitué de galactose, de mannose et de N-acétylglucosamine (1, 5, 10); le groupement osidique est uni à la protéine par l'acide aspartique (liaison asparaginy-N-acétylglucosaminide) et par la thréonine (O-thréonyl-N-acétylglucosaminide).
- 2- l'allo-ovomucoïde (10 %) serait un isomère du premier - probablement un allo-type - et posséderait la même composition en oses, mais il serait lié à la protéine par l'acide aspartique (liaison asparaginy-N-acétylglucosaminide) et par la cystine (liaison ester).
- 3- l'ovoglycoprotéine de Ketterer représenterait 20 % des glycoprotéides totaux et posséderait la composition glucidique suivante: galactose, mannose, N-acétylglucosamine, acide N-acétylneuraminique : 1, 3, 4, 1. Il serait

attaché à la protéine par l'acide aspartique (liaison asparaginy-N-acétyl-glucosaminide).

III - Bien que nos travaux aient porté sur un mélange de glycoprotéides, ils n'ont cependant pas été effectués en vain. En effet, outre le résultat précédent que nous avons acquis à propos de la nature physicochimique de l'ovomucoïde, nous avons mis au point un grand nombre de méthodes d'exploration de la structure du groupement polysidique des glycoprotéides: définition des modalités de l'hydrolyse destinée à suivre la libération des glucides et à fournir des quantités élevées d'osides, procédés d'isolement et d'étude de la structure des osides appliqués à de faibles quantités, description de méthodes de détermination de la liaison glucide-protéine qui nous ont permis d'éclaircir le problème de la liaison ose-acide aminé dans le cas de l'ovomucoïde. En outre, nous avons trouvé dans nos résultats une confirmation à notre hypothèse de travail qu'il existe un schéma général de structure des glycoprotéides.

#### IV - Existe-t-il un schéma général de structure des glycoprotéides ?

Nous posons en hypothèse que la plupart des glycoprotéides d'origine animale possèdent de nombreux points de structure communs en nous fondant sur les arguments et faits expérimentaux suivants:

L'identification de la N-acétyllactosamine (4-0- $\beta$ -D-galactopyrannosyl-N-acétyl-D-glucosamine) parmi les produits de l'hydrolyse partielle de l'ovomucoïde nous a incités à la rechercher systématiquement dans les glycoprotéides les plus divers (Montreuil, Spik et Chasson (371)). Nous soupçonnions en effet que ce diholoside devait être largement répandu dans les molécules de mucoïdes car notre observation venait à la suite de celles de plusieurs auteurs qui avaient antérieurement caractérisé ce diholoside dans les hydrolysats partiels de différents glycoprotéides: substances spécifiques des groupes sanguins [Côte et Morgan (372), Kuhn et Kirchenlohr (373), Masamune (374), Yosizawa (375)], mucine gastrique du porc [Tomarelli, Hassinen, Eckhardt, Clark et Bernhardt (376)], orosomucoïde [Eylar et Jeanloz (377)], fétuine [Spiro (378)]. En outre, la N-acétyllactosamine est le chaînon constitutif de l'acide keratosulfurique, que l'on peut en effet considérer comme un polymère de la sulfo-N-acétyllactosamine [Hirano, Hoffman et Meyer (379)]. Enfin, l'isolement d'un nucléotide de transfert de la neuraminy-N-acétyllactosamine [Jourdian, Shimizy et Roseman (380)] confirme l'importance de ce diholoside dans la biosynthèse des mucopolysides.

Nous avons appliqué le procédé de libération préférentielle de la N-acétyllactosamine par l'acide sulfurique 0,1 N (voir page 73) aux glycoprotéides ou mélanges de glycoprotéides suivants: uromucoïdes et séromucoïdes totaux de l'homme, du boeuf, du cheval, du porc, du mouton et du veau; sidérophiline;  $\gamma$ -globulines humaines et bovines; lactosidérophiline; gynolactomucoïde I.

Nos résultats ont été les suivants:

- la N-acétyllactosamine est présente dans les hydrolysats partiels de tous les hydrolysats que nous avons étudiés (figure 25 page 126),
- dans tous les cas, le fucose (quand il existe) apparaît le premier, suivi très rapidement du galactose; dans tous les hydrolysats le mannose est présent en très faible quantité ou totalement absent (figure 25).

Nous voyons donc que:

- l'étude cinétique effectuée par de nombreux auteurs et par nous-même, de l'hydrolyse des glycoprotéides fournit toujours les résultats suivants: l'acide sialique est libéré le premier, suivi du fucose et du galactose, puis d'une partie des osamines et enfin, plus tardivement, du mannose et du reste des osamines. On peut donc conclure que l'acide sialique et le fucose se trouvent en position "externe" suivis par le galactose, puis par une partie des osamines. L'autre fraction des osamines et le mannose constituent la fraction plus "interne" et plus stable de la molécule.
- la N-acétyllactosamine se trouve en position "externe" dans la plupart des glycoprotéides étudiés jusqu'à ce jour.
- une N-acétylosamine, généralement la N-acétylglucosamine, est toujours impliquée dans la liaison glucide-protéine et elle se trouve généralement liée au groupement amide de l'asparagine sous la forme d'un 2-acétamido-1- $\beta$ -(L-aspartamido)-1,2-desoxy-D-glucose, ou par une liaison osidique à la fonction alcoolique de la sérine ou de la thréonine. Toutefois, des liaisons esters faisant intervenir le groupement hémiacétalique de l'acétylgalactosamine et la fonction  $\beta$  ou  $\gamma$  carboxylique de l'acide aspartique et de l'acide glutamique ont été caractérisées dans les mucines des glandes sous-maxillaires.

Jusqu'à présent, seulement deux schémas de structure de glycoprotéides ont été donnés: l'un concerne l'orosomucoïde et a été donné par Eylar et Jeanloz (381) et confirmé par Barker, Pardoe, Stacey et Hopton (382) (figure 26, page 127), l'autre concerne la fétuine (Spiro (383) (figure 27, page 128).

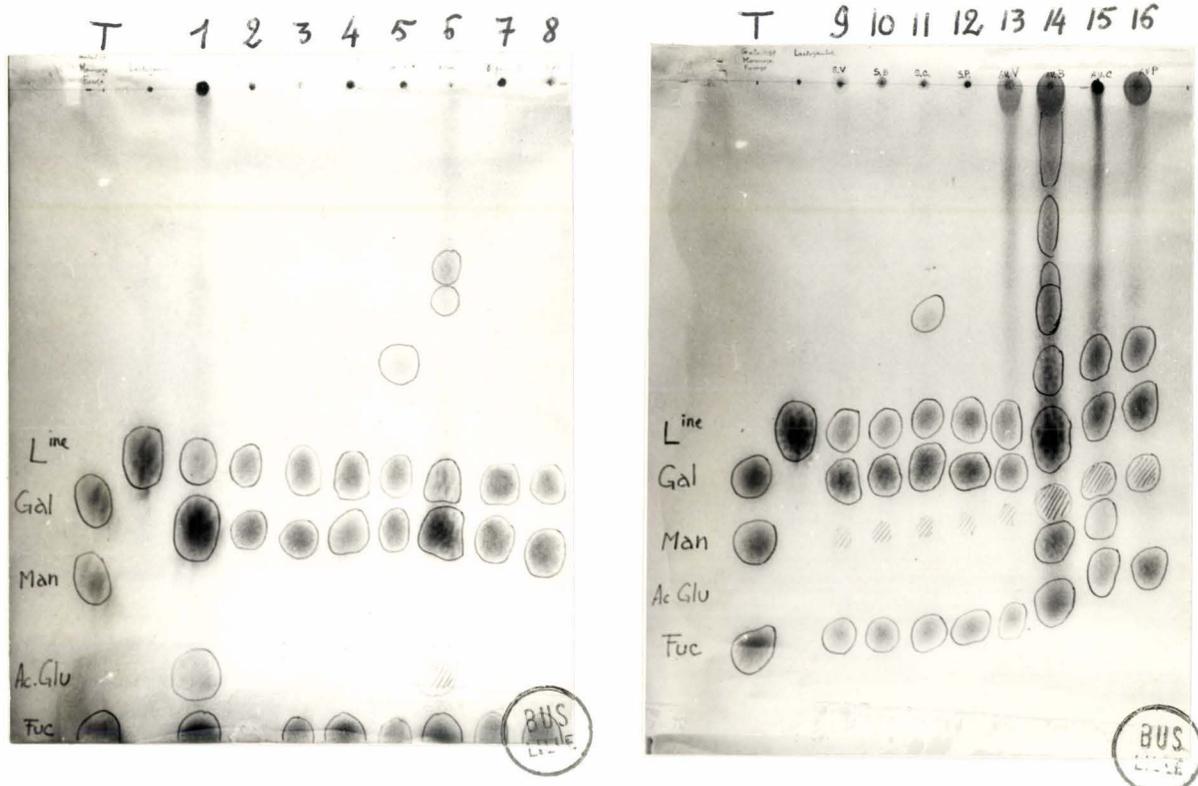


Figure 25

Chromatogrammes d'hydrolysats partiels de glycoprotéides divers par l'acide sulfurique 0,1 N, à 100°, pendant 6 heures (n-butanol/éthanol/eau (10:1:2), révélation à l'oxalate d'aniline).

Line: N-acétyllactosamine, Gal: galactose, Man: mannose, Ac. Glu: N-acétylglucosamine, Fuc: fucose.

1: orosomucoïde, 2: transferrine humaine, 3: lactotransferrine humaine, 4: lactomucoïdes du lait de femme, 5: lactomucoïde du lait de vache, 6: gynomucoïdes, 7:  $\gamma$ -globulines bovines, 8:  $\gamma$ -globulines humaines, 9: séromucoïdes de veau, 10: séromucoïdes de boeuf, 11) séromucoïdes de cheval, 12: séromucoïdes de porc, 13: séromucoïdes de veau, 14: uromucoïdes de boeuf, 15: uromucoïdes de cheval, 16: uromucoïdes de porc.

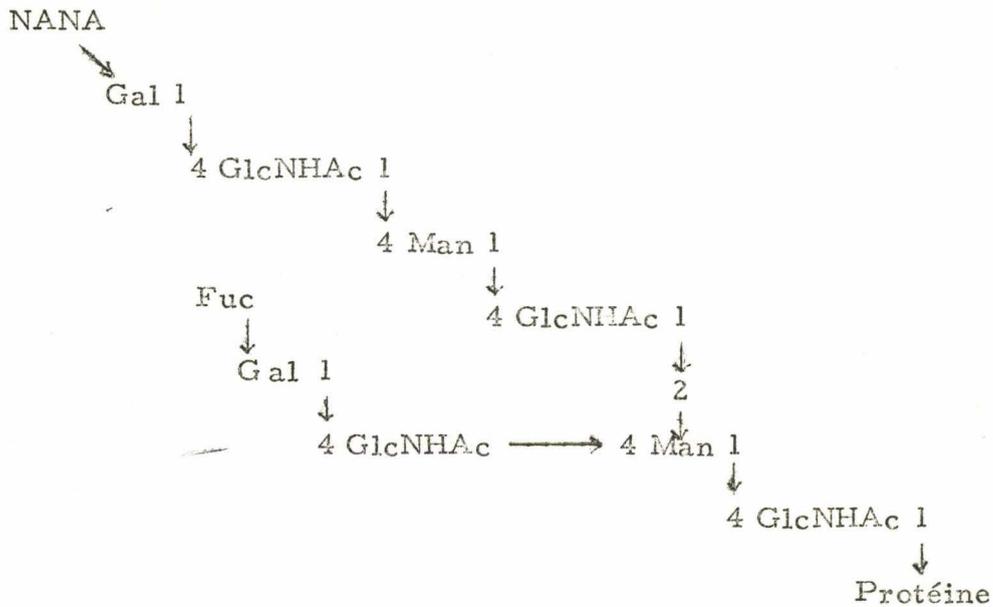
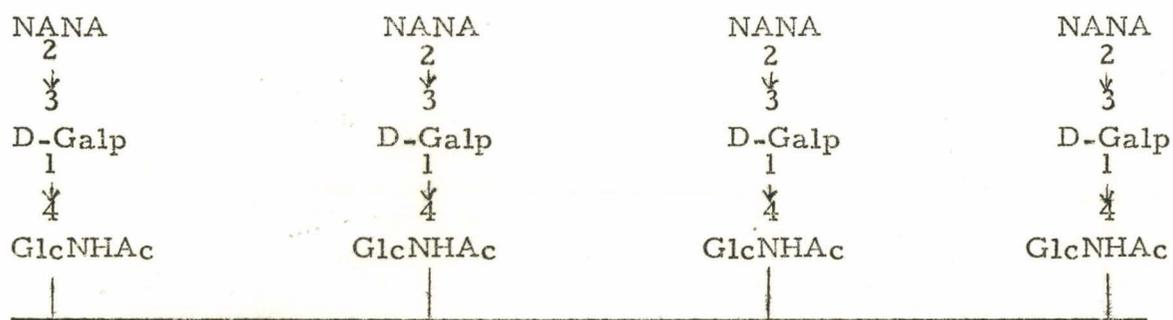


Figure 26

Schéma de structure d'une unité polysidique de l'orosomucoïde d'après Eylar et Jeanloz (381) et Barker et al. (382).

NANA: acide N-acétylneuraminique, Gal: galactose, Man: mannose  
GlcNHAc: N-acétylglucosamine, Fuc: fucose.



(Man, Man, Man, GlcNHAc) - GlcNHAc - peptide

Figure 27

Schéma de structure d'une unité polyosidique de la fétuine  
d'après Spiro (383).

L'hypothèse que nous avons émise au début de nos travaux semble donc se vérifier. L'existence de nombreux points communs de structure entre les glycoprotéines actuellement connues laisse espérer que des résultats acquis à propos des uns pourront être mis à profit pour explorer la structure des autres. Dans notre cas particulier, nous sommes convaincue que certains des osides que nous avons isolés et dont nous connaissons les caractéristiques seront retrouvés parmi les produits de l'hydrolyse partielle d'autres glycoprotéides. L'exemple de la N-acétyllactosamine est à cet égard très démonstratif et très encourageant ainsi que l'observation des figures 26 et 27. On voit par exemple que les enchaînements  $\text{Gal} \rightarrow \text{GlcNHAc}$ ,  $\text{GlcNHAc} \rightarrow \text{Man}$  et  $\text{Man} \rightarrow \text{GlcNHAc}$  sont communs à l'orosomucoïde et l'ovomucoïde. En outre, l'enchaînement  $(\text{Man}, \text{Man}, \text{Man}, \text{GlcNHAc}) \rightarrow \text{GlcNHAc}$  de la fétuine correspond à celui de l'oside XV que nous avons isolé de l'ovomucoïde (voir page 84). Enfin, les méthodes que nous avons mises au point pour explorer les liaisons ose-acide aminé de l'ovomucoïde sont parfaitement applicables à tout glycoprotéide puisque les liaisons glucosamine-asparagine et glucosamine-thréonine semblent être "universellement répandues".

Ces observations nous fournissent d'excellentes raisons de penser que les résultats que nous avons obtenus sur l'ovomucoïde et que les procédés d'exploration de sa structure que nous avons mis au point pourront être largement étendus à l'étude d'autres glycoprotéides.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALDERTON G. et FEVOLD H. L., J. Biol. Chem., 1946, 164, 1. (47)
- ASPINALL G. O., RASHBROOK R. B. et KESSLER G., J. Chem. Soc., 1958, 215 (291).
- BACON J. S. D. et EDELMAN J., Biochem. J., 1950, 48, 114 (288).
- BALLS A. K. et SWENSON T. L., J. Biol. Chem., 1934, 106, 409 (38).
- BARKER S. A., PARDOE G. I., STACEY F. R. S. et HOPTON J. W., Nature, 1963, 197, 231. (382).
- BECHAMPS M. A., C. R. Soc. biol., 1873, 77, 1525 (21).
- BEELEY J. G. et JEVONS F. R., Biochem. J., 1963, 88, 15.(326, 351, 362).
- BIER M., DUKE J. A., GIBBS R. J. et NORD F. F., Arch. Biochem. Biophys., 1952, 37, 491 (45, 48).
- BIER M., TERMINIELLO L., DUKE J. A., GIBBS R. J. et NORD F. F., Arch. Biochem. Biophys., 1953, 47, 465 (45, 168).
- BISERTE G., Biochimie générale, 1959, 1, 892, Masson ed., Paris (9).
- BISERTE G. et OSTEUX R., Bull. Soc. Chim. biol., 1955, 33, 50. (343).
- BISERTE G., PLAQUET-SCHOONAERT Th., BOULANGER P. et PAYSANT P., J. Chromatog., 1960, 3, 25 (342).
- BLIX G., GOTTSCHALK A. et KLENK E., Nature, 1957, 179, 1088 (1).
- BOGDANOV V., KAVERZNEVA E. et ANDREJEVA A., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 65, 168 (218).  
1964, 83, 69 (221, 348).
- BOURILLON R. et MICHON J., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 44, 608 (245).
- BOURILLON R., GOT R. et MEYER D., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 74, 255(246)
- BRAGG P. D. et HOUGH L., Biochem. J., 1961, 78, 11 (85, 99, 101, 156, 209, 261, 290, 295, 298, 301).
- CHAPUT M., MICHEL G. et LEDERER E., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 310  
1963, 78, 329; (337, 349).
- CHATTERJEE A. K. et MONTGOMERY R., Arch. Biochem. Biophys., 1962, 99, 426 (87, 158, 161, 169, 180, 185, 211, 299, 329, 356, 364).
- CHOSSON A., MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., C. R. Acad. Sci., 1962, 255, 3261 (213, 284).

- CORBETT W. M. et KENNER J., *J. Chem. Soc.*, 1954, 3274 (292).
- COHN E. J., BARNES B. A., BROWN R. K., DESROUAUX G., GILLESPIE J. M., GURD F. R. N., KAHNT F. W., LEVER W. F., LIU C. M., MITTELMAN D., MOUTON R., SCHMIDT K., SURGENOR D. M. et UROMA B., *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72, 465 (43).
- CORIN G. et BERARD E., *Bull. Acad. Roy. Belg.*, 1888, 15, 4 (27).
- COTE R. H. et MORGAN W. T. J., *Nature*, 1956, 178, 1171 (372).
- CUNNINGHAM L. W., NUENKE B. J. et NUENKE R. B., *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 26, 660 (237).
- CUNNINGHAM L. W., CLOUSE R. W. et FORD J. D., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 78, 379. (238).
- DENT C. E., *Biochem. J.*, 1947, 41, 240 (271).
- DIXON A. S. J., *Biochem. J.*, 1955, 60, 165 (80, 170).
- DUBOIS M., GILLES K. A., HAMILTON J. K., REBERS P. A. et SMITH F. *Anal. Chem.*, 1956, 28, 350 (341).
- EAKIN R. E., SNELL E. E. et WILLIAMS R. J., *J. Biol. Chem.*, 1943, 140, 535 (13).
- EICHHOLZ A., *J. Physiol.*, 1898, 23, 163 (14, 23, 33, 53, 57).
- ELSON L. A. et MORGAN W. T. J., *Biochem. J.*, 1933, 27, 1824; 1934, 28, 988(112).
- EYLAR E. H. et JEANLOZ R. W., *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 622 et 1021 (205, 274, 377, 381).
- FEENEY R. E., RHODES M. B. et ANDERSON J. S., *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2633 (84).
- FLEMING A., *Proc. Roy. Soc.*, 1922, B 93, 306 (12).
- FLETCHER A. P., MARSHALL R. D. et NEUBERGER A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 71, 505 (239).
- FLETCHER A. P., MARKS G. S., MARSHALL R. D. et NEUBERGER A., *Biochem. J.*, 1963, 87, 265 (239, 255, 323).
- FORSYTHE R. H. et FOSTER J. F., *J. Biol. Chem.*, 1950, 184, 377 et 385(42,172).
- FOSTER A. B., *Adv. Carbohydrate Chem.*, 1957, 12, 81 (127, 293).
- FOSTER A. B., HORTON D. et STACEY M., *J. Chem. Soc.*, 1957, 81 (262).
- FRAENKEL-CONRAT H. et PORTER R. R., *Biochem. Biophys. Acta*, 1952, 9, 537 (91).

- FRANKEL S. et JELLINEK C., *Biochem. Z.*, 1927, 185, 392. (61,66).
- FREDERICQ E. et DEUTSCH H. F., *J. Biol. Chem.*, 1949, 181, 499 (41,44,50, 52,79,107,139,149,159,160,171).
- GARDEL S., *Acta Chem. Scand.*, 1953, 7, 207 (121,123,126).
- GARDELL S., HEJKENSTOLD F. et ROCHNORLUND A., *Acta Chem. Scand.*, 1950, 4, 970 (120,124).
- GAUTIER A., *C. R. Acad. Sci.*, 1874, 79, 227 (26).
- GHUYSEN J. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 47, 561 (333, 334).
- GHUYSEN J. M. et SALTON M. R. J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 40, 462 (224, 331).
- GLICK M. C., CHEN I. W. et ZILLIKEN F., *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 981 (281, 289, 346).
- GODIN P., *Nature*, 1954, 174, 134 (280).
- GOT R., XIIème colloque sur les Protides des liquides biologiques, Bruges, 1964, p. 45 (260).
- GOTTSCHALK A., *The Chemistry and biology of sialic acids and related substances* Cambridge, University Press, 1960 (192).
- GOTTSCHALK A. et ADA G. L., *Yale J. Biol. Med.*, 1956, 28, 525 (81, 154).
- GOTTSCHALK A. et GRAHAM E. R. B., *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 34, 380(307).
- GOTTSCHALK A. et MURPHY W. H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 46, 81(189, 193, 304).
- GOTTSCHALK A., MURPHY W. H. et GRAHAM E. R. B., *Nature*, 1962, 194, 1051 (188).
- GRABAR P., *Methods of Biochemical Analysis*, D. Glick ed., 1959, tome 7, page 1 (179).
- GRABAR P. et WILLIAMS C. A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, 10, 193; 1955, 17, 65 (179).
- GRAHAM E. R. B., MURPHY W. H. et GOTTSCHALK A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 74, 222 (195, 308).
- GUIRARD B. M., SNELL E. E. et WILLIAMS R. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1946, 61, (77).
- GURIN S., et HOOD D. B., *J. Biol. Chem.*, 1939, 131, 211 (74).
- GUTHRIE R. D., *Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L. et Wolfrom M. L. ed., Academic Press, 1962, tome I, page 432 (283).

- HALLIBURTON, W. J. *Physiol.*, 1892, 13, 159 et 454 (30).
- HARBON S., Thèse de 3ème Cycle, Paris, 1963 (88, 157, 162, 173, 198, 368)
- HARBON S., HERMAN-BOUSSIER G. et CLAUSER H., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1963, 45, 1279 (200, 370, 308a)
- HARTLEY F. K. et JEVONS F. R., *Biochem. J.*, 1962, 82, 1p (86, 243, 325, 350, 353, 361).
- HARTLEY F. K. et JEVONS F. R., *Biochem. J.*, 1962, 84, 134 (243, 325, 350, 353, 361).
- HAYCRAFT Jt, DUGGAN J, *Brit. Med.*, 1890, 1, 167 et *Proc. Roy. Soc.*, 1889, 351 (29).
- HEKTOEN L. et COLE A. G., *J. Infectious Diseases*, 1927, 40, 647 (15); 1928, 42, 1 (36).
- HERMAN-BOUSSIER G., HARBON S. et CLAUSER H., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1963, 45, 1267 (199, 369).
- HESSELVIK L., *Z. Physiol. Chem.*, 1938, 254, 144 (72).
- HEWITT L. F., *Biochem. J.*, 1938, 32, 1554 (73).
- HEWLETT R. T., *J. Physiol.*, 1892, 13, 493 (28).
- HIRANO G., HOFFMAN P. et MEYER K., *Fed. Proc.*, 1960, 19, 146(379).
- HOCHSTRASSER K., *Z. Physiol. Chem.*, 1962, 328, 61 (197).
- HOFMEISTER F., *Z. Physiol. Chem.*, 1890, 14, 165 (10); 1898, 24, 159(71).
- HOUGH L., JONES J. K. N. et WADMAN W. H., *J. Chem. Soc.*, 1950, 1702 (270).
- IZUMI S., *Z. Physiol. Chem.*, 1925, 142, 175 (71 g).
- IZUMI K., MAKINO M. et YAMASHINA I., *J. Biochem. (Japon)*, 1962, 51, 365 (314, 340); *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 50, 196 (314, 340, 249).
- JAMIESON G. A., XIIème Colloque sur les Protides des liquides biologiques, Bruges, 1964 (257, 259).
- JAYLE M. F., Conférence, Club français des Mucopolysaccharides, Paris, avril 1964 (265).
- JEANLOZ R. W., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1960, 42, 303 (203, 263);
- JEANLOZ R. W. et EYLAR E. H., *Intern. Symp. Macromol.*, Section V, A8, Wiesbaden, 1959 (204, 263).
- JAKUBCZAK E., ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J., résultats non publiés (18).

- JERMYN M. A. et ISCHERWOOD F. A., *Biochem. J.*, 1949, 44, 402(125, 269)
- JEVONS F. R., *Nature*, 1958, 181, 1346 (240, 320); *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 45, 384 (174, 184).
- JOHANSEN P. G., MARSHALL R. D. et NEUBERGER A., *Nature*, 1958, 181, 1345 (234, 319); *Biochem. J.*, 1961, 78, 518 (234, 319); *Biochem. J.*, 1960, 77, 239 (275).
- JOLLES P., NGUYEN-TRUNG-LUONG-CROS H. et LEDERER E., *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 43, 559 (336, 339).
- JOLLES P., ALAIS C. et JOLLES J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 69, 511 (191).
- JOURDIAN G. W., SHIMIZU F. et ROSEMAN S., *Fed. Proc.*, 1961, 20, 161 (380).
- JUTISZ M., KAMINSKI M. et LEGAULT-DEMARE J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 23, 173 (46, 175, 187).
- KAMIYAMA S. et SCHMID K., *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 58, 80 et 63, 266 (231, 316).
- KARLBERG O., *Z. Physiol. Chem.*, 1936, 240, 55 (71 K).
- KAVERZNEVA E. D. et BODDANOV B. P., *Biokhimiya*, 1961, 26, 105 (233) 1962, 27, 273 (219, 233).
- KETTERER B., *Life Sci.*, 1962, 5, 163 (17, 151, 163, 368).
- KRAKOW N., *Pflinger's Archiv.*, 1896, 63, 804 (56).
- KRUKENBERG C. *Maly Jahresbericht*, 1885, 15, 16 (55).
- KUHN R., GAUHE A. et BAER H. H., *Chem. Ber.*, 1954, 87, 289 (273).
- KUHN R. et KIRCHENLOHR W., *Chem. Ber.*, 1954, 87, 384 et 560 (273, 373).
- KUHN R., BAER H. H. et GAUHE A., *Chem. Ber.*, 1954, 87, 1553 (273).
- KUHN R. et BAER H. H., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1956, 89, 504 (273).
- KUHN R. et BROSSMER R., *Chem. Ber.*, 1956, 89, 2471 (2); *Angew. Chem.*, 1958, 70, 25 (273).
- KUHN R., et KRUGER G., *Chem. Ber.*, 1956, 89, 1473; 1957, 90, 264(286)
- LANGSTEIN L., *Z. Physiol. Chem.*, 1900, 31, 49 (71b); *Hofmeister Beitr.*, 1903, 3, 510 (25, 64).
- LEE Y. C. et MONTGOMERY R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 95, 263 (214); 1962, 97, 9 (214, 241, 322).

- LEVENE P. A., Z. Physiol. Chem., 1900-1901, 31, 395 (59).
- LEVENE P. A. et SUAREZ L. J., J. Biol. Chem., 1918, 36, 103 (95).
- LEVENE P. A. et MORI T., J. Biol. Chem., 1929, 84, 49 (60, 67, 71i, 96, 207, 294, 296).
- LEVY G. A. et McALLAN A., Biochem. J., 1959, 73, 127 (128).
- LEWIS J. C., SNELL N. S., HIRSCHMANN P. J. et FRAENKEL-CONRAT H. J. Biol. Chem., 1950, 186, 23 (90, 94).
- LINEWEAVER H. et MURRAY C. W., J. Biol. Chem., 1947, 171, 565 (40, 51, 78, 108, 138, 148).
- LONGSWORTH L. G., CANNAN R. K. et McINNES D. A., J. Am. Chem. Soc., 1940, 62, 2580 (16, 35, 106, 136, 146, 176).
- LUSH J. E., Nature, 1961, 189, 981 (167).
- MANDELES S., J. Chromatog., 1960, 3, 256 (181).
- MARINETTI G. V. et ROUSER G., J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 5345(282).
- MARKS G. S., MARSHALL R. D. et NEUBERGER A., Biochem. J., 1962, 84, 30 P et 15 P; 1963, 87, 274 (235).
- MARKS G. S., MARSHALL R. D., NEUBERGER A. et PAPKOFF H., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 340 (252, 256, 328, 354, 363).
- MASAMUNE H. et HOSHINO S., J. Biochem. (Japon) 1936, 24, 219(71 P).
- MASAMUNE H., YOSIZAWA Z. et MAKI M., Tohoku J. Exptl. Med., 1950, 53, 155, 237 (141).
- MASAMUNE H. et YOSIZAWA Z., Tohoku J. Exptl. Med., 1951, 55, 43 (217, 374).
- MASAMUNE H., Compt. Rend. 3ème Congr. Intern. Biochim., Bruxelles, 1955, 72 (303).
- MASAMUNE H., YOSIZAWA Z. et HAGA M., Tohoku J. Exptl. Med., 1956, 64, 257 (217).
- MESTER L., MOCZAR E., MEDGYESI G. et LAKI K., C. R. Acad. Sci., 1963, 256, 3210 (216, 258).
- MEYER K., PALMER J. W., THOMPSON R. et KHORAZO D., J. Biol. Chem. 1936, 113, 479 (39).
- MEYER K., Advances in Protein Chem., 1945, 2, 249 (70, 76, 97).
- MICHON J. et BOURRILLON R., Bull. Soc. Chim. biol., 1961, 43, 348 (109, 140, 150).
- MONTGOMERY R. et WU Y. C., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1963, 11, 249 (244, 254, 330, 365, 357); J. Biol. Chem., 1963, 238, 3547 (244, 254, 330, 357, 366).

- MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. biol., 1949, 31, 1639 (114, 118); 1957, 39, suppl. 3, 3 (8, 114); 1957, 39, 395 (266).
- MONTREUIL J. et BISERTE G., C.R. Soc. Biol., 1957, 151, 1898; Bull. Soc. Chim. biol., 1959, 41, 959 (3, 164).
- MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., Bull. Soc. Chim. biol., 1959, 41, 13 (115, 119).
- MONTREUIL J. et CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3071
- MONTREUIL J., SPIK G. et CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3493 (371).
- MONTREUIL J., SPIK G., CHOSSON A., SEGARD E. et SCHEPPLER N., Chromatographie Symposium II, 1962, 47, (Sté Belge des Sciences pharmaceutiques) (251).
- MONTREUIL J., BISERTE G. et CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 1963, 256, 3372 (89, 196, 223, 250).
- MORNER C. T., Z. Physiol. Chem., 1894, 18, 525 (19, 31, 103, 104, 134, 135, 144, 145); 1912, 80, 430 et 84, 130 (22).
- MURPHY W. H. et GOTTSCHALK A., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 52, 349 (190, 306).
- NEEDHAM J., Biochem. J., 1927, 21, 733 (71 h).
- NEUBERG C. SCHEWKET O, Biochem. Z., 1912, 44, 491 (66, 71 f).
- NEUBERGER A., Biochem. J., 1938, 32, 1435 (232).
- NEUBERGER A. et PAPKOFF H., Biochem. J., 1963, 87, 581 (253, 327, 355).
- NEUMEISTER R., Z. Biol., 1890, 27, 369 (20, 32, 102, 132, 143).
- NOLAN C. et SMITH E. L., J. Biol. Chem., 1962, 237, 446 et 453 (228, 310).
- NOMOTO M. et NARAHASHI K., Symposia on enzyme chem., 1957, 12, 24 (247); J. Biochem. (Japon) 1959, 46, 839 (247).
- NUENKE R. H. et CUNNINGHAM L. W., J. Biol. Chem., 1961, 236, 2452 (236, 321).
- ODIN L., Chemistry and Biology of mucopolysaccharides, p. 234, Churchill London, 1958 (82, 155).
- OSBORNE T. B. et CAMPBELL G. F., J. Am. Chem. Soc., 1900, 22, 422 (11, 24, 34).

- OSWALDA. Z.Physiol. Chem., 1910, 65, 175 (65).
- PAINTER T. J. et MORGAN W. T. J., Nature, 1961, 191, 39 (297).
- PAQUIN R. et PERCHERON F., Bull. Soc. Chim. biol., 1963, 45, 101 (4, 165)
- PARK J. T., et STROMINGER J. L., Science, 1957, 125, 99(335).
- PARTRIDGE S. M., Biochem. J., 1948, 42, 238; Partition chromatography, Biochem. Soc. Symp., 1949, 3 (130).
- PARTRIDGE S. M., Biochem. J., 1948, 42, 238 (116, 268); Biochem. Soc. Symp., 1950, 3, 52 (117).
- PAVY F. W., Proc. Roy. Soc., 1893, 54, 53; Physiol. of the Carbohyd. London, 1894, p. 53 (54); Carbohydrate metabolism, 1907, 44 (71d).
- PENASSE L., JUTISZ M., FROMAGEOT C. et FRAENKEL-CONRAT H., Biochim. Biophys. Acta, 1952, 9, 551,(92).
- PETERSON E. A. et SOBER H. A?, J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 751(182).
- REISSIG J. L., STROMINGER J. L. et LELOIR L. F., J. Biol. Chem., 1955, 217, 959 (129).
- RHODES M. B., AZARI P. R. et FEENEY R. E., J. Biol. Chem., 1958, 230, 399 (183, 186).
- RHODES M. B., BENNETT N. et FEENEY R. E., J. Biol. Chem., 1960, 235, 1686 (83).
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1940, 34, 931 (111).
- ROMANOFF A. L. et ROMANOFF A. J., The Avian Egg, Hohn Wiley and sons ed., New York, 1949 (6).
- ROSEMAN S. et DAFFNER I., Anal. Chem., 1956, 1743 (142).
- ROSEVEAR J. W. et SMITH E. L., J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 250; J. Biol. Chem., 1961, 236, 425 (227, 309).
- ROTHFUS J. A. et SMITH E. L., J. Biol. Chem., 1963, 238, 1402 (311).
- SALTON M. R. J. et GHUYSEN J. M., Biochim. Biophys. Acta, 1959, 36, 552 (325, 332).
- SAMUELY F., Biochem. Handb. ., 1911, 4, 147 (71e).
- SCHEIDEGGER J., J. Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1955, 7, 103(178)
- SCHIFFMAN G., KABAT E. et LESKOWITZ S., J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 1122 (276).

- SCHMID K., J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 60 (215).
- SCHUTZENBERGER P., Maly Jahresbericht über Thierchemie, p. 299  
cité par Eicholz, J. Physiol., 1898, 23, 163 (58).
- SEEMANN J., Dissert. Marburg, 1898 (71a).
- SHARP D. G. COOPER G. R. ERICKSON J. O. et NEURATH H., J. Biol.  
Chem., 144, 139 (1942) (177).
- SMITHIES O., Advances in Protein Chem., 1959, 14, 65; Biochem. J.,  
1959, 71, 585 (166).
- SONNET J., Les glycoprotéides sériques à l'état normal et pathologique,  
Bruxelles, 1956, Thèse, Arscia ed., 60 Rue de l'Etuve Bruxelles (201).
- SØRENSEN M., Biochem. Z., 1934, 269, 271; Compt. Rend. Trav.  
Lab. Carlsberg, 1934, 20, 3 (68, 71j, 152).
- SPIRO R. G., J. Biol. Chem., 1962, 237, 382 (206, 345); 1962, 237, 646  
(206, 264, 277, 287, 378); Fed. Proc., 1961, 20, 383 (206); J. Biol.  
Chem., 1964, 239, 567 (264, 383).
- STACEY M., Advances in Carbohydrate Chem., 1946, 2, 161; STACEY M.  
et WOOLLEY J. M., J. Chem. Soc., 1940, 184 et 1942, 550 (5, 69, 75,  
98, 100, 153, 208, 300, 302).
- STANLEY P. J., Aust. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 1959, 234, 716 (285).
- SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L., Nature, 1958, 181, 1154 (131, 132).
- TAKAHASHI K., J. Biochem., 1962, 52, 74 (344).
- TANAKA M., Yakugaku Zasshi, 1961, 81, 1460, 1464, 1467, 1470  
(210, 222, 242, 324, 352, 358, 359, 360).
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1929, 215, 36 (110).
- TOMARELLI R. M., HASSINEN J. B., ECKHARDT E. R., CLARK R. H. et  
BERNHART F. W., Arch. Biochem. Biophys., 1954, 48, 225 (376).
- TREVELYAN W. E., PROCTOR D. P. et HARRISON J. S., Nature, 1950,  
444, 166 (279).
- TSUGITA A. et AKABORI S. J., J. Biochem. (Japon), 1959, 46, 695 (338, 248).
- TURNER R. A. et SCHMERZLER G., Biochim. Biophys. Acta, 1954, 13, 555 (9).
- WARNER R. C., "The Proteins", Neurath et Bailey ed., vol. II, part I,  
Academic Press Inc., Pub., New York, 1954, p. 440 (7).

- WEINFELD H. et TUNIS M., J. Biol. Chem., 1960, 235, 1668; Biochim. Biophys. Acta, 1961, 50, 590 (229, 313).
- WERNER I. et ODIN L., Upsala Läkareföreningar Förhandlingar, 1949, 54, 69 (37, 105, 137, 147); Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230(113).
- WEYDEMAN, Dissert. Marburg, 1896 (62).
- WHISTLER R. L. et DURSO D. F., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 677 (267).
- WINZLER R. J., dans Wolstenholme G. E. W. et O'Connorm, Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides, Little Brown and Co., Boston, 1958, p. 245 (202); in The plasma proteins, 1960, vol. I, p. 309, Putnam ed., Academic Press Inc. New York (230).
- WINZLER R. J. et INOUYE T., Abstr. 139th Meeting of Am. Chem. Soc., April, 1961, p. 4 c (230).
- YAMASHINA I., Acta Chem. Scand., 1956, 10, 1666 (312).
- YAMASHINA I. et IZUMI K., dans Biochemistry and Medicine of mucopolysaccharides, Egami F. et Oshima Y. ed., Research on mucopolysaccharides, Tokyo, 1962, p. 38 (315, 317)
- YAMASHINA I. et MAKINO, J. Biochem. (Japon), 1962, 51, 359 (318).
- YAMASHINA I., BAN-I K. et MAKINO M., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 78, 382 (220, 347).
- YOSIZAWA Z., Tohoku J. Exptl. Med., 1949, 51, 51 et 1950, 52, 145 (111, 375)
- YOUNG G., J. Biol. Chem., 1937, 120, 1 (49).
- ZANETTI C., Ann. Chim. e Pharm., 1897, 12 (63).
- ZILL L. P., KHYM J. X. et CHENIAE G. M., J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 1339 (278).