

N° d'ordre : 174

50376
1968
20-2

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DES SCIENCES



MÉMOIRE PRÉSENTÉ

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Geneviève SPIK

DEUXIÈME MÉMOIRE

PROCÉDÉS DE DOSAGES CHROMATOGRAPHIQUES ET ÉLECTROPHORÉTIQUES DES OSES CONSTITUANT LES GLYCOPROTÉIDES

PRÉSENTÉ LE 8 JUIN 1968 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M.M. J. MONTREUIL, Président
H. CLAUSER, Rapporteur
C. LOUCHEUX, Examineur

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie
Biologique de la Faculté des Sciences de Lille, sous la direction
du Professeur J. MONTREUIL.

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>GENERALITES</u>	2
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">LES GLYCOPROTEINES</div>	3
I - <u>DEFINITION</u>	3
II - <u>IMPORTANCE BIOLOGIQUE DES GLYCOPROTEIDES</u>	3
III - <u>LES OSES CONSTITUANT LES GLYCOPROTEIDES</u>	5
IV - <u>STRUCTURE DES GLYCOPROTEIDES</u>	12
A - Structure de la fraction glycanique	13
B - Structure de la fraction protidique	22
C - Nature du point d'attache glycanne-protide	22
V - <u>PROBLEMES POSES PAR LA DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLLAIRE EN OSES DES GLYCOPROTIDES</u>	27
A - <u>Les différents types d'hydrolyse des liaisons osidiques</u>	28
1 - Autolyse des osides	28
2 - Hydrolyse alcaline	29
3 - Hydrolyse acide	29
B - <u>Stabilité en milieu acide des liaisons osidiques</u>	30
C - <u>Facteurs de modification des oses au cours de l'hydrolyse acide</u>	34
a - Réactions de transosylation oses-oses	35
b - Réactions de condensation des oses et des protides. Réaction de MAILLARD	36
<u>METHODES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES</u>	
<u>D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGE DES OSES</u>	42
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE DES OSES NEUTRES</div>	43
I - <u>HYDROLYSE QUANTITATIVE DES OSIDES</u>	43
1 - Hydrolyse par des résines polystyrène-sulfonées	44
2 - Hydrolyse par les acides formique et acétique	46
3 - Hydrolyse par les acides oxalique et nitrique	47

4 - Hydrolyse par l'acide sulfurique	47
5 - Hydrolyse par l'acide chlorhydrique	53
6 - Conclusions générales concernant l'hydrolyse quantitative des osides	60
II - <u>PURIFICATION DES HYDROLYSATS</u>	62
1 - Cas d'hydrolysats de glycoprotéides	63
2 - Cas d'hydrolysats d'osides	67
III - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE DES OSES NEUTRES</u>	68
A - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES OSES NEUTRES</u>	69
1 - <u>SYSTEMES-SOLVANTS</u>	69
2 - <u>REVELATION DES OSES NEUTRES</u>	72
1° - Réactifs non spécifiques de révélation des glucides	73
2° - Réactifs spécifiques des cétoses	80
3° - Réactif spécifique des cyclitols	81
3 - <u>IDENTIFICATION DES OSES NEUTRES</u>	82
a - <u>Identification des oses natifs</u>	82
b - <u>Identification des dérivés des oses</u>	83
4 - <u>DOSAGE DES OSES NEUTRES</u>	85
1° - <u>Procédés de dosages des oses après révélation des chromatogrammes</u>	85
a - Méthodes photodensitométriques	86
b - Méthodes par élution des taches	86
2° - <u>Procédés de dosage des oses sans révélation préalable</u>	87
B - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES OSES NEUTRES</u>	91
1 - Procédés chromatographiques	92
2 - Révélation	93
3 - Dosage	93
C - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNES DES OSES NEUTRES</u>	94
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE</u>	95
a - sur colonnes d'amidon	95
b - sur colonnes d'échangeurs d'ions	96
2 - <u>CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS</u>	98
a - Procédé de WALBORG et coll.	101
b - Procédé de WEBER et coll.	103

D - <u>CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES OSES NEUTRES</u>	103
1 - Procédé de OATES et SCHRAGER	105
2 - Procédé de BOLTON et coll.	107
3 - Procédé de SAWARDEKER et coll.	108
E - <u>ELECTROPHORESE SUR PAPIER DES OSES NEUTRES</u>	109

<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	111
------------------------------	-----

<u>ADDENDUM</u>	113
-----------------	-----

I - <u>SOLUTION DU PROBLEME DE LA CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE DES OSES "NEUTRES" CONSTITUANT LES OSIDES LIBRES ET CONJUGUES</u>	113
--	-----

A - Etude de la chromatographie quantitative	113
B - Etude de l'hydrolyse	116
C - Etude du protocole expérimental de la purification des hydrolysats	118

II - <u>PROGRES RECENTS DE CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVES DES OSES "NEUTRES"</u>	121
---	-----

A - Chromatographie en couche mince	121
B - Chromatographie en phase gazeuse	123

<p style="text-align: center;">CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE DES ACIDES SIALIQUES</p>
--

124

I - <u>HYDROLYSE DES LIAISONS SIALYL</u>	124
--	-----

A - <u>HYDROLYSE CHIMIQUE DES LIAISONS SIALYL</u>	124
---	-----

1 - <u>STABILITE DES ACIDES SIALIQUES VIS-A-VIS DES ACIDES</u>	125
--	-----

2 - <u>STABILITE DES LIAISONS SIALYLS VIS-A-VIS DES ACIDES</u>	129
--	-----

B - <u>HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES LIAISONS SIALYL</u>	134
--	-----

C - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT L'HYDROLYSE DES LIAISONS SIALYL. PROCEDES D'HYDROLYSE</u>	137
---	-----

II - <u>PURIFICATION DES ACIDES SIALIQUES</u>	139
---	-----

III - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	141
---	-----

A - <u>SYSTEME-SOLVANTS</u>	142
B - <u>REVELATION DES ACIDES SIALIQUES</u>	143
1) <u>Réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde</u>	143
2) <u>Réactif au résorcinol</u>	144
3) <u>Réactif à l'orcinol</u>	144
4) <u>Réactif à l'acide thiobarbiturique</u>	144
C - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES SIALIQUES</u>	145
1 - <u>PROCEDES CHROMATOGRAPHIQUES</u>	145
2 - <u>DETERMINATION DES PROPRIETES PHYSIQUES</u>	147
3 - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGES RADICAUX ACYL</u>	147
a - <u>RUPTURE DES LIAISONS ACYL</u>	150
α - <u>Hydrolyse</u>	150
β - <u>Méthanolyse</u>	151
γ - <u>Hydrazinolyse</u>	152
δ - <u>Hydroxylaminolyse</u>	152
<u>CONCLUSIONS</u>	152
b - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES</u>	153
c - <u>DOSAGE DES ACIDES</u>	154
α - <u>Dosage des acides formique et acétique</u>	154
β - <u>Identification et dosage de l'acide</u>	
<u>glycolique</u>	155
1) <u>PROCEDE DE KLENK et coll.</u>	155
2) <u>PROCEDE DE GIBBONS</u>	156
4 - <u>IDENTIFICATION DES PRODUITS DE DEGRADATION DES</u>	
<u>ACIDES SIALIQUES PAR LA N-ACETYLNEURAMINIQUE-</u>	
<u>ALDOLASE</u>	157
D - <u>DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES SIALIQUES</u>	160
1 - <u>PROCEDES COLORIMETRIQUES</u>	160
2 - <u>PROCEDES ENZYMATIQUES</u>	160
E - <u>CONCLUSIONS</u>	151
CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE DES ACIDES URONIQUES	
I - <u>STABILITE DES ACIDES URONIQUES</u>	
<u>HYDROLYSE DES LIAISONS "URONOSIDYL"</u>	162
<u>RECHERCHES SUR LA STABILITE DES ACIDES URONIQUES</u>	164

A - <u>STABILITE VIS-A-VIS DES ACIDES URONIQUES</u>	164
B - <u>STABILITE VIS-A-VIS DES ECHANGEURS DE CATIONS</u>	168
<u>CONCLUSIONS</u>	169
 <u>II - IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE ET</u> <u>ELECTROPHORETIQUE DES ACIDES URONIQUES</u>	
A - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES URONIQUES ET DE LEURS LACTONES</u>	170
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	170
2 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE</u>	173
3 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ECHANGEURS D'IONS</u>	175
4 - <u>CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE</u>	177
5 - <u>ELECTROPHORESE SUR PAPIER</u>	179
B - <u>IDENTIFICATION DES DERIVES DE REDUCTION DES ACIDES URONIQUES</u>	180
1. - <u>REDUCTION DU GROUPEMENT CARBOXYLIQUE</u>	180
2. - <u>REDUCTION DES ACIDES URONIQUES EN ACIDES ALDONIQUES</u>	181
3. - <u>REDUCTION DES ACIDES URONIQUES EN POLYOLS</u>	182
<u>III - CONCLUSIONS GENERALES</u>	183
 <div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> <p style="text-align: center;">CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE QUANTITATIVES DES OSAMINES ET DE LEURS DERIVES</p> </div>	
1°) <u>HYDROLYSE DES LIAISONS OSAMINIDYL</u>	184
I - <u>STABILITE DES OSAMINES VIS-A-VIS DES ACIDES</u>	184
A - <u>ETUDE DE LA STABILITE DE LA GLUCOSAMINE DANS DIFFERENTES CONDITIONS D'HYDROLYSE</u>	185
B - <u>STABILITE DES OSAMINES VIS-A-VIS DE L'ACIDE CHLORHYDRIQUE</u>	188
II - <u>STABILITE DES LIAISONS OSAMINIDYL</u>	192
III - <u>CONCLUSIONS</u>	197
2°) <u>PURIFICATION DES HYDROLYSATS</u>	197
A - <u>Par évaporation sous vide</u>	197
B - <u>Par lyophilisation</u>	198

C - <u>Par chromatographie sur échangeurs d'ions</u>	198
1° - <u>Purification sur échangeurs de cations</u>	198
2° - <u>Purification sur échangeurs d'anions</u>	198
3°) <u>CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE DES OSAMINES ET</u> <u>DE LEURS DERIVES</u>	199
I - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES OSAMINES-BASES</u>	199
1. <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	199
2. <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DE VERRE</u>	203
3. <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE</u>	203
4. <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNES D'ECHANGEURS D'IONS</u>	205
a - <u>Procédé de GARDELL</u>	205
b - <u>Procédés automatiques</u>	206
Procédé de HEYNS <u>et al.</u>	206
Procédé de GREGORY <u>et VAN LENTEN</u>	208
Procédé de BRENDEL <u>et al.</u>	208
Procédés de MONSIGNY	209
5. <u>CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE</u>	213
II - <u>CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE DES</u> <u>DERIVES N-SUBSTITUES DES OSAMINES</u>	217
A - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES N-ACETYL-OSAMINES</u>	217
1 - <u>N-ACETYLATION DES OSAMINES</u>	217
a - <u>PROCEDES "IN VITRO"</u>	217
- Procédé de WHITE	218
- Procédé de ROSEMAN <u>et coll.</u>	218
- Procédé de LEVY <u>et MC ALLAN</u>	218
<u>CONCLUSIONS</u>	218
b - <u>PROCEDES DE N-ACETYLATION SUR PAPIER</u>	219
2 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES N-ACETYL-OSAMINES</u>	220
3 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE</u>	223
4 - <u>CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE</u>	223
a - Procédé de SWEELEY <u>et coll.</u>	
b - Procédé de RICHEY <u>et coll.</u>	
c - Procédé de KOBATA <u>et ZIRÔ</u>	
5 - <u>ELECTROPHORESE SUR PAPIER</u>	224
B - <u>IDENTIFICATION DE DERIVES DE N-SUBSTITUTION DIVERS</u>	227
1. - <u>DNP-osamines</u>	227

2. - <u>N-carbo-éthoxy-osamines</u>	227
3. - <u>N-dansyl-osamines</u>	228
III - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES OSAMINITOLS</u>	228
A - <u>CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE</u>	229
B - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEURS D'IONS</u>	229
IV - <u>ETUDE DES PRODUITS DE LA DESAMINATION OXYDATIVE DES OSAMINES</u>	230
1. <u>PRINCIPE</u>	230
2. <u>MODES OPERATOIRES</u>	231
a - Procédé de GARDELL, HEIJKENJOLD et ROCHNORLUND	231
b - Procédé de STOFFYN et JEANLOZ	231
c - Procédé de BYCHKOV et KOLESNIKOVA	232
4°) <u>DOSAGES COLORIMETRIQUES ET ENZYMATIQUES DE LA GLUCOSAMINE? DE LA GALACTOSAMINE ET DE LA MANNOSAMINE EN MELANGE</u>	232
I - <u>PROCEDES COLORIMETRIQUES</u>	232
A - <u>PROCEDE DE ROSEMAN ET DAFFNER</u>	232
B - <u>PROCEDE DE GOOD ET BESSMAN</u>	233
C - <u>PROCEDE DE CESSI ET SERAFFINI-CESSI</u>	234
D - <u>PROCEDE DE LUDOWIEG ET BENMAMAN</u>	235
II - <u>PROCEDES ENZYMATIQUES</u>	238
5°) <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DE L'ACIDE MURAMIQUE</u>	239
A - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	239
B - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE</u>	241
C - <u>ELECTROPHORESE</u>	241
6°) <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	242
BIBLIOGRAPHIE	244

INTRODUCTION

L'exploration de la structure d'un oside est nécessairement précédée par l'étude de sa composition molaire en oses. Cette dernière est réalisée en deux étapes :

1° - Détermination du pourcentage relatif de chacun des groupes d'oses qui entrent dans la constitution de l'oside (oses "neutres", acides uroniques, osamines et acides sialiques) et dont le dosage est généralement réalisé à l'aide de méthodes colorimétriques (voir à ce sujet: SPIK (1) ; MONTREUIL et SPIK (2) ; SPIK et MONTREUIL (3).

2° - Détermination des rapports molaires des oses effectuée grâce à l'application de la chromatographie et de l'électrophorèse quantitatives.

Le présent mémoire est consacré à ce second problème et nous nous proposons de décrire essentiellement les procédés que nous utilisons au laboratoire à la suite d'un choix qui repose sur des études critiques des différentes méthodes d'analyse, - personnelles ou non -, que nous avons effectuées d'une manière systématique. En effet, les recherches d'ordre physico-chimique ou structural effectuées sur les osides ne peuvent se contenter de résultats approximatifs, aussi bien dans l'identification que dans le dosage des glucides et elles exigent, des méthodes, une précision absolue.

Les procédés que nous décrivons et qui ont fait l'objet d'une revue générale récente (MONTREUIL, SPIK, DUMAISNIL et MONSIGNY) (4) sont susceptibles d'applications générales et s'étendent, à la fois, au domaine des osides "libres" et au domaine des osides "conjugués" à des protides ou glycoprotides ; mais notre mémoire concernera essentiellement cette dernière classe de composés et nous consacrerons un chapitre à l'exposé de leurs principales propriétés et aux problèmes particuliers que pose la dualité de leur structure.

GENERALITES

Bien que les procédés d'analyse des sucres que nous décrivons soient parfaitement applicables à l'étude de la composition des polyosides, nous limiterons ce chapitre à la seule étude des glycoprotéines.

LES GLYCOPROTEINES

I - DEFINITION

Les glycoprotéines sont des hétéroprotéides constitués par l'association d'une protéine avec un groupement prosthétique, de nature osidique.

L'étude des glycoprotéines a commencé vers la fin du siècle dernier et, malgré les difficultés de préparation, de nombreux composés ont été isolés pour lesquels plusieurs classifications et les terminologies les plus disparates ont été proposées. Actuellement, on donne le nom de glycane ou de mucopolyoside à la fraction glucidique liée à des protides. On groupe sous le nom de glycoprotides les produits d'association de glucides avec une protéine (glycoprotéine), un peptide (glycopeptide) ou un acide aminé (glyco-amino-acide).

II - IMPORTANCE BIOLOGIQUE DES GLYCOPROTEINES

L'intérêt que portent aux glycoprotéines 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 glycoprotéines 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 mucopolyosides acides associés à des protéines.

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

Des enzymes, comme la choline-estérase, la lactase, l'entérokinase, l'oxytocinase, l'atropine-estérase, la galactose-oxydase, la ribonucléase B, la thrombine sont des glycoprotéides.

De nombreux glycoprotéides entrent dans la constitution des membranes cellulaires et jouent un rôle important dans la cohésion tissulaire et dans des phénomènes immunitaires : les antigènes spécifiques des groupes sanguins A, B et O, présents dans la paroi des hématies humaines, sont des glycoprotéides. Des glycoprotéides sont présents dans les membranes, les parois et les capsules bactériennes (acides teichoïques ; "muréine").

Les liquides biologiques sont généralement très riches en glycoprotéides : salive, urine, bile, lait, larmes, sang. Tous les protéides de ce dernier - mise à part la sérumalbumine - sont des mucoïdes. Parmi ceux-ci, nous citerons, par exemple, les anticorps, l'orosomucoïde, la sidérophiline et la céruléoplasmine, formes de transport, respectivement, du fer et du cuivre ; les haptoglobines ; la cytochromophiline ; la prothrombine et le fibrinogène, ces deux derniers jouant un rôle fondamental dans la coagulation sanguine.

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

III - LES OSES CONSTITUANT LES GLYCOPROTEIDES

Il n'entre pas dans notre intention de traiter en détail de la chimie des glycoprotéines, 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 osidique et sur la nature du point d'attache glycanne-protide.

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

- 1 - Les oses "neutres", qui ne possèdent pas de groupements polaires ;
- 2 - Les acides uroniques porteurs d'une fonction acide ;
- 3 - Les osamines qui possèdent une fonction amine, généralement acylée ;
- 4 - Les acides osamine-carboxyliques ou acides osamine-uroniques qui renferment, à la fois, une fonction amine et une fonction acide.

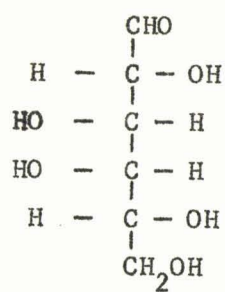
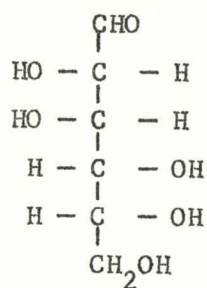
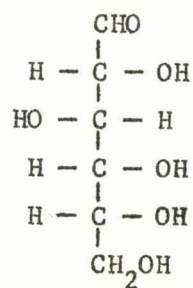
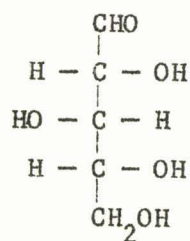
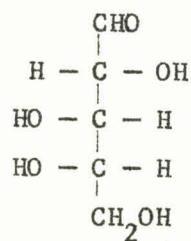
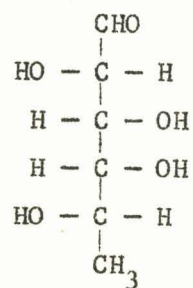
1 - LES OSES "NEUTRES" (Figure 1 ; p. 6)

Les oses "neutres" les plus répandus dans les molécules de glycoprotéines sont des aldohexoses : D-galactose, D-mannose et D-glucose; des aldopentoses : D-xylose, L-arabinose (+) ; des 6-désoxy-hexoses : L-fucose, L-rhamnose (++) .

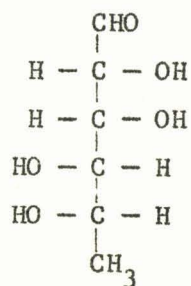
2 - LES ACIDES URONIQUES (Figure 2 ; p. 7)

L'acide D-glycuronique et l'acide L-iduronique sont des constituants des glycoprotéines animaux. Les acides D-galacturonique et

-
- (+) - Le D-arabinose est plus rare. On le trouve par exemple, dans certains polyosides du bacille de KOCH.
- (++) - Des 3,6-bis-désoxy-hexoses comme l'abéquose, le tyvélose et le paratose ont été caractérisés dans des polyosides bactériens.

D-galactoseD-mannoseD-glucoseD-xyloseL-arabinoseL-fucose

(6-désoxy-L-galactose)

L-rhamnose

(6-désoxy-L-mannose)

Figure 1

Formules linéaires des principaux oses "neutres" présents dans les osides libres et conjugués.

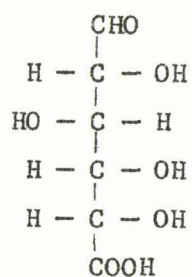
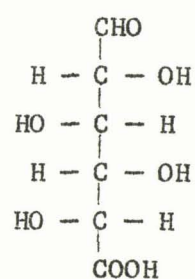
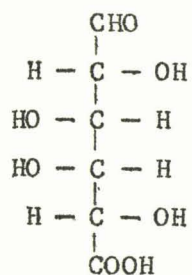
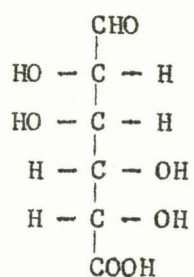
Acide D-glycuroniqueAcide L-iduroniqueAcide D-galacturoniqueAcide D-mannuronique

Figure 2

Formules linéaires des acides uroniques présents dans les osides libres et conjugués.

D-mannuronique n'ont été caractérisés, jusqu'à présent, que dans des polysides d'origine végétale et dans des polysides bactériens.

3 - LES OSAMINES (Figure 3 ; p. 9)

Les osamines constituant les glycoprotéines sont essentiellement la D-glucosamine (2-amino-2-désoxy-glucose) et la D-galactosamine (2-amino-2-désoxy-galactose). La D-mannosamine (2-amino-2-désoxy-mannose) 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 chondroïtine-sulfurique. La D- et la L-fucosamine, la D-gulosamine, la D-fructosamine et la D-quinovosamine ont été isolées récemment de divers glycoprotides.

Dans les osides libres et conjugués, les osamines existent sous la forme "neutralisée" de dérivés N-acylés, généralement N-acétylés (+).

4 - LES CARBOXY-OSAMINES (Figure 4 ; p. 10)

Les carboxy-osamines sont des oses dans les molécules desquels coexistent des fonctions amines et carboxyliques. On en distingue actuellement 3 classes :

- a - Les dérivés de substitution de l'acide neuraminique ou acides sialiques,
- b - Les dérivés de substitution de l'acide muramique,
- c - Les amino-acides uroniques.

a - Les acides sialiques.

Les acides sialiques ou neuraminiques sont des nonoses (oses à 9 atomes de carbone). Selon la nomenclature de BLIX, GOTTSCHALK et KLENK (5), ce sont des dérivés de substitution de l'acide neuraminique

(+) Des dérivés N-formylés ont aussi été signalés.

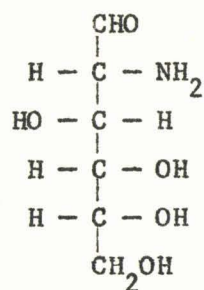
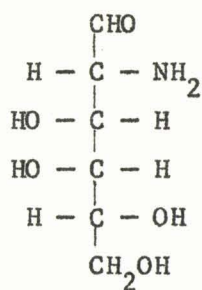
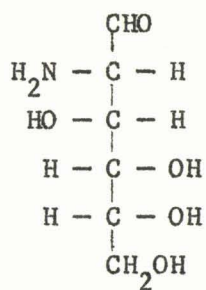
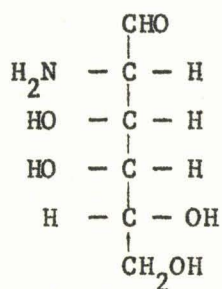
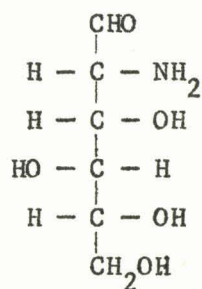
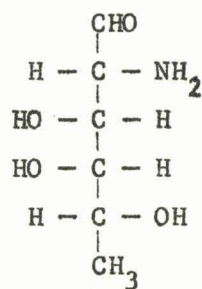
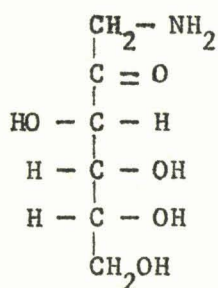
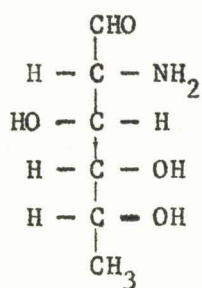
D-glucosamineD-galactosamineD-mannosamineD-talosamineD-gulosamineD-fucosamineD-fructosamineD-quinovosamine

Figure 3

Formules linéaires des principales osamines (2-désoxy-2-amino-oses) présentes dans les osides libres et combinés.

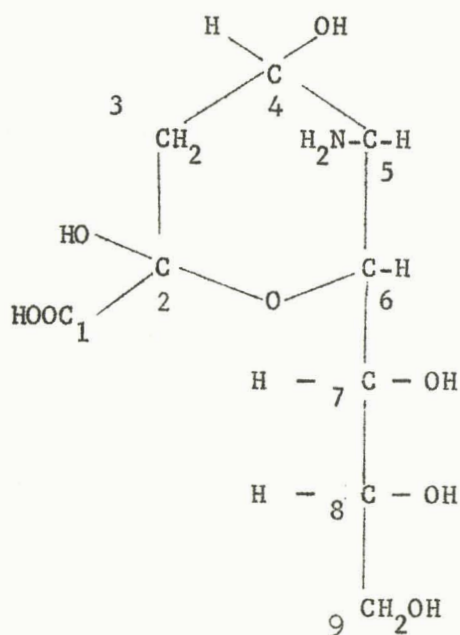
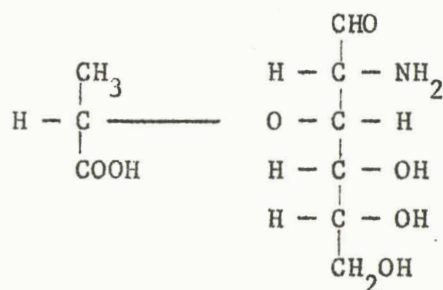
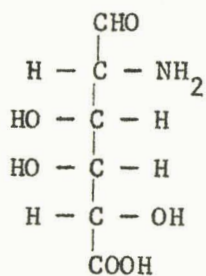
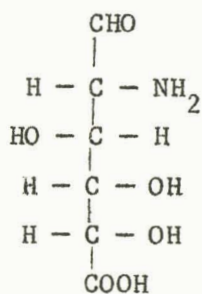
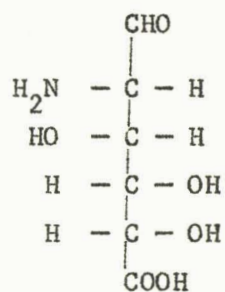
a - Acide neuraminiqueb - Acide muramiquec - Acide galacto-
samine carboxylique
ou galactosamine
uronique.d - Acide glucosamine-
carboxylique ou gluco-
samine uronique.e - Acide mannosamine
carboxylique ou manno-
samine-uronique.

Figure 4

Formules de divers acides osamine-carboxyliques.

(Fig. 4a ; p.10) que l'on peut considérer, lui-même, comme le résultat de la condensation par aldolisation d'une molécule d'acide pyruvique avec une molécule de D-mannosamine (KUHN et BROSSMER) (6). 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 :

1° - 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 ;

2° - l'acide N-glycolylneuraminique ou acide sialique de type porcin (acide sialique P) et l'acide N-acétylneuraminique coexistent dans les glycoprotéines du Porc ;

3° - l'acide N-acétyl-4-O-acétylneuraminique ou acide sialique de type équin (acide sialique E) ;

4° - l'acide N-acétyl-7-O-acétylneuraminique ou acide sialique de type bovin (acide sialique B) ;

5° - l'acide N-acétyl-7,8 (ou 9) -di-O-acétylneuraminique (2^e type bovin)

6° - l'acide N-glycolyl-8-O-méthylneuraminique identifié par WARREN (7) chez *Asteria forbesi* (Echino-derme).

La plupart des glycoprotéines 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 périodique-fuchsine de SCHIFF est très intense (MONTREUIL et BISERTE (8) ; PAQUIN et PERCHERON (9)). La caractérisation et l'isolement des sialomucoïdes en sont facilités.

b - Les acides muramiques.

L'acide muramique (Fig. 4 b; p.10) est un constituant de certains glycannes bactériens. Il peut être classé parmi les osamines dont il possède les propriétés essentielles, bien que son métabolisme semble le rattacher aux acides sialiques. Il s'agit, en effet, de la 3-O- α -carboxy-éthyl-D-glucosamine. L'acide muramique est N-acétylé dans les glycannes de la "muréine".

c - Les acides osamine-carboxyliques ou acides amino-uroniques.

Des acides hexosamine-uroniques ont été caractérisés chez des Virus : l'acide galactosamine-uronique dans l'antigène Vi (HEYNS, KIESSLING, LINDENBERG, PAULSEN et WEBSTER) (10) ; l'acide glucosamine-uronique (WILLIAMSON et ZAMENHOF) (11) ; chez Hemophilus et chez Staphylococcus aureus (HASKELL et HANESSIAN) (12) ; l'acide mannosamine-uronique chez Micrococcus lysodeikticus (PERKINS) (13).

IV - STRUCTURE DES GLYCOPROTIDES

Nos connaissances concernant la structure des glycoprotides sont encore très fragmentaires et les résultats les plus importants n'ont été acquis que dans les trois dernières années. Deux raisons peuvent être invoquées pour expliquer cette lente évolution. En premier lieu, peu de glycoprotéides ont été isolés à l'état pur et en quantités suffisantes pour permettre une exploration poussée de leur constitution. En second lieu, la dualité de composition des glycoprotides complique singulièrement la question car elle pose trois problèmes de structure : le premier concerne le groupement glycanique, le second la fraction polypeptidique et le troisième les modalités de l'attache du glycane sur la chaîne protidique. Sans décrire la totalité des résultats qui ont été acquis jusqu'à présent, nous ferons rapidement le point de cette question en nous limitant à

quelques exemples précis choisis parmi ceux qui seront indispensables dans la suite de notre exposé pour expliquer le mécanisme de certaines réactions.

Nous nous attacherons successivement à la structure du glycanne, du protide et du point d'attache de ces deux fractions.

A - STRUCTURE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE

Il est fort probable que la structure de la fraction glycanne est spécifique de chaque glycoprotide. Toutefois, bien que nos connaissances soient encore très limitées sur ce sujet, nous pouvons faire deux observations qui sont susceptibles de simplifier le problème.

Nous pouvons, en premier lieu, distinguer deux groupes fondamentaux de glycannes. Les uns sont de composition simple et sont constitués d'un (acides teichoïques, par exemple) ou de deux oses seulement. Dans ce dernier cas, les oses peuvent être associés en unités diholosidiques liées directement à la chaîne polypeptidique (mucines sous-maxillaires, par exemple) ou unies les unes aux autres en longues chaînes polysidiques non ramifiées (mucopolyosides acides, par exemple). Nous proposons de les appeler n-glycannes. Les autres sont de composition complexe et renferment de nombreux types d'oses associés en molécules ramifiées. Nous proposons de les appeler iso-glycannes. En second lieu, on observe qu'il existe un nombre limité de motifs moléculaires dans chacune des "familles" de glycoprotéides. On met, en effet, en évidence des analogies de constitution des glycannes et il est possible de ramener ceux-ci à quelques schémas fondamentaux (voir à ce sujet, MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (14) et MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (15)), les uns comportent, en effet, un résidu d'ose seulement, comme dans certains acides teichoïques une courte chaîne osidique (mucines sous-maxillaires, par exemple) ; d'autres, comme ceux de nombreux glycoprotéides animaux, possèdent un poids moléculaire moyen de l'ordre de 3000 ; certains, enfin, atteignent des poids moléculaires très élevés (mucopolyosides de la substance fondamentale, par exemple).

D'autre part, dans chacun de ces groupes, existent des analogies de structure des glycannes et il est possible de ramener celle-ci à

quelques schémas fondamentaux.

1° - n-GLYCANNES

a - Mucines sous-maxillaires.

La structure des mucines sous-maxillaires est en grande partie élucidée grâce aux travaux de GOTTSCHALK et de PIGMAN. Il s'agit de macromolécules d'un poids moléculaire élevé, variant entre 1 (mucine sous-maxillaire du Boeuf) et 2 (mucine sous-maxillaire du Mouton) $\times 10^6$. La mucine sous-maxillaire du Mouton comporte 800 unités diholosidiques (α -N-acétyl-neuraminyl-2,6-N-acétylgalactosamine) dont la majeure partie sont unies par la fonction réductrice de l'osamine avec les fonctions hydroxylées de la sérine et de la thréonine.

La mucine sous-maxillaire du Boeuf possède une structure très voisine qui est illustrée par la figure 5 (PIGMAN) (16)

b - Glycoprotides bactériens.

Les glycoprotides des parois bactériennes ont fait l'objet de nombreux travaux qui ont permis d'élucider la structure de certains d'entre eux, comme le mycoside C₂ de Mycobacterium avium, les acides teichoïques et les "muropeptides".

Le mycoside C₂ extrait de Mycobacterium avium est constitué de deux peptido-glycolipides qui possèdent en commun la structure suivante :

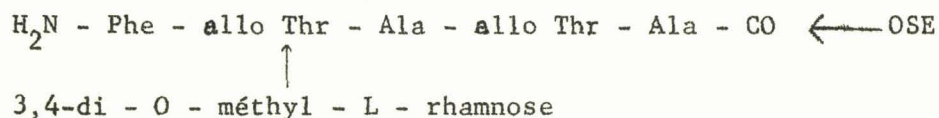


Figure 6

Le carboxyle terminal de l'alanine est estérifié par l'hydroxyle semi-aldéhydrique du 6-déoxy-L-talose, dans l'un, et par du 3-O-méthyl-6-déoxy-L-talose, dans l'autre (CHAPUT, MICHEL et LEDERER) (17).

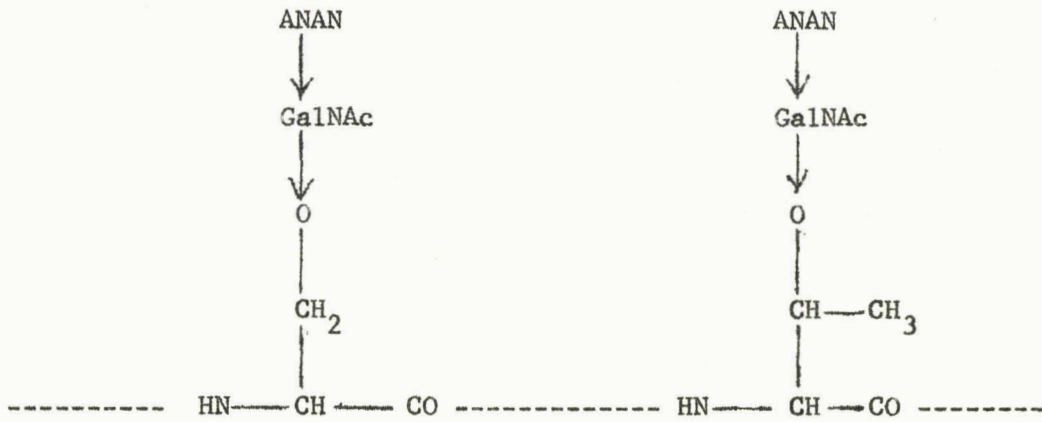


Figure 5

Liaison glycanne-protide dans les mucines sous-maxillaires

(d'après GOTTSCHALK et al. et PIGMAN et al.).

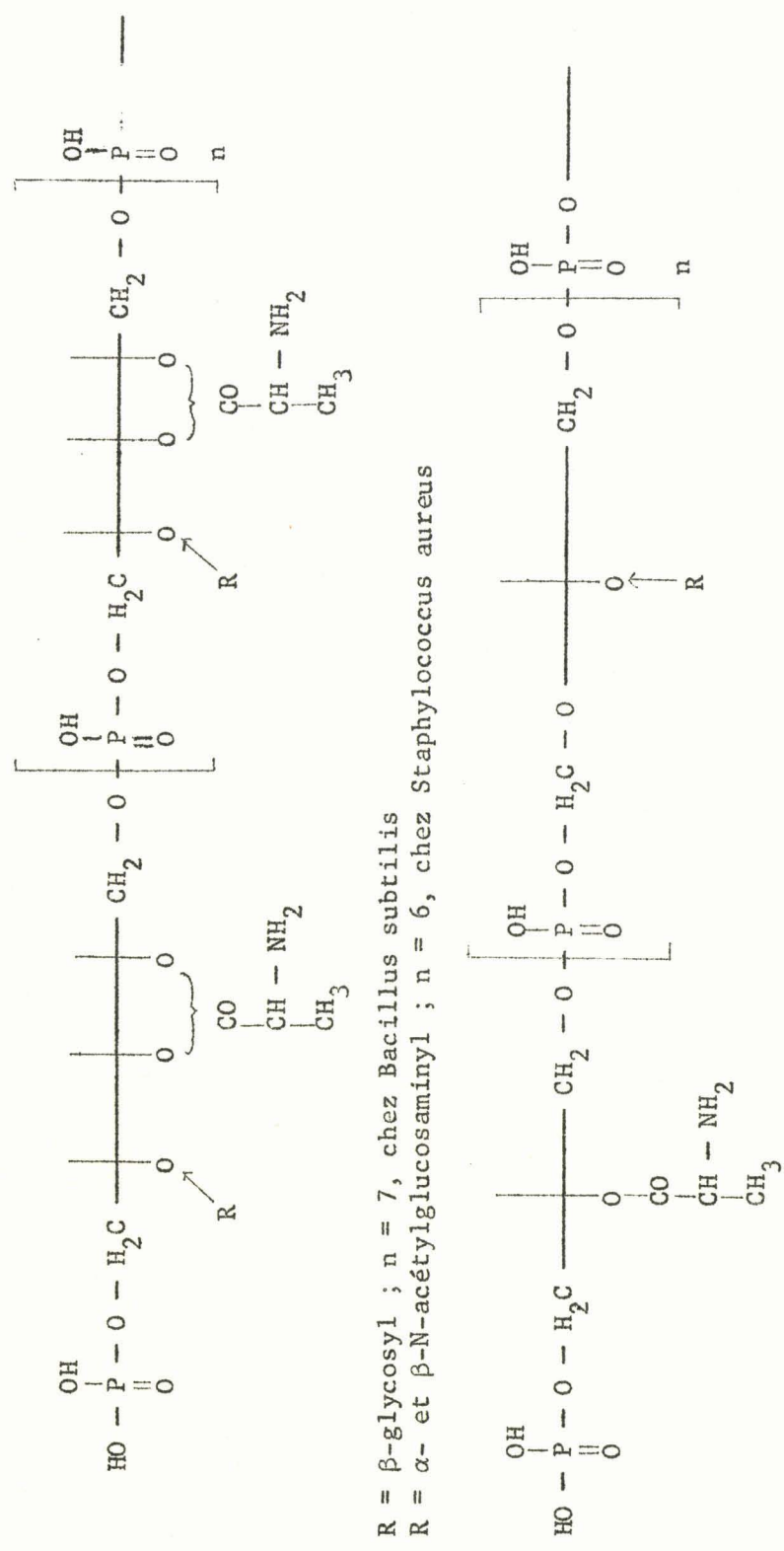
Les acides teichoïques (voir la revue générale de BADDILEY) (18) dont la structure a été élucidée par les travaux de l'école de BADDILEY, sont des constituants de la paroi des Bactéries. Ils sont constitués par des enchaînements linéaires de molécules de phospho-ribitol, (acides ribitol-teichoïques) ou de phospho-glycérol (acides glycérol-teichoïques) unies les unes aux autres, respectivement, par des liaisons 1,5 et 1,3-phosphodiester, sur lesquels se greffent des acides aminés et des oses ou des oligosides : les acides aminés se greffent par leur fonction carboxylique, et les glucides par leur groupement réducteur, sur l'une des fonctions alcooliques du glycérol ou du ribitol.

Nous avons précisé dans la figure 7 (p. 17) les schémas généraux de structure de quelques acides ribitol- et glycérol-teichoïques.

Les "muropeptides" (voir la revue générale de WEIDEL et PELZER) (19) constituent la "muréine" des parois de nombreuses Bactéries. Leur structure a été précisée par les remarquables travaux de GHUYSEN et de STROMINGER (20) qui ont démontré que, en général, la fraction polysidique était constituée par de longs enchaînements β -1,4 d'unités diholosidiques : le β -N-acétyl-glucosaminido-1,6-acide muramique, unis à de courtes chaînes peptidiques par une liaison amide entre le carboxyle de l'acide muramique et la fonction amine de l'alanine (Fig. 8 ; p. 18).

c - Mucopolysides acides de la substance fondamentale.

On sait que le tissu conjonctif est essentiellement constitué par un réseau de fibres protéidiques, comme l'élastine et la réticuline, noyées dans une substance amorphe, très riche en glucides, appelée substance fondamentale. Les constituants glucidiques de celle-ci ont été isolés et, grâce aux travaux de JEANLOZ et de MEYER leur structure a été déterminée. Tous possèdent, en commun, la particularité d'être constitués par de longs enchaînements réguliers, non ramifiés, d'unités diholosidiques N-acyl-osaminyl- 1,4- acide uronique unies les unes aux autres par une liaison uronosidyl - 1,3- N-acyl-osamine. L'acide uronique confère à ces macromolécules des caractères acides que renforce, en général, la présence de restes "sulfuryl". Nous avons rassemblé dans la figure 9 (p. 19) les schémas



R = β -glycosyl ; n = 7, chez *Bacillus subtilis*
 R = α - et β -N-acétylglucosaminyll ; n = 6, chez *Staphylococcus aureus*

R = α -glucosyl chez *Lactobacillus arabinosus* (acide teichoïque intracellulaire)
 R = α -N-acétylgalactosaminyll chez *St. phyllococcus lactis* (acide teichoïque de la paroi)
 R = β -glucosyl-1,6- β -glucosyl chez *Staphylococcus aureus* (acide teichoïque intracellulaire)

Figure 7

Schéma général de structure des acides ribitol-teichoïques (en haut) et des acides glycérol-teichoïques (en bas).

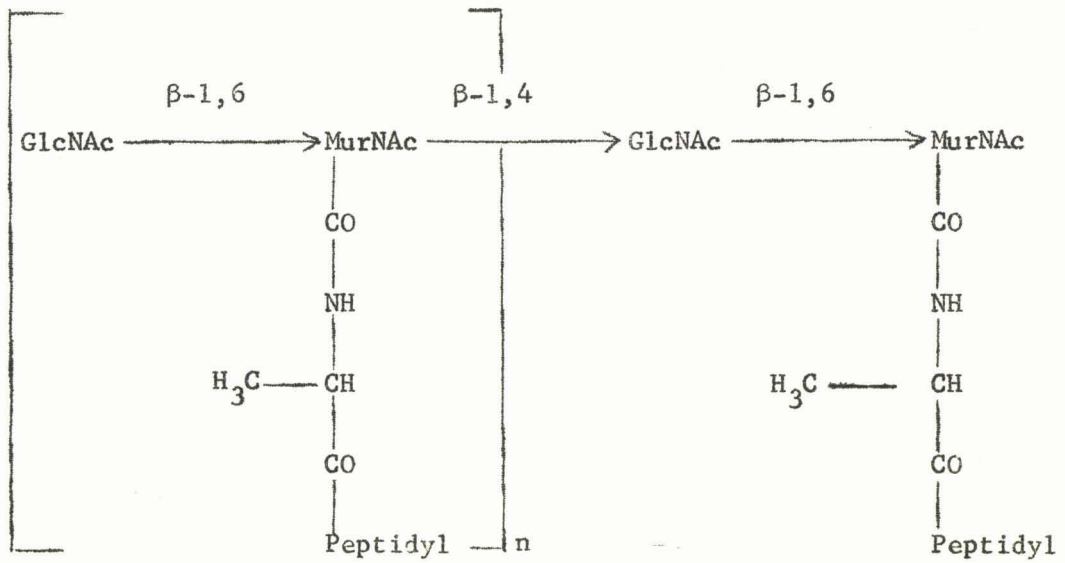


Figure 8

Structure d'un muropeptide isolé de la paroi d'Escherichia coli (d'après WEIDEL et PELZER) (20 bis).

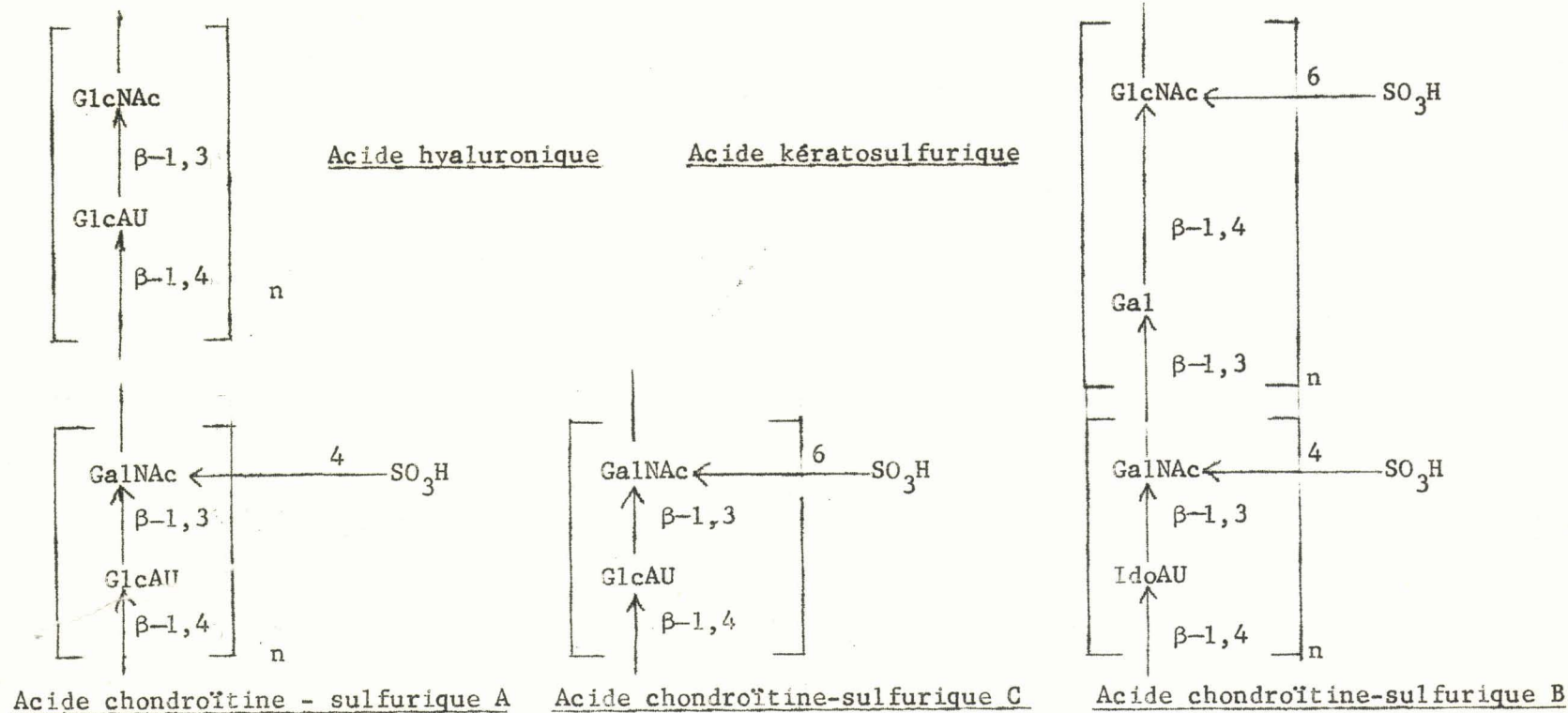


Figure 9

Formules des principaux mucopolysides de la substance fondamentale et du tissu conjonctif

GlcNAc = N-acétyl-D-glucosamine ; GalNAc = N-acétyl-D-galactosamine ; GlcAU = acide-D-glucuronique
 IduAU = acide L-iduronique ; Gal = D-galactose.

généraux de structure des principaux mucopolysides acides de la substance fondamentale.

2° - Iso-GLYCANNES

De nombreux glycoprotéides isolés des milieux biologiques les plus divers, comme les tissus, le sang, le lait, les urines sont constitués par l'association, avec la fraction protidique de plusieurs unités polyosidiques dont le poids moléculaire est relativement faible (environ 3 000) et dont la composition et la structure sont complexes. Ils sont, en effet, constitués par la conjugaison de plusieurs oses différents. Par exemple, certains glycoprotéides d'origine animale renferment, dans des proportions variables, du galactose, du glucose, du mannose, du fucose, les N-acétylglucosamine et galactosamine, de l'acide N-acétylneuraminique associé parfois à un ou deux autres acides sialiques, de l'acide glycuronique. En outre, ces oses se conjuguent sous la forme de chaînes très ramifiées et l'on conçoit aisément que la structure compliquée de ces "isoglucannes" ne soit pas encore connue.

Cependant, cette complexité n'est qu'apparente, car de nombreux glycanes possèdent des schémas de structure très voisins et les résultats acquis à propos des uns pourront être mis à profit pour explorer la structure des autres. Par exemple, dans le cas de plusieurs glycoprotéides d'origine animale, les études cinétiques des hydrolyses acides de la fraction glucidique donnent toujours les mêmes résultats : les acides sialiques et le fucose apparaissent dès le début de l'hydrolyse et se trouvent donc en position "externe" par rapport au reste de la molécule; ils sont suivis par le galactose et par une proportion importante des osamines ; le mannose et le reste des osamines font partie de la fraction résistante de la molécule osidique et se trouvent donc en position plus "interne". En outre, on caractérise dans tous les hydrolysats des chaînons osidiques communs : la N-acétyllactosamine, deux mannobioses isomères, un mannotriose et quelques osides supérieurs.

Nous donnons, dans la figure 10 (p. 21) deux schémas encore hypothétiques d'iso-glycannes. Ils concernent, l'un, l'orosomucoïde

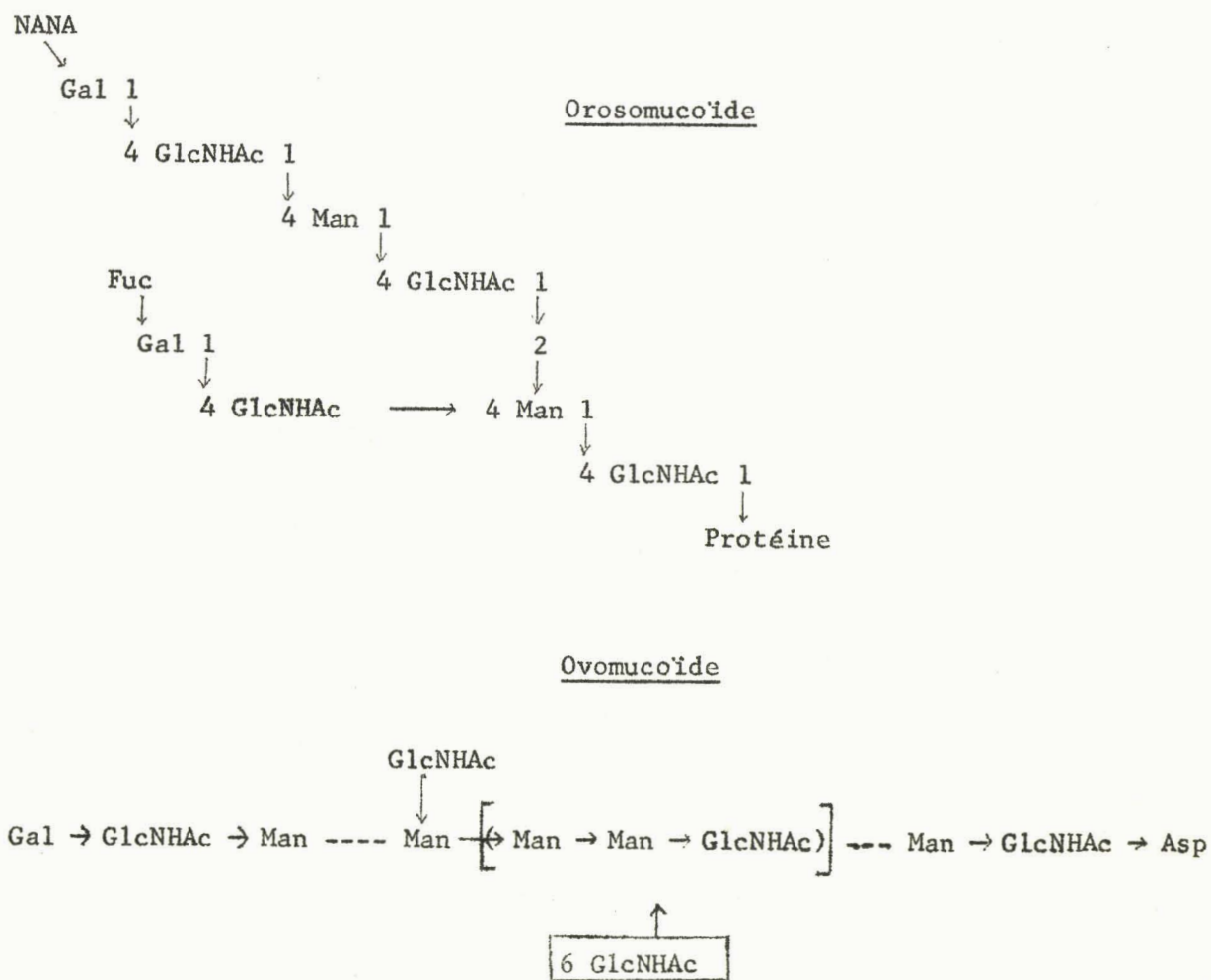


Figure 10

Schémas de structure hypothétiques de l'iso-glycane de l'orosomucoïde (EYLAR et JEANLOZ) (21) et de l'ovomucoïde (ADAM-CHOSSON et MONTREUIL) (22).

(EYLAR et JEANLOZ) (23) et l'autre, l'ovomucoïde (ADAM-CHOSSON et MONTREUIL) (24).

B - STRUCTURE DE LA FRACTION PROTIDIQUE

Jusqu'à présent, les chercheurs se sont surtout attachés à l'étude de la structure du groupement glycanique et du point d'attache glucide-protéine des glycoprotéides et ils se sont, en général, bornés à préciser la composition en acides aminés de la fraction protidique et la nature des amino-acides N-terminaux. La détermination de ces derniers n'a pas apporté de renseignements précis sur la structure de la fraction protidique. En effet, certains glycoprotéides comme l'orosomucoïde ou la lactotransferrine ne semblent pas posséder d'acide-amino-N-terminal ; d'autres, comme la transferrine, en possède un résidu. On ne peut toutefois tirer aucune conclusion de ces résultats, car on ne peut exclure a priori l'existence d'acides aminés N-substitués en position terminale. On ignore donc si les glycoprotéides actuellement connus possèdent une ou plusieurs chaînes peptidiques. Jusqu'à présent un seul schéma de structure a été proposé. Il concerne les globulines γG dont la molécule serait constituée par l'association de quatre chaînes peptidiques unies entre elles par des ponts "disulfure". La figure 11 (p.23) illustre cette conception qui ne possède aucun caractère définitif et relève encore du domaine de l'hypothèse.

C - NATURE DU POINT D'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE

De nombreux travaux ont été effectués dans les dernières années pour tenter de déterminer la nature de la liaison glycanne-protide dans les glycoprotides. Ils ont montré qu'il existait une certaine unité de motif structural et que l'on pouvait distinguer quatre types de liaisons :

- 1 - liaisons "ester"
- 2 - liaisons O-glycosidiques
- 3 - liaisons "amide"
- 4 - liaisons glycosylaminiques

Les deux premiers types de liaisons sont très labiles en milieu alcalin et en milieu acide ; les deux autres sont stables en milieu alcalin et relativement résistants à l'hydrolyse acide.

1 - LIAISONS DE TYPE ESTER

Des liaisons esters, conjuguant la fonction réductrice de l'ose terminal de la fraction glycanne et la fonction carboxylique d'un acide aminé de la chaîne peptidique, ont été caractérisées dans certains glycoprotéides. Par exemple, dans les mucines sous-maxillaires, GOTTSCHALK et ses collaborateurs ont montré qu'une partie des unités diholosidiques étaient liées à la protéine, d'une part, par le groupement réducteur de la N-acétylgalactosamine et, d'autre part, par les fonctions carboxyliques β de l'acide aspartique et γ de l'acide glutamique (Fig. 5 ; p. 15).

Dans les deux glycopeptides du mycoside C 2 de Mycobacterium avium, le carboxyle C-terminal de la D-alanine est estérifié par l'hydroxyle semiacétalique du 6-désoxy-L-talose, dans l'un, du 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose, dans l'autre (LEDERER et all.) ; (Fig. 6 ; p. 14)

Les liaisons de type ester sont très labiles et sont facilement rompues par les solutions alcalines diluées, par l'hydroxylamine et par le borohydrure de lithium. Dans ce dernier cas, la rupture s'accompagne d'une réduction du groupement carboxylique de l'acide aminé engagé dans la liaison ester.

2 - LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES

Dans de nombreux glycoprotéides, la fonction réductrice de l'ose terminal du glycanne est conjuguée avec la fonction alcoolique d'un hydroxy-amino-acide de la chaîne peptidique (sérine, thréonine, hydroxyllysine). Ce type de liaison a été mis en évidence dans les glycoprotéides suivants :

amide entre le groupement carboxylique de l'acide muramique et la fonction amine de l'alanine (GHUYSEN et al.).

4 - LIAISONS GLYCOSYLAMINIQUES

A la suite des travaux de YAMASHINA et al. et de NEUBERGER et al., on sait que dans de nombreux glycoprotéides d'origine animale le groupement glycanique et la fraction protidique sont unis par une liaison glycosylaminique formée par la conjugaison du groupement réducteur de la N-acétylglucosamine et de la fonction amide de l'asparagine. La chaînon qui unit le glycanne et la protéine a été identifié par les auteurs précédents au 2-acétamido-1- β (L-aspartamido) - 1,2 - désoxy-D-glucose (Fig.12).

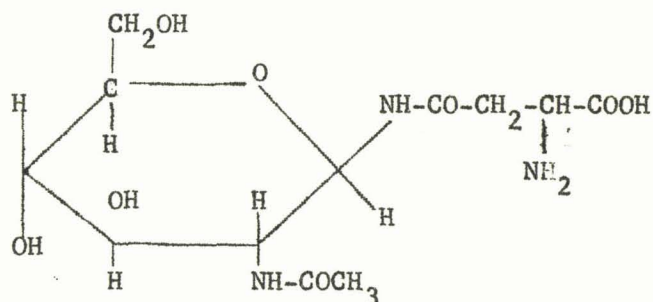


Figure 12

Formule du 2-acétamido-1- β (L-aspartamido) -1,2-désoxy-D-glucose.

Ce type de liaison a été caractérisé dans les glycoprotéides suivants : ovalbumine, ovomucoïde, orosomucoïde, transferrine, lacto-transferrine, globulines γ G et γ A du sérum humain, du sérum et du colostrum de vache, fibrinogène, haptoglobine. Ces résultats confirment l'hypothèse de travail que nous avons émise concernant l'unité de structure des "familles" de glycoprotéides (voir p.13).

V - PROBLEMES POSES PAR LA DETERMINATION DE LA COMPOSITION
MOLAIRE EN OSES DES GLYCOPROTIDES.

La détermination de la composition en oses d'un oside libre ou conjugué a longtemps posé plusieurs problèmes dont les deux principaux concernaient l'identification et le dosage des oses. L'isolement des osazones par cristallisation fractionnée et la détermination de leurs propriétés physico-chimiques, l'utilisation de micro-organismes fermentant sélectivement certains oses et les méthodes colorimétriques spécifiques furent, pendant près d'un siècle, les seuls procédés dont disposaient les chercheurs. Ils étaient longs, d'application délicate et très imprécis. La chromatographie sur papier, la chromatographie sur colonne et l'électrophorèse sur papier ont permis de résoudre ces deux problèmes. En effet, la séparation, l'identification et le microdosage des oses s'effectuent, en général, très aisément à la condition toutefois que les oses constituant un oside aient été au préalable quantitativement libérés. Le problème essentiel devant lequel se trouve le chercheur qui détermine la composition molaire d'un oside ou d'un glycoprotide concerne donc l'hydrolyse totale du composé.

LE PROBLEME DE L'HYDROLYSE QUANTITATIVE
DES OSIDES LIBRES OU CONJUGUES.

La détermination précise de la composition molaire d'un oside libre ou conjugué répond aux deux exigences suivantes : 1) les liaisons osidiques doivent être quantitativement hydrolysées ; 2) l'agent d'hydrolyse ne doit ni détruire, ni modifier les oses libérés.

Nous envisagerons successivement :

- A - les différents types d'hydrolyse des liaisons osidiques
- B - la stabilité en milieu acide des liaisons osidiques

C - les facteurs de modification des oses au cours de l'hydrolyse acide.

A - LES DIFFERENTS TYPES D'HYDROLYSE DES LIAISONS OSIDIQUES.

Les procédés d'hydrolyse quantitative des osides sont essentiellement chimiques car l'hydrolyse enzymatique est, en général, inapplicable. On ne dispose pas encore, en effet, de la collection d'enzymes purs indispensables pour hydrolyser totalement un oside. Dans le cas, par exemple, des glycanes de certains glycoprotides composés d'acide sialique, de galactose, de mannose, de fucose, de N-acétylglucosamine, l'hydrolyse enzymatique totale nécessiterait, en tenant compte de la co-existence possible de formes anomériques α et β , l'emploi de 8 à 10 osidases différentes. Ces enzymes n'ont pas encore été isolés dans un état de pureté suffisant pour envisager leur utilisation en vue de l'hydrolyse totale d'un oside. En outre, certaines osidases possèdent une activité transosidasi-que qui, en provoquant la resynthèse d'osides à partir des oses libérés, introduit une cause d'erreur dans le dosage de ces derniers.

Les types d'hydrolyse qui sont applicables aux liaisons glycosidiques sont les suivants :

- 1 - Autolyse
- 2 - Hydrolyse alcaline
- 3 - Hydrolyse acide

1 - AUTOLYSE DES OSIDES. Dans le cas d'osides acides, sialo- ou glycurono-conjugués, on peut tirer parti de l'ionisation des molécules pour réaliser leur autodégradation par chauffage plus ou moins prolongé, à 80 ou 100°C, de leurs solutions aqueuses. Ce procédé réalise une dégradation peu profonde des molécules osidiques et conduit, en général, à des mélanges d'oligosides. Il a, à cet égard, été appliqué à l'étude de la structure de gommes diverses (voir, par exemple, CHARLSON, NUNN et STEPHEN (25) et ANDREWS et JONES (26)) et à la libération de l'acide sialique des mucines sous-maxillaires (BLIX, LINDBERG, ODIN et WERNER (27) ; BLIX et LINDBERG (28)) en vue de la préparation de ce dernier.

Dans le cas des osides neutres, l'ébullition prolongée de leurs solutions aqueuses produit, en les dégradant, une quantité suffisante de composés acides pour hydrolyser les liaisons osidiques très acido-labiles comme les liaisons fructosyl de levanes (voir, par exemple, ASPINALL et TELFER) (29). Il est évident que ce procédé est inapplicable à la détermination de la composition molaire des osides neutres puisqu'il utilise la destruction d'une partie des oses pour réaliser une hydrolyse des liaisons osidiques qui reste d'ailleurs très partielle.

2 - HYDROLYSE ALCALINE.

L'hydrolyse alcaline est inapplicable car elle ne peut réaliser la dégradation quantitative des osides dont les liaisons osidiques résistent, en général, à l'action des alcalis. En outre, ceux-ci détruiraient très rapidement les oses libérés. Le procédé peut, cependant, être utilisé pour hydrolyser les liaisons esters d'oses ou d'osides comme, par exemple, dans le cas des acides teichoïques (voir p. 17) ou certaines liaisons O-glycosidiques comme, par exemple, dans le cas des mucines sous-maxillaires (voir p. 25).

3 - HYDROLYSE ACIDE.

L'hydrolyse acide représente la méthode de choix pour réaliser la rupture des liaisons osidiques. Les oses sont, en effet, généralement stables en milieu acide. En outre, on connaît suffisamment les modalités de l'hydrolyse acide des osides pour obtenir, à volonté, des oses ou des oligosides en faisant varier la nature et la concentration de l'acide, la température et la durée de l'hydrolyse.

a - Hydrolyse par les résines échangeuses de cations.

L'hydrolyse par les résines polystyrène-sulfonées a été appliquée par différents auteurs pour déterminer la composition en oses neutres de glycoprotéides divers (voir p. 44). On sait, à présent, que le procédé n'est pas satisfaisant car l'hydrolyse est incomplète et conduit à la formation de nombreux osides possédant, en général, une N-acétylosamine en position terminale. Les résines polystyrène-sulfonées coupent, en effet, assez sélectivement des liaisons N-acétylosaminidiques en respectant les fonctions "N-acétamido".

b - Hydrolyse par les acides concentrés.

Les acides concentrés sont exceptionnellement utilisés pour hydrolyser des liaisons osidiques particulièrement stables : hydrolyse de la chitine par HCl concentré à 100°C, pendant 24 h (BARKER, FOSTER, STACEY et WEBBER) (30), par exemple. Ce procédé drastique est de toute évidence inapplicable au dosage des oses qui sont partiellement (osamines) ou totalement (oses neutres, acides uroniques et acides sialiques) détruits en milieu acide concentré.

L'acétolyse, en milieu anhydre, par l'acide acétique, l'anhydride acétique et l'acide sulfurique, conduit à des mélanges d'oses et d'osides et ne peut être utilisée pour réaliser la rupture quantitative des liaisons osidiques.

c - Hydrolyse par les acides dilués.

Les acides chlorhydrique et sulfurique, à des concentrations variant de 0,01 à 4 N, sont couramment utilisés pour hydrolyser totalement les liaisons osidiques. La température d'hydrolyse varie de 80 à 100°C et la durée de quelques minutes à plusieurs heures.

Ces conditions très larges de l'hydrolyse acide s'expliquent par les différences importantes que l'on observe dans la stabilité, vis-à-vis des acides, des liaisons osidiques et des oses libérés au cours de l'hydrolyse.

B - STABILITE EN MILIEU ACIDE DES LIAISONS OSIDIQUES.

De nombreux travaux (voir les revues générales de BAILEY (31) et de WOLFROM et THOMPSON (32) ont démontré que le comportement des liaisons osidiques était en relation étroite avec les groupements "hydroxyle" et que la stabilité d'une liaison glycosidique était essentiellement liée au nombre et à la position des fonctions "hydroxyle", alcooliques et semi-acétalique.

Les règles générales suivantes peuvent être énoncées :

1 - Les liaisons 1 → 6 sont les plus stables vis-à-vis des acides minéraux dilués ; les liaisons 1 → 2 sont les plus labiles. On observe l'inverse

dans le cas de l'acétolyse, et l'ordre de stabilité décroissant devient alors le suivant : liaisons $1 \rightarrow 6$, $1 \rightarrow 4$, $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 2$ et $1 \leftrightarrow 1$ (FUJIMOTO, MATSUDA et ASO) (33).

2 - Les liaisons α -D-osidiques sont plus stables que les liaisons β -D-osidiques (HASSEL et OTTAR) (34). Le tableau I (p. 32) est, à cet égard, démonstratif.

3 - Les liaisons "cétosyl" (fructosyl et sialyl, par exemple) sont beaucoup plus labiles que les liaisons "aldosyl" et elles sont aisément hydrolysées par les acides chlorhydrique et sulfurique très dilués : 0,01 N à 100°C ou 0,1 N à 80°C pendant des temps n'excédant pas une heure.

4 - La stabilité des liaisons "glycosylaminy" varie essentiellement avec la nature de l'amine (voir les revues générales de ELLIS et HONEYMAN (35) et de PIGMAN (36)). Certaines sont très labiles et sont hydrolysées par l'acide acétique 1 à 3 N plus facilement qu'avec l'acide chlorhydrique 0,5 N. D'autres, comme la L-arabinosylamine, sont stables à des pH inférieurs à 2 et supérieurs à 8 et sont préférentiellement hydrolysées à pH 3-4 (ISBELL et FRUSH) (37). D'autres sont plus stables. C'est le cas, par exemple, de l'aspartylglycosylamine qui sert de point d'attache entre le glycanne et la fraction protidique de nombreux glycoprotides (voir p. 20) et qui est hydrolysée par l'acide chlorhydrique 1,5 N au bout de 6 heures. Cette stabilité relative peut s'expliquer par la présence, au voisinage de la liaison glycosylamine, d'un proton protecteur provenant de l'ionisation du groupement α -aminé libéré au cours de l'hydrolyse acide.

5 - La position axiale ou équatoriale des substituants des cycles pyranosiques, autres que l'hydrogène, possèdent une grande influence sur l'hydrolyse des liaisons osidiques et REEVES (38) a démontré que les substituants équatoriaux stabilisaient les liaisons aldopyranosides, principalement quand le groupement en 2 est axial (Tableau I ; p. 32).

En ce qui concerne les aldohexoses les plus couramment trouvés dans les glycoprotéides, l'ordre décroissant des stabilités des liaisons osidiques est donc le suivant : α -D-glucose, β -D-glucose, α -D-mannose, α -D-galactose, β -D-mannose, β -D-galactose.

Tableau I

Stabilité et vitesse d'hydrolyse comparées de méthyl-glycopyrannosides.
(d'après WOLFROM et THOMPSON) (39).

Méthyl-glycopyrannosides du	k/k' (a)	Facteurs d'instabilité (b)	
		C 1	1 C
α -D-glucose	1	1	Δ 2 ; 3, 4, 5
β -D-glucose	1,9	A	A ; 1,2,3,4,5
α -D-mannose	2,4	1,2	3,4,5
β -D-mannose	5,7	A ; Δ 2	A ; 1,3,4,5
α -D-galactose	5,2	1,4	Δ 2 ; 3,5
β -D-galactose	9,3	A ; 4	A ; 1,2,3,5
α -D-lyxose	14,5	1, 2	3, 4
β -D-lyxose	46,4	A ; Δ 2	A ; 1,3,4
α -D-rhamnose	9,5	1,2	3,4,5
β -D-rhamnose	21,9	A ; Δ 2	A ; 1,3,4,5
D-glycéro- α -L-manno- heptose	1,3	1, 2	3,4,5
D-glycéro- β -L-manno- heptose	3	A ; Δ 2	A ; 1,3,4,5
α -D-xylose	4,5	1	Δ 2 ; 3, 4
β -D-xylose	9	A	A ; 1,2,3,4
α -D-arabinose	13,1	A ; 1,2,3	A ; 4
β -D-arabinose	9	Δ 2 ; 3	1,4

- (a) Rapport de la constante de vitesse d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 0,5 N à 75°C des méthyl-glycopyrannosides à celle de l' α -D-méthyl-glycopyrannoside.
- (b) A concerne la configuration anomérique des glycosides : Δ 2 illustre l'influence labilisante de la présence d'un groupe hydroxyle axial sur le carbone 2 . C 1 et 1 C désignent les deux formes chaises du noyau pyranosique. Les chiffres seuls indiquent les carbones dont l'hydroxyle est un facteur d'instabilité.

6 - La substitution des fonctions "hydroxyle" du cycle pyranosique augmente la stabilité des liaisons glycosidiques (PAUL) (40). Ainsi s'explique la stabilité des liaisons osidiques des oses O-méthylés et des osamines. Dans le cas de ces dernières, la stabilisation des liaisons "osaminidyl" est réalisée par un double mécanisme : substitution d'un hydroxyle du cycle pyranosique et apparition d'un proton provenant de l'ionisation de la fonction α -aminé au voisinage de la liaison (+).

7 - La substitution du carbone 5 d'un ose stabilise sa liaison glycosidique.

a - C'est pourquoi, les liaisons "furannosyl" sont beaucoup plus labiles que les liaisons "pyranosyl". Par exemple, les aldofurannosides sont hydrolysés 50 à 200 fois plus rapidement que les aldopyranosides isomères (HAWORTH) (41). Les liaisons glycosidiques de l'arabinose et du fructose sont donc aisément rompues et on utilise généralement de l'acide sulfurique dilué (solution d'acide à 1 p.100), à 80 - 100°C, pendant un temps relativement court, n'excédant pas, en général, quelques minutes.

b - En outre, la nature du substituant du carbone 5, intervient dans la stabilisation de la liaison osidique dans l'ordre suivant (WOLFROM et THOMPSON) (42).



L'ordre croissant de stabilité des liaisons aldopyranosidiques est donc : pentosyl, méthylpentosyl, hexosyl, heptosyl, uronosidyl. Le Tableau I (p. 32) est à cet égard démonstratif : on voit, en effet, que pour une position déterminée des hydroxyles des carbones 2,3 et 4, la

(+) L'absence du proton explique la plus grande fragilité des liaisons N-acétyl-osaminidiques par rapport aux liaisons osaminidiques.

résistance des liaisons osidiques à l'hydrolyse acide croit dans l'ordre suivant : α -D-lyxose, α -L-rhamnose, α -D-mannose, D-glycéro- α -D-manno-heptose. En outre, la stabilité des liaisons "uronosidyl" est bien connue et il est parfois nécessaire, pour les hydrolyser totalement d'opérer dans des conditions telles (acide à 4 p.100 à 120°C, pendant 10 à 24 h) (WHISTLER et CORBETT) (43) que l'on ne peut éviter une destruction importante des acides uroniques.

C - FACTEURS DE MODIFICATION DES OSES AU COURS DE L'HYDROLYSE ACIDE.

Les conditions dans lesquelles est effectuée l'hydrolyse acide d'un oside ne sont satisfaisantes que dans la mesure où les oses libérés quantitativement se retrouvent intacts à la fin de la réaction. Les modifications qu'ils sont susceptibles de subir sont de trois ordres : 1) destruction ; 2) épimérisation ; 3) condensation.

1 - Destruction des oses en milieu acide.

La stabilité d'un ose vis-à-vis des acides varie avec sa nature et nous envisagerons chaque cas particulier dans les chapitres réservés aux différents types d'oses. Toutefois, nous pouvons énoncer les règles générales suivantes :

a - l'acide sulfurique est moins agressif que l'acide chlorhydrique.

b - l'oxygène et les sels de fer sont des facteurs de destruction des oses.

c - l'ordre croissant de stabilité des molécules d'oses est le suivant : acides sialiques et cétooses, acides uroniques, oses neutres, osamines.

2 - Epimérisations.

L'épimérisation d'un ose est généralement réalisée en milieu alcalin. Il convient cependant de savoir qu'elle peut se produire en milieu acide (OST) (44) et introduire une cause d'erreur due à la conversion des oses. Par exemple, du fructose se forme à partir du glucose

après 1 h d'action de l'acide sulfurique à 2,5 p.100 et à 120°C (OHNO et WARD) (45). Selon MATSUZAKI, WARD et MURRA (46) il se forme, en outre, du mannose.

3 - Condensations par transosylation.

La transosylation chimique, en provoquant la condensation des oses entre eux ou avec des amines, est une des principales causes d'erreur de l'hydrolyse acide qui avait été signalée par FISCHER (47), dès 1890.

a - REACTIONS DE TRANSOSYLATION OSES-OSES.

Le phénomène de la transosylation est connu depuis 1890. A cette date, en effet, FISCHER (48) réalisa la synthèse de l'isomaltose en chauffant une solution acide de glucose. Depuis, le mécanisme de la réaction a été étudié et l'on sait que les processus de transosylation obéissent aux règles générales suivantes :

1°) - La transosylation en milieu acide conduit à la formation préférentielle de glycosides 1 → 6. Toutefois, ceux-ci sont accompagnés d'une faible proportion de glycosides 1 → 3 et 1 → 4.

2°) - Les cétooses et les osamines ne donnent pas de produits de transosylation. Au contraire, les aldoses se condensent dans l'ordre suivant de réactivité croissante : 6-désoxy-hexoses (Résultats personnels), mannose, galactose, glucose (SILBERMAN) (49).

3°) - Les processus de transosylation ont lieu avec n'importe quel type d'acide (TAUFEL, IWAINSKY et RUTTLOFF) (50).

4°) - Quelle que soit la concentration de l'acide, les réactions de transosylation ont lieu. Seules varient les conditions de l'incubation. L'acide chlorhydrique gazeux à la température du laboratoire réalise la transosylation des aldohexoses (RICKETTS (51) ; RICKETTS et ROWE (52), du xylose (BISHOP) (53), de la N-acétylglucosamine (FOSTER et HORTON) (54) et on doit donc éviter d'éliminer l'acide chlorhydrique d'un hydrolysât par évaporation sous vide (PACSU et MORA) (55). L'acide chlorhydrique 6 N, à la température du laboratoire, condense les aldohexoses et l'arabinose (TURTON, BEBBINGTON, DIXON et PACSU) (56) JONES et NICHOLSON (57). A la concentration 4 N, à 98°C, il provoque l'apparition en quelques

minutes de di- et de tétrasaccharides des aldohexoses (SILBERMANN) (58). Les acides chlorhydrique et sulfurique 1 N, réalisent en 1 à 2 h, à 100°C, la transosylation du glucose, du galactose et du mannose. La réaction a lieu même avec de très faibles concentrations en acide : par exemple, le glucose dans l'acide chlorhydrique 0,082 N à 97°C ou dans l'acide sulfurique 0,33 N à 100°C donne, en dix heures 0,5 à 10p.100 de disaccharides (THOMPSON, WOLFROM et QUINN) (59).

5°) - La transosylation est favorisée par les concentrations élevées en oses. Par exemple, on obtient d'excellents rendements en iso-maltose avec une solution de glucose à 18 p.100 dans l'acide sulfurique 1 N (BACON et BACON) (60). SILBERMAN (61) obtient, en deux heures, des oligosides par chauffage à 100°C des solutions à 3 p.100 de divers hexoses dans l'acide chlorhydrique 1 N et PEAT, WHELAN, EDWARDS et OWEN (62) ont observé une transosylation du glucose en solution à 1 p.100 dans l'acide sulfurique 0,33 N.

De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure avec MORA et WOOD (63) que la transosylation est favorisée en milieu acide par les températures élevées et par de fortes concentrations en oses. Nous avons vérifié que, pour une température de 100°C, les réactions de transosylations étaient nulles ou négligeables, même après 3 h de chauffage, dans les acides chlorhydrique et sulfurique 1 N, pour une concentration de 1 g p.100 ml et qu'elles étaient, au contraire, très importantes lorsque la concentration en oses atteint 20 g p.100 ml (Fig. 13 ; p. 37).

b - REACTIONS DE CONDENSATION DES OSES ET DES PROTIDES.

REACTION DE MAILLARD.

Les oses sont susceptibles de se condenser, dans certaines conditions, par leur fonction semi-aldéhydrique, avec des amines pour former des complexes aminés stables. La réaction de MAILLARD (64) concerne plus précisément la condensation des oses ou des osides-oses avec les fonctions amines des protides : acides aminés, peptides et protéines. Elle a fait l'objet de nombreuses revues générales : ADRIAN (65), DANEHY et PIGMAN (66), ELLIS (67), HEYNS et PAULSEN (68), HODGE (69), PIGMAN (70), REYNOLDS

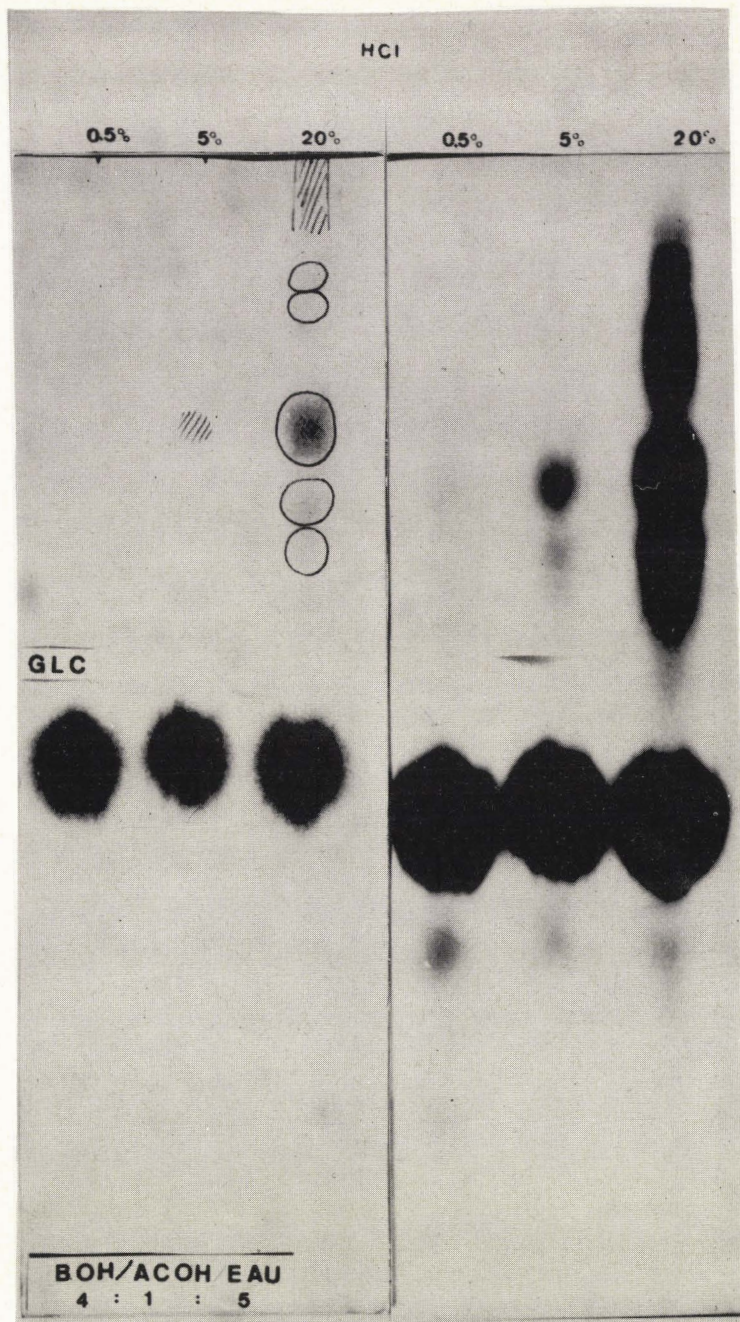


Figure 13

Transoxidation de ^{12}C -glucose et de ^{14}C -glucose (1 h à 100°C) en solution, à différentes concentrations (0,5 - 1 et 20 p.100), dans de l'acide chlorhydrique 1 N. A gauche : chromatogramme révélé par le réactif à l'oxalate d'aniline. A droite : autoradiogramme.

(71), STANEK, CERNY, KOCOUREK et PACÁK (72).

Le mécanisme même de la réaction est encore mal connu et de nombreux schémas ont été proposés. Il semble que la condensation s'effectue en deux temps : formation d'une base de SCHIFF (glycosylamine), puis remaniement moléculaire appelé réarrangement d'AMADORI dans le cas des aldoses et réarrangement de HEYNS dans le cas des cétooses. Selon certains auteurs, la réaction s'arrêterait, au stade de la "cétosamine" (Fig. 14 a ; p. 39) ; pour d'autres, elle se poursuivrait par la dégradation du complexe en dérivés du furfural (Fig. 11 b ; p. 39) responsables de la coloration brune du milieu réactionnel. Mais, quel que soit le mécanisme de la réaction de condensation, celle-ci conduit à des causes d'erreur par défaut dans la détermination de la composition en oses des glycoprotides. En outre, elle trouble le dosage des osamines car les composés auxquels elle donne naissance donnent une coloration au cours de la réaction d'ELSON et MORGAN (73) VASSEUR et IMMERS) (74).

La condensation des glucides et des protides, qui se manifeste par l'apparition d'une coloration jaunâtre ou d'un précipité noirâtre dans les milieux réactionnels suivant l'intensité du phénomène, dépend de nombreux facteurs :

1°) - Elle augmente avec la température, mais elle a encore lieu à 0°C.

2°) - Elle a lieu en milieu neutre ou légèrement alcalin, le pH optimum variant entre 7 et 10. Elle est inhibée ou très faible en milieu acide.

3°) - Elle augmente avec le temps de la réaction.

4°) - Elle est favorisée par des concentrations élevées en glucides et en protides.

5°) - Elle est liée à la concentration en eau du mélange glucide-protide : le taux optimal d'humidité est de 30 à 60 p.100, mais, selon certains auteurs, la réaction peut avoir lieu en milieu anhydre.

6°) - Certains sels métalliques comme les sels de fer favorisent les condensations. D'autres, comme les sels de titane, la ralentissent ou l'inhibent.

7°) - La lumière semble catalyser la réaction.

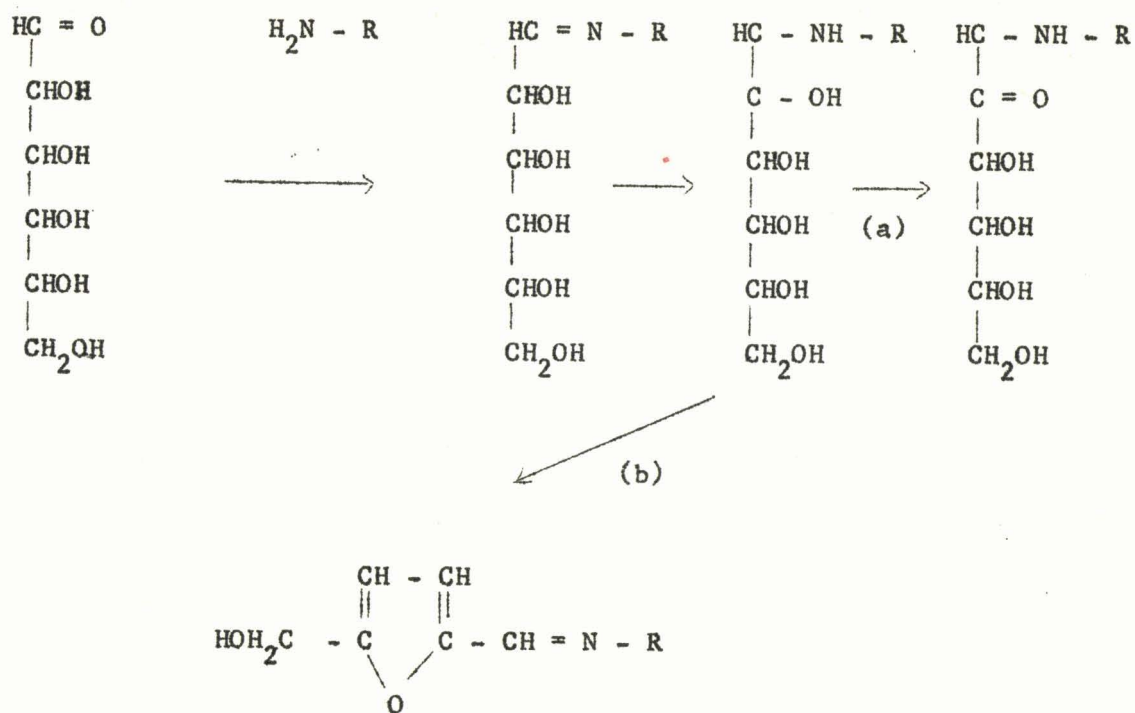


Figure 14

Deux mécanismes possibles de la condensation de MAILLARD.

(a) selon KUHN et WEYGAND (75) ; (b) selon RICHARDS (76).

8°) - La réaction de MAILLARD a lieu avec les oses neutres, les osamines et les acides uroniques et la nature des oses et des acides aminés joue un rôle très important dans son développement.

En règle générale, les acides uroniques sont plus réactifs que les autres oses (SEEVER et KERTESZ) (77), les cétooses plus que les aldoses, et les pentoses plus que les hexoses.

Dans le cas des acides aminés, le groupement carboxylique voisin de la fonction α -aminé freinant la réaction, celle-ci se fera préférentiellement avec les diamino-acides comme la lysine. En outre, la présence de fonctions supplémentaires dans leur molécule favorise la condensation des acides aminés soufrés et de la tyrosine. De tous les amino-acides, le tryptophane est le plus réactionnel et son intervention dans la réaction de MAILLARD a été particulièrement bien étudiée par ADRIAN (78).

CONCLUSIONS. De l'ensemble des résultats parfois contradictoires obtenus à la suite des nombreux travaux suscités par la réaction de MAILLARD, nous pouvons tirer les enseignements suivants dont l'application élimine ou réduit les réactions de condensation glucides-protides au cours des expériences concernant les glycoprotéides :

1°) - La concentration des hydrolysats acides en glucides et en protides doit être faible et de l'ordre de 0,5 à 1 p.100 de glycoprotéide.

2°) - Les hydrolyses doivent être effectuées à l'obscurité et avec des produits exempts de sels de fer.

3°) - La réaction de MAILLARD étant maximale entre pH 7 et 10, les solutions de glucides et de protides, seront maintenues acides par l'addition d'un peu d'acide acétique ou formique à tous les stades d'un mode opératoire

4°) - Le dernier stade de la concentration d'une solution contenant des glucides et des protides est le plus favorable aux condensations de MAILLARD. Les conditions sont, en effet, optimales : concentrations élevées en glucides et en protides ; faible taux d'humidité ; pH tendant vers la neutralité. Les réactions seront inhibées ou au moins

réduites en prenant la précaution d'acidifier de temps en temps le milieu en cours d'évaporation et d'effectuer cette dernière à l'obscurité.

5°) - Les solutions de glucides et de protides doivent être conservées au congélateur, en milieu acide et à l'obscurité.

6°) - Dans le cas particulier du dosage des osamines par la méthode d'ELSON et MORGAN, pour éviter la cause d'erreur éventuellement apportée par la réactivité des produits de la condensation de MAILLARD, il est important de tracer le spectre d'absorption des chromophores dont les longueurs d'onde d'absorption maximale sont très nettement différentes: 530 m μ , par exemple, dans le cas de la glucosamine ; 570 m μ , dans le cas des produits de la réaction de MAILLARD. En outre, ces derniers donnent la réaction "indirecte" d'EHRlich (traitement par une solution de carbonate de sodium, puis par le réactif d'EHRlich) (IMMERS et VASSEUR (79) et VASSEUR et IMMERS (80)).

METHODES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES D'IDENTIFICATION
ET DE DOSAGE DES OSES.

Nous exposerons successivement les méthodes de dosages chromatographiques et électrophorétiques des oses neutres, des acides uroniques, des osamines et des acides osamine-carboxyliques (acides sialiques et acide N-acétyl muramique).

CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE DES OSES NEUTRES

La détermination de la composition en oses neutres d'un oside libre ou conjugué est généralement réalisée par chromatographie sur papier. En effet, l'électrophorèse n'apporte pas une excellente résolution des oses neutres et les procédés de dosage par chromatographie en phase gazeuse sont encore imparfaits et n'ont pas reçu un nombre suffisant d'applications pour être utilisés actuellement dans le dosage de ces composés. Toutefois, bien que notre expérience de cette dernière méthode soit très limitée, nous effectuerons une mise au point de la question dans le paragraphe réservé à la chromatographie des oses neutres.

Quel que soit le procédé utilisé, la chromatographie des oses n'est possible qu'après une purification préalable des solutions à étudier et la détermination de la composition en oses neutres d'un oside nécessite donc les étapes suivantes :

- I - Hydrolyse quantitative de l'oside ;
- II - Purification des hydrolysats ;
- III - Identification et dosage chromatographique des oses.

I - HYDROLYSE QUANTITATIVE DES OSIDES.

De très nombreuses méthodes d'hydrolyse des osides ont été proposées qui utilisent les agents acides les plus divers :

- 1 - Résines polystyrène-sulfonées
- 2 - Acides formique et acétique
- 3 - Acides oxalique et nitrique
- 4 - Acide sulfurique
- 5 - Acide chlorhydrique

1 - HYDROLYSE PAR DES RESINES POLYSTYRENE-SULFONEES

La méthode d'hydrolyse des glycoprotéines par les échangeurs de cations polystyrène-sulfonés (Dowex 50, Permutite 50 ou Amberlite IR 120, forme acide) préconisée par DIXON (81) appliquant le procédé d'hydrolyse des protéines de PAULSON et DEATHERAGE (82) a été utilisée par de nombreux auteurs (voir, en particulier, BRAGG et HOUGH (83), GLEGG et coll. (84,85), SCHMID (86), SCHULTZE, SCHMIDTBERGER et HAUPT (87), TOLBERT et ZILL (88)).

Cette méthode est, a priori, très séduisante puisque l'échangeur de cations joue à la fois le rôle d'agent d'hydrolyse et d'agent de purification en fixant les produits de dégradation protidique. Elle doit, cependant, être rejetée car elle ne réalise pas l'hydrolyse totale des osides libres ou conjugués.

Nous avons, en effet, vérifié à la suite de MONTREUIL et SCHEPPLER (89), qu'après un séjour de 32 heures à 100°C, l'amidon soluble n'était hydrolysé que dans la proportion de 67 p.100 et que l'hydrolyse même de diholosides comme le lactose restait incomplète dans les mêmes conditions.

Nous avons, en outre, appliqué à l'ovomucoïde (*) le procédé d'hydrolyse décrit par MONTREUIL et CHOSSON (90) pour obtenir des oligosides et nous avons suivi par chromatographie sur papier, la libération des glucides pendant des temps variant de 5 minutes à 2 jours.

MODE OPERATOIRE. 500 mg d'ovomucoïde en solution dans 100 ml d'eau sont maintenus à 100°C, sous agitation, en présence de 50 ml de résine polystyrène-sulfonée humide. (Dowex-50 x 8 ; mesh 25-50 ; forme acide) Des prélèvements sont effectués à des temps déterminés et les hydrolysats, convenablement concentrés, sont soumis directement à l'analyse chromatographique sur papier dans les conditions décrites dans le figure 15 (p. 45).

(*) L'ovomucoïde est un glycoprotéide du blanc d'oeuf. Il renferme 8,5 à 9 p.100 d'oses neutres (galactose, mannose : 1 : 5).

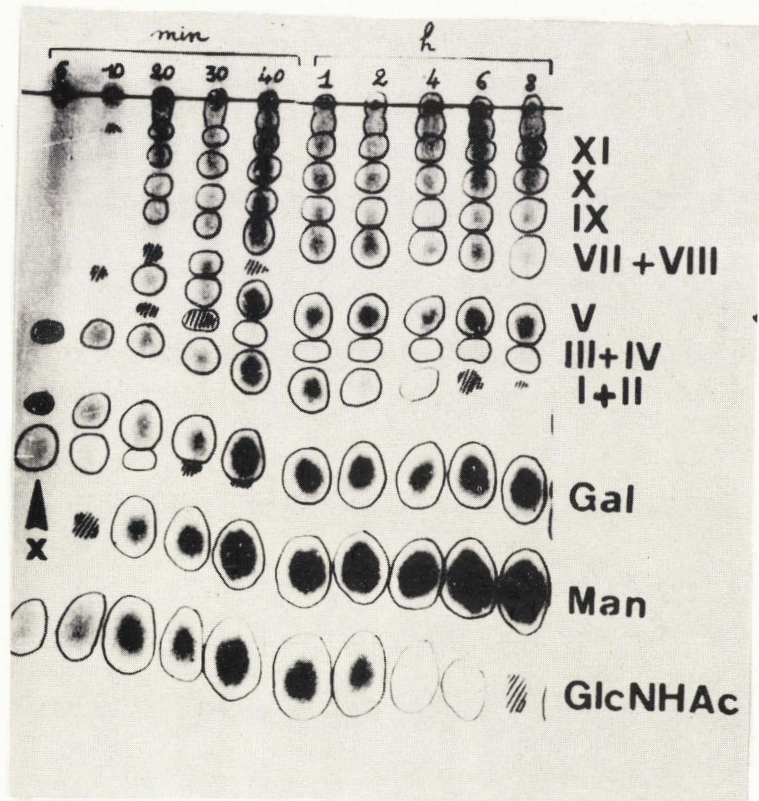


Figure 15

Chromatographie d'hydrolysats d'ovomucoïde effectués par le Dowex-50 (forme acide). Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline. Les nombres indiquent en minutes ou en heures la durée de l'hydrolyse. Gal : galactose ; Man : mannose ; GlcNHAc : N-acétylglucosamine. Les chiffres romains désignent des oligosides.

RESULTATS. Les résultats que nous avons obtenus peuvent se résumer de la manière suivante :

1 - Au bout de 8 h, les hydrolysats renferment, outre des oses libres, une proportion importante d'oligosides (environ 50 p.100 des glucides totaux). Ces résultats sont identiques à ceux de MONTREUIL et CHOSSON (91) ; CHOSSON, MONTREUIL et SCHEPPLER (92) ; MONTREUIL, SPIK et ADAM-CHOSSON (93) (Fig. 15 ; p. 45).

2 - Après 48 h d'hydrolyse (conditions appliquées par GLEGG et coll.) (94) et au delà, il subsiste encore, dans les hydrolysats, de faibles quantités d'osides mais les oses neutres libérés ont été dégradés dans des proportions importantes.

CONCLUSIONS . La méthode d'hydrolyse des osides libres ou conjugués par les résines polystyrène-sulfonées n'est pas quantitative car elle conduit à des mélanges d'oses et d'osides. Aussi est-elle, à présent, abandonnée dans les procédés de détermination de la composition molaire en oses neutres des glucides conjugués. Toutefois, elle représente le procédé de choix pour préparer des oligosides à partir de polyosides, les auteurs utilisant, les uns, des résines solubles (hydrolyse de l'inuline par PAINTER (95), de substances spécifiques de groupes sanguins par PAINTER et MORGAN (96), PAINTER, WATKINS et MORGAN (97) et PAINTER, REGE et MORGAN (98), et de l'orosomucoïde par JEANLOZ (99)) ; les autres, des résines insolubles (hydrolyse de l'ovomucoïde par MONTREUIL et CHOSSON (100), CHOSSON, MONTREUIL et SCHEPPLER (101), ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (102) ou des globulines γ G humaines par CLAMP et PUTNAM (103)).

2 - HYDROLYSE PAR LES ACIDES FORMIQUE ET ACETIQUE.

Nous n'avons pas retenu les hydrolyses par l'acide formique et par l'acide acétique. L'une et l'autre sont, en effet, incomplètes : après 24 heures d'action à 100°C sur l'amidon soluble, l'acide acétique 4 N libère seulement 58,3 p.100 du glucose. En outre, dans le cas de l'hydrolyse formique, la chromatographie des hydrolysats de glucosanes (amidon et maltose) révèle l'existence, à côté du glucose, d'esters formiques migrant plus rapidement que ce dernier et réagissant avec le réactif

à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (voir aussi, MONTREUIL et SCHEPPLER) (104). La formation d'esters formiques des oses avait été antérieurement signalée par JONES (105) qui préconisait, pour les éliminer, d'effectuer une seconde hydrolyse par les acides sulfurique ou chlorhydrique dilués.

3 - HYDROLYSE PAR LES ACIDES OXALIQUE ET NITRIQUE.

Les acides oxalique et nitrique dilués ont été utilisés pour hydrolyser les liaisons d'oses neutres particulièrement fragiles, comme les liaisons fructosyl (hydrolyse du saccharose par l'acide oxalique 5p.100 à 100°C, pendant 1 h (DUFF et EASTWOOD) (106) ; hydrolyse de fructosannes par l'acide oxalique 0,1 N, à 70°C, pendant 45 mn ou à 2 p.100, à 100°C, pendant 24 h (LAIDLAW et REID) (107)) et pentosyl (acide nitrique à 3 p.100 (HAMPTON, HAWORTH et HIRST (108) ; HAWORTH, HIRST et OLIVER (109) ; HEUSER et JAYME (110)).

4 - HYDROLYSE PAR L'ACIDE SULFURIQUE.

L'acide sulfurique a été, jusqu'à présent, largement utilisé, à des concentrations et pendant des temps très variables, pour hydrolyser les osides et les glycoprotéides :

- 0,25 N à 100°C pendant 18 h (GOTTSCHALK et ADA) (111)
- 0,5 N à 100°C pendant 5 h (PARTRIDGE) (112)
- 1 à 2 N à 100°C pendant 2 à 4 h (WERNER et ODIN) (113)
- 2 N à 100 °C pendant 12 h (YAMASHINA) (114)

Les solutions diluées d'acide sulfurique semblaient offrir, en effet, l'avantage d'être moins agressives vis-à-vis des oses que les solutions d'acide chlorhydrique. En outre, on l'éliminait aisément des hydrolysats par une précipitation barytique. Malheureusement, l'application de l'hydrolyse sulfurique conduisait souvent à des résultats anormaux et cette observation incita des auteurs à effectuer une étude critique du procédé. Par exemple, MONTREUIL et SCHEPPLER (115) avaient été frappés par le fait que la somme des oses libérés des mucoïdes par l'hydrolyse sulfurique et dosés par chromatographie quantitative sur papier était toujours inférieure de 20 à 50 p.100 à la quantité d'oses totaux déterminée à partir du mucoïde natif par la méthode classique de dosage colorimétrique à l'orcino-

sulfurique. La même constatation pouvait être faite à l'examen des travaux d'autres auteurs. Par exemple YAMASHINA (116), après une hydrolyse du séromucoïde acide α_1 -perchlorosoluble par SO_4H_2 2 N pendant 12 heures à 100°C et un dosage du galactose et du mannose par la méthode de chromatographie sur colonne d'amidon de GARDELL (117), ne récupérait que 79,5 p.100 des oses totaux. De même, GOTTSCHALK et ADA (118), après avoir effectué une étude du comportement de plusieurs mucoïdes et de mélanges d'oses et de protéines vis-à-vis de l'acide sulfurique 0,25 N à 100°C pendant 12 heures parvenaient à une récupération de 70 à 90 p.100 des oses et expliquaient ce déficit par des réactions de condensation entre les oses et les acides aminés libérés au cours de l'hydrolyse.

MONTREUIL et SCHEPPLER (119) entreprirent alors une série d'expériences afin de rechercher, d'une part, les causes du "déficit chromatographique" des oses au cours des hydrolyses des glycoprotéides et de préciser, d'autre part, les conditions optimales de l'hydrolyse de ces composés. En effet, ce "déficit chromatographique" pouvait s'expliquer de plusieurs manières et il était permis d'envisager les causes d'erreur suivantes :

- 1 - imperfection des méthodes de dosage colorimétrique des oses neutres conduisant à des résultats par excès
- 2 - condensation d'oses et d'acides aminés
- 3 - imperfection des méthodes de purification des hydrolysats et de chromatographie quantitative
- 4 - destruction des oses au cours de l'hydrolyse
- 5 - hydrolyse incomplète des glycoprotéides.

Dans une première série d'expériences, les auteurs démontrèrent que les méthodes de dosages colorimétriques des oses ne pouvaient être mises en cause, que la condensation d'oses et d'acides aminés au cours de l'hydrolyse était négligeable dans certaines conditions expérimentales (voir p. 40) et que les procédés de purification des hydrolysats à l'aide de résines échangeuses d'ions ainsi que la méthode de chromatographie quantitative sur papier n'entraînaient aucune perte en oses (Tableau VI; p.55 bis)..

Dans une seconde série de recherches, ils étudièrent le comportement des oses vis-à-vis de la solution d'acide sulfurique 2 N

qui était le plus couramment utilisée. Les résultats obtenus par les auteurs sont rassemblés dans le tableau II (p. 50). On voit que les oses, sauf le fructose et le xylose, résistent parfaitement à l'action de l'acide sulfurique 2 N pendant 8 h à 100°C et que le "déficit chromatographique" ne pouvait s'expliquer par une destruction des oses au cours de l'hydrolyse sulfurique.

Le "déficit chromatographique" est donc du à une hydrolyse incomplète des osides qui se manifeste d'ailleurs souvent par l'apparition de taches d'oligosides accompagnant les oses sur les chromatogrammes. MICHON et BOURRILLON (120) parviennent à la même conclusion à la suite d'une étude cinétique de la libération des oses neutres par hydrolyse sulfurique du pleuromucoïde (+) dont les résultats sont rapportés dans le tableau III (p. 51) : on voit que, dans les meilleures conditions, le pourcentage des oses libérés n'excède pas 65 p.100. Cependant, l'hydrolyse des liaisons osidiques des oses neutres est parfois quantitative comme, par exemple, dans le cas de l'amidon soluble (Tableau IV ; p. 52) qui possède pourtant un poids moléculaire plus élevé que celui du glycanne de la plupart des glycoprotéides. L'efficacité de l'hydrolyse d'un oside par l'acide sulfurique est donc liée à la nature des liaisons osidiques des oses qui le constituent et à sa structure moléculaire.

CONCLUSIONS.

Les conclusions que nous pouvons tirer des différentes études qui ont été réalisées sur l'hydrolyse sulfurique des osides libres et combinés sont les suivantes :

1° - La stabilité des oses constituant un oside vis-à-vis de l'acide sulfurique à différentes concentrations et à des températures et pendant des temps variables doit être systématiquement étudiée.

(+) Le pleuromucoïde est un glycoprotéide dont les propriétés sont très voisines de celles de l'orosomucoïde et qui a été isolé du liquide pleural par MICHON et BOURRILLON.

Tableau II

Action de l'acide sulfurique dilué sur différents oses à 100°C pendant des temps variables (p.100 des oses totaux avant l'action de l'acide) (MONTREUIL et SCHEPPLER) (121).

Nature de l'ose	Concentration de l'acide	Durée de l'action de l'acide				
		2 h	4 h	6 h	8 h	18 h
Glucose	2 N	100	100	104	104	90
Galactose	2 N	98	100	-	99	91
Mannose	2 N	100	100	102	102	90
Fucose	2 N	100	101	100	105	97
Arabinose	2 N	101	100	99	100	86
Xylose	2 N	99	97	90	90	75
Fructose	1 N	97	75	58	39	-
	2 N	91	71	30	15	-

Tableau III

Pourcentage des oses neutres libérés en fonction du temps et de la concentration en acide sulfurique au cours de l'hydrolyse du pleuromucoïde (MICHON et BOURRILLON) (122).

Concentration de l'acide sulfurique	Durée de l'hydrolyse	p.100 d'oses neutres libérés(+)
1 N	2 h	57,19
	4 h	48,45
	6 h	54,97
2 N	2 h	63,83
	4 h	59,46
	6 h	61,68

(+) Différence entre la quantité de glucides réducteurs totaux dosés par la méthode de SOMOGYI (123), modifiée par NELSON (124) et la quantité d'osamines dosées par la méthode d'ELSON et MORGAN (125), modifiée par BLIX (126).

Tableau IV

Cinétique de l'hydrolyse de l'amidon soluble par l'acide sulfurique
1 N et 2 N (p.100 des oses totaux avant l'hydrolyse) (MONTREUIL
et SCHEPPLER) (127).

Concentration de l'acide sul- furique	Durée de l'hydrolyse	Dosage du glucose total (+)	Dosage du glucose libéré (+ +)
1 N	0 h	100	0
	2 h	99	90
	4 h	103	100
	6 h	99	102
	8 h	100	98
	16 h	96	97
	2 N	0 h	100
2 h		100	104
4 h		102	103
6 h		97	96
8 h		98	97
16 h		90	91

(+) Méthode à l'orcinol-sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (128),
modifiée par RIMINGTON (129).

(++) Méthode réductimétrique au ferricyanure de MONTREUIL (130),
modifiée (MONTREUIL, SPIK, DUMAINIL et MONSIGNY (131)).

Dans le cadre des recherches que nous avons effectuées, nous pouvons conclure que les hexoses habituellement présents dans les glycoprotéines (galactose, glucose, mannose, fucose et l'arabinose) sont stables pendant au moins 8 heures dans les conditions d'hydrolyse sulfurique généralement utilisées (SO_4H_2 2 N, à 100°C). Le xylose est un peu moins stable et le fructose résiste moins de 2 heures à l'acide sulfurique 1 N à 100°C .

2° - L'acide sulfurique ne réalise pas toujours l'hydrolyse quantitative des liaisons osidiques des oses neutres et il est impossible de prévoir le résultat de son action. Aussi est-il indispensable, d'une part, d'effectuer systématiquement des études cinétiques de l'hydrolyse d'un oside avec différentes concentrations de l'acide et pendant des temps variables et, d'autre part, de déterminer le pourcentage d'oses neutres libérés en dosant ces derniers, soit à l'aide d'une méthode réductimétrique classique, soit par chromatographie quantitative sur papier. On évitera, de cette manière, des causes d'erreur importantes dans la détermination des rapports molaires des oses constituant les osides de poids moléculaires élevés. Les liaisons osidiques présentent, en effet, des stabilités différentes suivant la nature de l'ose et suivant sa position dans la molécule d'oside (voir p. 30).

5 - HYDROLYSE PAR L'ACIDE CHLORHYDRIQUE.

En 1959, l'hydrolyse chlorhydrique des glycoprotéides n'avait reçu que de très rares applications : hydrolyse du "séromucoïde" par HCl 1 N pendant 4 heures (RIMINGTON) (132), de substances de groupes sanguins par HCl 1 N pendant 6 heures (MORGAN et KING) (133), de l'orosomucoïde par HCl 1 N pendant des temps variables (WINZLER) (134). Il était, en effet, classique d'admettre que l'acide chlorhydrique, contrairement à l'acide sulfurique, détruisait une proportion importante d'oses, principalement de pentoses et de cétooses. Les travaux de MONTREUIL et SCHEPPLER (135) et de MICHON et BOURRILLON (136) entrepris à cette époque devaient démontrer que cette conception était erronée, sauf en ce qui concerne les cétooses, et que l'acide chlorhydrique était le meilleur

agent d'hydrolyse des glycoprotéines et de la plupart des osides.

MONTREUIL et SCHEPPLER (137) ont étudié le comportement de différents oses vis-à-vis de l'acide chlorhydrique 1 N et 2 N, à 100°C, pendant des temps variant de 1 à 4 h. Les résultats qu'ils ont obtenus sont rassemblés dans le tableau V (p. 55). On voit que les aldohexoses et les aldopentoses sont stables pendant au moins 4 heures vis-à-vis de l'acide chlorhydrique 1 N, à 100°C. Les aldohexoses résistent aisément pendant 2 heures, - certains même pendant 4 heures -, à l'action de l'acide chlorhydrique 2 N vis-à-vis duquel les aldopentoses sont moins stables. Dans tous les cas, les cétooses sont détruits dans d'importantes proportions.

Dans une autre série d'expériences, les mêmes auteurs ont étudié la cinétique de libération des oses neutres constituant l'oroso-mucoïde sous l'action de l'acide chlorhydrique 2 N, à 100°C, pendant des temps variant de 1 à 3 h. L'examen du tableau VI (p. 55 bis) montre que l'hydrolyse est quantitative au bout de 2 heures. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de MICHON et BOURRILLON (138). Ils concernent l'hydrolyse chlorhydrique du pleuromucoïde et sont rassemblés dans le tableau V (p. 55). On voit que, dans ce cas, le meilleur pourcentage d'oses neutres libérés atteint 94 p.100 et qu'il est obtenu par l'action de l'acide chlorhydrique 1 N pendant 6 h à 100°C. Selon les auteurs, l'acide chlorhydrique 2 N accentue la destruction des oses.

CONCLUSIONS.

Les conclusions que nous pouvons tirer à propos de l'hydrolyse chlorhydrique des osides sont les suivantes :

1° - L'acide chlorhydrique 1 N convient parfaitement à l'hydrolyse des polyosides et des glycoprotéides et son action pourra être prolongée, éventuellement, pendant 4 heures. L'acide chlorhydrique 2 N se montre, au contraire, un peu plus agressif. Cependant, son utilisation se justifiera entièrement pour effectuer l'hydrolyse de polymères d'aldohexoses et de méthylpentoses, en évitant toutefois, de prolonger son action au delà de 3 heures.

Tableau V

Action de l'acide chlorhydrique dilué sur différents oses à 100°C pendant des temps variables (p.100 des oses totaux avant l'action de l'acide) (MONTREUIL et SCHEPPLER) (139).

Nature de l'ose	Concentration de l'acide	Durée de l'hydrolyse			
		1 h	2 h	3 h	4 h
Glucose	1 N	100	101	101	101
	2 N	101	98	95	92
Galactose	1 N	101	100	100	100
	2 N	105	102	99	98
Mannose	1 N	101	101	101	100
	2 N	106	101	99	96
Fucose	1 N	106	104	100	100
	2 N	109	105	100	100
Arabinose	1 N	100	103	103	103
	2 N	98	92	89	86
Xylose	1 N	100	100	100	100
	2 N	97	92	90	89
Fructose	1 N	76	29	21	12
	2 N	51	14	5	0

Tableau VI

Etude cinétique de l'hydrolyse par HCl 2N du séromucoïde acide α_1 perchlorosoluble humain (Orosomucoïde)
(MONTREUIL et SCHEPPLER)(139 bis).

	Durée de l'hydrolyse		
	1 h	2 h	3 h
Séromucoïde hydrolysé (en mg)	50 mg (7,5 mg d'oses)	50 mg (7,5 mg d'oses)	50 mg (7,5 mg d'oses)
Composition en oses de l'hydrolysate (en mg)	7,35 (+ 6 p.100)	7,55 (+ 0,7 p.100)	7,15 (- 4,7 p.100)
Composition en oses de l'hydrolysate après passage sur les échangeurs d'ions (en mg)	8 (+ 6,7 p.100)	7,55 (+ 0,7 p.100)	7,15 (- 4,7 p.100)
Composition en oses de l'hydrolysate déterminée par chromatographie quantitative sur papier (en mg) :			
Galactose	3,23	3,85	3,49
Mannose	2,327	2,33	2,975
Fucose	0,510	0,525	0,510
Total	6,067 (80,9 p.100)	7,305 (97,4 p.100)	6,975 (93 p.100)
Rapports molaires :			
Galactose	10	10	10
Mannose	7,2	7,6	8,5
Fucose	1,7	1,5	1,6

Tableau VII

Pourcentage des oses neutres libérés en fonction du temps et de la concentration en acide chlorhydrique au cours de l'hydrolyse du pleuromucoïde (MICHON et BOURRILLON) (140).

Concentration de l'acide chlorhydrique	Durée de l'hydrolyse	p.100 d'oses neutres libérés (+)
1 N	2 h	85,78
	4 h	86,25
	6 h	93,98
	8 h	91,26
	10 h	77,81
2 N	2 h	72,33
	4 h	73,15
	6 h	59,17
4 N	2 h	23,29
	4 h	15,66
	6 h	8,15

(+) Différence entre la quantité de glucides réducteurs totaux dosés par la méthode de SOMOGYI (141), modifiée par NELSON (142) et la quantité d'osamines dosées par la méthode d'ELSON et MORGAN (143), modifiée par BLIX (144).

Les conditions les plus favorables pour libérer quantitativement les oses neutres constituant les osides libres ou conjugués sont, généralement, les suivantes :

HCl 1 N , à 100°C, pendant 2 h

HCl 1,5N , à 100°C, pendant 1,5 h

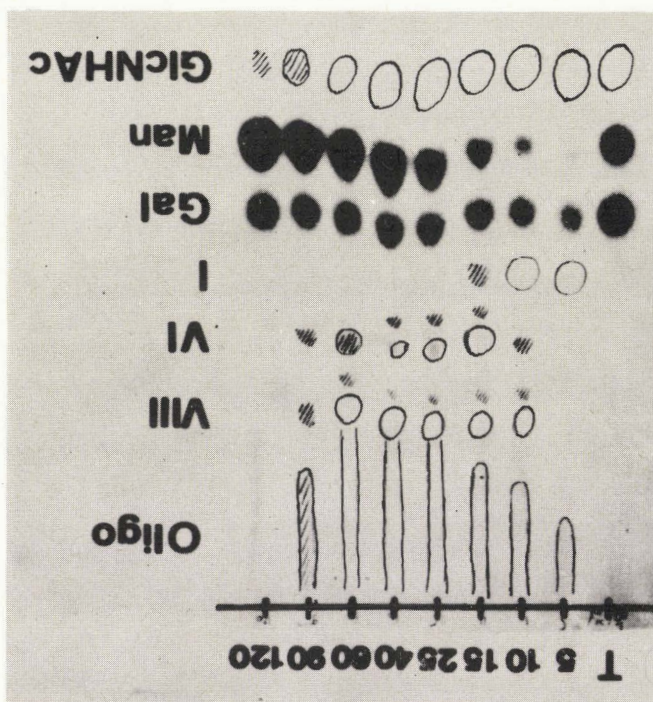
HCl 2 N , à 100°C, pendant 1 h

2° - L'emploi de l'acide chlorhydrique est à rejeter lorsque les osides contiennent des cétooses.

3° - Toutefois, comme dans le cas de l'hydrolyse sulfurique, il n'existe pas de procédé général d'hydrolyse chlorhydrique et il est nécessaire, comme le préconisent MONTREUIL (145), MICHON et BOURRILLON (146a) et GOT, BOURRILLON et MICHON (146b), d'effectuer systématiquement, lors de l'étude de la composition d'osides ou de glycoprotides en oses neutres une cinétique de l'hydrolyse de ces composés avec différentes concentrations en acide et pendant des temps variables, jusqu'à obtenir des valeurs maximales de la composition en oses (Fig. ; p. 58). On hydrolyse, par exemple, avec des acides chlorhydriques 1 N et 2 N pendant des temps échelonnés jusqu'à 2 h et à 100°C, en évitant d'utiliser des températures supérieures qui apportent un risque d'épimérisation (voir p. 34). La figure 16 (p. 58) illustre le procédé utilisé au laboratoire. Il s'agit d'une application à l'ovomucoïde du mode opératoire précédent. On voit que, pour une concentration en acide chlorhydrique 1 N, 2 h sont nécessaires pour obtenir la libération totale des oses neutres et la disparition des taches de faible vitesse de migration, témoins de la présence d'osides et d'une hydrolyse incomplète. En outre, le dosage chromatographique des oses neutres présents dans les différents hydrolysats permet de tracer les courbes de libération des oses. La figure 17 (p. 59) est, à cet égard, démonstrative : on voit que, dans le cas de l'hydrolyse de l'ovomucoïde par l'acide chlorhydrique 2 N, les oses neutres sont quantitativement libérés au bout d'une heure.

Chromatographie d'hydrolysats d'ovomucoïde effectués par HCl 1 N, à 100°C, pendant des temps variant de 5 mn à 2 h. Révélation par Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5). Les nombres indiqués, la durée de l'hydrolyse. Oligo : oligosides ; I, VI et VIII : di- et triholosides ; Gal : galactose ; Man : mannose ; GICNHAC : N-acétylglicosamine.

Figure 16



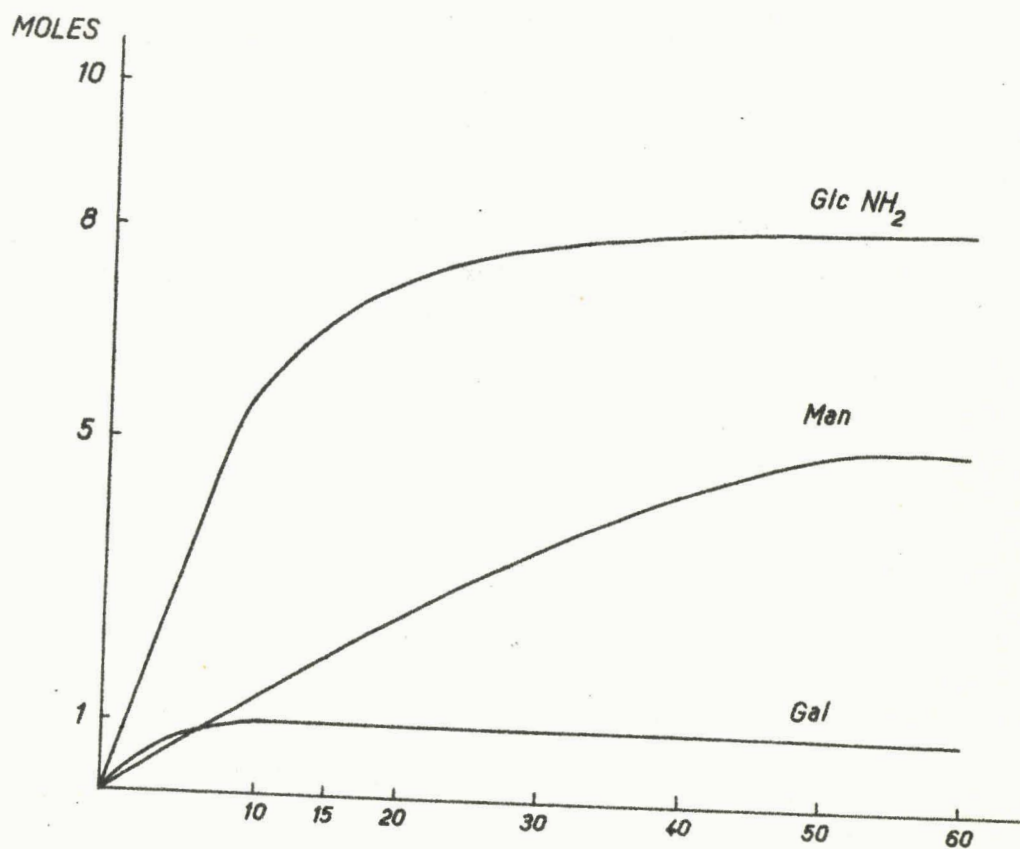


Figure 17

Courbes de libération des oses au cours d'une hydrolyse de l'ovomucoïde par HCl 2 N à 100°C. Le galactose et le mannose ont été dosés par chromatographie quantitative sur papier (voir p.89). Les osamines ont été déterminées par la méthode d'ELSON et MORGAN (147), modifiée par BELCHER et al. (148).

6 - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT L'HYDROLYSE QUANTITATIVE DES OSIDES.

La conclusion essentielle que nous pouvons tirer des études qui ont été effectuées par différents auteurs et par nous-mêmes à propos de la libération quantitative des oses neutres constituant les osides libres ou conjugués (glycannes des glycoprotides) est qu'il n'existe pas de procédé général d'hydrolyse quantitative des osides car les conditions à appliquer dépendent de nombreux facteurs (voir p. 30) et, en particulier, de la nature des oses et de la structure de l'oside. La nature de l'agent d'hydrolyse, sa concentration et la durée de son action devront donc être déterminées pour chaque cas particulier:

1° - On choisira l'agent d'hydrolyse en se fondant sur les principes généraux suivants :

a - Dans la plupart des cas, l'acide chlorhydrique représente l'agent d'hydrolyse de choix dont l'efficacité est supérieure à celle de l'acide sulfurique. Il réalise généralement la libération quantitative des oses neutres.

b - L'acide chlorhydrique convient parfaitement à l'hydrolyse des liaisons "pentosyl" à la condition de ne pas dépasser la concentration 1 N.

c - Les cétooses étant très sensibles à l'action de l'acide chlorhydrique, l'emploi de celui-ci est à rejeter lorsque des cétooses sont présents dans des molécules d'osides. On utilisera de préférence des solutions diluées d'acide sulfurique ($\text{SO}_4 \text{H}_2 \text{O}$, 0,1 à 0,5 N) et les hydrolyses seront effectuées, en tirant parti de la grande labilité des liaisons cétosyl, pendant des temps très courts et, dans certains cas favorables, à des températures inférieures à 100°C.

d - L'emploi des résines polystyrène-sulfonées est à rejeter car l'hydrolyse est incomplète et elle conduit toujours à des mélanges complexes renfermant des oses et une proportion très importante d'oligosides. L'application de ce procédé expose donc à de graves causes d'erreur puisque la libération de certains oses est préférentielle (voir p. 30).

2° - En second lieu, on étudiera la stabilité des oses constituant l'oside vis-à-vis de divers agents d'hydrolyse utilisés à différentes concentrations et pendant des temps variables. La température n'excédera pas 100°C pour éviter des épimérisations.

En ce qui concerne les oses constituant de nombreux osides libres et conjugués et, en particulier, les glycoprotides d'origine animale (galactose, glucose, mannose, fucose), nous pouvons affirmer qu'ils sont stables à 100°C dans les conditions suivantes :

SO₄ H₂ 2 N pendant 6 h

HCl 1 N pendant 4 h

HCl 2 N pendant 2 h.

3° - Quel que soit l'agent d'hydrolyse utilisé, la durée de son action devra être déterminée en étudiant, d'une manière cinétique, la libération des oses neutres qui constituent l'oside ou le glycoprotide.

4° - Pour éviter les réactions de transosylation (voir p. 35) la concentration des oses totaux dans les hydrolysats ne doit pas excéder 1 g p. 100 ml.

5° - Les nombreux résultats qui ont été obtenus au laboratoire à propos de la détermination de la composition molaire en oses neutres de divers glycoprotides nous ont conduits à adopter l'acide chlorhydrique comme agent d'hydrolyse et à mettre au point le mode opératoire suivant :

Une quantité déterminée d'oside ou de mucoïde est introduite dans un tube avec un volume d'acide chlorhydrique 1 N ou 2 N tel que la concentration finale de la solution n'excède pas 0,5 p.100 de glucides totaux et 1 p. 100 de protéines dont le pouvoir tampon est négligeable à ce taux. Le tube, bouché hermétiquement, est maintenu au bain-marie bouillant pendant des temps variant de 1 à 2 heures. Après refroidissement, l'hydrolysats est dilué au triple du volume initial et filtré. Le filtre est lavé soigneusement et les eaux de lavage sont jointes au filtrat précédent qui est ensuite complété à un volume tel que la concentration ne

dépasse pas 0,1 N en acide chlorhydrique. L'hydrolysate est soumis à l'analyse chromatographique sur papier selon le mode opératoire que nous décrivons plus loin, après avoir subi une purification préalable.

II - PURIFICATION DES HYDROLYSATS

Les ions minéraux et organiques troublent les séparations chromatographiques des oses neutres et provoquent la formation de traînées. Il est donc indispensable de débarrasser les solutions d'osides et de glycoprotides de l'acide qui a servi à hydrolyser ces derniers et, dans le cas des glycoprotéides, des produits de la dégradation de la fraction protéinique. De nombreux procédés ont été proposés pour purifier les solutions glucidiques. Les uns sont d'application générale et s'adressent à n'importe quel type d'hydrolyse acide ; d'autres, au contraire, concernent soit l'hydrolyse sulfurique, soit l'hydrolyse chlorhydrique.

GOTTSCHALK (149) a tenté, sans résultat, d'améliorer la méthode de chromatographie directe des hydrolysats de glycoprotéides préconisée par GAILLARD (150) en éliminant une partie des protides par dialyse. De même, les méthodes de "dessalage" de MALPRESS et MORRISSON (151) (extraction des glucides par la pyridine anhydre dans laquelle ne se dissolvent pas les sels minéraux) et de LESTER-SMITH et PAGE (152) (extraction de l'acide par agitation de l'hydrolysate avec une solution chloroformique de trioctylamine) ne sont pas satisfaisantes car elles entraînent des pertes en glucides.

Dans le cas des hydrolysats sulfuriques, l'acide peut être éliminé par l'addition d'eau de baryte (PARTRIDGE) (153) ou d'eau de baryte, d'éthanol et de charbon (WERNER et ODIN) (154). GOTTSCHALK et ADA (155) utilisent le même mode opératoire, mais achèvent la purification

par un passage sur échangeur de cations. Toutefois, l'élimination de l'acide sulfurique par la baryte peut introduire deux causes d'erreur : l'une est due au risque d'épimérisation (SPECK (156) ; SUNDMAN (157)), mais on peut aisément l'éliminer en effectuant la précipitation sans dépasser pH 7 et même pH 4 selon SUNDMAN (158) ; l'autre, qui ne peut être évitée, est apportée par l'absorption des glucides sur les précipités formés.

Dans le cas des hydrolysats chlorhydriques, certains auteurs préconisent l'emploi du carbonate d'argent pour éliminer l'acide. L'application de ce procédé nous a permis de vérifier qu'il ne réalisait pas un dessalage total et, qu'en outre, dans le cas des glycoprotéides il n'éliminait pas les produits de dégradation de nature protéique.

Ces différentes méthodes ne sont donc pas satisfaisantes et n'ont pas reçu d'applications nombreuses. Au contraire, l'emploi d'échangeurs d'ions préconisé, dès 1948, par PARTRIDGE (159) se répand de plus en plus et il a été généralisé au laboratoire depuis de nombreuses années (MONTREUIL (160, 161, 162) ; MONTREUIL et SCHEPPLER (163)). Le mode opératoire est le suivant :

1 - CAS D'HYDROLYSATS DE GLYCOPROTEIDES (voir Addendum p. 113)

Les hydrolysats acides sont passés successivement sur des colonnes (20 mm x 250 mm) (+), d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 (++) ; mesh 25-50 forme acide) puis d'anions (Duolite A 102 D (+++) ; mesh 25-50 ; forme formiate) (++++). Le liquide effluent, auquel on joint les eaux de lavage (2 à 3 fois le volume de l'hydrolysate), est

-
- (+) Ces quantités de résines sont suffisantes pour purifier l'hydrolysate de 0,5 g de glycoprotéide par 50 ml d'acide chlorhydrique 2 N.
 - (++) PARIS-LABO, 7 rue du Cardinal Lemoine, Paris (6ème).
 - (+++)
DIAPROSIM, 107 rue E. Covell, Vitry-sur-Seine (Val-de-Marne).
 - (++++)
A la suite de recherches qui se sont poursuivies pendant la rédaction du présent mémoire, nous avons été amenés à remplacer la forme formiate par la forme acétate pour les raisons qui sont exposées à la page 118.

ensuite concentré à un volume déterminé et soumis à l'analyse chromatographique sur papier suivant les procédés décrits plus loin.

Ce mode opératoire que nous avons schématisé dans la figure 18 (p. 65) présente un double avantage ; il permet, d'une part, d'éliminer l'agent d'hydrolyse et réalise, d'autre part, un fractionnement en 3 groupes des glucides présents dans les hydrolysats (+).

1 - les oses "neutres" qui ne sont pas retenus par les échangeurs d'ions et se trouvent dans la solution effluente. Celle-ci est lyophilisée ou concentrée sous vide à une température n'excédant pas 40°C (+ +).

2 - les osamines qui sont fixées, avec les produits de dégradation des protéines, sur l'échangeur de cations. On les déplace par le passage de 200 ml d'acide chlorhydrique 0,4 N (BOAS) (164), exempt de fer. L'emploi de solutions ammoniacales est, en effet, à proscrire car les osamines, sous la forme de bases, sont très labiles en milieu alcalin ou neutre et elles ne sont stables que sous la forme de chlorhydrates en milieu acide ou neutre. La solution effluente est évaporée à siccité sous vide à 40-50°C. Ce procédé sera discuté plus loin dans le chapitre réservé aux osamines.

3 - les acides uroniques qui sont fixés sur l'échangeur d'anions et que l'on déplace par le passage de 500 ml d'une solution aqueuse d'acide formique à 5 p.100 (v:v). La solution effluente est ensuite évaporée à siccité par distillation sous vide à une température inférieure à 40°C et analysée selon les modes opératoires décrits plus loin à propos des acides uroniques.

(+) Les acides sialiques sont détruits dans les conditions de l'hydrolyse.

(+ +) La solution effluente renferme une certaine proportion d'acide formique qui est déplacé de la Duolite A 102 D par l'acide chlorhydrique.

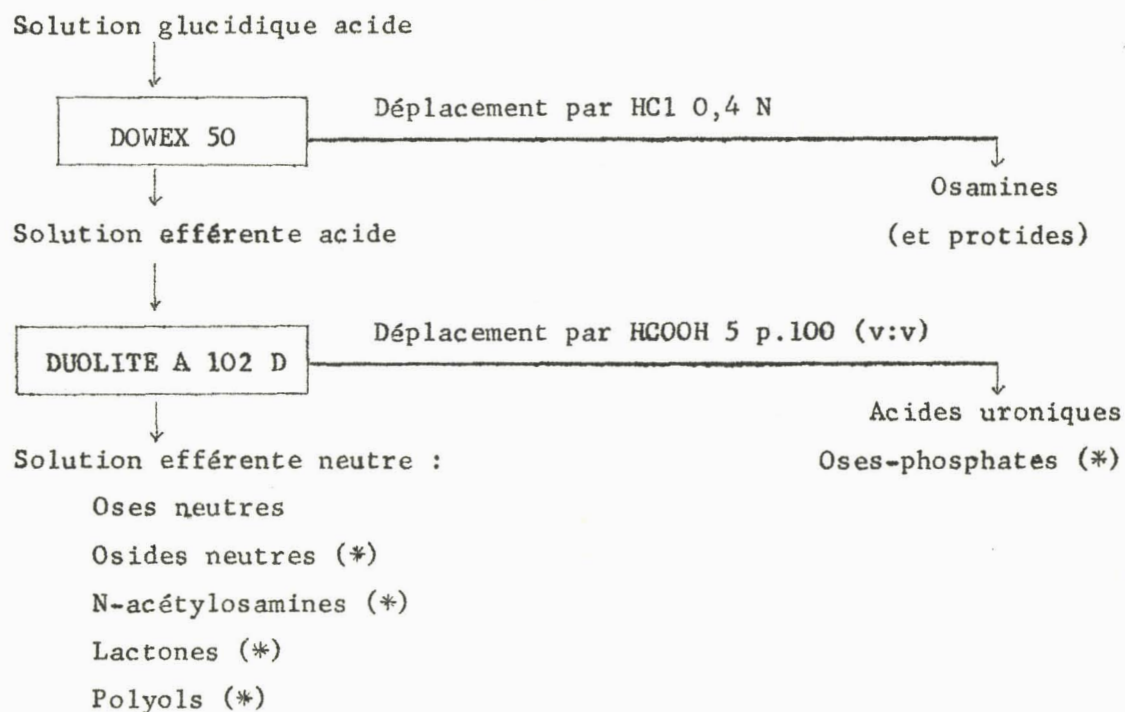


Figure 18

Schéma de purification et de fractionnement des hydrolysats acides d'osides sur des échangeurs d'ions.

(*) Ces composés ne se trouvent évidemment pas dans des hydrolysats totaux d'osides ou des glycoprotides. Nous les faisons néanmoins figurer sur ce schéma car le procédé que nous décrivons est applicable aussi bien à des hydrolysats de glucides qu'à des solutions glucidiques d'origine biologique.

Ce fractionnement des glucides évite des causes d'erreur dans l'identification et le dosage chromatographique des oses neutres dues à des superpositions, dans certains systèmes-solvants, de ces derniers avec des osamines ou des acides uroniques.

Dans les conditions expérimentales que nous avons décrites la récupération des oses neutres est quantitative dans les solutions effluentes, à conditions, toutefois, de préparer convenablement les résines selon le mode opératoire suivant.

PREPARATION DES RESINES.

Avant leur emploi, les échangeurs d'ions sont traités selon le mode opératoire préconisé par COHN (165) : agitation pendant plusieurs heures, à la température du laboratoire, successivement avec de l'eau, un mélange d'acétone, et d'eau (v:v) et de l'acétone, de l'éther de pétrole, de l'acétone, un mélange d'acétone et d'eau (v:v), de l'eau. Ils sont ensuite séchés et tamisés (seuls les grains de grosseur comprise entre les mesh 25 et 50 sont conservés), puis convertis en leur forme d'utilisation : forme acide de l'échangeur de cations ; forme **Formiate** de l'échangeur d'anions.

La forme acide de l'échangeur de cations est obtenue par le passage de 500 ml d'acide chlorhydrique 3 N (+), suivie d'un lavage soigneux à l'eau distillée (environ 6 litres) jusqu'à ce que le pH du liquide effluent atteigne 6 - 6,5.

La forme **Formiate** de l'échangeur d'anions est obtenue par le passage sur la colonne (+), successivement, de 1 litre de soude 3 N, d'eau distillée jusqu'à ce que le liquide effluent soit neutre (environ 3 litres), d'acide formique concentré (3 fois le volume de la résine), d'eau distillée jusqu'à obtenir un pH du liquide effluent (environ 6 litres) voisin de celui de l'eau de lavage.

(+) Ces quantités concernent les volumes d'échangeurs d'ions précisés plus haut.

L'utilisation de la forme formiate de l'échangeur d'anions a pour but d'éviter la fixation, l'épimérisation et la destruction des oses par la résine. ROSEMAN, ABELES et DORFMAN (166) ont montré que des colonnes d'Amberlite IRA 400 et de Dowex 1, sous la forme OH (traitement des résines par la soude) retenaient une forte proportion d'oses qui ne peuvent alors être déplacés que par le passage d'une solution aqueuse de chlorure de sodium à 10 g p. 100 ml (voir aussi, YORSTON (167) ; VAJNA (168) et WOOLF (169)). D'autre part, de nombreux auteurs ont démontré que le passage ou le séjour prolongé de solutions d'oses sur des colonnes d'échangeurs d'anions basiques (forme OH) entraînait une destruction importante de l'ose qui pouvait atteindre 50 p.100 et la formation d'acides lactique, lactyl-lactique, glycolique et malique (voir, par exemple, les travaux de BUHLER, THOMAS, CHRISTENSEN et WANG (170), de HULME (171), de PHILLIPS et POLLAR (172) et de ROSEMAN, ABELES et DORFMAN (173)). Enfin, la forme basique des échangeurs d'anions peut provoquer des phénomènes d'épimérisation (BUHLER, THOMAS, CHRISTIENSEN et WANG (174) ; HIATT (175) ; REBENFELD et PACSU (176) ; ROSEMAN, ABELES et DORFMAN (177) ; SOWDEN (178) ; ZERBAN, SATTLER, ROSENTHAL et GLAUBACH (179)). L'emploi des formes salines des résines échangeuses d'ions, - et de nombreux auteurs recommandent la forme carbonate -, permet d'éviter la rétention (BRYANT et OVERELL) (180), l'épimérisation (REBENFELD et PACSU) (181) et la destruction (HULME (182) ; PHILLIPS et POLLARD (183)).

2 - CAS D'HYDROLYSATS D'OSIDES.

a - Purification sur échangeur d'anions :

Dans le cas particulier des hydrolysats chlorhydriques ou sulfuriques d'osides, la purification peut être réalisée d'une manière différente. En effet, l'absence de protides permet d'éviter l'emploi de l'échangeur de cations et les acides sont éliminés des hydrolysats par un passage sur l'échangeur d'anions seul. Dans ces conditions, le liquide effluent contient les oses "neutres" et les osamines sous leur forme

basique instable. Il sera donc recueilli dans un récipient contenant quelques gouttes d'acide formique ou d'acide acétique pour éviter la destruction des osamines.

b - Purification par lyophilisation.

L'hydrolyse chlorhydrique des osides offre l'avantage sur l'hydrolyse sulfurique de permettre l'élimination de l'acide par lyophilisation. En effet, BISERTE et MOSCHETTO (Communication personnelle) ont démontré que l'acide chlorhydrique pouvait être quantitativement éliminé de ses solutions aqueuses par une lyophilisation à -70°C à condition que sa concentration soit comprise entre 0,4 et 0,8 N.

Ce procédé offre l'avantage d'être très rapide et de préserver la stabilité des oses et des osamines. Nous avons, en effet, vérifié que les taux de glucides dissous dans des solutions chlorhydriques n'avaient pas varié après la lyophilisation et que les chromatogrammes n'avaient rien perdu de leur qualité. Toutefois, ce mode opératoire n'est pas à conseiller dans le cas d'osides contenant des osamines ou des acides uroniques qui sont susceptibles d'interférer avec les oses dans le cas de chromatographies effectuées à l'aide de système-solvants acides.

III - IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE DES OSES NEUTRES.

Les différents types de chromatographie sont applicables à l'identification des oses neutres :

- A - Chromatographie sur papier
- B - Chromatographie sur couche mince
- C - Chromatographie en colonne
- D - Chromatographie en phase gazeuse .

Pour chacun de ces groupes nous décrirons les principales méthodes de séparation de révélation et d'identification des oses neutres en nous intéressant principalement aux constituants des glycoprotides.

A - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES

OSSES NEUTRES

1 - SYSTEMES-SOLVANTS

De très nombreux procédés de séparation des oses neutres par chromatographie sur papier ont été décrits qui diffèrent essentiellement par la composition des systèmes-solvants utilisés et par la nature du papier employé. A la suite d'une étude critique systématique, entreprise au laboratoire depuis plusieurs années et que nous avons poursuivie, on peut conclure que, dans le cas particulier des glycoprotéides animaux, les problèmes d'identification et de dosage des oses neutres constituant la fraction glycannique peuvent être résolus à l'aide de deux systèmes-solvants seulement dont l'emploi combiné permet de séparer le galactose, le glucose, le mannose, le xylose, le fucose, et, éventuellement, la N-acétyl-glucosamine.

Il s'agit des systèmes-solvants suivants :

a) n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) (PARTRIDGE) (184).

Après une agitation énergique dans une ampoule à décanter, suivie d'un repos de 15 minutes, la phase inférieure (phase de saturation) est recueillie par décantation et introduite dans la cuve à chromatographie; la phase supérieure (phase mobile), généralement trouble, est additionnée d'un mélange de n-butanol/acide acétique (4:1) (v:v) jusqu'à ce que le liquide devienne limpide. On évite ainsi la démixion du système-solvant au cours de la chromatographie.

La chromatographie est effectuée pendant 24 heures sur papier Whatman n° 1 ou mieux, pendant 48 à 72 heures, sur papier Whatman n° 3. Ce système-solvant donne d'excellentes résolutions des mélanges suivants : galactose (ou glucose), mannose (ou fructose), xylose (ou N-acétylglucosamine), fucose. Dans le cas de l'analyse d'hydrolysats de glycoprotéides, il possède le désavantage de ne pas séparer parfaitement le galactose du glucose (Fig. 19; p. 70). Cependant nous avons observé que

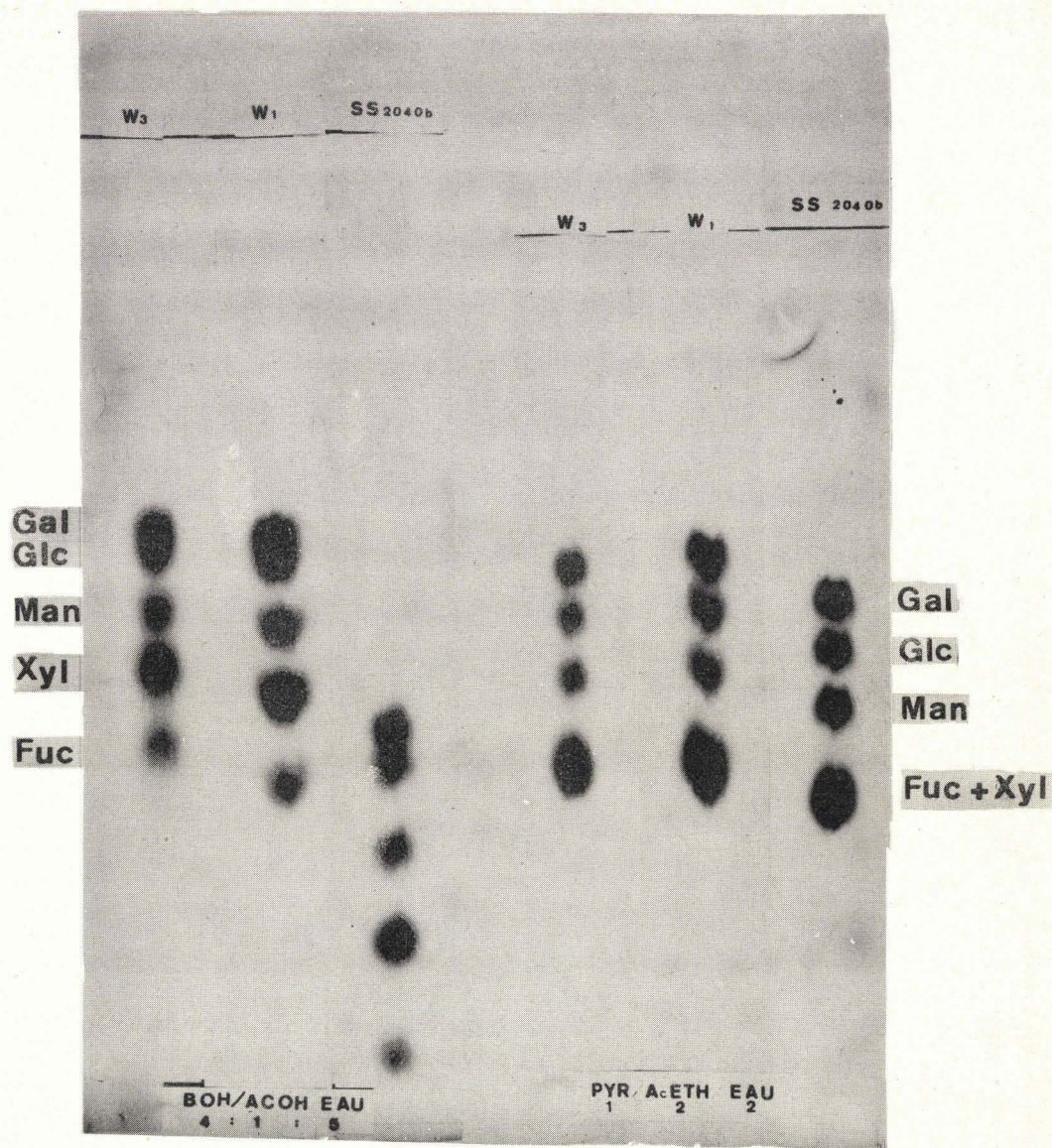


Figure 19

Chromatographie, dans différents systèmes-solvants, des différents oses neutres : galactose (Gal) ; glucose (Glc) ; mannose (Man) ; xylose (Xyl) ; fucose (Fuc). A gauche : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) ; à droite : pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2). Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline. W_1 : papier Whatman n°1 ; W_3 : papier Whatman n°3 ; SS 2040 b : papier Schleicher et Schull n° 2040 b.

cette discrimination pouvait être obtenue en employant du papier Schleicher Schüll 2040 b (durée de la chromatographie 48 h) (Fig. 19; p. 10).

b) Pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2) (JERMYN et ISHERWOOD) (185).

Après une agitation énergique, le mélange des deux phases est introduit dans la cuve de chromatographie (+) et constitue la "phase saturante". Après décantation, la phase supérieure (phase mobile) est recueillie et, pour les mêmes raisons que précédemment, elle est légèrement "désaturée" par l'addition d'une faible quantité du mélange pyridine/acétate d'éthyle (1:2). La chromatographie est réalisée pendant 24 heures sur papier Whatman n° 1 ou pendant 8 à 10 h sur papier Schleicher et Schüll 2040 b. On obtient, de cette manière, d'excellentes séparations du galactose, du glucose, du mannose, du fucose et du rhamnose. Toutefois, le xylose, le fucose et la N-acétylglucosamine possèdent le même comportement chromatographique. (Fig. 19 ; p. 70).

Les systèmes-solvants pyridiniques présentent le désavantage de "tasser" les taches des oses les unes sur les autres et de fournir des "spectres chromatographiques" moins étalés que ceux que donne le système-solvant de PARTRIDGE. Ce "tassage" des taches s'accroît parfois exagérément et il est alors nécessaire de nettoyer parfaitement la cuve de chromatographie.

Nota. De nombreuses variantes de la composition des systèmes-solvants ont été proposées. Elles n'apportent aucune amélioration à la qualité des séparations. Nous signalerons toutefois, les systèmes-solvants proposés par BOURRILLON (186) et par BOURRILLON et MICHON (187) qui, en une opération, permettent de séparer, sur papier Schleicher et Schüll 2043b lavé aux acides, les acides N-glycolyl- et N-acétylneuraminiques, la galactosamine, la glucosamine, le galactose, le glucose, le mannose et le

(+) Le système-solvant de JERMYN et ISHERWOOD ne peut être utilisé que dans des cuves de chromatographie entièrement en verre.

fructose. La composition de ces systèmes-solvants est la suivante :

- a) n-butanol/pyridine/HCl 0,1 N (5:3:2)
- b) alcool iso-amylque/pyridine/HCl 0,1 N (4:4:2)

2 - REVELATION DES OSES NEUTRES

De nombreux réactifs de révélation des oses neutres préalablement séparés par chromatographie sur papier ont été décrits. La plupart mettent à profit les propriétés réductrices des oses, d'autres la présence de fonctions α -glycoliques, d'autres encore la formation, en milieu acide, de dérivés du furfural qui donnent des composés colorés par condensation avec des amines ou avec des phénols. Ils peuvent être classés en réactifs généraux et en réactifs spécifiques.

Des centaines de réactifs de révélation des glucides ont été décrits dont un grand nombre dérivent les uns des autres par de légères modifications dans la composition des solutions (+). Depuis plus de quinze ans, la question a été suivie de très près au laboratoire et la plupart des révélateurs proposés ont été essayés du double point de vue de la sensibilité et de la spécificité. Nous avons nous-même poursuivi cette étude critique systématique et, de l'ensemble des résultats qui ont été accumulés, nous avons retenu un très petit nombre de réactifs dont l'emploi combiné nous a permis, jusqu'à présent, de résoudre tous les problèmes de révélation des oses qui se sont présentés au laboratoire. En outre, ces réactifs sont de loin les plus utilisés par les chercheurs.

Il s'agit :

1 - de trois réactifs non spécifiques :

- a - le réactif au nitrate d'argent de TREVELYAN et al. (188)

(+) voir à ce sujet, les revues générales de DEDONDER (188a) ; LEDERER et LEDERER (188b) ; HEFTMAN (188c) ; HAIŠ et MACEK (188d) ; KOWKABANY (188e) HOUGH (188f) ;

aqueuse d'acide fluorhydrique à 40 p.100 (v:v) et 40 volumes d'acétone. Après séchage pendant 5 à 10 minutes à la température du laboratoire, la révélation est effectuée suivant le procédé de TREVELYAN et al décrit plus haut.

b - Réactif au chlorure de triphényltétrazolium de WALLENFELS (201)

Le chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium est réduit en milieu alcalin par les oses en triphényl-formazan de coloration rouge, à la condition que ceux-ci présentent une isomérisation 1,2-énoles. La réaction est donc négative avec les 2-désoxyaldoses et les 2-O-méthyl-aldoses (+). WALLENFELS (202) a décrit un excellent procédé de révélation des oses à l'aide d'un réactif au 2,3,5-triphényltétrazolium dont le mode opératoire est le suivant :

Le papier séché est imprégné par pulvérisation d'une solution préparée extemporanément en mélangeant à volumes égaux une solution aqueuse de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium à 2 g p.100 ml et une solution aqueuse de soude 1 N. Le développement de la coloration est effectué en maintenant le papier pendant 20 minutes environ à 70°C dans une atmosphère saturée de vapeur d'eau. La sensibilité de la méthode atteint 1 à 2 µg.

Des modifications à la méthode originale de WALLENFELS ont été proposées par différents auteurs sans apporter d'amélioration sensible à ses performances. Par exemple, TREVELYAN et al. (203) préconisent l'emploi d'une solution chloroformique de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium à 0,5 g p. 100 ml et d'une solution éthanolique de soude 0,2 N. Selon BACON (204) et AVIGAD, ZELIKSON et HESTRIN (205), l'emploi du 2,5-diphényl-3-(4-styrylphényl)-tétrazolium rendrait la réaction plus sensible, mais nous n'avons pas vérifié cette affirmation.

(+) Et avec les osides-osides et avec les osides-oses substitués sur le carbone 2 de l'ose réducteur terminal.

c - Réactifs aux sels d'aniline

L'emploi des sels d'aniline comme agents de révélation des glucides a été introduit, en 1949, par PARTRIDGE (206) qui utilisait le phtalate d'aniline. Un peu plus tard, le même auteur (207) préconisa l'emploi de l'oxalate d'aniline. Depuis, de nombreux réactifs ont été décrits qui diffèrent par la nature de l'acide destiné à transformer les oses en dérivés du furfural : acides citrique, phosphorique, acétique, trichloracétique, malique. Dans tous les cas, les chromatogrammes ou les électrophorégrammes sont imprégnés du réactif par pulvérisation et maintenus à 100-105°C pendant des temps variant de 10 à 15 minutes. En général, les colorations obtenues sont les suivantes : brunes avec les aldohexoses, roses avec les aldopentoses, brun-verdâtre avec les 6-désoxyhexoses. Les cétooses donnent peu ou pas de coloration. De nombreux oligosides réagissent avec les sels d'aniline, en général, plus difficilement et il est nécessaire, pour les révéler, d'augmenter sensiblement le temps de chauffage.

Pour les oses, la sensibilité est généralement de l'ordre de quelques microgrammes. Elle est considérablement augmentée par l'observation des taches en lumière de WOOD : on peut, en effet, caractériser jusqu'à 0,5 µg de glucose. En outre, les taches données par les aldohexoses, les 6-désoxyhexoses et les osides donnent des fluorescences ou des colorations caractéristiques.

Nous avons effectué une étude comparative des réactifs aux sels d'aniline les plus couramment utilisés en nous attachant plus particulièrement à la sensibilité et à la spécificité des colorations obtenues. Nous avons employé les réactifs suivants :

- Réactif au phtalate d'aniline de PARTRIDGE (208)

Aniline	0,93 g
Acide o-phtalique	1,66 g
n-butanol saturé d'eau	qsp 100 ml

- Réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (209)

Solution d'aniline dans l'éthanol absolu à 2 p.100 (v:v) 2 vol.
Solution aqueuse d'acide oxalique à 2,5 p.100 (p:v) 3 vol.

- Réactif au citrate d'aniline de WHITE et HESS (210)

Solution d'aniline dans l'éthanol absolu à 2 p.100 (v:v) 1 vol.
Solution aqueuse d'acide citrique 0,2 M 1 vol.

- Réactif au phosphate d'aniline de HOUGH, JONES et WADMAN (211) modifié par FRAHN et MILLS (212)

Solution d'aniline 0,075 M et d'acide phosphorique 0,15 M dans du n-butanol contenant 12 p.100 d'eau. *0,68 ml* *1,02 ml 85 p.100*
ob 100 ml

- Réactifs au trichloracétate d'aniline.

a - de HOUGH, JONES et WADMAN (213)

Solution à 2,5 p.100 de trichloracétate d'aniline dans l'acide acétique glacial.

b - de GEE et Mc CREADY (214)

Aniline	2 g
Acide trichloracétique	2 g
Acétate d'éthyle	qsp 100 ml

Discussion des résultats.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de l'étude critique que nous avons effectuée à propos des différents réactifs aux sels d'aniline et les conclusions auxquelles nous sommes parvenus sont les suivants :

1 - Le réactif au phtalate d'aniline est à rejeter car, de tous les sels d'aniline, il est le moins sensible. En outre, les teintes obtenues possèdent des tons pastels assez uniformes qui rendent difficile la discrimination entre les oses fondée sur des différences de coloration. Enfin, les osides sont peu ou pas révélés par le phtalate d'aniline. Ce comportement introduit une cause d'erreur dans la chromatographie quantitative des oses

présents dans des hydrolysats car l'utilisateur ne pourra pas vérifier si l'hydrolyse acide d'un oside ou d'un glycoprotide a été totale.

Il explique, en outre, comment les auteurs qui employaient le phtalate d'aniline pour révéler les chromatogrammes d'hydrolysats sur des glycoprotéides effectués avec des résines polystyrène-sulfonées n'ont pas pu observer que l'hydrolyse était incomplète et ont obtenu des compositions molaires en oses neutres erronées.

2 - Les réactifs au citrate et au trichloracétate d'aniline donnent de bons résultats : la sensibilité est augmentée, les différences de colorations entre les oses sont plus nettes et le fond du papier est moins coloré que dans le cas précédent.

3 - Les réactifs au phosphate d'aniline de HOUGH, JONES et WADMAN (215) et à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (216) sont de loin les plus satisfaisants. Ils sont très sensibles puisque 1 à 2 μg d'ose donnent une tache nettement visible (0,5 μg en lumière de WOOD). Les aldohexoses, d'une part, les aldopentoses d'autre part, les 6-désoxyhexoses enfin, donnent des colorations très nettement différentes, respectivement brun chocolat, rose et brun-jaunâtre. En outre, les osides sont très facilement mis en évidence et, comme nous l'avons précédemment signalé (voir p. 57 et p. 61) leur absence sur les chromatogrammes quantitatifs d'hydrolysats d'osides libres ou conjugués est un critère d'hydrolyse complète de ces derniers.

Nota. De nombreux auteurs emploient des réactifs à la p.anisidine, à la benzidine ou à la diphénylamine. Leur utilisation ne nous paraît pas satisfaisante. En effet, leur sensibilité n'est pas supérieure à celle des réactifs précédents et leur spécificité est pratiquement nulle, tous les oses donnant la même coloration (+). En outre, l'application des réactions

(+) L'emploi des réactifs à la benzidine et à la diphénylamine est cependant précieux dans le cas de la révélation d'osides car ils donnent des colorations spécifiques des points d'attache 1,2 - 1,3 - 1,4.

à la benzidine et à la diphénylamine est dangereuse car ces substances sont cancérogènes. Toutefois, nous croyons utile de donner la composition et les modalités de l'utilisation des réactifs à la p -anisidine et à la benzidine qui sont les plus utilisés et qui nous ont donné les meilleurs résultats.

Réactif à la p -anisidine de MUKHERJEE et SRIVASTAVA (217)

a - Solution A

p-anisidine	0,5 g
Acide phosphorique d ^é	2 ml
Ethanol qsp.	50 ml

Filtrer. Le filtrat constitue la solution A

b - Solution B

Le précipité resté sur le filtre est dissous dans le minimum d'eau et la solution obtenue (environ 50 ml) est additionnée d'un volume égal d'éthanol, puis d'acide phosphorique jusqu'à une concentration finale de 2 p.100 (v:v).

Le réactif est constitué par le mélange des solutions A et B. Il est pulvérisé sur les chromatogrammes que l'on maintient ensuite à 95-100°C pendant 3 à 5 minutes. Les colorations données par les différents oses sont les suivantes : aldohexoses : brun clair ; aldopentoses : brun sombre ; cétohexoses : jaune brun ; 6-désoxyhexoses : brun orangé ; acides hexuroniques : rose.

Réactif à la benzidine de BACON et EDELMAN (218)

Benzidine	0,5 g
Solution aqueuse d'acide trichloracétique à 40 g p.100 ml	10 ml
Acide acétique glacial	10 ml
Ethanol absolu	80 ml

Les chromatogrammes sont imprégnés par pulvérisation du réactif à l'air libre et maintenus à 100°C pendant 5 à 10 minutes. Tous les oses neutres donnent une coloration brun-jaune.

2° - REACTIFS SPECIFIQUES DES CETOSES

a - Réactif à l'urée chlorhydrique de DEDONDER (219)

Les solutions acides d'urée donnent avec les cétohexoses une coloration bleu-verdâtre (+). Les acides suivants ont été utilisés : acide chlorhydrique (HIRST et JONES (220) ; DEDONDER (221)) ; acide oxalique (HIRST, GILVRAY et PERCIVAL) (222) ; acide phosphorique (GREEN, MORRIS, RICHMOND (223) ; WISE, DIMLER, DAVIS et RIST (224)). Le plus sensible, puisqu'il révèle jusqu'à 2 µg de fructose, est le réactif de DEDONDER (225):

Urée	5 g
Acide chlorhydrique	4 ml
Ethanol à 80° qsp.	100 ml

Les papiers sont imprégnés de la solution par pulvérisation et maintenus à 100°C pendant 5 à 10 minutes.

b - Réactif à l'orcinol de KLEVSTRAND et NORDAL (226)

Le réactif de KLEVSTRAND et NORDAL possède la composition suivante :

Orcinol	0,5 g
Acide trichloracétique	15 g
Eau saturée de n-butanol	100 ml

La solution biphasique, énergiquement agitée avant l'emploi, est pulvérisée sur les chromatogrammes que l'on maintient ensuite à 105°C pendant 15 à 20 minutes. Les cétohexoses donnent des colorations différentes suivant leur nature :

(+) Et avec les osides renfermant des cétohexoses. Par chauffage prolongé les N-acétylhexosamines donnent une coloration rose.

cétohexoses	:	coloration jaune
cétopentoses	:	coloration violacée
cétoheptoses	:	coloration bleu ou bleu-vert
acides sialiques	:	coloration brun-orangé

Des causes d'erreur peuvent être introduites par la présence de quantités élevées de pentoses (coloration bleu apparaissant immédiatement ou, au plus tard, au bout de 4 à 5 jours) et d'aldohexoses (coloration jaune pale au dessus de 100 μ g).

c - Réactif à l'acide thiobarbiturique de PERCHERON (227)

L'acide thiobarbiturique est un réactif des aldéhydes et son emploi a été introduit dans la chromatographie des glucides par PERCHERON (228). Dans le cas de cétooses libres et conjugués, le développement de la coloration jaune avec les cétohexoses, rose avec les kétopentoses et verte avec les kétuheptoses s'explique par la formation rapide de dérivés du furfural qui se condensent avec l'acide thiobarbiturique.

Le réactif est obtenu en dissolvant 0,5 g d'acide thiobarbiturique et 2 ml d'une solution aqueuse d'acide phosphorique à 85 p.100 (v:v) dans 100 ml d'éthanol à 80°. Il doit être conservé à l'obscurité et à la température du laboratoire.

Les chromatogrammes préalablement séchés sont imprégnés avec le réactif par pulvérisation et maintenus ensuite à 100-105°C pendant 5 à 7 minutes.

Avec le temps, le fond du papier se colore en rose et les taches correspondant aux kétoses prennent une teinte brune mais restent très visibles.

3° - REACTIF SPECIFIQUE DES CYCLITOLS

Jusqu'à présent, la présence de cyclitols conjugués à des oses n'a été signalée que dans des composés d'origine bactérienne. Ils doivent cependant être systématiquement recherchés dans les osides libres ou

conjugués quelle que soit l'origine de ces derniers.

On utilise couramment le réactif de SCHERER-GALOIS adapté à la révélation des chromatogrammes par FLEURY, COURTOIS et MALANGEAU (229). Le mode opératoire est le suivant.

On pulvérise sur les chromatogrammes une solution mercurique (oxyde mercurique 10 g ; acide nitrique 7,5 ml ; eau 600 ml) et on chauffe à 85°C. Cette opération est répétée une fois et on imprègne ensuite le papier, par pulvérisation, avec une solution barytique (15 ml de solution aqueuse d'acétate de baryum à 10 p.100 ml + 85 ml d'acide acétique glacial). Par chauffage à 100°C pendant plusieurs minutes et après des pulvérisations répétées de ce second réactif, on obtient une coloration rose spécifique des cyclitols.

3 - IDENTIFICATION DES OSES NEUTRES

L'identification des oses est généralement réalisée, d'une part, en comparant leur comportement chromatographique dans un ou plusieurs systèmes-solvants avec celui de témoins latéraux constitués par des oses purs et, d'autre part, en tirant parti des colorations plus ou moins spécifiques que donnent les oses avec les réactifs de révélation. Ces procédés ne mettent pas les auteurs à l'abri des causes d'erreur dues, en particulier, à des comportements chromatographiques identiques ou voisins et il nous paraît indispensable de ne pas considérer la chromatographie sur papier comme un critère absolu d'identification des oses, mais d'avoir recours, en outre, aux procédés anciens d'identification des glucides et de leurs dérivés par la détermination de leurs propriétés physico-chimiques (voir la revue générale de NOGGLE) (230).

a - Identification des oses natifs.

L'identification des oses peut être effectuée en recherchant leurs caractères de fermentation par des micro-organismes (voir par exemple NOGGLE) (231) ou par l'application de réactions enzymatiques

spécifiques que l'on effectue, soit sur le chromatogramme lui-même (par exemple, identification du glucose par la glucose-oxydase (SALTON (232) ; WHITE et SECOR (233)) et du galactose par la galactose-oxydase (COOPER, SMITH, BACILA et MEDINA) (234), soit in vitro après élution des oses des chromatogrammes.

FROMMHAGEN (235) a proposé une élégante méthode qui met à profit les différences que l'on observe dans les vitesses d'oxydations des oses par l'acide periodique. Le procédé consiste à tracer la courbe d'oxydation d'un ose préalablement élué d'un chromatogramme et de la comparer à des courbes étalons. L'oxydation est poursuivie pendant 25 h et le dosage de l'acide periodique consommé est effectué par spectrophotométrie à 227 m μ . La sensibilité de la méthode est de 1 à 10 μ g.

Les oses peuvent encore être identifiés par spectrométrie dans l'infra-rouge (voir, par exemple, PRIMA, ZHBANKOV et MARUPOV (236)) ou par diffraction des rayons X (ALVSAKER et GJESSING) (237). Toutefois, la polarimétrie reste le procédé de choix, à la fois simple et précis. Jusqu'à présent, la mesure des pouvoirs rotatoires nécessitait des quantités élevées de substances, mais l'apparition sur le marché scientifique de micro-polarimètres (Polarimètre photo-électrique à 0,005° de ZEISS, par exemple) qui réclament des quantités d'oses de l'ordre du milligramme, devrait amener les auteurs à appliquer systématiquement le procédé à l'identification des oses séparés par chromatographie sur papier. La détermination du pouvoir rotatoire spécifique des oses permet, en outre, de préciser la nature L ou D de ces derniers sans faire appel à des méthodes délicates comme la fermentation ou la cristallisation particulière des osazones des isomères L et D (CLARKE et HUMPHREYS) (233).

b - Identification des dérivés des oses.

La détermination des propriétés physico-chimiques des osazones et des hydrazones permet d'identifier aisément les oses, mais les quantités relativement élevées de glucides que réclament les méthodes rendent celles-ci difficilement applicables. Toutefois, la mise au point de procédés micro-analytiques permettent d'effectuer cette identification.

Les osazones - généralement, les phénylosazones - sont préparées par les moyens classiques. Au laboratoire, nous les obtenons en chauffant le mélange du réactif à la phénylhydrazine et de la solution aqueuse de l'ose préalablement élué du chromatogramme (0,1 à 1 mg) (volume final 20 à 250 μ l) dans la partie capillaire d'une pipette Pasteur. On examine ensuite au microscope la forme des cristaux et on détermine leur point de fusion, leur pouvoir rotatoire dans différents solvants organiques ou leur spectre infra-rouge (KLEIN et WEISSMAN (239); OTTING (240)).

L'identification des phénylosazones des oses peut encore être réalisée par différents procédés chromatographiques :

- chromatographie sur colonne de carbonate de calcium (FISCHER-JØRGENSEN) (241)

- chromatographie sur papier :
 chromatographie circulaire (BARRY et MITCHELL) (242) ;
 chromatographie sur papier imprégné de formamide (MUNOZ) (243) ou de borate de potassium (ARREGUIN) (244)

- chromatographie sur couche mince de polyamide (HAAS et SEELIGER) (245), de Silene E.F. (TORE) (246), de Kieselguhr G (RHEK et HERMANN) (247).

La détermination des propriétés des hydrazones est plus généralement mise à profit pour identifier les oses car, contrairement aux osazones, les hydrazones sont spécifiques d'un seul sucre. Par exemple, BRAGG et HOUGH (248) ont identifié les oses constituant l'ovomucoïde en déterminant le point de fusion de la phénylhydrazone du mannose et de la 1-méthyl-1-phénylhydrazone du galactose.

SWEELEY (249) a décrit une élégante méthode d'identification des oses fondée sur la formation spécifique de dérivés de méthylsilylation partielle. Le principe du mode opératoire est le suivant : 15 secondes après avoir mélangé la solution pyridinique de l'ose à identifier et la solution pyridinique de trichlorosilane et d'hexaméthylidisilazane

(voir p. 105), on analyse, à 140°C, les composés intermédiaires des oses sur une colonne polaire contenant 3 p.100 de XE-60. On obtient, pour chacun des oses, un diagramme caractéristique qui est, d'après l'auteur, très reproductible.

4 - DOSAGE DES OSES NEUTRES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER (+)

Les procédés de dosage des oses neutres préalablement séparés par chromatographie sur papier peuvent être classés de la manière suivante:

1^o Procédés de dosage appliqués aux chromatogrammes après révélation de l'emplacement des oses :

2^o Procédés de dosages appliqués aux chromatogrammes sans révélation préalable de l'emplacement des oses.

1 - PROCEDES DE DOSAGES DES OSES APRES REVELATION DES CHROMATOGRAMMES.

(voir addendum p. 113)

Les méthodes par appréciation visuelle de l'intensité des taches ou par planimétrie ou pesée de ces dernières ne sont pas d'une précision suffisante pour être utilisées dans la détermination des rapports molaires des oses constituant les osides. Les procédés de dosage colorimétriques appliqués, soit à la mesure de l'intensité des taches directement sur le papier (enregistrement photodensitométrique), soit après élution de la coloration sont plus satisfaisantes et nous exposerons rapidement le principe de ces méthodes en renvoyant, pour plus de détails, à des revues générales comme celles de DEDONDER (250) de HAIS et MACEK (251) ; de HEFTMANN (252) et de LEDERER et LEDERER (253).

(+) Revue générales : DEDONDER (254) ; HAIS et MACEK (255) ; HEFTMANN (256) ; LEDERER et LEDERER (257) ; MONTREUIL, SPIK, DUMAISNIL et MONSIGNY (258) ; NEUBERGER et MARSHALL (259).

a - METHODES PHOTODENSITOMETRIQUES

De nombreux dosages photodensitométriques des oses ont été décrits dont le principe est le suivant : l'emplacement des oses est d'abord déterminé à l'aide d'un réactif plus ou moins spécifique qui est utilisé dans des conditions très précises et l'intensité des taches est mesurée à l'aide de photocolorimètres enregistreurs. On se reporte ensuite à des courbes de références ou à des témoins "internes" représentés par des solutions de glucides purs à des concentrations connues. Les auteurs utilisent généralement les procédés "par réflectance" dont INGLE et MINSHALL (260) ont montré la supériorité sur les procédés "par transmittance".

Les techniques qui ont été décrites diffèrent essentiellement par la composition des réactifs utilisés. Nous citerons, par exemple, les méthodes aux sels d'aniline d'ALBERS et FREISKORN (261), de COLOMBO et coll. (262), de GUSTAFFSON et coll. (263) et de Mc CREADY et Mc COMB (264) ; au nitrate d'argent de Mc FARREN et coll. (265) ; au 4,5-dinitrovératrol de BEVENUE et WILLIAMS (266) ; à la benzidine de WOHNLICH (267).

D'après différents auteurs et d'après l'expérience acquise au laboratoire (KONARSKA (268) ; MONTREUIL, SPIK et KONARSKA (269)) la précision des dosages est de l'ordre de 5 p.100 et les résultats sont proportionnels de 5 à 50 µg d'oses, à condition d'observer les précautions suivantes :

- effectuer, en une fois, des dépôts de 10 µl de solution ;
- introduire des "témoins internes" ;
- développer les colorations dans des étuves de température uniforme.

b - METHODES PAR ELUTION DES TACHES

Ces méthodes consistent à dissoudre dans des solvants appropriés les taches obtenues après l'application de réactifs divers et à déterminer l'absorbance des solutions colorées. Ce sont, par exemple, les procédés de BLASS, MACHEBOEUF et NUNEZ (270) ; élution par le méthanol de la coloration donnée par le phtalate d'aniline de WALLENFELS (271) ; dissolution dans la pyridine chlorhydrique de la coloration donnée par le

réactif au chlorhydrate de triphényltétrazolium, et de PRIDHAM (272) :
révélation par la p-anisidine et extraction des taches par le méthanol.

Le procédé le plus couramment utilisé et que nous appliquons
au laboratoire est celui de HUGHES et JEANLOZ (273). Le mode opératoire
est le suivant :

Sur le même chromatogramme on dépose des volumes croissants,
- correspondant au maximum à 50 µg de chacun des oses -, de la solution à
étudier et d'une solution-témoin renfermant des quantités connues d'oses
purs. Après développement dans un système-solvant approprié, le chroma-
togramme est séché à l'air et imprégné par pulvérisation régulière du
réactif au phtalate d'aniline de BAAR (274) :

Isopropanol	340 ml
Eau distillée	60 ml
Acide phtalique	6,64 g
Aniline redistillée	3 ml

Il est ensuite maintenu pendant 10 à 15 mn, à 100-105°C, dans une étuve
de température uniforme. Des carrés de papier de surfaces identiques, en-
globant largement chacune des taches, sont découpés dans le chromatogram-
me et extraits pendant 3 h par une solution éthanolique d'acide chlorhy-
drique :

Acide chlorhydrique 0,5 N	20 ml
Ethanol absolu	80 ml

L'absorbance des solutions est déterminée à 390 mµ.

L'expérience acquise au laboratoire montre que le procédé
fournit des résultats très reproductibles et précis à 2 p.100 près. Sa sensi-
bilité est augmentée en utilisant le réactif de révélation de DATE (274 bis)
au citrate d'aniline (voir addendum p.113 et MONTREUIL, SPIK et KONARSKÁ
(274 te:)).

2 - PROCEDES DE DOSAGE DES OSES SANS REVELATION PREALABLE

Le principe des procédés est le suivant : les oses, dont
l'emplacement a été repéré grâce à la révélation de témoins latéraux, sont
mis en solution dans l'eau et dosés à l'aide de diverses méthodes après
avoir pris la précaution d'éliminer soigneusement toute trace de cellulose

provenant du papier à chromatographier :

- dosages colorimétriques non spécifiques par les réactifs à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (275), modifié par RIMINGTON (276) ; à l'anthrone sulfurique de DREYWOOD (277), modifié par SHIELDS et BURNETT (278) ou au phénol sulfurique de DUBOIS et al. (279), modifié par DRAPRON et GUILBOT (280) ;
- dosage colorimétrique spécifique du fucose par le réactif au chlorhydrate de cystéine sulfurique de DISCHE et SHETTLES (281) ;
- oxydation par l'acide periodique suivie d'un dosage de l'aldéhyde formique (FLOOD, HIRST et JONES) (282) ou de l'acide formique (HIRST et JONES (283) ; QUICK (284)) formés.
- dosage par le réactif à l'hypoiodite de LINDERSTRØM-LANG et HOLTER (285) (HAWTHORNE) (286) (+).
- dosage par la méthode au cuivre de SOMOGYI : réduction d'une liqueur cuivrique et titrage iodométrique de l'oxyde cuivreux (FLOOD, HIRST et JONES) (287).
- dosage par la méthode colorimétrique de SOMOGYI (288) au réactif arsénomolybdique de NELSON (289) (DUFF et EASTWOOD (290) ; SHU (291) ; SHALLENBERGER et MOORES (292)). Notre expérience personnelle nous a conduit à abandonner ce procédé très délicat qui fournit des résultats non reproductibles. Nos conclusions rejoignent celles de DYGERT et coll. (293) et de MARAIS, de WIT et QUICKE (294).
- dosage par des réactifs aux sels d'aniline (BARTLETT, HOUGH et JONES (295) ; BLASS, MACHEBOEUF et NUNEZ (296) PHILIPPU (297)).
- dosage par le triphényltetrazolium (MATTSON et JENSEN) (298).

(+) Cette méthode nécessite l'élimination préalable de toute trace de solvant par un lavage soigneux du papier à l'éther sulfurique anhydre ou à l'éther de pétrole dans un extracteur du type Soxhlet.

A la suite d'études critiques, nous avons choisi de doser, au laboratoire, les glucides réducteurs à l'aide de deux méthodes colorimétriques, simples et rapides, qui se prêtent parfaitement à des dosages de routine (*).

a - PREMIER PROCÉDE

Principe. Le principe de la première méthode (MONTREUIL (299, 300) ; MONTREUIL et SCHEPPLER (301)) 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 ou bleu de Prusse que l'on maintient en solution par l'addition préalable d'acide oxalique.

Mode opératoire. La solution des glucides est soumise à la séparation chromatographique en quantité telle que 25 à 50 µg de l'ose le plus faiblement représenté dans l'hydrolysât soient déposés sur le chromatogramme. Après développement et séchage de celui-ci, les surfaces de papier correspondant à chaque ose, préalablement localisé par la révélation d'une bande latérale de référence, sont introduites dans les récipients avec une quantité d'eau bidistillée telle que 5 ml de la solution finale renferment de 10 à 50 µg d'hexoses et de 25 à 50 µg de fucose. Le contact est maintenu pendant 24 heures à la température du laboratoire. Une goutte de toluène pur est introduite dans chaque flacon pour éviter le développement des micro-organismes.

Le dosage des oses est effectué par la méthode colorimétrique au ferricyanure :

On introduit dans des tubes propres, jaugés à 25 ml, 5 ml de la

(*) Toutefois, une seconde série de travaux effectués ultérieurement, nous a amenés à appliquer plus couramment le procédé de HUGUES et JEANLOZ modifié, dont nous avons, entre-temps, observé la précision (voir addendum p.113 et MONTREUIL, SPIK et KONARSKA (301 bis)).

solution de glucides réducteurs (10 à 40 μg d'oses), 1 ml d'une solution aqueuse, fraîchement préparée, à 0,20 g p. 100 ml de ferricyanure de potassium pur et 1 ml du réactif : cyanure de sodium pur 1,5 g, carbonate de sodium pur 8 g, eau bidistillée q.s.p. 500 ml. Toutes les opérations sont ensuite effectuées à l'abri de la lumière. Le mélange est maintenu pendant 9 minutes au bain-marie bouillant, refroidi rapidement et additionné de 0,25 ml d'une solution aqueuse d'acide oxalique à 2 g p. 100 ml, puis de 1 ml d'une solution phosphoferrique (sulfate ferrique pur anhydre 5 g, acide phosphorique à 60°Bé 75 ml, eau bidistillée q.s.p. 500 ml). On complète à 25 ml avec de l'eau bidistillée et, après un séjour à l'obscurité variant de 3 à 5 heures (on effectue des mesures successives jusqu'au moment où la coloration est stabilisée), l'intensité de la coloration bleue est déterminée à 640 m μ .

Ce procédé de dosage est à la fois précis et rapide. En effet, il n'exige pas l'élimination préalable du système-solvant qui imprègne encore le papier, ni celle des fibres de cellulose.

b - DEUXIEME PROCEDE

Principe. Le second procédé (MONTREUIL, SCRIBAN et MULLET (302) consiste à éluer des quantités suffisantes d'oses pour effectuer ensuite des dosages colorimétriques avec les réactifs à l'orcinol ou à l'anthrone sulfurique.

Mode opératoire. Des quantités de 0,25 à 1 ml de solution glucidique sont déposées sur les feuilles de papier Whatman en un trait continu de 40 cm de longueur. La séparation chromatographique est réalisée à l'aide des systèmes-solvants pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2) (papier Whatman n° 1, pendant 18 à 24 h) ou n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) (papier Whatman n° 1 ou 3 pendant 2 à 4 jours). Deux bandes sont ensuite découpées de part et d'autre des chromatogrammes dans le sens de la migration du système-solvant, chacune entamant de 4 cm la ligne de départ. Révélées à l'oxalate d'aniline, elles servent à repérer l'emplacement des glucides. Les bandes de papier correspondant à chacun de ceux-ci sont découpées et

éluées selon la méthode de DENT (303) pendant 24 à 36 heures avec de l'eau bidistillée. La solution d'élution est complétée à un volume variant de 25 à 200 ml et les glucides sont dosés sur une partie aliquote à l'aide d'une méthode colorimétrique classique à l'orcinol ou à l'anthrone sulfurique. Des dosages témoins sont effectués sur des bandes de papier Whatman soumises au passage du système-solvant et des corrections sont faites en fonction de la surface des bandes éluées. Les résultats obtenus sont enfin multipliés par 1,25 puisque un cinquième de la surface du chromatogramme a servi au repérage des glucides.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

DES OSES NEUTRES (*)

A la suite d'une étude critique effectuée au laboratoire, nous sommes parvenus à la conclusion que la chromatographie quantitative des oses neutres sur couche mince offre peu d'intérêt. En effet, les avantages essentiels de la chromatographie en couche mince - qui compensent, dans une certaine mesure, la complexité de la préparation des chromatoplaques - sont la rapidité et la sensibilité puisque 1 à 2 µg d'oses peuvent être mis en évidence. Malheureusement, aucune technique ne permet de doser avec précision des quantités d'oses aussi faibles et il devient indispensable d'effectuer des dépôts "en ligne" de manière à soumettre à l'analyse des quantités d'oses de l'ordre de 10 à 200 µg. On retrouve donc les conditions de concentration de la chromatographie sur papier. En outre, l'élution des glucides du support chromatographique est souvent plus complexe que dans le cas du papier. Toutefois, nous décrivons quelques procédés de séparation par chromatographie sur couche mince des oses constituant les glycoprotéides que nous avons retenus à la suite de notre étude critique. Nous exposerons, en outre, le principe des méthodes de dosage décrites jusqu'à présent.

(*) Voir l'ouvrage récent de MONTREUIL, SPIK et KONARSKA (303 bis).

1°- PROCEDES CHROMATOGRAPHIQUES (+)

Les procédés de chromatographie en couche mince les plus satisfaisants pour séparer le galactose, le glucose, le mannose et le fucose sont les suivants.

PROCEDE DE HAKOMORI et JEANLOZ (304)

Support : Homogénéiser, à grande vitesse, pendant quelques minutes, dans un "mixer" 8 g de cellulose MN 300 (Macherey-Nagel) et étaler régulièrement, à l'aide d'une pipette, 10 ml de la solution sur une plaque de 10 x 20 cm. Laisser sécher à l'air ambiant.

Système-solvant: Acétate d'éthyle/pyridine/eau (12:5:4).

PROCEDE DE SCHWEIGER (305)

Support : Suspension de 15 g de cellulose MN 300 (Macherey-Nagel) dans 90 ml d'eau distillée. Maintenir la plaque à 100°C pendant 10 mn.

Système-solvant: Le système-biphasique constitué par le mélange suivant : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2:1:2).

WOLFROM, De LEDERKREMER et SCHWAB (306) ont modifié ce procédé en utilisant de la cellulose "microcristalline". Celle-ci (50 g) est traitée par agitation à 25°C, pendant 10 h dans 1 l de borohydrure de sodium 0,1 N renouvelé deux fois. Elle est ensuite lavée avec de l'eau jusqu'à neutralité, séchée sur anhydride phosphorique et pulvérisée finement. Les chromatoplaques sont développées deux fois avec le système-solvant de JERMYN et ISHERWOOD. (voir p. 71)

(+) Revues générales : GUILLOUX et BEAUGIRAUD (307) ; RANDEATH (308) ; STAHL (309) ; MONTREUIL, SPIK et KONARSKA (309 bis).

PROCEDE DE RAGAZZI et VERONZE (310)

Support : Etendre sur 2 dm² une suspension de Kieselgel G (2 g) dans une solution tamponnée de phosphate de SØRENSEN M/15 de pH 8 (5 ml). Sécher à l'air pendant 24 h.

Systèmes-solvants :

n-butanol/dioxane/eau (4:5:1)

n-butanol/acétone/eau (4:5:1)

PROCEDE DE WALDI (311)

Support : Etaler sur 5 plaques de 40 cm² chacune une suspension de 20 g de Kieselgur G dans 40 ml d'une solution de phosphate tamponnée à pH 5 (acide phosphorique 0,1 M + phosphate disodique 0,1 M) (1:1). Sécher à l'air ambiant pendant 18 h.

Système-solvant: n-butanol/acétone/eau (ou solution tamponnée précédente) (4:5:1).

2°- REVELATION

Les réactifs de révélation des oses, décrits à propos de la chromatographie sur papier de ces derniers, sont parfaitement utilisables dans la chromatographie en couche mince. En outre, dans le cas particulier des supports minéraux, les réactifs à l'acide sulfurique donnent d'excellents résultats. Nous utilisons, au laboratoire, la classique solution aqueuse d'acide sulfurique à 5 p.100 (v:v) que nous pulvérisons sur les chromatoplaques. Ces derniers sont ensuite maintenues à 100-105°C pendant 15 à 20 mn (environ 1 h, dans le cas des polyols)

3° - DOSAGE DES OSES NEUTRES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCEPROCEDE DE WOLFROM, De LEDERKREMER et SCHWAB (312)

Les oses sont révélés à l'aide d'un réactif au phtalate

d'aniline. Les taches obtenues sont introduites dans des tubes à essais et traitées de nouveau par le réactif au phtalate d'aniline. Après décan-
tation, la coloration est extraite avec de l'acétone chlorhydrique.

PROCEDES PAR ELUTION

Le support chromatographique correspondant à l'emplacement des oses, préalablement repérés en révélant des témoins latéraux, est recueilli et extrait par des solvants divers. La concentration en oses des solutions est ensuite déterminée à l'aide de différentes techniques volumétriques ou colorimétriques : réactif au bichromate de JAYME et HAHN (313) (PASTUSKA) (314) ; réactifs à l'anthrone-acide sulfurique (THOLEY et WURTZ (315) ; VOMHOF et coll. (316)) ; réactif au phénol - acide sulfurique (HAY, LEWIS et SMITH) (317) ; réactif à la benzidine (BANCHER et coll.) (318).

C - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNES DES OSES NEUTRES (*)

La chromatographie quantitative des oses neutres sur colonnes a reçu, jusqu'à présent, peu d'applications en raison même de la complexité relative des techniques qui sont difficilement applicables à des dosages de routine. Toutefois, leur emploi représente un complément précieux à la chromatographie sur papier quand on désire doser les oses par deux procédés entièrement différents l'un de l'autre.(**).

De nombreuses méthodes de chromatographie sur colonnes des glucides ont été décrites. Elles sont fondées sur des principes différents et utilisent les supports les plus divers. La plupart d'entre elles sont destinées au fractionnement des osides ou des dérivés des oses : chromatographie d'adsorption des osides et des dérivés méthylés des oses

(*) Revues Générales de BINKLEY (319) ; DEDONDER (320) ; MONTREUIL, SPIK et KONARSKA (320 bis).

(**) Cependant, le procédé a été récemment automatisé (voir, à ce sujet, MONTREUIL, SPIK et KONARSKA)(320 ter).

sur charbon de WHISTLER et DURSO (321) ; chromatographie de partage préparative sur cellulose, sur hydrocellulose ou sur Celite de mélanges complexes de glucides ; chromatographie de gel filtration des osides sur Sephadex divers.

Certaines, toutefois, ont reçu quelques applications dans l'identification et le dosage des oses. Elles peuvent être classées en deux groupes suivant le type de chromatographie : chromatographie de partage ou chromatographie sur échangeurs d'ions.

1. - CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR COLONNES

Les procédés de chromatographie de partage des oses sur Celite (HALL (322) ; LEMIEUX, BISHOP et PELLETIER (323)), sur cellulose ou hydrocellulose (voir, par exemple, HOUGH, JONES et WADMAN (324) et la revue générale de BINKLEY (325)), sur Sephadex (ZELEZNICK) (326) ont essentiellement été utilisés pour isoler et identifier les oses et n'ont pas reçu d'application dans le dosage de faibles quantités d'oses. Les méthodes les plus satisfaisantes de chromatographie quantitative sur colonne des oses sont celles de GARDELL (chromatographie de partage sur amidon) et de SAMUELSON et coll. (chromatographie de partage sur échangeurs d'ions).

a - CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE DES OSES SUR COLONNES D'AMIDON.

La chromatographie de partage des oses sur colonnes d'amidon a été introduite, en 1948, par STEIN et MOORE (327) et perfectionnée, en 1953, par GARDELL (328). L'amidon est préalablement purifié suivant le procédé d'ÅQVIST (329) (extraction à 55°C pendant 36 h avec du méthanol, suivie d'un séchage sous vide à 55°C pendant 24 h). Il est ensuite traité par un mélange de n-butanol et d'eau ajoutée en quantité suffisante pour représenter 30 p.100 du poids d'amidon et introduit dans des colonnes (9 g dans une colonne de 0,9 cm de diamètre). Les oses (100 à 1000 µg de chacun d'eux) sont élués avec le système-solvant n-butanol/n-propanol/eau (4:1:1) et des fractions de 0,5 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur. Le dosage des oses est ensuite effectué par une méthode

colorimétrique décrite par l'auteur (GARDELL) (330) qui emploie un réactif au trichloracétate d'aniline. La figure 20 (p. 97) illustre les résultats obtenus par GARDELL. Les colonnes chromatographiques ne peuvent servir que pour une expérience.

b - CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR COLONNES D'ECHANGEURS D'IONS

SAMUELSON et SJÖSTRÖM (331) et SAMUELSON (332) ont montré que des mélanges de glucides pouvaient être analysés par chromatographie de partage sur Dowex-1 x 8 (forme bisulfite) à l'aide d'éthanol dilué. RÜCKERT et SAMUELSON (333), MATTISON et SAMUELSON (334) et SAMUELSON (335) ont observé que la qualité de la séparation était liée à la concentration en éthanol, à la taille des particules de résine, à la vitesse d'écoulement de l'éluant et à la température. La concentration en glucides des fractions obtenues était déterminée à l'aide de la méthode au phénol sulfurique de DUBOIS et coll. (336) ou d'un procédé au ferricyanure décrit par SAMUELSON et SWENSON (337). La qualité des séparations était peu satisfaisante et les auteurs furent amenés à utiliser des échangeurs d'ions poreux : Amberlyst XN-1001 (+) et Dowex-21 K. Les meilleurs résultats furent obtenus avec cette dernière résine (DAHLBERG et SAMUELSON) (338). Finalement, SAMUELSON et coll. (ARWIDI et SAMUELSON (339,340); LARSSON et SAMUELSON (341)) ont mis au point une excellente méthode de dosage des oses que nous avons expérimentée au laboratoire et dont le mode opératoire est le suivant (LARSSON et SAMUELSON) (342).

La résine (++) (Dowex-21K ; 1-16 μ ou 10-35 μ ; forme bisulfite) (+++) est introduite dans des colonnes de 6 x 430 mm et

-
- (+) ROHM et HAAS C°.
 (+ +) Bio-Rad Laboratories, Richmond (Calif.).
 (+ + +) Dans les premières expériences, de la Celite était ajoutée à la résine (ARWIDI et SAMUELSON) (343, 344). Cette addition fut supprimée ultérieurement.

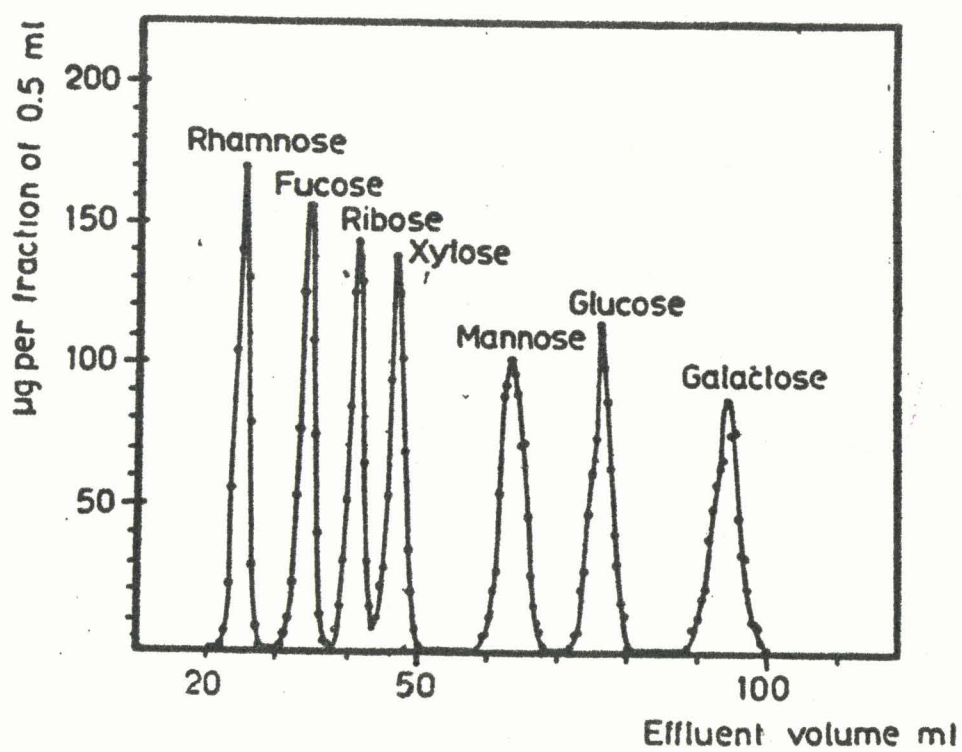


Figure 20

Chromatographie des oses sur colonne d'amidon (0,9 x 20 cm) selon GARDELL (345). Système-solvant : n-butanol/n-propanol/eau (4:1:1)

maintenue à 75°C à l'aide d'un manchon chauffant. La solution des oses (50 à 300 µg de chacun d'eux), effectuée dans l'éthanol à une concentration identique à celle de l'éluant, est déposée au sommet de la colonne de résine. L'éluion est effectuée à débit constant (0,9 à 1,8 ml cm⁻² mn⁻¹), grâce à une pompe péristaltique, avec de l'éthanol dont la concentration varie avec la nature des oses présents dans le mélange à étudier (86 - 88 - 89 - 90 ou 92 p.100). La concentration en oses du liquide effluent est déterminée par une méthode à l'orcinol sulfurique adaptée à l'Auto-analyseur TECHNICON.

Mise au point pour l'analyse des mélanges classiques des oses constituant les glycoprotéides (galactose, glucose, mannose, fucose), la méthode a été étendue, par les auteurs, à 12 autres oses : arabinose, 2-désoxy-galactose, 2-désoxy-glucose, 2-désoxy-ribose, digitoxose, fructose, lyxose, rhamnose, ribose, sorbose, tagatose, xylose. La figure 21 (p. 99) illustre les résultats obtenus par les auteurs.

La colonne sert indéfiniment sans qu'il soit nécessaire de régénérer la résine et la qualité des séparations s'améliore avec le temps. Elle devient optimale au bout de deux mois de fonctionnement de la résine.

2. - CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR COLONNES

Les composés polyhydroxylés donnent, avec les ions borates, des complexes acides (voir, à ce sujet, BOESEKEN) (346) qui peuvent être séparés par chromatographie d'échange d'ions sur des colonnes de résines fortement basiques. La formation des complexes boratés et leur comportement chromatographique obéissent aux règles générales suivantes :

- Ils se forment facilement dans les solutions diluées de borate.

- Leur capacité de fixation sur les résines basiques est fonction du poids moléculaire, du nombre de radicaux hydroxyle et de la configuration spatiale de la molécule (nature furannique ou pyrannique de l'ose ; positions relatives des OH) (FRONTALI et coll.) (347).

La propriété des glucides de former des complexes boratés a

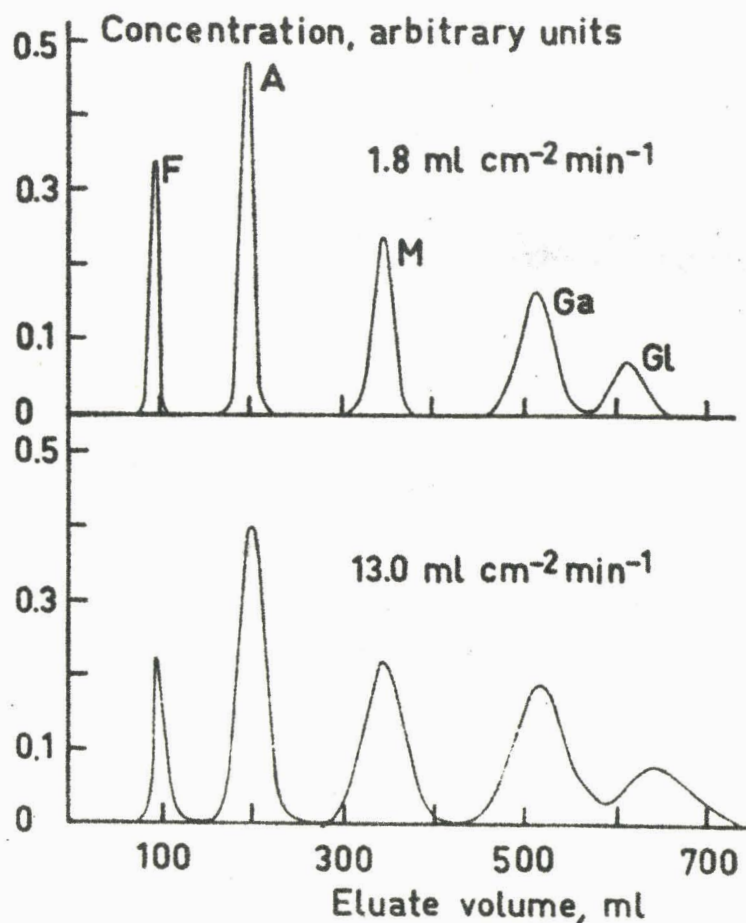


Figure 21

Chromatographie d'un mélange de fucose (F), d'arabinose (A), de mannose (M), de galactose (Ga) et de glucose (Gl) sur colonnes de Dowex 21 K (10-35 μ ; forme sulfate ; 6 x 430 mm). Concentration en éthanol : 92 p.100. Vitesse d'écoulement : $1,8 \text{ ml cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ (d'après LARSSON et SAMUELSON) (348).

été mise à profit par KHYM et ZILL (349, 350) qui ont, les premiers, décrit un procédé de chromatographie sur des colonnes de Dowex-1 (mesh 200-400 ; forme borate) des complexes boratés du fructose, du galactose (élution par du borate de sodium 0,018 M) et du glucose (borate de sodium 0,03 M). La méthode a trouvé, par la suite, de nombreuses applications dans l'isolement d'osides (voir, par exemple, NOGGLE et ZILL (351) : isolement du saccharose, du raffinose, du stachyose et du fructose présents dans des extraits végétaux). La première tentative de chromatographie des oses revient à KHYM et ZILL (352) qui, en 1952, obtinrent une excellente séparation du ribose, de l'arabinose et du xylose. Toutefois, le principe général de la méthode ne reçut pas d'applications dans le domaine du dosage des oses. La raison essentielle doit être recherchée dans le fait que le déplacement des glucides nécessitait des volumes élevés de solution d'élution et interdisait l'application du procédé à de faibles quantités d'oses.

HALLÉN (353) apporta un premier perfectionnement en utilisant des solutions de force ionique et de pH plus élevés. L'auteur obtenait d'excellentes séparations du mannose, du fucose, du galactose et du glucose, dans les conditions expérimentales suivantes :

- colonnes de Dowex 2 x 8 (mesh 200 - 400 ; forme borate ; 0,6 x 150 cm) "stabilisée" avec une solution tamponnée à pH 8,7 de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M + NaHCO_3 0,2 M

- élution des oses (0,2 à 0,8 mg de chacun d'eux), à 20-22°C, avec la solution tamponnée précédente (vitesse d'élution : 1,5ml/h).

- dosage des oses par la méthode à l'acétate d'aniline de GARDELL (353)^{bis}. La récupération des oses est totale à ± 10 p.100 près.

Le procédé fut appliqué à la détermination de la composition en oses de l'hormone de lutéinisation par WALBORG et WARD (354). Les auteurs observèrent un léger déficit en oses de l'ordre de 5 à 10 p.100 qu'ils attribuèrent à une destruction partielle des oses sous l'action, à 20°C, du pH élevé de la solution d'élution. C'est pourquoi, WALBORG, CHRISTENSSON et GARDELL (355) ont récemment proposé une méthode chromatographique dérivée de celle de HALLÉN, dans laquelle le pH de la solution

d'éluion est ramené à 7 et sa température élevée à 50°C. En outre, du glycérol est ajouté au mélange pour augmenter la quantité de borate ionisable à ce faible pH.

Ce procédé a fait l'objet, au laboratoire, d'une étude critique et il donne entière satisfaction du double point de vue de la sensibilité et de la reproductibilité des résultats. Il offre le seul désavantage d'être long et délicat. Le mode opératoire est le suivant.

PROCEDE DE WALBORG, CHRISTENSSON et GARDELL (356)

a - Préparation des colonnes. 150 g de l'échangeur d'anions (Dowex 2 x 8 ; mesh 200-400 ; porosité moyenne ; capacité totale : $3 \pm 0,3$ méq/g), préalablement calibré par plusieurs décantations successives dans l'eau, sont convertis sous la forme borate, par les traitements suivants, effectués dans un entonnoir de Büchner muni d'un filtre en verre frité :

- Laver avec 1 l de soude 2 N, ajouté en 4 fractions.

- Laver avec 2 l d'eau distillée. (Solution A)

- Laver avec 2 l d'une solution 0,4 M en acide borique, 1 M en glycérol et 0,05 M en chlorure de sodium (additionnée de 0,5 ml de toluène) ajoutée en 4 fractions. Le pH de l'effluent doit alors atteindre 6,5 au maximum.

- suspendre la résine dans 250 ml du tampon précédent, chauffer à 50°C et ajuster le pH à $6,8 \pm 0,05$ (à 50°C)

- "Equilibrer" en agitant avec 250 ml du tampon précédent, ajusté à pH $6,8 \pm 0,05$ (à 50°C) et maintenu à 50°C. Renouveler 2 fois cette opération.

- "Equilibrer" une fois encore avec 350 ml de tampon dans les conditions précédentes et dégazer la suspension sous vide.

- Ajouter, à 1 vol. de résine, 2 vol. de tampon. Maintenir à 50°C la suspension épaisse et l'introduire dans les colonnes (hauteur de résine : 150 à 153 cm). "Equilibrer" la colonne avec la solution tampon maintenue à 50°C (vitesse d'écoulement : $3 \pm 0,2$ ml/h).

b - Chromatographie des solutions glucidiques. 0,200 à 1 ml de la solution des oses (75 à 250 μ g) (+) effectuée dans une solution tamponnée (solution B) dont la composition est identique à celle de la solution tamponnée précédente (solution A) à la différence près qu'elle ne contient pas de chlorure de sodium. L'élution des oses est effectuée par le passage de la solution tamponnée^A maintenue à 50°C (vitesse d'écoulement : $3 \pm 0,2$ ml/h). Des fractions de 1 ml sont recueillies et les oses sont dosés par la méthode colorimétrique de WALBORG et CHRISTENSSON (357) :

c - Dosage des oses. A 1 ml de la solution effluente, on ajoute 3 ml d'un réactif à l'aniline acéto-phosphorique dont la composition est la suivante:

Acide acétique glacial Merck	200 ml
Aniline redistillée (++)	6 ml
Acide orthophosphorique Merck à 85p.100 (p:v)	100 ml

Le mélange est maintenu dans des tubes fermés à l'aide d'une bille de verre, d'abord à 100°C pendant 2 h, puis à 30°C pendant 20 mn. L'absorbance de la coloration, qui est stable pendant 96 h, est déterminée à 360 et à 370 m μ .

(+) Les sels minéraux troublant la séparation chromatographique, les hydrolysats de glycoprotéides (5 à 7 mg dans 1 ml d'acide sulfurique 1 N ; 100°C pendant 8 à 12 h) sont purifiés sur Dowex 2 x 8 (forme bicarbonate ; 1 g de résine p. méq de H₂SO₄). Une quantité connue de rhamnose est introduite comme témoin interne à l'hydrolysats, avant la purification.

(+ +) L'aniline est redistillée 2 fois sous azote et conservée à l'obscurité et à 4°C.

d - Résultats. Les résultats obtenus par les auteurs sont illustrés par la figure 22 (p. 104). On voit que le procédé permet une excellente séparation du mannose, du fucose, du galactose et du glucose. En outre, les dosages sont effectués avec une précision de ± 5 p.100.

PROCEDE DE WEBER, BORNSTEIN et WINZLER (358)

Récemment, WEBER et coll. (359) ont adapté à l'analyse automatique (Appareillage Technicon) un procédé de chromatographie des oses sur des colonnes de Dowex 1 x 8 (forme borate) dérivé des techniques de KHYM et coll. (360, 361) et de SYAMANANDA et coll. (362). Le dosage est effectué à l'aide d'une méthode fluorimétrique fondée sur l'intense fluorescence que donnent les produits de la réaction de la 5-hydroxytétralone-1 avec les hexoses en milieu sulfurique.

Le procédé est très rapide (durée totale d'une opération : 4,5 h) et très sensible puisque des quantités de 20 à 120 μ g seulement sont soumises à la chromatographie. Les auteurs l'ont appliqué à la détermination de la composition en oses de l'orosomucoïde (rapport galactose/mannose = 0,65). Toutefois, la somme des oses "récupérés" représente 9,7 p.100 seulement de l'orosomucoïde au lieu de 12,1 p.100 trouvés par la méthode à l'orcinol. Selon l'auteur, le déficit ne serait pas imputable à la méthode mais à l'hydrolyse elle-même (HCl 2 N à 100°C pendant 2 h ; élimination de l'acide chlorhydrique sous vide) qui serait incomplète ou qui détruirait une partie des oses.

D - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES OSES NEUTRES

(voir Addendum page 113)

Il n'entre pas dans notre intention d'exposer en détail les principes et les techniques de la chromatographie en phase gazeuse des oses neutres et nous renvoyons aux excellentes revues générales de BISHOP (364) ; CHEMINAT et BRINI (365) et de SWEELEY (366). Nous nous limiterons à l'exposé de quelques méthodes d'identification et de dosage des oses neutres constituant classiquement les glycoprotéides : galactose, glucose

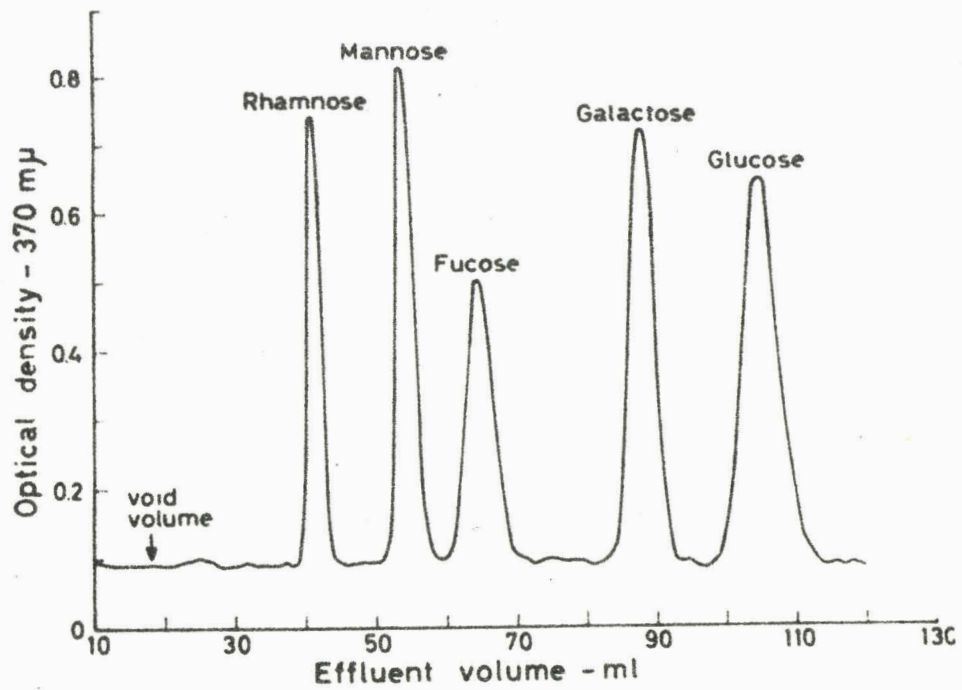


Figure 22

Chromatographie sur colonne de Dowex 2 x 8 (forme borate) d'un mélange d'oses : rhamnose ($0,4 \mu\text{M}$), mannose ($0,75 \mu\text{M}$), fucose ($0,5 \mu\text{M}$), galactose ($1 \mu\text{M}$) et glucose ($1,25 \mu\text{M}$) (d'après WALBORG, CHRISTENSSON et GARDELL) (363).

mannose, fucose.

Actuellement, les procédés d'analyse chromatographique des dérivés méthylés ou acétylés des oses ont été abandonnés au profit des dérivés O-triméthylsilylés dont l'emploi a été introduit à la suite des travaux de SWEELEY et coll. (367). Les procédés s'appliquent aux dérivés O-triméthylsilylés des oses eux-mêmes ou à leurs dérivés de méthylglycosidation et aux dérivés acétylés des polyols provenant de la réduction des oses.

1 - PROCEDE DE OATES ET SCHRAGER (368)

Principe : Les oses neutres obtenus par hydrolyse acide des glycoprotéides sont purifiés sur échangeurs d'ions, transformés en triméthylsilyldérivés et soumis à la chromatographie en phase gazeuse sur butane-1,4-diol succinate polyester/Celite. La méthode permet de doser le galactose, le mannose, le glucose et le fucose.

Mode opératoire :

1 - Hydrolyse. L'hydrolyse des glycoprotides est effectuée par de l'acide chlorhydrique 0,25 N en présence de 10 p.100 (p:v) de Dowex 50 W x 12 (mesh 200-400) à 100°C pendant 16 h. L'hydrolysate est ensuite purifié sur de petites colonnes de Dowex 2 (mesh 200-400) après qu'un témoin interne d'arabitol eût été ajouté. Le liquide effluent est évaporé à siccité sous vide.

2 - Triméthylsilylation. Le résidu sec contenant jusqu'à 8 mg d'oses, est traité par 0,4 ml du réactif de silylation dont la composition est la suivante :

Pyridine (+)	5 ml
Hexaméthylsilylazane HOPKIN et WILLIAMS	1,5 ml
Triméthyl chlorosilane LIGHT	1 ml

(+) La pyridine est deshydratée en la maintenant pendant 15 à 24 h en présence d'oxyde de baryum. Elle est ensuite distillée et conservée sur hydrure de calcium dans des flacons opaques. Elle est enfin débarrassée de l'air qu'elle contient par le passage d'un courant d'argon ou d'azote.

Après une heure de contact, la solution (5 à 10 μ l) est soumise à l'analyse chromatographique.

3 - Chromatographie en phase gazeuse. Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- Colonne de verre de 4,6 mm \times 2,1 m
- Support de Celite (mesh 80-100 ; lavée aux alcalis et aux acides) et de butane -1,4-diol succinate polyester à une concentration de 20 p.100 (p:p).

- Température : 142°C
- Débit du gaz vecteur (argon) : 25-30 ml/mn
- Température du détecteur (ionisation au ⁹⁰Sr)
- Tension du détecteur 700 V

4 - Résultats. Les auteurs ont appliqué ce procédé à l'étude de la composition en oses neutres de glycannes constituant des sécrétions gastriques et salivaires. La comparaison des résultats qu'ils ont obtenus avec des méthodes classiques de dosage leur permet de conclure que la marge d'erreur est de l'ordre de 0 à 12 p.100.

NOTA. Parmi les nombreux procédés de chromatographie en phase gazeuse des triméthylsilyl-dérivés des oses qui ont été décrits, nous avons retenus les deux procédés suivants qui semblent donner des résultats satisfaisants. Ils n'ont, toutefois, pas encore reçu d'applications dans le domaine des glycoprotides.

Procédé de RICHEY et coll. (369)

- Colonnes (6mm \times 2,4m) de polyéthylène glycol succinate (15 p.100) sur chromosorb (AW) W (mesh 80-100)
- Température 160°C
- Gaz vecteur : argon

Selon les auteurs , les erreurs de dosage sont de l'ordre de 10 p.100.

Procédé de SAWARDEKER et SLONECKER (370)

- Colonnes de Carbowax 20 M sur Chromosorb W traité par l'hexaméthylidisylazane.

- Débit du gaz vecteur (helium) : 100 ml/mn
- Température de la colonne : 170°C
- Température du détecteur : 270°C
- Température de l'injecteur : 300°C

Ce procédé semble satisfaisant puisque les erreurs de dosage n'excèdent pas 1p.100. Il a fourni, entre nos mains, d'excellents résultats (voir Addendum p. 113)

2 - PROCEDE DE BOLTON, CLAMP et coll. (371)(voir Addendum p. 113)

Principe. Les méthylglycosides obtenus par méthanolyse des glycoprotides sont transformés en triméthylsilyldérivés et soumis à la chromatographie en phase gazeuse sur des colonnes de 3,1 p.100 "silicone gum rubber" SE-30 sur Diatoport S. Le procédé permet de doser, non seulement les oses neutres, mais aussi les osamines et l'acide N-acétylneuraminique.

Mode opératoire.

1 - Méthanolyse. Une quantité de glycoprotides correspondant à 0,25 mg de glucides totaux est additionnée de 0,05 mg de glucose. La solution est séchée sur P₂O₅ pendant 12 h. Le résidu sec est méthanolysé par chauffage à l'ébullition pendant 24 h avec 5 ml de méthanol anhydre 0,5 N en HCl. La solution est évaporée, pendant 6 h, sous vide à siccité en présence de potasse et le résidu est traité pendant 24 h, à 20°C, par une solution d'anhydride acétique (0,25 ml) dans le méthanol (0,75 ml) en présence de quelques milligrammes d'acétate d'argent de manière à réacetyler les composés N-désacétylés (WHITE) (372). Le filtrat est évaporé sous vide à siccité pendant 24 h en présence de KOH.

2 - Triméthylsilylation. Le sirop obtenu est trituré, pendant 5 à 10 mn, avec 0,1 ml de la solution de silylation (pyridine/triméthylchlorosilane/hexaméthyl-disilazane : 5 : 1 : 1). Des quantités de solution de l'ordre de 0,5 à 1 µl sont ensuite soumises à l'analyse chromatographique dans les conditions suivantes.

3 - Chromatographie en phase gazeuse

- Colonnes de verre de 3,2mm × 1,8 m . . .
- Support de "silicone gum rubber" SE-30 (3,1 p.100) sur

Diatoport-S (mesh 80-100) (+) introduit dans la colonne suivant le procédé de HORNING, MOSCATELLI et SWEELEY (373).

- Gaz vecteur : azote

- Températures : 155°C pour les oses neutres (30 mn environ), puis 183°C (atteinte à raison de 10°C/mn) pour les osamines et 215°C (10°C/mn) pour l'acide N-acétylneuraminique.

4 - Résultats. Les temps de rétention des composés sont les suivants (par rapport au triméthylsilyl- α -D-méthylgalactopyrannoside :

α -L-fucose	0,34
β -L-fucose	0,37
α -D-mannose	0,83
β -D-mannose	0,96
α -D-galactose	1
β -D-galactose	1,15
β -D-N-acétylglucosamine	2,2
α -D-N-acétylglucosamine	2,4
α -D-N-acétylgalactosamine	2,3
Acide N-acétylneuraminique	3,2 - 3,3

Les auteurs ont appliqué ce procédé à l'analyse de globulines γ A et γ G et de leurs glycopeptides, de l'ovalbumine et d'osides du lait de Femme. Ils ont observé une remarquable concordance entre les résultats fournis par la chromatographie en phase gazeuse et par les méthodes classiques de dosage des glucides.

3 - PROCEDE DE SAWARDEKER, SLONEKER et JEANES (374)

Principe. Les dérivés peracétylés des alditols sont séparés et dosés par chromatographie en phase gazeuse sur ECNSS-M. Le procédé offre l'avantage de conduire à des diagrammes simples puisque les formes α - β et γ des oses sont éliminées.

(+) F and M Corp.

Mode opératoire.

1 - Réduction et peracétylation. Les oses sont réduits par le borohydrure de sodium qui est ensuite détruit par l'addition d'acide acétique. La solution est évaporée à siccité et le résidu obtenu est traité à reflux pendant 4 h, avec un mélange (1ml p. 100 mg d'oses) d'anhydride acétique et de pyridine (1:1). Du peracétylxylitol est ajouté comme témoin interne.

2 - Chromatographie. Les résultats les plus satisfaisants ont été obtenus avec une colonne de 6,3mm x 3 m renfermant du Gas-chrom Q (mesh 100-200) à 3 p.100 d'ECNSS-M dans les conditions expérimentales suivantes :

- Température de la colonne 190°C
- " du détecteur 270°C
- " de l'injecteur 300°C
- Débit du gaz vecteur (helium) : 60 ml/mn

3 - Résultats. Les auteurs obtiennent d'excellentes séparations des alditols suivants : fucitol, mannitol, galactitol, glucitol (et glycérol, érythritol, rhamnitol, ribitol, arabinitol) avec une récupération quantitative des composés (erreur : ± 2 p.100).

Ce procédé, qui n'a pas encore reçu d'application dans le domaine des glycoprotides, devrait représenter la méthode de choix pour identifier et doser les oses neutres.

E - ELECTROPHORESE SUR PAPIER DES OSES NEUTRES

De nombreuses méthodes de séparation sur papier des oses neutres ont été décrites. Jusqu'à présent, elles ont été appliquées essentiellement à l'identification de ces composés et non à leur dosage. Leur emploi reste très limité car les séparations ne sont pas toujours satisfaisantes. En outre, elle nécessite un appareillage particulier puisque les électrophorégrammes sont généralement effectués sous des tensions élevées.

Nous nous bornerons à renvoyer le lecteur aux revues générales de FRAHN et MILLS (375) et de FOSTER (376) dans lesquelles il trouvera les conditions de séparation électrophorétique des oses et des polyols.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les conclusions générales que nous pouvons tirer après l'étude bibliographique et technique que nous avons réalisée à propos des dosages chromatographiques des oses sont les suivantes :

1 - Dans le cas particulier des glycoprotides animaux, pour lesquels le problème de l'identification et du dosage des oses neutres se limite au galactose, au glucose, au mannose, au fucose et au xylose, de nombreux procédés de chromatographie sur papier et sur colonnes permettent d'effectuer les déterminations de rapports molaires à 1 p.100 près.

La chromatographie en phase gazeuse représentera le procédé de choix rapide et sensible, quand l'expérience aura prouvé sa valeur. Déjà, des procédés satisfaisants de séparation des triméthylsilyl-O-méthylglycosides ont été décrits. Ils seront supplantés par les méthodes de séparation des polyols obtenus par réduction des oses qui fournissent des diagrammes chromatographiques très simples.

Toutefois, quelle que soit la valeur des différentes méthodes, il nous paraît indispensable d'appliquer à l'analyse d'un hydrolysate de glycoprotide au moins deux procédés de dosage des oses neutres entièrement différents dans leur principe, en associant, par exemple, la chromatographie sur papier, la chromatographie sur colonnes d'échangeurs d'ions et la chromatographie en phase gazeuse.

2 - Au contraire, le problème de l'hydrolyse des glycannes reste entier. On connaît encore très mal l'action des acides sur les oses, - destruction et transosidation -, en particulier, en présence d'autres constituants comme les osamines, les acides uroniques, les acides sialiques et les protides. Les recherches doivent, actuellement, être orientées dans ce sens.

C'est pourquoi, faute de renseignements précis, il est nécessaire

d'effectuer des hydrolyses cinétiques des glycoprotides de manière à saisir les meilleures conditions d'hydrolyse.

Sur la question de l'hydrolyse des osides, nous partageons entièrement le point de vue de NEUBERGER et MARSHALL (377) :

"Hydrolysis by acid poses the most formidable problem encountered in the carbohydrate analysis of glycoproteins".

NOTE A LA CORRECTION :

Pendant que s'élaborait le présent mémoire, les recherches se poursuivaient au laboratoire en vue de préciser les conditions à appliquer aux glycoprotéines pour hydrolyser quantitativement les liaisons glycosidyl des oses "neutres" et nous apportaient, enfin, une solution à ce problème. Les résultats que nous avons obtenus, ainsi que quelques procédés mis au point dans d'autres laboratoires, font l'objet de l'Addendum de la page 113.

I - SOLUTION DU PROBLEME DE LA CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE DES OSES
"NEUTRES" CONSTITUANT LES OSIDES LIBRES OU CONJUGUES

L'application, à l'étude de la composition molaire des osides, des procédés d'hydrolyse, de purification sur échangeurs d'ions et de chromatographie quantitative sur papier que nous avons décrits plus haut conduit à des résultats inconstants. En effet, on observe tantôt une discordance entre les dosages colorimétriques et les dosages chromatographiques et tantôt une concordance parfaite. Pour obtenir de la méthode des résultats réguliers et reproductibles, nous avons vérifié systématiquement les différentes étapes du procédé de manière à révéler le mode opératoire qui était la cause de l'erreur. Celle-ci pouvait se situer au niveau :

- A - de la chromatographie quantitative,
- B - de l'hydrolyse,
- C - de la purification sur échangeurs d'ions.

A - ETUDE DE LA CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE

L'étude bibliographique et technique de nombreux procédés de dosages des oses "neutres" par chromatographie sur papier, sur couche mince, sur colonnes et en phase gazeuse nous a permis de conclure que ces derniers n'étaient pas responsables du déficit que nous observions.

Les résultats que nous avons obtenus à la suite de cette étude critique ont été rassemblés dans une récente monographie (MONTREUIL, SPIK et KONARSKA)(377a) dont les conclusions générales étaient les suivantes : 1°) - Nous avons rassemblé dans le tableau VIII (p.114) les résultats que nous avons obtenus en appliquant divers procédés chromatographiques au dosage d'oses "neutres" purs, présents dans des solutions titrées. On voit que les erreurs p.100 varient dans de larges proportions suivant les procédés utilisés.

Les techniques les plus précises (erreur de ± 1 à 2 p.100) sont 1) les méthodes de dosage par chromatographie sur papier de HUGUES et JEANLOZ (élution des taches révélées par le phtalate d'aniline ; voir p.76),

Tableau VIII (suite)

Procédés chromatographiques	Couche mince	Phase gazeuse	Echange d'ions	Partage sur échangeurs d'ions
Procédés de dosage	Phtalate d'aniline (d)		Acétate d'aniline (e)	Oxydation périodique (f)
Précision des méthodes appliquées à des solutions titrées d'oses purs	± 4 à 10 p.100	± 1 à 10 p.100	± 1 à 5 p.100	± 2 p.100
Valeur du rapport mannose/galactose dans l'ovomucoïde	-	-	4,05 \pm 0,2	-
Précision			± 5 p.100	

(d) Procédé de WARD et WALBORG (voir MONTREUIL, SPIK et KONARSKA ; p. 21)(377b) .

(e) Procédé de WALBORG,CHRISTENSSON et GARDELL (voir p. 101)

(f) Procédé de SAMUELSON et STROMBER (voir MONTREUIL, SPIK et KONARSKA ; p. 102)(377b) .

de DATE modifiée (élution des taches révélées par le citrate d'aniline ; voir MONTREUIL, SPIK et KONARSKA ; p.77 (377c)) et de MONTREUIL et coll. (méthode réductimétrique au ferricyanure ; voir p.89) ; 2) les procédés de chromatographie d'échange d'ions de WALBORG, CHRISTENSSON et GARDELL (voir p. 101) et de chromatographie de partage sur échangeurs d'ions de SAMUELSON et STROMBER (voir MONTREUIL, SPIK et KONARSKA ; p.102)(377d) ; 3) certaines méthodes de chromatographie en phase gazeuse.

Les procédés les moins précis peuvent être utilisés pour confirmer des résultats obtenus par l'application de méthodes plus rigoureuses afin d'écartier tout risque d'erreur grossière et pour obtenir une première approximation de la concentration en oses d'un hydrolysate, de manière à éviter les tâtonnements dans la confection des chromatogrammes.

Au laboratoire, nous réalisons un premier "dosage" par le procédé d'appréciation visuelle, appliqué par plusieurs opérateurs (voir MONTREUIL, SPIK et KONARSKA ; p. 39)(377e). Des déterminations précises sont ensuite effectuées en appliquant les procédés de chromatographie quantitative sur papier des oses "neutres" de HUGUES et JEANLOZ, de DATE modifié et de MONTREUIL et coll. Dans certaines analyses dont les résultats doivent être acquis avec une certitude absolue et avec une grande précision, nous appliquons, en outre, le procédé de chromatographie sur colonnes d'échangeurs d'ions de WALBORG et al.

2*) - Nous avons rassemblé dans le tableau VIII (p.114) les valeurs du rapport mannose/galactose que nous avons obtenues en appliquant différents procédés de dosage chromatographique à l'étude d'un hydrolysate d'ovomucoïde. On voit que les valeurs varient peu d'un procédé à un autre. Ce résultat confirme notre première conclusion et montre que de nombreux procédés chromatographiques permettent de doser les oses "neutres" avec une précision satisfaisante ou absolue.

B - ETUDE DE L'HYDROLYSE

Nous avons vu plus haut (p. 54) que les oses étaient stables en présence de l'acide chlorhydrique 1 à 2 N, à 100°C, pendant 2 à 4 h. Toutefois, une cause d'erreur pouvait se glisser dans l'interprétation de nos résultats. En effet, la stabilité des oses avait été étudiée à l'aide de dosages colorimétriques effectués par la méthode à l'orcinol sulfurique de RIMINGTON. Or, l'acide chlorhydrique pouvait parfaitement avoir détruit une certaine proportion des oses en donnant des chromogènes qui réagissaient avec l'orcinol sulfurique. Pour éliminer cette cause d'erreur, nous avons soumis des solutions titrées d'oses à l'action de l'acide chlorhydrique et, après purification sur échangeurs d'ions, nous avons dosé les oses par chromatographie sur papier.

L'examen du tableau IX (p. 117) montre que les oses sont stables dans les conditions d'hydrolyse des osides.

A la suite de ces travaux, l'énigme du "déficit chromatographique" subsistait donc et, contrairement à la conclusion de notre récente monographie (MONTREUIL, SPIK et KONARSKA ; p.111), la cause d'erreur ne semblait pas provenir de l'hydrolyse même des osides. En effet, nous observions des pertes, même en travaillant sur des solutions chlorhydriques d'oses purs. En outre, le procédé, appliqué à l'ovomucoïde, donnait tantôt des résultats non déficitaires et tantôt des résultats par défaut. Dans ce dernier cas, le pourcentage de l'erreur était constant quelles que soient les conditions de l'hydrolyse (HCl 1 à 2 N, à 100°C, pendant des temps variant de 1 à 4 h). On ne pouvait donc invoquer une hydrolyse incomplète des liaisons osidiques. La cause d'erreur ne pouvait donc plus se trouver que dans le procédé de purification.

Tableau IX

Récupération du galactose et du mannose et détermination du rapport mannose/galactose après chromatographie quantitative sur papier de solutions titrées d'oses purs.

Traitement subi par la solution avant le passage sur échangeurs d'ions	Dosage du galactose et du mannose					Rapport mannose/galactose		
	Quantités théoriques de chacun des oses	Procédé au phtalate d'aniline (a)		Procédé au ferri-cyanure (b)		Valeur théorique	Procédé au phtalate d'aniline (a)	Procédé au ferricyanure (b)
		Galactose	Mannose	Galactose	Mannose			
Solution aqueuse non traitée	100 µg	100,2	98,7	101,8	97,6	1	0,98	0,97
Solution dans HCl 1,5 N non chauffée	100 µg	97,2	100,3	100	96,8	1	1,03	0,97
Solution dans HCl 1,5 N maintenue à 100°C pendant 1,5h	100 µg	95,1	95,5	101,8	97,6	1	1	0,96

(a) Procédé de HUGUES et JEANLOZ (voir p. 76).

(b) Procédé de MONTREUIL et coll. (voir p. 89).

C - ETUDE DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE LA PURIFICATION DES HYDROLYSATS

Dans une première série de recherches, nous avons vérifié, par des dosages colorimétriques, que les oses se retrouvaient quantitativement dans les effluents de colonnes d'échangeurs d'ions. Ces derniers ne retiennent donc pas et ne détruisent pas les oses.

Dans une seconde série de recherches, nous avons observé que les déficits chromatographiques s'accompagnaient toujours de l'apparition d'osides sur les chromatogrammes. La figure 23 (p.119) est, à cet égard, démonstrative. Il s'agit de la chromatographie d'hydrolysats de lactose effectués en présence de ^{14}C -glucose. Dans un cas (Fig. 23/2), la récupération chromatographique des oses était effective à 100 p.100 ; dans l'autre cas existait un "déficit chromatographique" de près de 25 p.100. La figure 23/1 montre que de nombreux osides sont apparus sur le chromatogramme.

Or, l'hydrolyse du lactose était effectuée dans des conditions (voir p. 36) qui ne provoquent pas de transosidation. Cette dernière ne pouvait donc s'effectuer qu'au cours de la concentration des effluents de colonnes.

Dans une dernière série d'expériences, nous avons vérifié cette hypothèse et décelé l'ultime cause d'erreur dont l'élimination supprime le "déficit chromatographique" des oses "neutres". En effet, nous avons observé que les formes formiate des échangeurs d'anions, quels qu'ils soient (Duolite A-102-D ; Dowex 1 x 2), laissaient souvent passer dans les solutions effluentes des faibles traces d'acide chlorhydrique (0,3 à 0,8 mg dans les conditions expérimentales décrites aux pages 66 et 67 : 25 ml d'acide chlorhydrique 1,5 N sur une colonne (2 x 40 cm) de Duolite-A-40 (forme formiate) ; lavage avec 500ml d'eau distillée.). Ces dernières sont suffisantes pour provoquer des transosidations au cours de l'évaporation à siccité des solutions "neutres" effluentes comme nous avons pu le vérifier en évaporant en exsiccateur 10 ml d'une solution de galactose (15 mg) et de mannose (15 mg) contenant 0,7 mg d'acide chlorhydrique (Fig.24 ; p.120).

Cette cause d'erreur peut être éliminée en utilisant des colonnes d'échangeurs d'anions sous la forme acétate qui retiennent quantitativement

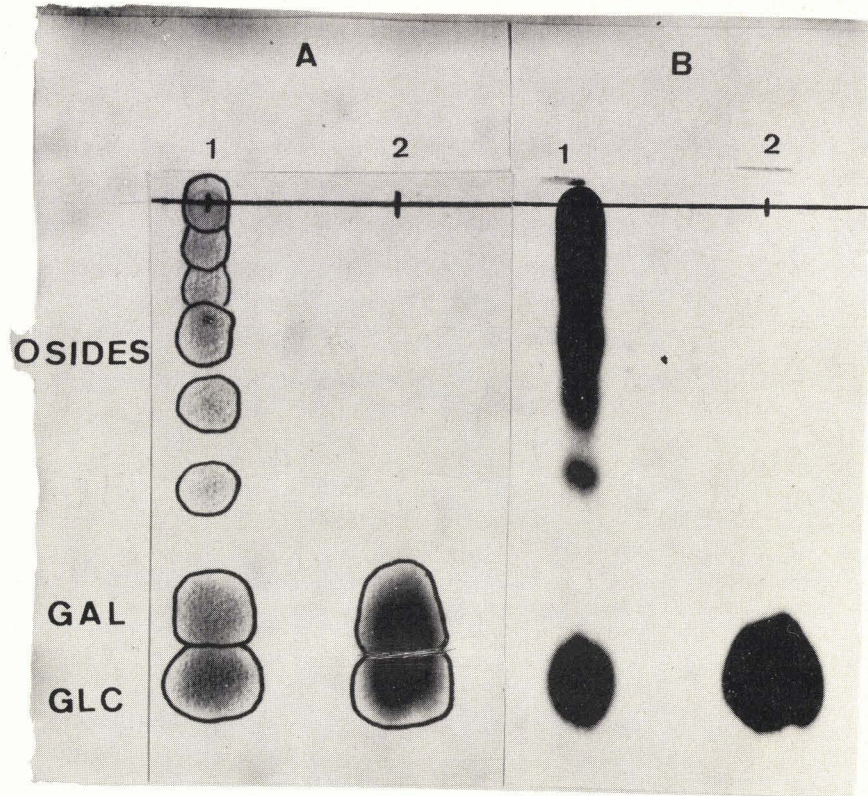


Figure 23

Chromatographie, dans le système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5), d'hydrolysats chlorhydriques (HCl 1,5 N ; 1,5 h ; 100°C) de lactose en présence de ^{14}C -glucose. A : révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline ; B : autoradiographie. En 1, subsistait de l'acide chlorhydrique.

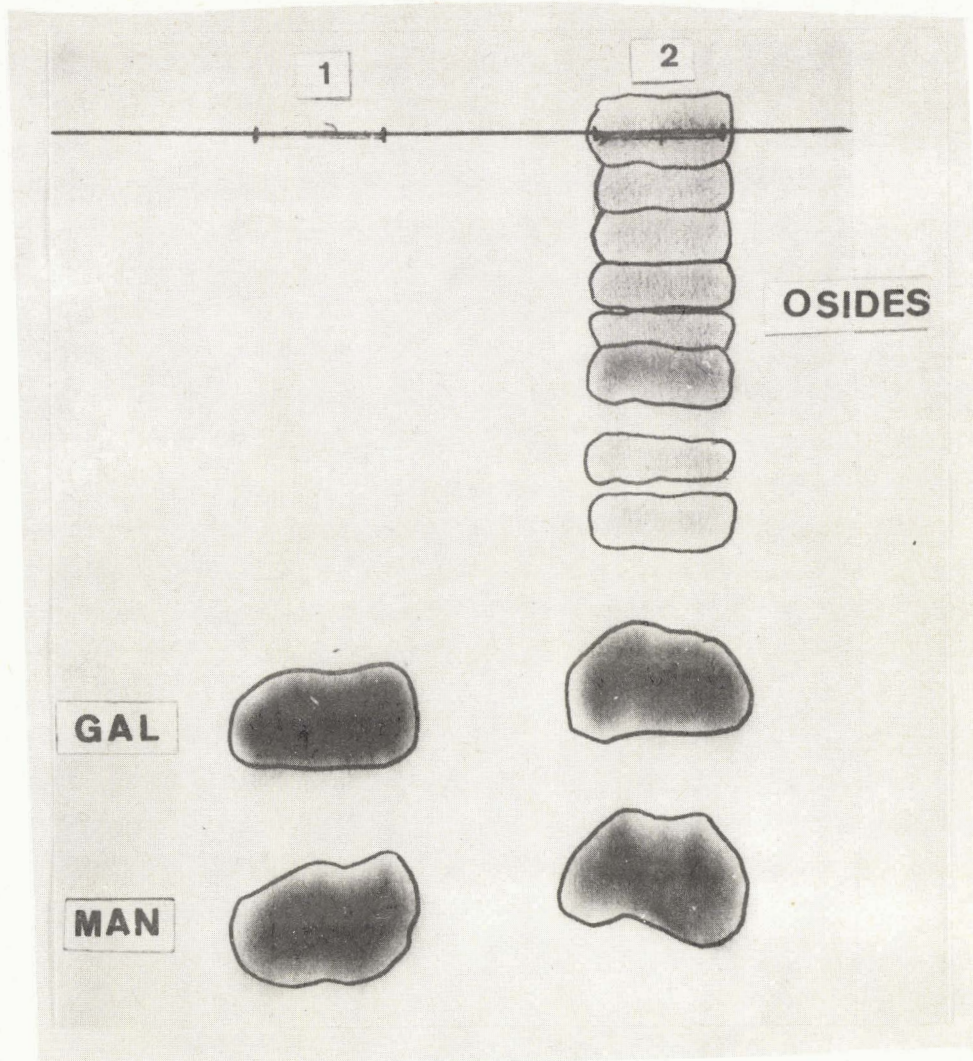


Figure 24

Chromatographie d'une solution aqueuse (10 ml) de galactose et de mannose (15 mg) évaporée en exsiccateur, additionnée (2) ou non (1) de 0,7 mg d'acide chlorhydrique. Chromatographie dans le système-solvant : n-butanol/ acide acétique/eau (4:1:5).

les ions chlore. Toutefois, pour le cas où des traces de ces derniers subsisteraient encore, nous préconisons d'effectuer la concentration sous pression réduite des solutions effluentes en évitant d'évaporer à siccité et en ajoutant à plusieurs reprises du méthanol quand le volume des solutions atteint quelques millilitres.

Appliqué à des hydrolysats d'ovomucoïdes, effectués en présence de ^{14}C -glucose, le procédé est satisfaisant puisque ni le réactif à l'oxalate d'aniline, ni l'autoradiographie ne révèlent de transosidation. (Fig. 25 ; p.122).

II - PROCEDES RECENTS DE CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE DES OSES "NEUTRES"

A - Chromatographie en couche mince

1 - MOCZAR, MOCZAR, SCHILLINGER et ROBERT (377f) ont récemment décrit une méthode de chromatographie sur couche mince qui permet de doser des quantités de l'ordre de 1 à 2 μg de galactose, de glucose; de mannose, de fucose, de glucosamine et de galactosamine avec une erreur de l'ordre de ± 2 p.100. Le mode opératoire est le suivant :

Les hydrolysats de glycoprotides (HCl 2 N, 100°C pendant 1,5 à 3 h, pour les oses "neutres" ; HCl 4 N, 100°C pendant 4 à 8 h, pour les osamines) sont chromatographiés sur chromatoplaques Eastman Kodak 511 V (10 x 10 cm), préalablement imprégnés d'une solution de phosphate 0,2 M de pH 6,8. Les oses neutres sont séparés à l'aide du système-solvant : n-propanol/acétate d'éthyle/eau (5:1:1) (voir la description d'un procédé analogue par ANDERSON et STODDARDT)(377g) et les osamines, à l'aide du système-solvant : éthanol/solution d'ammoniac à 25 p.100/eau (85:0,5:14,5)

La révélation des glucides est effectuée en plongeant les plaques dans un réactif au chlorure de triphényltétrazolium (TTC) obtenu en mélangeant, à volumes égaux, une solution à 1 g de TTC pour 100 ml d'éthanol et une solution, fraîchement préparée, à 1 g de soude pour 100 ml de méthanol. La coloration rouge est développée en maintenant les plaques à 90°C, pendant 15 mn, en atmosphère saturée d'eau et son intensité est déterminée à l'aide d'un densitomètre (Photovolt Corp.). Les résultats sont proportionnels de

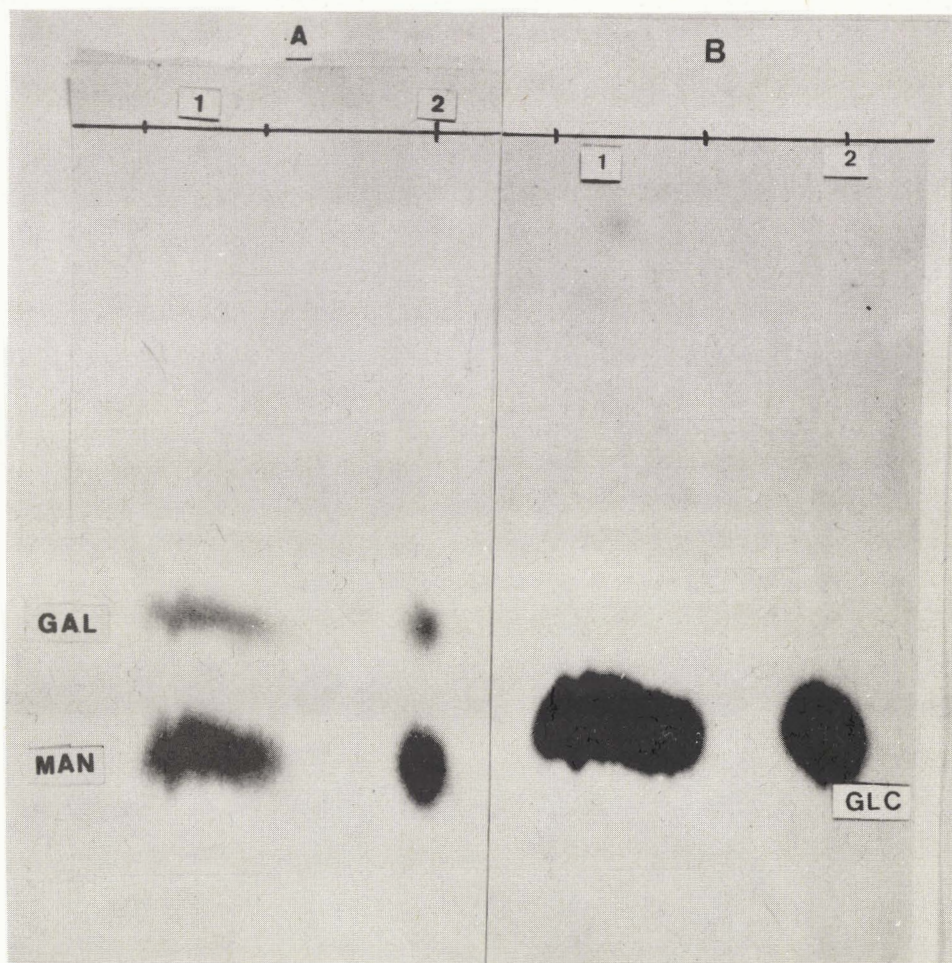


Figure 25

Chromatographie, dans le système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5), d'un hydrolysât d'ovomucoïde en présence de ^{14}C -glucose. A : révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline ; B : autoradiographie.

0,25 à 2 µg et précis à ± 2 p.100 (pour 5 à 6 déterminations) (± 5 p.100 dans le cas du fucose).

2 - NICOT, CHEFTEL et MORETTI (377h) ont adapté la méthode chromatographique sur couche mince de VOMHOF, TRUITT et TUCKER (377i.) au dosage de quantités de l'ordre de 40 µg de galactose et de mannose : les hydrolysats chlorhydriques, purifiés sur colonnes d'échangeurs d'ions suivant le protocole expérimental que nous avons décrit (voir p. 63) sont chromatographiés sur couche mince de cellulose 300 MN sans liant dans les systèmes-solvants : acide formique/ter-butanol/méthyl-éthylcétone/eau (15:40:30:15) (deux chromatographies successives de 2 h), puis acétate d'éthyle/pyridine/eau (30:15:10) (troisième chromatographie de 1,5 h). Les oses, repérés par des témoins latéraux révélés par le réactif au nitrate d'argent de TREVELYAN et al. (voir p. 73), sont élués avec 1 ml d'eau et dosés par la méthode de NELSON (377j) et SOMOGYI (377k) après 15 mn de réaction pour le galactose et 30 mn pour le mannose.

B - Chromatographie en phase gazeuse

Bien que nous l'ayons décrit dans une récente monographie (MONTREUIL, SPIK et KONARSKA ; p. 26) (377l), nous rappellerons l'élégant procédé de CLAMP et coll. (BOLTON, CLAMP, DAWSON et HOUGH (377m) ; CLAMP, DAWSON et HOUGH (377n,377o)) qui permet de doser en une seule opération chromatographique les triméthyl-silyl-dérivés des méthylglycosides des oses suivants : galactose, glucose, mannose, fucose, N-acétyl-glucosamine, acide N-acétylneuraminique. Ces derniers sont obtenus par méthanolyse des osides libres ou conjugués, suivie d'une N-réacétylation des fonctions aminées et d'une triméthyl-silylation.

CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE
DES
ACIDES SIALIQUES

Les acides sialiques se trouvent en position "externe" dans les molécules de glycoprotéides. En outre, les liaisons sialyl, de type cétosyl sont extrêmement sensibles à l'action des acides et leur hydrolyse devrait donc permettre de libérer facilement et en totalité les acides sialiques du reste de la molécule glycoprotidique. Malheureusement, comme dans le cas des acides uroniques, certaines liaisons sialyl sont particulièrement résistantes et leur hydrolyse chimique s'accompagne souvent d'une destruction partielle des acides sialiques. En outre, l'action des sialidases est rarement complète. La chromatographie des acides sialiques sera donc essentiellement qualitative et, dans le cas où plusieurs acides sialiques seront présents dans les glycoprotides, la détermination de leurs rapports molaires ne pourra s'effectuer que dans la mesure où l'expérimentateur aura la certitude d'avoir hydrolysé quantitativement les liaisons sialyl.

I - HYDROLYSE DES LIAISONS SIALYL

Les liaisons sialyl peuvent être hydrolysées par voie chimique ou par voie enzymatique.

A - HYDROLYSE CHIMIQUE DES LIAISONS SIALYL

Selon COURTOIS, LABAT et BARANCOURT (378), "l'hydrolyse des liaisons sialyl est un compromis entre la destruction et la libération des acides sialiques". Qu'elle soit le prélude à l'application de méthodes de dosage colorimétrique, comme celles de WARREN ou d'AMINOFF, ou de dosage chromatographique des acides sialiques, l'hydrolyse des liaisons sialyl doit faire l'objet d'une double étude critique portant sur la

stabilité, d'une part des acides sialiques eux-mêmes, et, d'autre part, des liaisons sialyl, vis-à-vis de l'agent d'hydrolyse utilisé.

Les solutions diluées d'acide chlorhydrique et d'acide sulfurique sont le plus généralement employées, à des concentrations, à des températures et pendant des temps variables, pour hydrolyser les liaisons sialyl des sialo-conjugués. Toutefois, d'autres agents d'hydrolyse ont été préconisés par différents auteurs, comme l'acide trichloracétique 0,3 N à 100°C pendant 8 minutes KOHN, WINZLER et HOFFMAN (379) ou à 5 p.100, à 80°C, pendant 1 heure SAIFER et GERSTENFELD (380) ; RZECZYCKI (381) ,mais ces procédés n'ont reçu qu'un nombre limité d'applications et n'ont pas fait, en outre, l'objet d'études critiques. Leur utilisation n'est donc pas à l'abri de causes d'erreur.

Les conditions d'hydrolyse sulfurique ou chlorhydrique généralement appliquées à la rupture des liaisons sialyl sont les suivantes :

- Autohydrolyse lorsque la teneur en acides sialiques du composé est très élevée comme dans le cas des mucines sous-maxillaires (BLIX et coll. (382).

- HCl ou SO_4H_2 0,1 N, à 80°C, pendant des temps variant de 30 minutes à 2 heures.

- HCl ou SO_4H_2 0,01 N, à 100°C, pendant des temps variant de 30 minutes à 2 heures.

- pH 2 (acide sulfurique), à 37°C, pendant 24 h (PUSZTAI et MORGAN) (383).

1 - STABILITE DES ACIDES SIALIQUES VIS-A-VIS DES ACIDES.

Plusieurs auteurs ont étudié la stabilité des acides sialiques vis-à-vis des acides employés dans les conditions précédentes (voir, en particulier, AMINOFF (384) ; BERGGÅRD et ODIN (385); GIBBONS (386) ; GOTTSCHALK (387) ; KARKAS et CHARGAFF (388)). Les conclusions auxquelles ils sont parvenus peuvent se résumer de la manière suivante :

a - Les liaisons N-acyl sont plus stables que les liaisons O-acyl dont la labilité est voisine de celle de la liaison sialyl . La plus grande

prudence doit donc être observée dans le choix des conditions de l'hydrolyse d'acides sialiques O-substitués et dans l'interprétation des chromatogrammes quantitatifs.

b - Les acides N-acétyl et N-glycolyl-neuraminiques sont stables pendant 1 heure à 100°C vis-à-vis des acides chlorhydrique et sulfurique 0,01 N (Tableau IX ; p. 116). Le risque de destruction augmente quand on applique à l'hydrolyse une concentration en acide 0,1 N (à 80°C) utilisée par de nombreux auteurs (Tableaux X et XI ; p.127 et figure 26 ; p. 128) et atteint 4 à 7 p.100 au bout de 0,5 à 1 heure.

c - La méthode de dosage colorimétrique des acides sialiques par l'acide thiobarbiturique de WARREN (389) ne doit pas être utilisée dans les expériences de contrôle de la stabilité des acides sialiques vis-à-vis des agents d'hydrolyse. AMINOFF (390) et KARKAS et CHARGAFF (391) ont, en effet, observé que la méthode à l'acide thiobarbiturique indiquait une destruction des acides neuraminiques sous l'action de l'acide chlorhydrique, tandis que les procédés au résorcinol et au réactif d'EHRlich conduisaient à des conclusions opposées (voir le tableau X ; p.127 et la figure 26 ; p. 128). Selon KARKAS et CHARGAFF (392) cette cause d'erreur est due, soit à un phénomène de dimérisation de l'acide sialique, soit à la dégradation de celui-ci en dérivés du pyrrole qui ne donnent pas d'acide formylpyruvique au cours de l'oxydation périodique mais qui réagissent avec le résorcinol et le p- diméthylamino-benzaldéhyde. Selon GIBBONS (393), l'acide chlorhydrique 0,1 N favoriserait la formation de lactones qui sont indosables par la méthode à l'acide thiobarbiturique, mais qui réagissent avec le résorcinol et le p- diméthylamino-benzaldéhyde. Pour la même raison, le procédé de purification des acides sialiques sur colonnes d'échangeurs d'anions décrit par SVENNERHOLM (394) doit être rejeté car les lactones passent dans le liquide effluent (GIBBONS) (395).

d - Il convient d'attirer l'attention sur le point important suivant : les résultats concernant la stabilité des acides sialiques "libres" vis-à-vis des acides, ne peuvent en aucun cas être étendus aux acides

Tableau X

Stabilité de l'acide N-acétylneuraminique vis-à-vis de l'acide chlorhydrique (p. 100 d'acide N-acétylneuraminique retrouvé après traitement) (d'après AMINOFF) (396)

Temps de chauffage (en mn)	HCl 0,01 N à 84°C			HCl 0,1 à 100°C		
	Méthodes de dosage			Méthodes de dosage		
	Résorcinol	Ehrlich	Acide thio-barbiturique	Résorcinol	Ehrlich	Acide thio-barbiturique
5	105	99	100	99	99	100
30	98	100	80	95	92	98
60	98	91	65	96	80	83
120	82	84	44	88	81	77
240	58	65	26	80	71	61

Tableau XI

Stabilité de l'acide N-acétylneuraminique vis-à-vis de l'acide sulfurique 0,1 N à 80°C (p. 100 d'acide N-acétylneuraminique retrouvé après traitement) (d'après GIBBONS) (397)

Temps de chauffage (en h)	Acide N-acétylneuraminique retrouvé
0,5	95,9 ± 1,06
1	93,1 ± 1,35
2	87,6 ± 1,80
4	78,5 ± 2,20
7	67,2 ± 1,51
12	54 ± 2,01
24	33,5 ± 2,19

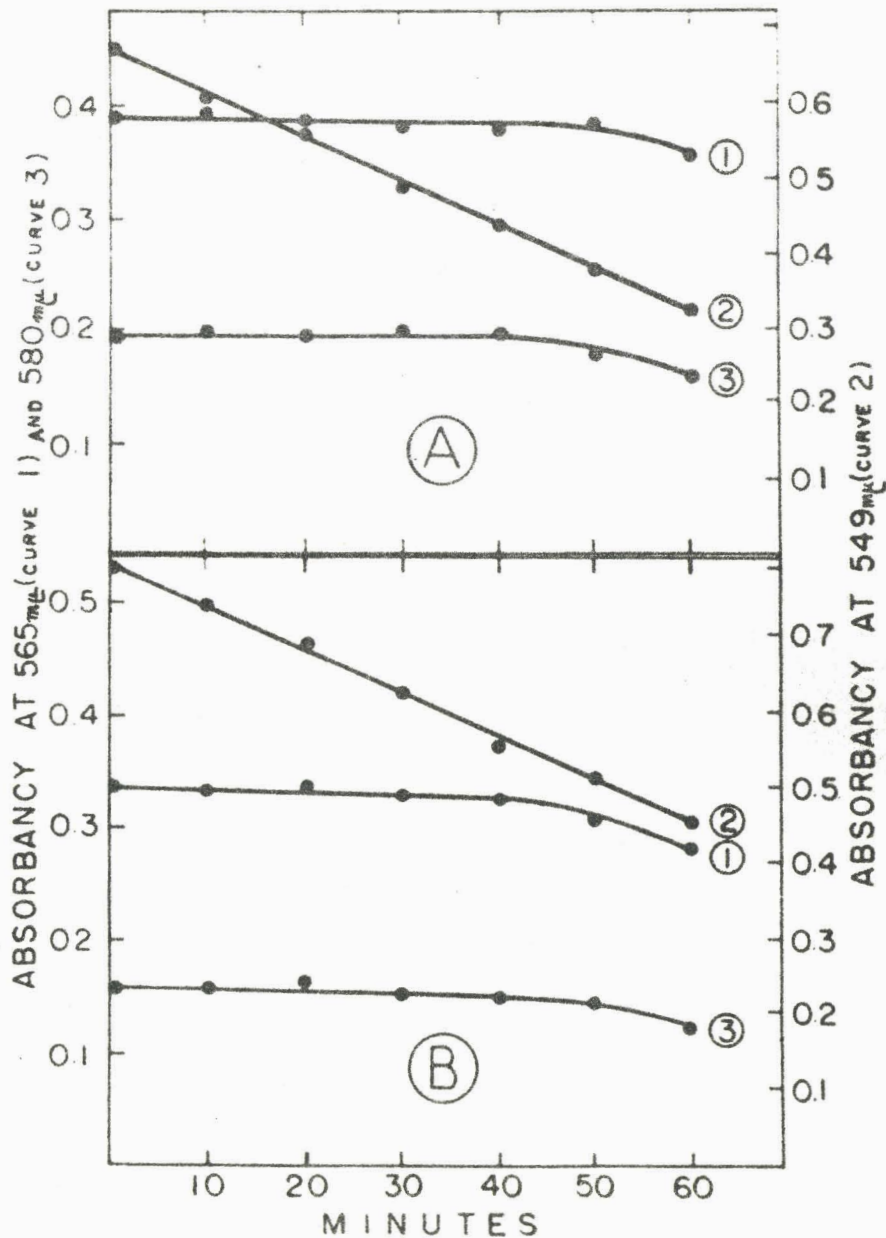


Figure 26

Action de l'acide chlorhydrique 0,1 N à 100°C sur des préparations d'acides sialiques de sérum de Boeuf (A) et de sérum humain (B). Les dosages ont été effectués avec les réactifs d'ERLICH (courbes 1), à l'acide thiobarbiturique (courbes 2) et au résorcinol (courbes 3) (d'après KARKAS et CHARGAFF) (398).

sialiques "conjugués" dont la labilité est accrue au moment de l'hydrolyse de la liaison sialyl. Par exemple, traité par HCl 1 N, à 100°C, pendant 3 h, l'acide N-acétylneuraminique perd 25 p.100 de son azote sous forme d'ammoniac (SPIRO et SPIRO (399) ; GRAHAM, MURPHY et GOTTSCHALK (400)). Il en perd 50 p.100 dans des conditions identiques quand il est sous une forme conjuguée (GOTTSCHALK et SIMMONDS (401) ; MURPHY et GOTTSCHALK (402) ; GOA (403) ; SPIRO et SPIRO (404)). Ce résultat s'explique par le fait que l'acide sialique est libéré sous la forme d'un ion carbonium instable dont une partie fait retour à la molécule stable d'acide sialique et une autre partie s'engage dans une voie de dégradation génératrice d'ammoniac (NEUBERGER, MARSHALL et GOTTSCHALK) (405).

e - Nous avons vérifié que, dans les conditions d'hydrolyse des liaisons sialyl, les autres glucides constituant la fraction glycanique de divers glycoprotéides ne sont pas libérés, à l'exception, toutefois, de faibles quantités de fucose, de N-acétyllactosamine et, plus rarement, de galactose. Selon certains auteurs (AYRAULT-JARRIER, CHEFTEL et POLONOVSKI (406) ; CHEFTEL et al. (407)) ; ces glucides seraient responsables de la dégradation par les acides des acides sialiques puisque la destruction de ces derniers commence lorsque les oses libres apparaissent dans l'hydrolysate.

2 - STABILITE DES LIAISONS SIALYL VIS-A-VIS DES ACIDES.

Il est bien établi à présent que l'hydrolyse acide des liaisons sialyl est incomplète (MONTREUIL et BISERTE (408) ; AMINOFF (409) ; BALAKRISHNAN et Mc ILWAIN (410) ; HASHIMOTO, TSUIKI, NIZAGAWA et PIGMAN (411) ; PAQUIN et PERCHERON (412) ; GIBBONS et ROBERTS (413) ; GIBBONS (414)) et, dans l'état actuel de nos connaissances de la structure des glycoprotéides, il est impossible de prévoir le degré d'hydrolyse de ces liaisons car il varie dans de larges proportions avec la nature de l'acide sialique et avec l'attache de ce dernier sur l'ose "subterminal". En outre, nos connaissances concernant la labilité des liaisons sialyl sont encore très fragmentaires et nous pouvons les résumer de la manière suivante :

a - Il n'existe pas de procédé général d'hydrolyse quantitative des liaisons sialyl et les conditions de l'hydrolyse doivent être déterminées pour chaque cas particulier. On effectuera donc des hydrolyses cinétiques avec les acides chlorhydrique ou sulfurique 0,01 N à 100°C et par l'acide sulfurique 0,02 N, à 37°C, pendant des temps variables en suivant la libération des différents acides sialiques en les dosant par la méthode colorimétrique de WARREN (dans la mesure où les causes d'erreur qu'elle comporte peuvent être évitées) ou mieux par chromatographie quantitative sur papier (voir p. 160). Le tableau XII (p. 121), emprunté à COURTOIS, LABAT et BARANCOURT (415), illustre ce mode opératoire.

b - On évitera l'emploi d'acides 0,1 N qui favorisent la lactonisation. Selon KARKAS et CHARGAFF (416), les meilleurs résultats sont obtenus à pH 2 et 3, à 100°C : l'hydrolyse du méthylglycoside de l'acide N-acétylneuraminique est, en effet, totale au bout de 25 minutes à pH 2 et de 30 minutes à pH 3 (Figure 27 ; p. 132).

c - Les liaisons 2,3-sialyl sont coupées plus lentement que les liaisons 2,4 (GIBBONS) (417).

d - L'estérification de la fonction carboxylique stabilise la liaison sialyl. KARKAS et CHARGAFF (418) ont, en effet, démontré que l'ester méthylique du méthylglycoside de l'acide N-acétylneuraminique restait intact dans les conditions où le méthylglycoside était totalement hydrolysé (pH 3, 100°C, 30 minutes) (Fig. 27 ; p. 132) et que même l'acide chlorhydrique 0,5 N ne parvenait à hydrolyser qu'une faible proportion du composé. Selon les auteurs, ce comportement s'expliquerait par le rôle important que joue l'hydrogène du groupement carboxylique en formant, par une liaison pont-hydrogène, un cycle à cinq sommets dans lequel s'intègre le groupement osidique (Fig. 28 ; p. 133).

Tableau XII

Etude cinétique de la libération de l'acide N-acétylneuraminique (+) de l'orosomucoïde humain (200 mg dans 100 ml SO₄ H₂ 0,1 N) exprimée en p.100 de l'acide sialique total (d'après COURTOIS, LABAT et BARANCOURT) (419).

Température d'hydrolyse	Durée de l'hydrolyse (en heures)												
	0,5	0,75	1	2	4	6	8	12	15	26	50	74	98
37°C	-	-	0	0	16	18	-	-	-	58	80	106	130
80°C	75	77,5	95	65	55	-	35	40	42	-	-	-	-

(+) Dosé par la méthode colorimétrique à l'acide thiobarbiturique de WARREN (420).

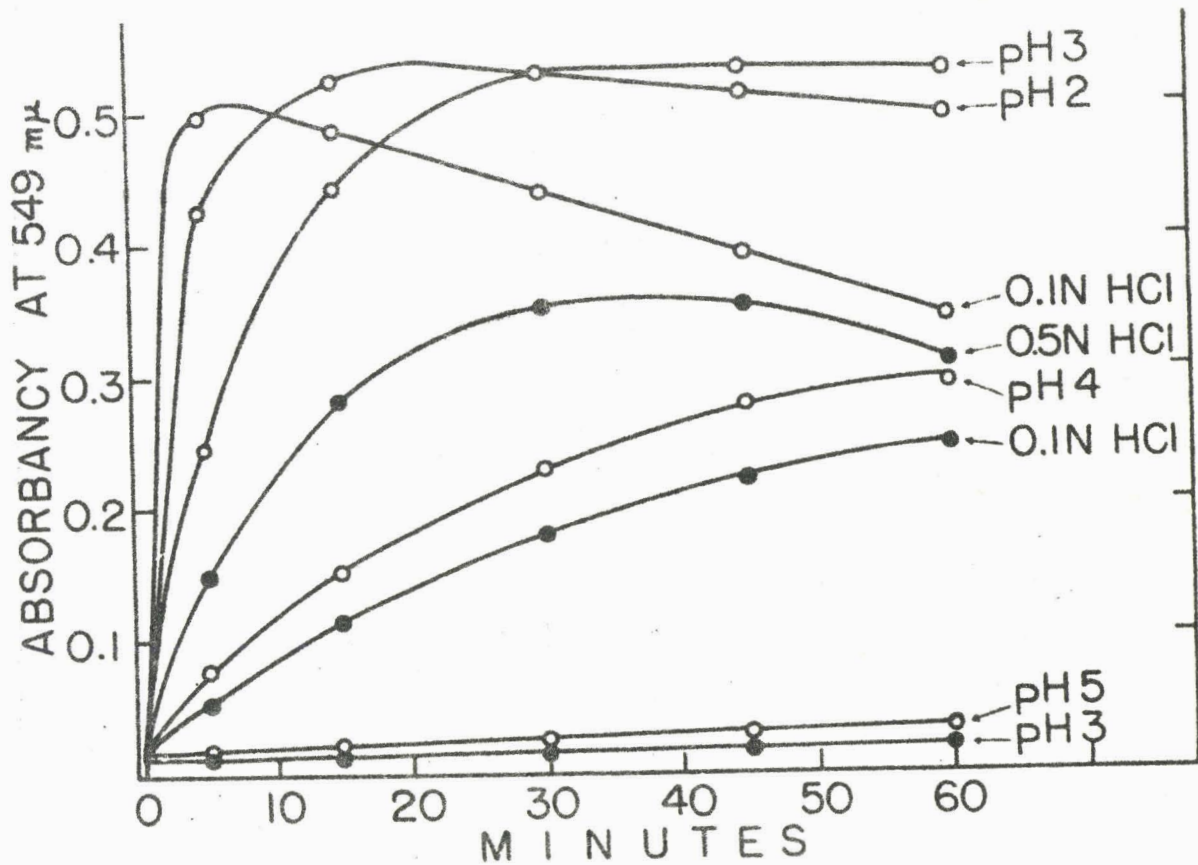


Figure 27

Hydrolyse du méthylglycoside de l'acide N-acétylneuraminique (—○—) et de son ester méthylique (—●—) à 100°C et à des concentrations variables en acide. Les dosages de l'acide sialique libre ont été effectués par la méthode à l'acide thiobarbiturique de WARREN (d'après KARKAS et CHARGAFF) (421).

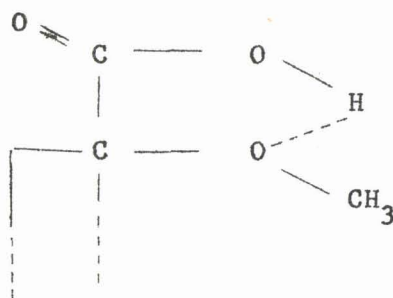


Figure 28

L'hydrolyse de ce dernier implique la fixation d'un proton sur l'oxygène du groupement méthoxy et cette fixation est grandement facilitée si le proton est déjà lié à celui-ci par une liaison hydrogène. Cette "catalyse interne" est inhibée et la liaison "sialyl" est stabilisée lorsque le groupement carboxylique est estérifié.

En outre, selon KARKAS et CHARGAFF (422), dans le cas de l'ester méthylique du méthylglycoside, la fonction ester elle-même, à cause de la substitution de la fonction semi-acétalique, est stabilisée vis-à-vis des acides et des alcalis.

Ces résultats sont importants car des liaisons mixtes - "ester" et glycosidiques - d'acides sialiques ont été mises en évidence dans l'acide colominique d'Escherichia coli (Mc GUIRE et BINKLEY)(423). Ainsi s'expliquerait la résistance particulière à l'hydrolyse acide de sialoglycannes et de sialomucoïdes d'origine bactérienne (AMINOFF (424) ; BARRY (425) ; BARRY, HAMM et GRAHAM (426)). En outre, on ne peut exclure a priori l'existence de liaisons "ester" dans d'autres sialo-conjugués.

e - Les sels de fer catalysent la destruction des acides sialiques (sans modifier le spectre d'absorption de la coloration donnée par la réaction de WARREN) (LUDEWIG et GLOVER) (426 bis).

B - HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES LIAISONS SIALYL.(*)

L'hydrolyse des liaisons sialyl peut être réalisée par des enzymes spécifiques (sialidases ou neuraminidases) extraits de Clostridium perfringens, de Vibrio cholerae, du Virus de l'influenza, du Diplococcus pneumoniae type I. Actuellement, les préparations de neuraminidase sont commercialisées (**)

L'hydrolyse est généralement effectuée à 37°C pendant 1 à 24 h suivant les auteurs, dans des tampons acétate à pH 4,8 dans le cas de la neuraminidase de C.perfringens, ou à pH 5,6 et en présence de chlorure de calcium 0,001 à 0,05 M dans le cas de la neuraminidase de Vibrio cholerae, ou encore dans un tampon phosphate de pH 6,5, dans le cas de la neuraminidase du Virus de l'influenza.

Comme dans le cas de l'hydrolyse acide, la libération des acides sialiques par les neuraminidases est rarement complète (FAILLARD (427) ; GIBBONS (428, 429) ; MONTREUIL et BISERTE (430) ; WARREN et SPICER (431)). GIBBONS (432), en particulier, a effectué une étude de l'action de la neuraminidase de Vibrio cholerae sur différents glycoprotides dont les résultats sont rassemblés dans le tableau XIII (p. 135). Ces mêmes recherches ont été effectuées par CASSIDY, JOURDIAN et ROSEMAN (433) (voir tableau XIII ; p. 135) avec la neuraminidase de Clostridium perfringens. Des résultats identiques ont été obtenus à propos des gangliosides dont 40 à 65p.100 seulement des acides sialiques sont libérés par la neuraminidase (CASSIDY, JOURDIAN et ROSEMAN (434) ; DAIN et al. (435) ; SVENNERHOLM (436), TRAMS et LAUTER (437)).

Ces résultats s'expliquent par la spécificité de l'enzyme dont l'action est liée à la nature de l'acide sialique, au type de liaison sialyl et à la structure du sialo-conjugué. Des nombreux travaux qui ont été effectués sur cette question, nous pouvons tirer les règles générales suivantes :

(*) Voir la revue générale de RAFELSON (437 bis).

(**) Nous utilisons au laboratoire la neuraminidase purifiée type V SIGMA de Clostridium perfringens.

Tableau XIII

Taux d'hydrolyse par les neuraminidases de Vibrio cholerae et de Clostridium perfringens des liaisons sialyl de divers sialoconjugués.

Origine de la neuraminidase	Nature du sialo conjugués	p.100 d'acides sialiques libérés (*)
<u>Vibrio cholerae</u> (**)	Mucopolysaccharide cervical de la Vache	47
	Mucopolysaccharide cervical humain	75
	Mucopolysaccharide bronchial humain	83
	Mucine sous-maxillaire bovine	45
	Mucine sous-maxillaire de la chèvre	92
	Mucine sous-maxillaire du Porc	90
<u>Clostridium perfringens</u> (***)	Sialyl-lactose bovin	99
	Sialyl-lactose humain	96
	Orosomucoïde	99
	Inhibiteur de l'hémagglutination (****)	99
	Mucine sous-maxillaire ovine	97 à 99
	Mucine sous-maxillaire bovine	21 à 50
	Mucine sous-maxillaire porcine	74 à 84
	Ganglioside du cerveau du Veau	43 à 44
	Sialomucoïde de Collacalia	97
Acide colominique	98	

- (*) Après 24 heures d'hydrolyse.
 (* *) d'après GIBBONS (438)
 (* *) d'après CASSIDY, JOURDIAN et ROSEMAN (439)
 (* *) KATHAN et WINZLER (440).

1 - D'après de nombreux auteurs, les neuraminidases possèdent essentiellement une activité N-acétylneuraminidasique. En effet, les liaisons N-acétylsialyl sont, en général, quantitativement hydrolysées. Au contraire, les liaisons de l'acide N-glycolylneuraminique sont coupées plus lentement (GIBBONS) (441). Quant à celles des acides N, O-acétylneuraminiques, elles résistent totalement à l'action des enzymes (FAILLARD (442, 443) ; GIBBONS (444, 445)). Selon ces auteurs, cette inhibition est levée par une hydrolyse alcaline douce des glycoprotides natifs (CO_3Na_2 0,05 N, à 100°C, pendant 20 minutes) (GIBBONS) (446) qui, en éliminant les groupements O-acétyl et en transformant les acides sialiques en acide N-acétylneuraminique (FAILLARD) (447), rend quantitative l'hydrolyse neuraminidasique.

2 - L'activité neuraminidasique ne semble pas être liée à l'origine de l'enzyme. La seule cause d'erreur que pourrait éventuellement apporter les préparations de neuraminidases est due à la présence de l'acide N-acétylneuraminique aldolase qui catalyse réversiblement la condensation de l'acide pyruvique et de la N-acylmannosamine et qui doit donc être recherchée systématiquement dans les échantillons d'enzymes selon le procédé décrit par GIBBONS (448) (voir p. 138) .

3 - Les neuraminidases coupent préférentiellement les liaisons 2,3-sialyl. Par exemple, le 3'-neuraminyl-lactose est plus rapidement hydrolysé que l'isomère 6' par la neuraminidase du Virus de l'influenza (KUHN et BROSSMER) (449).

4 - L'activité des neuraminidases est enfin liée à la structure du substrat.

En premier lieu, des empêchements stériques peuvent jouer un rôle protecteur des liaisons sialyl. Par exemple, l'hydrolyse enzymatique des liaisons sialyl de macromolécules natives comme les mucines sous-maxillaires ou le glycoprotéide urinaire de TAMM et HORSFALL est incomplète. Au contraire, elle est totale sur les produits de dégradation de ces mêmes composés par la pronase (GOTTSCHALK (450); LABAT et BERGER (450 bis)).

En second lieu, la substitution, au voisinage du point d'attache, de fonctions hydroxylées de l'ose lié à l'acide sialique, ralentit ou inhibe l'action des neuraminidases. Par exemple, alors que le 3'-N-acétylneuraminyl-lactose (Fig. 29 a) est quantitativement hydrolysé

neuraminiques O-substitués dont la labilité des groupes O-acylés est très voisine de celle de la liaison sialyl.

L'acide sulfurique est à préférer à l'acide chlorhydrique dont l'action est plus agressive et qui favorise, en outre, la formation de lactones.

Les conditions d'hydrolyse optimales sont les suivantes :

- SO_4H_2 0,01 N, à 100°C, pendant 1 h (*)
- pH 1 ou 2, à 37°C, pendant 24 h (*)

3 - L'hydrolyse enzymatique n'est applicable qu'aux acides N-acétyl et N-glycolylneuraminique. Lorsque des acides neuraminiques O-acylés sont présents dans les sialoconjugés, ceux-ci seront soumis à une hydrolyse alcaline ménagée ($\text{CO}_3 \text{Na}_2$ 0,05 N, à 100°C, pendant 20 mn) de manière à éliminer les fonctions O-acylés qu'inhibent l'action des neuraminidases.

En outre, on recherchera systématiquement, dans les préparations de neuraminidases, l'acide N-acétylneuraminique-aldolase dont la présence provoquerait la destruction des acides N-acétyl et N-glycolylneuraminiques.

Recherche de la N-acétylneuraminique-aldolase.

On applique les deux procédés suivants :

a - Procédé de GIBBONS (451).

A 1 ml d'une solution d'acide N-acétylneuraminique à 1 g p.100 ml de tampon acétate de pH 5,75 et de μ 0,1, on ajoute 2 ml de la préparation de neuraminidase. Après un séjour à 37°C, pendant 18 h à 24 h, on dose, dans la solution, l'acide N-acétylneuraminique et la N-acétylmannosamine éventuellement libérée.

(*) Ces temps d'hydrolyse sont purement indicatifs et nous rappelons qu'ils doivent être déterminés, pour chaque sialoconjugé, par une étude cinétique de la libération des acides sialiques.

b - Procédé de COMB et ROSEMAN (452)

Le protocole expérimental est identique au précédent, à la différence près que l'hydrolyse est effectuée dans un tampon de phosphate de potassium 0,1 M de pH 7,2.

II - PURIFICATION DES ACIDES SIALIQUES

La purification des acides sialiques est généralement effectuée par chromatographie sur échangeurs d'anions. Les différents procédés qui ont été décrits dérivent de la méthode originale de SVENNERHOLM (453) destinée à purifier l'acide N-acétylneuraminique : passage successif des hydrolysats sur une colonne de Dowex-50 × 8 (mesh 50-100 ; forme acide), puis sur une colonne de Dowex-1 × 8 (mesh (50-100 ; forme formiate) et élution de l'acide sialique de l'échangeur d'anions par un gradient de concentration en acide formique variant de 0 à 0,7 N. L'acide sialique est déplacé par une concentration en acide formique 0,3 N.

Le procédé de SVENNERHOLM a été généralisé et de nombreuses méthodes ont été décrites. Elles diffèrent, d'une part, par la composition de la solution d'élution dont les constituants doivent être facilement éliminés du liquide effluent et, d'autre part, par la nature de l'échangeur d'anions :

- Dowex 1 × 8 ; mesh 100-200 ; forme formiate ; élution à 2°C avec un gradient de concentration en acide formique variant de 0 à 0,4 M (RIBADEAU-DUMAS et ALAIS) (454).

- Dowex 1 × 8 ; mesh 200-400 ; forme formiate ; 8,3 × 20 cm ; élution à 4°C par l'acide formique 0,4 M (250 ml pour 1 mg d'acide N-acétylneuraminique) (WARREN et FELSENFELD) (455).

- Dowex 1 × 4 ; forme formiate ; élution par un gradient de concentration en acide formique, ou Dowex 1 × 4 ; forme acétate ; élution par un gradient de concentration en acétate de pyridine, à pH 4,5 (Mc GUIRE et BINKLEY) (456).

Ces différents procédés de purification des acides sialiques en vue de leur isolement à l'état pur sont parfaitement applicables au dosage chromatographique de ces composés.

Procédé appliqué au Laboratoire

Au laboratoire, nous appliquons le procédé de SVENNERHOLM (457), modifié en remplaçant l'élution des acides sialiques à l'aide d'un gradient de concentration en acide formique par une élution effectuée avec une solution du même acide 0,3 N. Le mode opératoire est le suivant :

L'hydrolysats sulfurique refroidi ($\text{SO}_4 \text{H}_2$ 0,01 N, à 100°C , pendant 1 heure) du sialoconjugué est amené à pH 6 par l'addition d'eau de baryte sous contrôle permanent au pH-mètre pour éviter d'atteindre à aucun moment une valeur élevée de pH, car la dégradation des acides sialiques est très rapide en milieu fortement alcalin et donne lieu à la formation d'acide pyrrole-2-carboxylique (GOTTSCHALK) (458). Le précipité formé entraîne une grande partie des produits de dégradation protidique. Il est éliminé par filtration ou par centrifugation et lavé plusieurs fois avec une solution aqueuse d'acide acétique à 1 p.100 (v:v).

Un volume d'hydrolysats, renfermant de 0,25 à 10 mg d'acide sialique est amené à pH 8-9 avec une solution diluée de carbonate de sodium et abandonné, pendant 30 à 60 minutes, à la température du laboratoire. Ce traitement est destiné à ouvrir les ponts lactone qui se seraient formés, en milieu acide, au cours de l'hydrolyse. On vérifiera, toutefois, l'absence de toute forme d'acide sialique dans le liquide effluent à l'aide des méthodes colorimétriques à la diphenylamine ou au résorcinol, en évitant d'employer les méthodes à l'acide thiobarbiturique qui ne révèlent pas les dérivés des acides sialiques non retenus par l'échangeur d'anions (GIBBONS) (459).

La solution est ensuite passée, à 4°C, successivement sur une colonne d'échangeur de cations (Dowex 50 x 8 ; mesh 25-50 ; forme acide (*) ; 1 x 10 cm) puis sur une colonne d'échangeur d'anions (Dowex 1 x 8 ; mesh 200-400 ; forme formiate ; 1 x 10 cm). Après un lavage soigneux des colonnes à l'eau distillée, les acides sialiques sont déplacés de l'échangeur d'anions par le passage de 50 ml d'acide formique 0,3 N (SVENNERHOLM) (460). La solution d'élution est lyophilisée et le résidu sec est repris par de l'eau distillée. Il est ensuite soumis à l'analyse chromatographique.

D'autres méthodes de purification des hydrolysats ont été proposées par différents auteurs. BEZKOROVAINY (461), par exemple, applique le procédé modifié d'extraction méthanolique de BLIX et LINDBERG (462) : le résidu sec de l'hydrolysat chlorhydrique est lyophilisé et extrait, à 4°C, quatre fois avec du méthanol anhydre pendant 4 heures. Cette méthode ne nous a pas donné satisfaction car la purification est imparfaite. D'autre part, la dissolution des acides sialiques est incomplète et on court, en outre, le risque d'une estérification de ces composés.

III - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Jusqu'à présent, l'identification et le dosage des acides sialiques sont réalisées seulement par chromatographie sur papier, car les procédés d'électrophorèse et de chromatographie sur couche mince et en phase gazeuse n'ont pas encore été appliqués à la séparation de mélanges complexes d'acides sialiques. Les principes de ces dernières méthodes seront exposés à la fin du paragraphe suivant sous la rubrique "Méthodes diverses".

(*) La forme acide de l'échangeur de cations et la forme formiate de l'échangeur d'anions sont obtenues suivant le procédé général décrit à la page 66 .

A - SYSTEMES-SOLVANTS

De nombreux systèmes-solvants ont été décrits pour séparer les acides sialiques par chromatographie sur papier (voir les revues générales de BLIX, LINDBERG, ODIN et WERNER (463) ; GOTTSCHALK (464) ; NEUBERGER et MARSHALL (465) ; WHITEHOUSE et ZILLIKEN (466) ; ZILLIKEN et WHITEHOUSE (467)). L'expérience que nous avons acquise au laboratoire à ce sujet nous a permis de retenir les systèmes-solvants suivants :

1) - n-butanol/pyridine/HCl 0,1 N (5 : 3 : 2) (BOURRILLON et MICHON) ; papier Schleicher et Schüll 2043 b lavé aux acides ; chromatographie descendante (voir p. 71). Ce système-solvant donne une bonne résolution des acides N-glycolyl et N-acétylneuraminiques.

2) - n-butanol/n-propanol/HCl 0,1 N (1:2:1) (SVENNERHOLM et SVENNERHOLM) (468) ; papier Whatman n° 1 lavé avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N, puis avec de l'eau et, enfin avec un mélange de deux volumes de chloroforme et d'un volume de méthanol (*) ; chromatographie descendante de 18 heures.

Ce système-solvant donne une excellente résolution des acides N-glycolyl et N-acétyl-neuraminiques (R_F , respectivement : 0,34 et 0,45). Les acides sialiques O-substitués s'accumulent en une tache unique qui permet de les mettre en évidence au niveau du "front de démixion" du système-solvant. Lorsque cette tache apparaît, les techniques chromatographiques suivantes sont appliquées.

3) - Acétate d'éthyle/acide acétique/eau (3:1:3) (NORDAL et OISETH) (469) ; papier Whatman n° 3 ; chromatographie descendante pendant 18 à 24 heures.

4) - n-butanol/pyridine/eau (6:4:3) (GOTTSCHALK) (470).

L'utilisation des systèmes-solvants 3 et 4 permet de séparer les acides N-glycolyl-, N-acétyl-, N,O-diacétyl-, N,O-triacétylneuraminiques.

(*) Ce traitement permet d'éviter le dédoublement de la tache de l'acide N-acétylneuraminique.

NOTA : METHODES DIVERSES

1 - La chromatographie en couche mince des acides sialiques a reçu peu d'applications et les procédés décrits jusqu'à présent ne donnent pas des résultats satisfaisants. Par exemple, la méthode de GRANZER (473) (chromatographie sur Kieselgel G, activé 15 mn à 120°C dans les systèmes-solvants propanol/eau (7:3) et propanol/solution d'ammoniaque/eau (6:2:1)) ne permet pas de séparer les acides N-glycolyl et N-acétylneuraminiques.

2 - L'électrophorèse sur papier dans des solutions de pyridine acétique tamponnées à des pH variant entre 3 et 6 (WHITEHOUSE et ZILLIKEN) (474) ou dans des solutions de borate tamponnées à pH 8,2 (7 V/cm) (JAMIESON) (475) ne semble pas avoir reçu d'applications nombreuses.

3 - La chromatographie en phase gazeuse n'a reçu, jusqu'à présent, que de rares applications : voir CABEZAS (476) (dosage des acides N-acétyl et N-glycolylneuraminiques) en un seul pic d'acide triméthylsilyl neuraminique provenant de la désacétylation de ces derniers au cours de la méthanolyse ; voir aussi CLAMP et coll. (p.123) qui ont mis au point une méthode de dosage, en un chromatogramme unique, des triméthylsilyl-méthyl-glycosides des oses "neutres", de la glucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique.

B - REVELATION DES ACIDES SIALIQUES

La révélation des acides sialiques est effectuée à l'aide des réactifs suivants dont la limite de sensibilité est de l'ordre de 20 à 50 µg pour les réactifs au p-diméthylamino-benzaldéhyde et au résorcinol et de l'ordre de 5 à 10 µg pour les réactifs à l'orcinol et à l'acide thiobarbiturique.

1) Réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM
(477)

p-diméthylaminobenzaldéhyde	0,5 g
Acide trichloracétique	5 g
Ethanol/eau (v:v)	20 ml

Après dissolution, ajouter 60 ml de n-butanol.

Après chauffage à 100°C des chromatogrammes pendant 10 à 15 mn, les acides sialiques donnent des taches bleu-violacé sur un front jaune.

Nota. Les N-acétylosamines donnent, à forte concentration, la même coloration. Leur vitesse de migration élevée élimine, toutefois, toute cause d'erreur.

2) Réactif au résorcinol de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (478)

Résorcinol	1 g
Acide trichloracétique	15 g
Ethanol/eau (v:v) contenant 0,2 ml d'une solution 0,1 M de sulfate de cuivre	20 ml

Après dissolution, ajouter 60 ml de n-butanol.

Dans les mêmes conditions que précédemment, les acides sialiques donnent des taches brunâtres sur un fond rose.

3) Réactif à l'orcinoï trichloracétique

Le réactif à l'orcinoï trichloracétique mis au point par KLEVSTRAND et NORDAL (479) pour révéler les cétooses présents dans des extraits de Crassulacées s'applique parfaitement à la révélation des acides sialiques (voir aussi BÖHM et BAUMEISTER) (480). Le réactif est préparé en dissolvant, dans 100 ml d'eau saturée de n-butanol, 0,5 g d'orcinoï et 15 g d'acide trichloracétique. Le système biphasique obtenu est agité vigoureusement avant d'être pulvérisé sur les chromatogrammes. Ceux-ci sont ensuite maintenus à 105°C pendant 15 à 20 mn. Les acides sialiques donnent une coloration brun-orange.

Nota. Ce réactif de BIAL modifié, n'est pas spécifique des acides sialiques. Il donne aussi une coloration jaune avec les cétohexoses et une coloration bleue ou verte avec les cétoheptoses.

4) Réactif à l'acide thiobarbiturique de WARREN (481)

On imprègne d'abord le papier avec une solution d'acide sulfurique 0,1 N, puis d'une solution de periodate de sodium 0,05 M dans l'acide sulfurique 0,05 N.

Après 15 minutes de contact, on pulvérise sur le chromatogramme un mélange d'éthylène-glycol, d'acétone et d'acide sulfurique concentré (50:50:0,3) (v:v:v).

Dix minutes plus tard, on imprègne le papier avec une solution aqueuse de thiobarbiturate de sodium à 6 p.100 (p:v) (voir Nota b ci-dessous).

Après un temps de chauffage de 5 à 10 minutes, à 100°C, les acides sialiques donnent des taches roses sur un fond jaune qui fournissent une fluorescence rouge très intense en lumière ultraviolette vers 260-280 m μ (lampe Mineralight).

Nota

a - Les acides sialiques 0-7-substitués ne donnent pas la réaction de WARREN. En outre, les cétooses réagissent dans les mêmes conditions et donnent une coloration jaune pâle (voir, à ce sujet, PERCHERON) (482).

b - La solution de thiobarbiturate de sodium est préparée en dissolvant 4,5 g d'acide thiobarbiturique dans un peu d'eau distillée et en ajustant la solution à pH 7 avec de la soude 2 N. On complète ensuite à 100 ml avec de l'eau distillée.

C - IDENTIFICATION DES ACIDES SIALIQUES

1 - PROCEDES CHROMATOGRAPHIQUES

L'identification des acides sialiques présents dans une solution peut être réalisée en comparant leur vitesse de migration chromatographique à celles de composés purs. Les solutions de ces derniers peuvent être effectuées à partir d'acides sialiques fournis par les firmes commerciales. Toutefois, les produits sont d'un prix élevé et nous préférons, au laboratoire, préparer, à partir de la mucine sous-maxillaire bovine un mélange des acides N-glycolyl, N-acétyl, N-O-7,8 (ou 9)-diacétyl et N-O-triacétylneuraminiques. L'acide N-O-4-diacétylneuraminique peut être obtenu dans les mêmes conditions à partir de la mucine équine.

Extraction des acides sialiques des mucines sous-maxillaires (*)

Nous appliquons un mode opératoire adapté de ceux de BLIX,

(*) Voir BLIX et LINDBERG (483) ; BLIX, LINDBERG, ODIN et WERNER (484) ; GOTTSCHALK (485) ; SVENNERHOLM (486) ; et WHITEHOUSE et ZILLIKEN (487).

LINDBERG, ODIN et WERNER (488) et de SVENNERHOLM (489) :

Les glandes salivaires, coupées en petits morceaux, sont extraites, plusieurs fois, par incubation dans de l'eau distillée (3 à 5 vol.) pendant 24 h.

Les suspensions de mucine sont réunies et on ajoute de l'acide chlorhydrique 1 N jusqu'à dissolution de la mucine. Celle-ci est reprécipitée par addition de plusieurs volumes d'eau distillée. Cette manipulation est répétée une ou deux fois. La mucine est enfin lavée à l'eau distillée, à l'éthanol et à l'éther, puis séchée.

40 g de mucine sont suspendus dans 400 ml d'eau distillée et la suspension, constamment agitée, est amenée en 30 minutes à la température de l'ébullition qui est maintenue pendant 1 heure. L'hydrolysate est refroidi à la température du laboratoire, débarrassé de la fraction insoluble par centrifugation et passé successivement sur une colonne de Dowex 50 x 8 (mesh 25-50 ; forme acide (*) ; 3 x 30 cm) et sur une colonne de Dowex 1 x 8 (mesh 50-100 ; forme formiate (*) ; 3 x 30 cm (**)). La colonne d'échangeur d'anions est soigneusement lavée à l'eau distillée et les acides sialiques sont déplacés par le passage d'une solution aqueuse d'acide formique 0,3 N. Le fractionnement est effectué avec un collecteur de fractions et l'élution des acides sialiques est suivie à l'aide d'une méthode de dosage des acides sialiques totaux (méthode à la diphenylamine ou au résorcinol). Les solutions effluentes contenant de l'acide sialique sont rassemblées et lyophilisées. Le rendement est d'environ 1 g d'acides sialiques totaux.

Nota : La libération des acides sialiques peut encore être effectuée par une hydrolyse sulfurique (400 ml d'acide sulfurique 0,01 N pour 40 g de mucine ; 100°C pendant 30 à 60 mn). Dans ce cas,

(*) Les formes acide de l'échangeur de cations et formiate de l'échangeur d'anions sont obtenus en appliquant les modes opératoires décrits à la page 66

(**) 1 à 2 g d'acides sialiques peuvent être purifiés sur cette colonne.

l'hydrolysate est amené à pH 6 par l'addition d'eau de baryte et débarrassé des composés insolubles par centrifugation avant d'être soumis à la chromatographie sur colonnes dans les conditions décrites ci-dessus.

2 - DETERMINATION DES PROPRIETES PHYSIQUES DES ACIDES SIALIQUES (*)

L'application des critères physiques permet l'identification rigoureuse des acides sialiques. Malheureusement, la plupart d'entre eux nécessitent des quantités relativement élevées de substances.

Nous avons rassemblé dans le tableau XIV (p. 148), les caractères de cristallisation et les valeurs des pouvoirs rotatoires spécifiques et des points de fusion des différents acides sialiques.

Les spectres de diffraction des rayons X sont caractéristiques des acides sialiques (BLIX, LINDBERG, WERNER et ODIN (490) ; BLIX, LINDBERG, WERNER et ODIN (491)). Ce procédé ne représente cependant pas un critère absolu d'homogénéité des acides sialiques car les acides N-glycolyl et N-acétylneuraminiques donnent des cristaux mixtes qui fournissent le diagramme de l'un seulement des deux acides sialiques (ATTERFELT et coll. (492) ; BLIX, LINDBERG, WERNER et ODIN (493)) : de l'acide N-acétylneuraminique jusqu'à une proportion de 75 p.100 de ce dernier et de l'acide N-glycolylneuraminique à partir d'une proportion de 50 p.100 de celui-ci (ABRAHAMSON, FISCHMEISTER et SVENNERHOLM) (495).

La spectrophotométrie dans l'infra-rouge représente le procédé d'identification de choix car le tracé des spectres d'absorption est très spécifique de chaque acide sialique (FISCHMEISTER) (496) (Fig. 30 ; p. 149).

3 - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES RADICAUX ACYL

L'identification et le micro-dosage des fonctions O- et N-acyl apporte des renseignements précieux sur la nature des acides sialiques.

(*) Voir : BLIX, LINDBERG, ODIN et WERNER (497) ; GOTTSCHALK (498) ; WHITEHOUSE et ZILLIKEN (499).

Tableau XI V

Propriétés physiques des acides sialiques.

	$[\alpha]_D^{22^\circ}$ (*)	P. F. (**)	Cristallisation
N-acétyl	- 32°	179-181°C	Etoiles de fines aiguilles
N-glycolyl	- 32°	185-187°C	Etoiles d'aiguilles épaisses
4-O-acétyl-N-acétyl	- 59°	183-187°C	Longues aiguilles
7-O-acétyl-N-acétyl	+ 6 à 8°	134-140 °C	Plaquettes
O-diacétyl-N-acétyl	+ 9°	130-131°C	Aiguilles ou prismes
Méthoxy-N-acétyl	- 55°	env. 200°C	Eventails de fines aiguilles

(*) En solution aqueuse. Les acides sialiques ne donnent pas le phénomène de mutarotation, sauf le 7-O-acétyl-N-acétyl $\left([\alpha]_D^{22^\circ} - 17^\circ \text{ au bout de 400 h} \right)$.

(***) Points de décomposition.

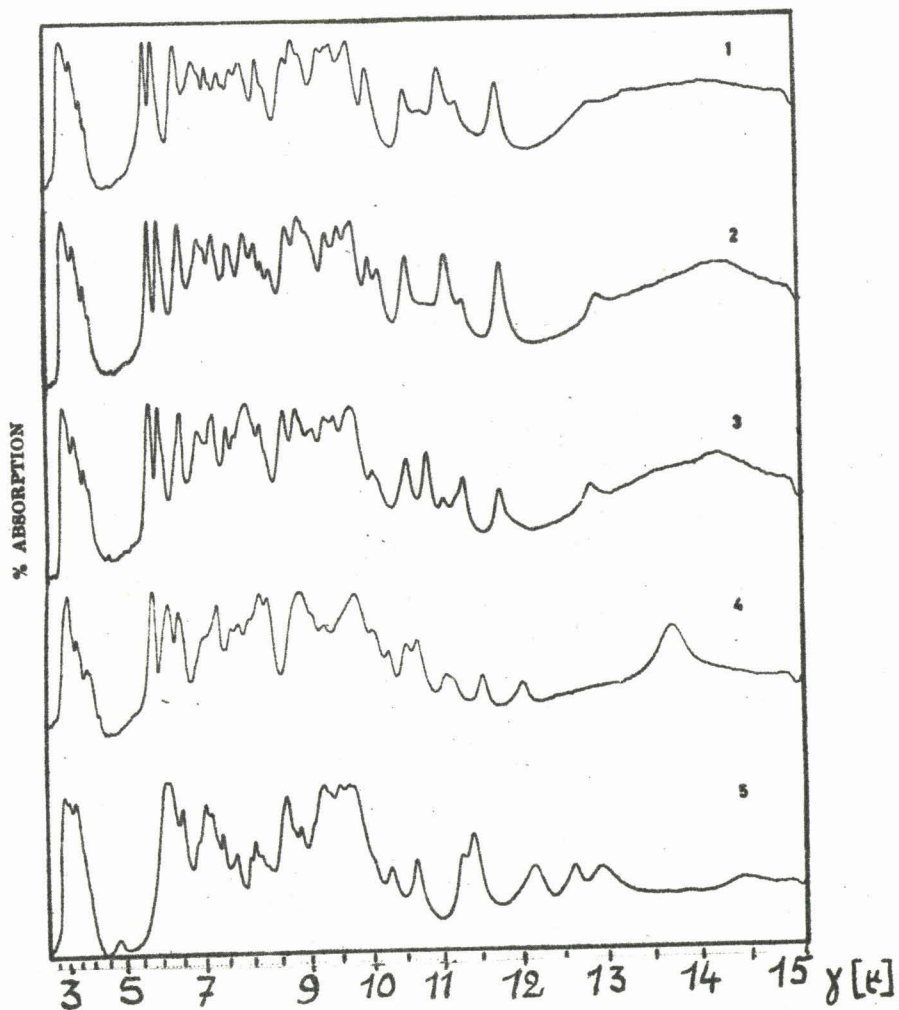


Figure 30

Spectres d'absorption de l'infra-rouge par les acides sialiques
1 : N-glycolyl ; 2 : N-acétyl ; 3 : O-4-acétyl-N-acétyl ; 4 : O-7-
-acétyl-N-acétyl ; 5 : acide méthoxyneuraminique (d'après FISCH-
MEISTER) (500).

La discrimination entre les deux types de fonctions est réalisée en se fondant sur la grande labilité des liaisons O-acyl.

a - RUPTURE DES LIAISONS ACYL (*)

La rupture des liaisons acyl peut être réalisée par hydrolyse, par éthanolyse ou par hydrazinolyse.

α - Hydrolyse

- Hydrolyse en milieu alcalin. Dans des solutions alcalines diluées, seules les liaisons O-acyl sont hydrolysées. Les modalités de l'hydrolyse varient avec la nature du composé O-acylé et les conditions d'hydrolyse les plus diverses ont été proposées :

- KOH 0,36 N, à 0°C, pendant 2 ~~mn~~ ou à pH 8 pendant 105 ~~mn~~ pour hydrolyser totalement les liaisons O-acyl du polyoside de Bacillus anthracis (SMITH et ZWARTOUW) (501).

- NaOH 0,1 N, à 24°C qui libère la moitié des groupements O-acylés de Streptococcus faecalis (ABRAMS) (502) et qui hydrolyse totalement l'acétate d'éthyle en 30 mn (Résultats personnels).

Les conditions de l'hydrolyse des liaisons O-acyl doivent donc être fixées pour chaque constituant à la suite d'une étude cinétique de la libération des acides effectuée avec des concentrations en alcali et des temps progressivement croissants.

- Hydrolyse en milieu acide. L'hydrolyse acide s'applique aux liaisons N-acyl de composés natifs ou de composés préalablement soumis à l'hydrolyse alcaline, quand des fonctions N- et O-acyl coexistent dans sa molécule.

Divers acides sont utilisés dans des conditions variables :

- acide p-toluènesulfonique 1,5 N, à 100°C, pendant 3 à 6 h

(*) Voir la revue générale de NEUBERGER et MARSHALL (503)

(AMINOFF et coll. (504) ; CHANEY et WOLFROM (505) ; GRANT (506)) : t/2 de la N-acétyl glucosamine : 30 mn (AMINOFF et coll.) (507) .

- acide chlorhydrique 1 N (t/2 de la N-acétylglucosamine: 1,2 h (MOGGRIDGE et NEUBERGER) (508)) ou 2 N, à 100°C, pendant 3 à 6 h.

- acide sulfurique 0,1 N (t/2 de la N-acétylglucosamine : 4 h (MORGAN et ELSON) (509)) à 6 N, à 100°C, pendant 2 h GIBBONS (510) ;

- résine polystyrène sulfonique soluble 0,0135 N, à 86°C (t/2 de la N-acétylglucosamine : 45 h) (PAINTER et MORGAN) (512).

Dans des conditions d'hydrolyse identiques, les liaisons O-acyl sont beaucoup plus labiles. Par exemple, dans l'acide chlorhydrique 0,05 N, à 25°C, la demi-vie des esters de l'acide acétique varie de 3 à 4 h et l'hydrolyse croît linéairement avec la concentration de l'acide (HAMMETT (513) ; INGOLD (514)).

Comme dans le cas des liaisons O-acyl, l'hydrolyse quantitative des fonctions N-acyl fera l'objet d'une étude cinétique, car elle varie avec la structure des composés. Par exemple, les liaisons N-acyl de la N-acétylglucosamine sont stabilisées quand le groupement réducteur est engagé dans une liaison glycosidique (MOGGRIDGE et NEUBERGER (515) ; AMINOFF et coll. (516)).

β - Méthanolyse. Divers procédés d'alcoolyse des liaisons O- et N-acyl ont été décrits (voir, par exemple, GRANT (517) ; WOLFROM et THOMPSON (518) ; LUDOWIEG et DORFMAN (519)). La méthode décrite par ces derniers auteurs est le plus généralement appliquée : chauffage à 100°C, pendant 4 h, en présence de méthanol anhydre 2 N en acide chlorhydrique (SPIRO) (520) ; distillation des esters méthyliques suivie d'un dosage colorimétrique après transformation en acides hydroxamiques (LUDOWIEG et DORFMAN) (521) (sensibilité 1 à 10 μ M) ou par chromatographie en phase gazeuse (voir p. 123 et 143).

Les fonctions O-acyl peuvent être spécifiquement rompues par le méthoxyde de sodium à 20°C. Les esters méthyliques formés sont distillés et dosés par la méthode colorimétrique aux hydroxamates de LUDOWIEG et

et DORFMAN (522).

γ - Hydrazinolyse. L'hydrazine coupe, spécifiquement, en quelques minutes, les liaisons O-acyl. Sur ce principe, plusieurs méthodes de dosage des fonctions O-acétyl ont été décrites. Dans des conditions plus brutales (100°C pendant 8 à 20 h), les liaisons N-acyl sont aussi rompues (PHILLIPS) (524). Les hydrazides formées sont converties en dérivés dinitrophénylés qui sont dosés par chromatographie quantitative sur papier (BLOCK et coll. (525) ; PHILLIPS (526^a, 526^b) sur colonne de polycaprolactame (Ultramid BM) (HÖRMANN et JOSEPH) (527) ou sur couche mince de Silicagel G (HÖRMANN et JOSEPH) (528). Le procédé est très sensible puisque 0,1 à 1 μ M d'acide acétique peut être déterminé. Malheureusement, les erreurs de dosage atteignent 30 p.100.

δ - Hydroxylaminolyse.

L'hydroxylamine en milieu alcalin (pH 7 à 9 pour les composés de faible poids moléculaire ; pH 11 pour les composés de poids moléculaire élevé) coupe sélectivement, à 20°C, les liaisons O-acyl. Les hydroxamates formés sont ensuite dosés colorimétriquement (voir, par exemple, HESTRIN (529) ; Mc COMB et Mc READY (530) (p. 154).

CONCLUSIONS

Dans le cas de composés N-acylés, les procédés de choix pour libérer quantitativement les acides sont, d'une part, l'hydrolyse acide effectuée par l'acide p-toluène sulfonique 1 à 2 N ou par l'acide sulfonique 2 à 6 N, à 100°C, pendant des temps variables et, d'autre part, la méthanolyse.

Dans le cas de composés O-acylés, l'hydrolyse sodique (NaOH 0,1 N, à 20°C, pendant 5 à 30 mn) l'hydrazinolyse et l'hydroxylaminolyse en milieu alcalin coupent quantitativement les liaisons esters. Le premier type de lyse est applicable à l'identification des acides et le second à leur dosage.

Dans le cas de composés à la fois O- et N-acylés, on effectuera

l'hydrolyse en deux temps, d'abord en milieu alcalin de manière à couper les liaisons O-acyl, puis en milieu acide pour identifier et doser les acides N-conjugués.

b - IDENTIFICATION DES ACIDES

α - Dans le cas d'une hydrolyse acide ou alcaline, les acides volatils (formique, acétique) sont déplacés des hydrolysats acidifiés avec de l'acide sulfurique, par distillation. Dans ces conditions, l'acide glycolique non volatil ne peut être ni identifié, ni dosé et un procédé particulier lui sera appliqué, mettant à profit sa réactivité spécifique avec le 2,7-dihydroxynaphtalène sulfurique (voir p. 155). Le distillat est ensuite soumis à la chromatographie sur papier (voir par exemple, BLOCK et coll. (531) ; PUTNAM (532)) ou à la chromatographie en phase gazeuse (JAMES et MARTIN (533) ; BAYER (534) ; GAETJENS et BARANY (535) après extraction des acides dans de l'éther.

β - Dans le cas d'une méthanolyse, les esters méthyliques, préalablement recueillis par distillation, sont soumis à l'analyse chromatographique en phase gazeuse. Un excellent procédé d'identification et de dosage des esters méthyliques des acides formique et acétique a été récemment décrit par OAKLEY, WEISSBECKER et RESNIK (536) dont les conditions expérimentales sont les suivantes :

- colonne (0,25 pouce/4 pieds) de Carbowax 20 M (20 p.100 de Carbowax sur du Chromosorb P de mesh 60-80).

- Débit du gaz vecteur (hélium) : 100 ml/mn

- Température de la colonne : 50°C
de l'injecteur : 200°C
du détecteur : 225°C

γ - Dans le cas d'une hydrazinolyse, les hydrazides sont converties en DNP-dérivés qui sont ensuite soumis à la chromatographie sur papier (BLOCK et coll. (537) ; PHILLIPS (538)).

c - DOSAGE DES ACIDES α - Dosage des acides formique et acétique

1) Dans le cas de la présence d'un seul acide, les microméthodes volumétriques sont parfaitement applicables (voir, par exemple, les procédés décrits par BARTLEY (539) et par BELCHER (540)). Toutefois, lorsque l'hydrolyse est effectuée en milieu alcalin, les dosages peuvent être entachés d'une erreur par excès due à la formation de produits de dégradation acides des glucides. La chromatographie en phase gazeuse représente donc le procédé de choix.

2) Dans le cas d'un mélange d'acides l'identification et le dosage sont aisément réalisés par chromatographie en phase gazeuse (voir ci-dessus).

3) Dans le cas particulier de liaisons O-acyl, le dosage de ces fonctions ^{est} effectué par l'une des méthodes dérivées du procédé original de HESTRIN (541). Nous utilisons au laboratoire la technique de Mc COMB et Mc READY (542) dont le mode opératoire est le suivant :

METHODE DE DOSAGE DES FONCTIONS O-ACYL PAR HYDROXYLAMINOLYSE (Mc COMB et Mc READY) (543)

Réactifs

a - Solution aqueuse de chlorhydrate d'hydroxylamine à 3,75 g p. 100 ml.

b - Solution aqueuse de soude à 9,4 g p. 100 ml.

c - Solution à 35,2 ml d'acide perchlorique à 70 p.100 (p:v) pour 500 ml de méthanol absolu.

d - Une première solution de perchlorate ferrique est préparée en dissolvant dans 100 ml d'eau le résidu obtenu par évaporation à sec d'une solution de 1,93 g de chlorure ferrique à 6 H₂O dans 5 ml d'acide chlorhydrique concentré et 5 ml d'acide perchlorique à 70 p.100 (p:v).

Le réactif lui-même est préparé en mélangeant 60 ml de la solution précédente à 8,3 ml d'acide perchlorique à 70 p.100 (p:v) et en

complétant à 500 ml avec du méthanol absolu. Le réactif est stable pendant une semaine à 20°C.

Mode opératoire

A 5 ml de l'échantillon à doser, on ajoute 2 ml d'une solution obtenue en mélangeant extemporanément, à volumes égaux, les réactifs a et b. Après 5 mn de contact, on ajoute 5 ml du réactif c, très lentement et en agitant constamment, 8 ml du réactif d. L'absorbance de la solution colorée obtenue est mesurée à 520 m μ .

La coloration est proportionnelle de 0 à 500 μ g d'acide acétique conjugué. Toutefois, les résultats les plus reproductibles sont obtenus pour des concentrations variant de 50 à 250 μ g.

β - Identification et dosage de l'acide glycolique

1) PROCEDE DE KLENK ET UHLENBRUCK (544).

KLENK et UHLENBRUCK (545) ont décrit un procédé de dosage de l'acide glycolique, préalablement libéré de l'acide N-glycolyl-neuraminique par une hydrolyse sulfurique, en mettant à profit la formation d'une coloration pourpre avec le réactif d'EEGRIWE (546) au 2,7 - dihydroxynaphthalène. Selon GIBBONS (547), la réaction serait donnée par l'aldéhyde formique provenant de la décarboxylation de l'acide glycolique. En effet, les spectres donnés par ces deux composés sont superposables.

Réactifs

Solution de 2,7 - dihydronaphtalène (recristallisé) dans l'acide sulfurique concentré de densité 1,8 (10 mg dans 100 ml).

Solution d'acide glycolique à 10 mg p. 100 ml d'eau distillée, conservée à 4°C.

Mode opératoire

- Ajouter à 1 ml de solution d'acide sialique (correspondant à 1 à 10 μ g d'acide glycolique) 1 ml d'acide sulfurique 2 N. Maintenir à 100°C pendant 1 heure.

- Ajouter un peu de charbon animal activé, filtrer et compléter à 10 ml avec de l'eau distillée.

- A 0,2 ml de l'hydrolysate, ajouter 4 ml de réactif d'EEGRIVE. Chauffer pendant 20 mn exactement à 100°C. Mesurer la densité optique à 546 m μ .

- On introduit dans chaque série de dosage deux séries de témoins constitués, d'une part, par de l'eau distillée et, d'autre part, par la solution titrée d'acide glycolique.

De nombreuses substances interfèrent : les osamines, l'acide muramique, les oses, certains acides aminés, l'acide lactique, le glycolal-déhyde (GIBBONS (548) ; WHITEHOUSE et ZILLIKEN (549)). Toutefois, on éliminera toute cause d'erreur en traçant le spectre d'absorption de la coloration obtenue : le chromophore de l'acide glycolique présente un maximum à 546 m μ et ceux des substances interférentes à 480 m μ . L'intensité de la coloration donnée par l'acide N-acétylneuraminique ne dépasse pas 3p.100 de celle que donne une quantité équivalente d'acide N-glycolylneuraminique (WHITEHOUSE et ZILLIKEN) (550).

2) PROCEDE DE GIBBONS (551)

Afin d'éliminer toute interférence, GIBBONS (552) préconise de purifier les hydrolysats sur des colonnes d'échangeurs d'anions.

Réactifs

- Solution de 2,7-dihydroxynaphtalène (voir ci-dessus).
- Solution stock de 213 mg de glycolate de zinc à 2 H₂O (conservé sous chlorure de calcium) pour 100 ml d'eau. Maintenir au froid et diluer au dixième au moment de l'emploi pour obtenir une solution correspondant à 0,1 g p. 1000 ml d'acide glycolique.
- Dowex 1 x 8 ; mesh 200-400 ; forme benzoate obtenue en traitant successivement la résine par 5 volumes d'acide chlorhydrique 2 N à 80°C pendant 30 mn, par de l'eau, par 20 volumes de soude 2 N, par de l'eau, par 10 volumes d'une solution 1 M de benzoate de sodium et par de l'eau.

Mode opératoire

- L'hydrolysats est passé sur la colonne d'échangeur d'anions qui est ensuite lavé soigneusement à l'eau distillée. L'acide glycolique est déplacé par le passage d'une solution 1 M de sulfate de potassium. Le volume du liquide effluent est complété à 10 ml.

- A 1 ml de la solution, on ajoute 10 ml de réactif d'EEGRIVE et l'on applique le protocole expérimental décrit plus haut. Les "témoins internes" sont représentés par une solution 1 M de sulfate de potassium et par la solution titrée de glycolate de zinc. La détermination des absorbances est effectuée à 535 m μ .

Nota. TETTAMANTI et coll. (553) ont décrit une méthode d'identification et de dosage de l'acide glycolique par chromatographie en phase gazeuse dont le principe est le suivant. Les hydrolysats sulfuriques de l'acide N-glycolylneuraminique sont purifiés par l'addition d'eau de baryte, puis par passage sur une colonne de Dowex 2 x 8 (forme acétate). L'acide glycolique est déplacé par une solution 2 M de chlorure de sodium et extrait du résidu sec, provenant de l'évaporation de la solution effluente par un mélange de chloroforme et de méthanol (7:3). Celui-ci est évaporé et le résidu est traité par le propanol chlorhydrique anhydre. L'ester propylique de l'acide glycolique est identifié et dosé par chromatographie en phase gazeuse effectuée dans les conditions suivantes : colonnes de Weas sur Chromosorb ; longueur : 2 m ; diamètre 2 mm ; température de la colonne : 136°C ; gaz vecteurs : azote (0,7 kg/cm²), hydrogène (0,3 kg/cm²), oxygène (1 kg/cm²) ; débit de l'azote (0,9 l/h).

IV - IDENTIFICATION DES PRODUITS DE DEGRADATION DES ACIDES SIALIQUES PAR LA N-ACETYLNEURAMINIQUE-ALDOLASE.

La N-acétylneuraminique-aldolase dégrade les acides N-acétyl et N-glycolylneuraminique en N-acyl-mannosamine et en acide pyruvique (BRUNETTI, JOURDIAN et ROSEMAN (554) ; COMB et ROSEMAN (555)). L'identification des deux produits de la dégradation permet de confirmer la nature de ces deux acides sialiques.

a - Hydrolyse par la N-acétylneuraminique-aldolase.

Nous utilisons au laboratoire le mode opératoire suivant (BRUNETTI, SWANSON et ROSEMAN) (556).

250 à 500 µg d'acide sialique sont dissous dans 2 à 5 ml d'une solution de phosphate de potassium 0,1 M tamponnée à pH 7,2. On ajoute ensuite 100 à 200 unités d'aldolase (*) et on maintient la solution à 37°C pendant 8 à 12 h.

b - Identification de la N-acylosamine

Une partie aliquote de l'hydrolysats est passée sur de petites colonnes d'échangeurs de cations (Dowex 50 × 8 ; mesh 25-50 ; forme acide ; 1 × 5 cm) et d'anions (Duolite A-40 ; mesh 25-50 ; forme formiate ; 1 × 5cm). Les N-acylosamines présentes dans la solution effluente sont identifiées par les procédés chromatographiques et électrophorétiques décrits par JOURDIAN et ROSEMAN (557) (Tableau XV ; p. 159).

c - Identification de l'acide pyruvique.

Sur une partie aliquote de l'hydrolysats nous appliquons le procédé décrit par BISERTE et DASSONVILLE (557^{bis}) et ^{DASSONVILLE} (558) dont le principe est fondé sur la transformation de l'acide pyruvique en dinitrophénylhydrazone qui est extraite par l'éther et identifiée par chromatographie sur papier.

Nota. Dans le cas d'acides neuraminiques O-substitués, l'action de l'aldolase doit être exercée après une saponification des fonctions O-acyl effectuée dans les conditions suivantes :

a - soit en traitant le sialoconjugué lui-même par une solution de CO_3Na_2 0,05 N, à 100°C pendant 30 mn (GIBBONS)(559) et en effectuant ensuite la libération et l'isolement chromatographique de l'acide sialique dans les conditions que nous avons décrites plus haut;

(*) Nous employons une préparation commerciale d'aldolase de Clostridium perfringens provenant des Etablissements SIGMA.

Tableau XV

Comportement chromatographique et électrophorétique et propriétés physiques des N-acétyl
et N-glycolylhexosamines (JOURDIAN et ROSEMAN) (560)

Nature des composés	R_{GlcNAc} (*)		Comportement en électrophorèse sur papier (cm parcourus)(**)		PF (en °C) (***)	$\left[\begin{array}{c} \alpha \\ D \\ \text{(****)} \end{array} \right]_{25}$
	Solvant n°1	Solvant n°2	Cathode	Anode		
N-acétylgalactosamine	1	0,43		0,3		
N-acétylglucosamine	1	1	1,5			
N-acétylmannosamine	1,08	0,40		3,8		
N-glycolylgalactosamine	0,72	0,15		0,4	156-160	+106 → +72,4
N-glycolylglucosamine	0,76	0,70	1		184-190	+33,4 → +28,2
N-glycolylmannosamine	0,83	0,19		3,7	66-73	+8,3 → + 7,6

(*) Migration chromatographique calculée par rapport à la N-acétylglucosamine (GlcNAc).
Système-solvant n° 1 : n-butanol/acide acétique/eau (50:12:25) ; papier Whatman n° 1
Système-solvant n° 2 : n-butanol/pyridine/eau (6:4:3) ; papier Whatman n°1 boraté
(procédé de CARDINI et LELOIR) (561)

Révélation par la méthode "indirecte" d'EHRlich (voir p. 222).

(**) Electrophorèse effectuée selon MARKHAM et SMITH (562) ; papier Whatman n°3 MM ; solution tamponnée
de tétraborate de sodium à 1 p.100 de pH 9,5 ;22V/cm pendant 0,5 h ; refroidissement par du
tétrachlorure de carbone.

(***)Points de décomposition déterminés en tubes capillaires.

(****)En solution aqueuse.

b - soit en maintenant les acides sialiques eux-mêmes à pH 1,3, pendant 4 à 6 jours, à 25°C (BLIX) (563) ou dans l'acide sulfurique 0,01 N, pendant 18 à 24 h à + 4°C (BLIX, LINDBERG, ODIN et WERNER (564) ou encore à pH 8-9, à 20°C, pendant des temps variant de 1 h à plusieurs jours. Toutefois, on court le risque de dégrader totalement les acides sialiques qui sont très labiles en milieu alcalin.

D - DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES SIALIQUES

1 - PROCEDES COLORIMETRIQUES

Nous appliquons au laboratoire le mode opératoire suivant :

Les solutions d'acides sialiques sont soumises à la chromatographie quantitative suivant le procédé de MONTREUIL, SCRIBAN et MULLET (565) décrit à propos des oses neutres. Les solutions d'élution sont complétées à un volume tel que 1 ml renferme 50 à 100 µg de chacun des acides sialiques. Le dosage colorimétrique est ensuite effectué par les méthodes colorimétriques classiques (voir MONTREUIL et SPIK) (566) : méthode à la diphénylamine de WERNER et ODIN (567), méthodes à l'acide thiobarbiturique de WARREN (568) et d'AMINOFF (569). Ces dernières ne sont toutefois pas applicables au dosage des acides neuraminiques 0-7- substitués.

Des procédés analogues ont été décrits par SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (570) : dosage par la méthode au résorcinol de SVENNERHOLM (571) (erreur \pm 3 p.100) ; par MARKOVIĆ (572) : dosage par la méthode de WERNER et ODIN (573) au p-diméthylaminobenzaldéhyde ; par RZECZYCKI (574) : dosage par la méthode de WERNER et ODIN (575) à la diphénylamine.

2 - PROCEDES ENZYMATIQUES

Les acides N-acétyl et N-glycolylneuraminiques peuvent être dosés en mettant à profit l'action d'une aldolase spécifique qui dégrade les deux acides sialiques en libérant de l'acide pyruvique et la N-acyl-D-mannosamine (BRUNETTI, JOURDIAN et ROSEMAN (576) ; COMB et ROSEMAN (577)). La réaction est équilibrée mais elle est complète si elle est

couplée avec la réduction de l'acide pyruvique par la lactico-transhydrogénase. COMB et ROSEMAN (578) et BRUNETTI, SWANSON et ROSEMAN (579) ont mis au point, sur ce principe, une méthode de dosage des acides N-acétyl et N-glycolylneuraminique par la mesure fluoro ou spectrophotométrique de la quantité de pyridine nucléotide oxydé.

Les acides sialiques O-substitués ne réagissent pas. Toutefois ils pourront être dosés après hydrolyse alcaline des fonctions O-acylées (voir p. 150).

On trouvera dans les articles de COMB et ROSEMAN (580) et BRUNETTI, SWANSON et ROSEMAN (581) tous les détails techniques de cet élégant procédé de dosage qui offre, en outre, l'avantage d'être très sensible puisqu'il permet de doser jusqu'à 5 μ g d'acide sialique.

E - CONCLUSIONS

Comme dans le cas des oses, l'identification et le dosage des acides sialiques par chromatographie sur papier ne présentent aucune difficulté. Au contraire, le problème de l'hydrolyse quantitative des liaisons sialyl, effectuée sans dégrader les acides sialiques libérés, reste entier, sauf dans le cas, évidemment où le sialoconjugué ne renferme qu'un seul acide sialique. Dans l'état actuel de la question, l'analyse chromatographique n'est applicable qu'à l'identification des acides sialiques. Elle ne peut permettre de déterminer les rapports molaires dans lesquels sont répartis plusieurs acides sialiques dans un glycoprotide.

CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE
DES
ACIDES URONIQUES

La détermination de la composition molaire en acides uroniques d'un oside ne présente aucune difficulté lorsque ce dernier ne renferme qu'un seul type d'acide uronique. Au contraire, le problème devient insoluble quand plusieurs acides uroniques différents entrent dans sa constitution. En effet, il est impossible de libérer quantitativement les acides uroniques sans les dégrader car les liaisons "uronosidyl" sont parmi les plus stables (voir p. 33 et 164). Les méthodes chromatographiques ou électrophorétiques de séparation des acides uroniques seront donc essentiellement appliquées à l'identification de ces composés.

I - HYDROLYSE DES LIAISONS URONOSIDYL.
STABILITE DES ACIDES URONIQUES (+).

Les liaisons uronosidyl sont caractérisées par une grande stabilité vis-à-vis des acides. Celle-ci est bien supérieure à celle des liaisons glycosidiques des oses "neutres" correspondants. Elle est conférée par la présence du groupement carboxylique en position C₅ de la molécule d'ose (voir p. 33). C'est pourquoi la réduction de la fonction acide des acides uroniques conjugués dans des molécules d'osides a été préconisée pour l'hydrolyse de ces dernières (voir p. 180).

La stabilité des liaisons uronosidyl est liée, en outre, à la structure de l'acide uronique lui-même et à celle de l'oside auquel celui-ci appartient. Elle obéit aux règles suivantes :

a - Un hydroxyle équatorial en 4 stabilise la liaison. Ce fait explique que les liaisons galacturonosidyl soient plus labiles que les liaisons glucuronosidyl.

b- Comme dans le cas des oses (voir p. 33), les formes pyranosidiques sont plus stables que les formes furanosidiques.

c - L'ordre décroissant des stabilités suivant le point d'attache des liaisons uronosidyl est le suivant : 1→4, 1→2 et 1→6 (DE et TIMELL)(584)

(+) Voir les revues générales d'ADAMS (582) et de MARSH (583).

Les modalités de l'hydrolyse acide des liaisons uronosidyl varient donc, 1°) avec la nature de l'acide uronique et 2°) avec la structure de l'oside.

1°) - Les liaisons de l'acide mannuronique sont parmi les plus stables et, pour réaliser l'hydrolyse de l'acide alginique, on doit utiliser de l'acide formique à 90 p.100 à 100°C pendant 2 heures (SPOEHR) (585) ou de l'acide sulfurique à deux concentrations différentes : d'abord l'acide sulfurique à 80 p.100 (v:v) à 20°C pendant 18 heures, puis avec de l'acide sulfurique 2 N à 100°C pendant 5 heures (HAUG et LARSEN) (586). Au contraire, les liaisons de l'acide glucuronique sont plus labiles et l'hydrolyse est généralement effectuée avec des solutions diluées d'acide chlorhydrique ou d'acide sulfurique à 100°C et pendant des temps plus courts : acide 1 à 2 N, agissant pendant 0,5 à 2 heures. Toutefois, des auteurs ont préconisé l'emploi de l'acide formique (hydrolyse de l'héparine par l'acide formique à 90,6 p.100 pendant 4 à 6 h à 100°C) (RADHAKRISHNAMURTHY et BERENSON) (587) et des formes acides des résines échangeuses de cations utilisées seules (hydrolyse de l'acide chondroïtine-sulfurique B par le Dowex-50 (HOFFMAN, LINKER et MEYER) (588) ou associées à l'acide chlorhydrique 0,05 N (hydrolyse à 107°C de divers polyosides par l'Amberlite CG 120 (DZIEWIA TKOWSKI) (589); STARY, WARDI et TURNER (590) ou par le Dowex-50 (ANASTASSIADIS et COMMON) (591); HAAB et ANASTASSIADIS (592)). Enfin, l'hydrolyse enzymatique n'a reçu que de rares applications (voir, par exemple, JOHNSTON et MASON) (593). En effet, les glucuronosidases ne sont actives que si les molécules d'acides uroniques appartiennent à des urono-conjugués ou si elles se trouvent en position "externe" dans des osides.

D'autre part, les liaisons des acides uroniques engagés dans des macromolécules mucopolyosidiques, comme, par exemple, les gommés (WHISTLER et RICHARDS) (594) ou les acides chondroïtine-sulfuriques, sont plus stables que celle des glucuronos-conjugués de faible poids moléculaire (voir la revue d'ADAMS) (595).

Il est donc difficile de prévoir la résistance des liaisons "uronosidyl" et illusoire de rechercher une méthode générale d'hydrolyse. Comme dans le cas des oses, il est indispensable d'effectuer des études cinétiques de la libération des acides uroniques avec des acides de nature différente et à des concentrations variables (CORNILLOT) (596) parvient à la même conclusion. Cet auteur a, par exemple, étudié la cinétique de la libération de l'acide glu-

curonique des glucurono-conjugués urinaires sous l'action d'acide chlorhydrique 2 N et 4 N pendant 30 à 90 minutes à 100°C et observé que l'hydrolyse était maximale avec l'acide chlorhydrique 2 N pendant 30 minutes et que 50 p.100 de l'acide glucuronique était détruit en 90 minutes par l'acide chlorhydrique 4 N.

Toutefois, certaines limites de concentrations et de temps ne pourront pas être dépassées sans amener une destruction plus ou moins profonde des acides uroniques. A cet égard, de nombreux travaux ont été effectués concernant la stabilité de l'acide glucuronique vis-à-vis des agents acides d'hydrolyse, mais les résultats étaient encore fragmentaires. C'est pourquoi, nous avons étudié la stabilité des acides uroniques les plus courants, - acides glucuronique et galacturonique-, vis-à-vis des acides chlorhydrique et sulfurique, le plus fréquemment utilisés pour hydrolyser les polysaccharides.

RECHERCHES SUR LA STABILITE DES ACIDES URONQUES

A - STABILITE VIS-A-VIS DES ACIDES

Nous avons réalisé une étude de la cinétique de destruction de l'acide glucuronique, libre et conjugué sous la forme d'acide chondroïtine-sulfurique A et de l'acide galacturonique, par les acides chlorhydrique et sulfurique agissant à 100°C, à des concentrations et pendant des temps variables.

1°- Mode opératoire

Des solutions de 100 mg d'acide glucuronique ou d'acide galacturonique dans 100 ml d'acide chlorhydrique 1 N, 2 N ou 4 N ont été maintenues à 100°C dans des tubes scellés, pendant des temps variant de 0,5 à 48 h. Le dosage des acides uroniques a été effectué sur 1 ml des solutions, préalablement diluées au 1/15, par la méthode au carbazol-sulfurique de DISCHE (597) (voir MONTREUIL et SPIK ; (597 bis) ; p. 59 (+)).

(+) Nous avons préalablement vérifié que l'acide chlorhydrique dilué n'interférait pas dans le développement de la coloration. En outre, les solutions-témoins d'oses purs ont été préparées avec de l'acide chlorhydrique à la même concentration que celle des solutions étudiées.

Dans une deuxième série d'expériences, un mode opératoire identique a été appliqué à l'acide chondroïtine-sulfurique A (200 mg dans 100 ml de solution chlorhydrique).

2° - Résultats et discussion

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XVI (p. 166) pour les acides uroniques libres et dans le tableau XVII (p. 167) pour l'acide glucuronique conjugué de l'acide chondroïtine sulfurique A. Nous les résumerons de la manière suivante :

a - Les acides uroniques sont sensibles à l'action des acides. La dégradation est due à une décarboxylation qui est d'ailleurs mise à profit dans des dosages manométriques de ces composés et qui conduit, non pas au xylose, mais au furfuraldéhyde (ANGELL et al.(598) ; BRISSAUD et al.(599) ; DUNSTAN et GILLAM (600) ; LAUNER et WILSON (601) ; UNGAR et JAGER (602) ; YOUNGBURG (603)).

Cette observation confirme celle de nombreux auteurs : ANDERSON, RUSSEL et SEIGLE (604) ; CORNILLOT (605)(destruction de l'acide glucuronique des glucuro-conjugués urinaires par HCl 2 N à 100°C au delà de 30 mn) ; DANISHEFSKY, EIBER et CARR (606) (destruction de l'acide glucuronique de l'héparine par SO_4H_2 1 N à 100°C pendant 16 h) ; DIFERANTE et RICH (607) (destruction pratiquement totale de l'acide glucuronique par HCl 4 N à 100°C pendant 6 h) ; ANASTASSIADIS et COMMON (608) et HAAB et ANASTASSIADIS (609) (cinétique de la destruction de l'acide glucuronique par HCl 4 N à 107°C) ; MOREL et al. (610) ; NELSON et PERCIVAL (611) (destruction par HCl 1 N à 120°C pendant 10 à 24 h) ; WOLFROM et KARABINOS (612) (destruction partielle de l'acide glucuronique de l'héparine au cours des hydrolyses acides).

b - La labilité des acides uroniques vis-à-vis des acides dépend de leur nature. L'acide galacturonique est un peu plus résistant que l'acide glucuronique. D'après les travaux de plusieurs auteurs, l'acide mannuronique est nettement plus stable que les deux précédents, tandis que l'acide iduronique est de loin le plus labile.

Tableau XVI

Stabilité des acides uroniques vis-à-vis des acides chlorhydrique et sulfurique.
(Les nombres précisent les pourcentages de récupération des acides uroniques)

Nature de l'acide uronique	Nature de l'acide	Concentration de l'acide	Temps de chauffage (en h) à 100°C													
			0,5	1	2	4	6	8	10	15	24	48				
Acide glucuronique	HCl	1 N	97,5	96	87,5	84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2 N	-	98	85	75	65,5	57	-	-	-	-	-	24	-	-
		4 N	-	96,5	86	42	35,5	33	23	-	-	-	-	8	-	-
Acide glucuronique	SO ₄ H ₂	1 N	100	100	100	100	90	87,5	84,5	66	51,5	30	-	-	-	-
		2 N	100	100	87,5	84,5	81	74,5	72	55	40	21	-	-	-	-
		4 N	100	100	93	74	60	51	48	36	23	-	-	-	-	-
Acide galacturonique	HCl	1 N	100	100	100	94	83	79	66	42	32	18,5	-	-	-	-
		2 N	100	100	92	80,5	68,5	53	30	7	54	0	-	-	-	-
		4 N	100	100	89,5	56	39,5	18	6	4	2	0	-	-	-	-
Acide galacturonique	SO ₄ H ₂	1 N	100	100	95	92	81	75	-	58	40	20	-	-	-	-
		2 N	100	99,5	93,5	83	72,5	62	-	29	16	0	-	-	-	-
		4 N	-	93,5	87	73,5	58,5	56	27,5	21	17	0	-	-	-	-

Tableau XVII

Hydrolyse de l'acide chondroïtine-sulfurique A

Stabilité de l'acide glucuronique conjugué vis-à-vis des acides chlorhydrique et sulfurique

(Les nombres précisent les pourcentages de récupération de l'acide glucuronique)

Nature de l'acide	Concentration de l'acide	Temps de chauffage (en h) à 100°C							
		0,5	1	2	3	4	6	24	48
HCl	N	103,5	107	107	103	103	103	-	82
	2 N	-	101	108	105	101	99	-	54,5
	4 N	105	102	117	104	95	80,5	-	0
SO ₄ H ₂	N	101	98	100	100	94	94	74	-
	2 N	103	97	97	97	91	94	-	-
	4 N	107	107	100	100	100	95	64	-

c - L'acide sulfurique est moins agressif que l'acide chlorhydrique.

d - La stabilité d'un acide uronique semble être augmentée lorsque ce dernier est sous une forme conjuguée. On observe, en effet, dans le tableau XVII (p. 167), que le taux de destruction de l'acide glucuronique présent dans l'acide chondroïtique-sulfurique A est, pour chaque temps de l'hydrolyse, nettement inférieur à celui de l'acide glucuronique libre. La quantité dosée d'acide glucuronique est même, au début de chaque hydrolyse, supérieure à la quantité théorique (augmentation, par exemple, de 7 à 8 p.100 au bout de 2 h d'hydrolyse par HCl 1 N et 2 N). La même observation a été faite par ANASTASSIADIS et COMMON (613) sans qu'il soit possible, pour l'instant, de donner une explication à ce phénomène.

B - STABILITE VIS-A-VIS DES ECHANGEURS DE CATIONS

Les résines polystyrène-sulfonées dégradent les acides uroniques dans une proportion moindre que les acides minéraux et plusieurs auteurs ont préconisé leur emploi pour couper les liaisons uronosidyl. Ce procédé d'hydrolyse a principalement été appliqué à la préparation de l'acide L-iduronique à partir de l'acide chondroïtine-sulfurique B (DZIEWIATKOVSKI (614) ; HOFFMAN, LINKER et MEYER (615) ; RADHAKRISHNAMURTHY et BERENSON (616)). ANASTASSIADIS et COMMON (617) et HAAB et ANASTASSIADIS (618), à la suite d'une étude poussée de la stabilité des acides uroniques vis-à-vis des acides et des échangeurs de cations ont proposé un procédé "mixte" d'hydrolyse des mucopolyosides qui associe l'acide chlorhydrique 0,05 N et le Dowex-50 sous sa forme acide. D'après les auteurs, l'échangeur de cations jouerait un rôle de catalyseur de l'hydrolyse des liaisons uronosidyl et de "protecteur" des acides uroniques libérés. Ils ne parviennent cependant pas à éviter une destruction partielle de ces derniers puisque le pourcentage de récupération de l'acide glucuronique "libre" est de 90 et 80 p.100 après, respectivement, 12 et 36 h d'hydrolyse. Ces résultats ont été confirmés par DZIEWIATKOWSKI (619) à propos de l'hydrolyse, à 108°C, de l'acide chondroïtine sulfurique A (10 mg en solution dans 5 ml d'acide chlorhydrique 0,05 N) par la forme acide de l'Amberlite CG 120 x 8 (200 mg).

CONCLUSIONS

La conclusion générale que nous pouvons tirer (voir aussi ADAMS (620) ; MARSH (621)) de l'ensemble des travaux qui concernent la stabilité des liaisons uronosidyl et des acides uroniques est qu'il n'existe pas encore de procédé de libération quantitative des acides uroniques conjugués. Il est, en effet, impossible d'effectuer l'hydrolyse totale des liaisons uronosidyl sans détruire une partie importante des acides uroniques. Le problème est compliqué par le fait que la stabilité de ces derniers varie, d'une part, avec leur nature et , d'autre part, avec la structure moléculaire des urono-conjugués. Comme dans le cas des acides sialiques, l'étude chromatographique ou électrophorétique des acides uroniques présents dans des hydrolysats d'osides est donc exclusivement qualitative et elle ne peut permettre, en aucun cas, de déterminer la composition molaire d'un oside dès que deux acides uroniques coexistent dans une molécule de glycanne.

Au laboratoire, nous associons, généralement, l'identification chromatographique ou électrophorétique des acides uroniques avec ceux des oses neutres et nous effectuons l'hydrolyse avec de l'acide chlorhydrique 1 N pendant 1 à 2 h ou 2 N pendant 1 à 1,5 h. L'hydrolysat est ensuite purifié et fractionné, comme nous l'avons vu plus haut (voir p. 65), sur colonnes d'échangeurs d'ions et les acides uroniques sont déplacés de l'échangeur d'anions (Duolite A 102 D) par le passage d'une solution d'acide formique à 5 p.100 (v:v). L'éluat est évaporé à siccité sous vide et le résidu, repris par de l'eau légèrement alcalinisée avec de l'ammoniaque, est soumis à l'analyse chromatographique ou électrophorétique.

Dans d'autres cas, pour réduire la destruction des acides uroniques, nous limitons notre étude de l'oside aux seuls acides uroniques et nous effectuons alors l'hydrolyse par l'acide sulfurique 1 à 2 N pendant des temps variant de 2 à 24 h. Les hydrolysats sont ensuite purifiés selon le mode opératoire précédent. En effet, le procédé d'élimination de l'acide sulfurique par la baryte est à proscrire, car il provoque des pertes importantes d'acides uroniques dont les sels de baryum sont peu solubles (voir en particulier, HIRST et JONES) (622).

II - IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE
ET ELECTROPHORETIQUE DES ACIDES URONIQUES
ET DE LEURS DERIVES

L'identification des acides uroniques peut être effectuée par chromatographie sur papier, sur colonnes ou en phase gazeuse et par électrophorèse sur papier, soit des acides eux-mêmes ou de leurs lactones, soit des acides modifiés : oses obtenus par réduction de leur fonction carboxylique ou acides aldoniques obtenus par réduction de leur fonction réductrice.

A - IDENTIFICATION DES ACIDES URONIQUES
ET DE LEURS LACTONES

Il est relativement aisé de préparer des solutions qui renferment exclusivement soit les acides uroniques, soit leurs lactones. En effet, l'ouverture du pont lactonique est effectuée par simple alcalinisation des solutions par des traces d'ammoniaque. Quant à la lactonisation des acides uroniques, on l'obtient par les procédés suivants :

- Chauffage à 80°C, pendant 30 mn, des solutions d'acides uroniques amenées à pH 2 ou par chauffage à 70°C sous vide, pendant 4 à 5 h (GEE et Mc CREADY) (623).

- Chauffage à 80°C, pendant 30 mn, des solutions d'acides uroniques dans l'acide chlorhydrique 1 N et élimination de ce dernier par évaporation sous vide, en présence de méthanol (LIN et HASSID) (624).

1 - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

a - Systèmes -solvants (+)

α - La composition des systèmes-solvants joue un rôle très important dans la chromatographie des acides uroniques. On évitera, par exemple, l'emploi de systèmes-solvants basiques. Ils introduisent, en effet, un risque d'épimérisation des acides uroniques et d'hydrolyse des ponts lactoniques qui provoque un phénomène de traînée. Nous avons obtenu les meilleures séparations avec des systèmes-solvants acides à base d'acétate d'éthyle,

(+) Voir la revue générale de MARSH (625).

comme, par exemple :

- Le système-solvant de FISCHER et DÖRFEL (626) : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5:5:3:1) ; papier Whatman n°3 ; chromatographie descendante ; saturation de la cuve de chromatographie avec le mélange pyridine/acétate d'éthyle/eau (11:40:6) ;

- Le système-solvant de SIDDIQUI et PURVES (627) : acétate d'éthyle/acide acétique/eau (9:2:2) ; papier Whatman n°1 ; durée de la chromatographie : 48 h.

Ces deux systèmes-solvants donnent de bonnes résolutions, le premier, des acides glucuronique, galacturonique et mannuronique purs, le second, des acides glucuronique et iduronique, mais ils ne sont pas toujours applicables à l'étude d'acides uroniques déplacés des échangeurs d'anions.

β - Plusieurs systèmes-solvants ont été proposés pour la séparation des lactones des acides uroniques dont la vitesse de migration est généralement plus élevée que celle des acides eux-mêmes (voir, par exemple, AYRES et al. (628) ; HOUGH et al. (629) ; JONES et WISE (630) ; PARTRIDGE (631) ; SIMONART et GODIN (632)). Récemment, LIN et HASSID (633) ont obtenu d'excellentes séparations chromatographiques ; en 8 à 12 h, de la glucurone, de la mannurone et de la gulurone, sur papier Whatman n°52, avec le système-solvant : pyridine/acétate d'éthyle/eau (11:40:6). Nous avons, en outre, précisé, dans le tableau XVIII (p.172) le comportement de quelques urono-lactones dans différents systèmes-solvants.

γ - OERTEL (634) a décrit des procédés de chromatographie des acides glucuronique et galacturonique sur des papiers échangeurs d'ions : papiers Whatman DE-20 et ET-20.

b - Réactifs de révélation

-Réactif à l'oxalate d'aniline. Le procédé général de PARTRIDGE (635) (voir p. 76) est parfaitement applicable à la révélation des acides uroniques qui donnent une coloration brune non spécifique.

Important : Dans le cas de l'utilisation de systèmes-solvants (ou de tampons d'électrophorèse) boratés, le réactif à l'oxalate d'aniline exige l'élimination des ions borate. Celle-ci est réalisée en imprégnant, par pulvérisation,

Tableau XVIII

Comportement des lactones de quelques acides uroniques dans différents systèmes-solvants.

Lactones	Systèmes-solvants (+)				
	1	2	3	4	5
Glucurono-lactone	0,21	0,37	0,97	0,93	0,92
Idurono-lactone	-	-	1,23	1,28	1,24
Mannurono-lactone	0,13	0,29	0,89	0,80	0,68

(+) (1) n-butanol/acide formique/eau (500:115:385) (HIRASAKA) (636) ;

(2) n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) (HIRASAKA) (637) ;

(3) n-butylacétate/acide acétique/éthanol/eau (3:2:1:1) (MASAMUNE et SATAKE) (638) ;

(4) n-butylacétate/acide acétique/n-butanol/méthanol/eau (3:2:1:1:1) (MASAMUNE et SATAKE) (639) ;

(5) n-butanol/méthanol/eau (5:2:1) (MASAMUNE et SATAKE) (640).

les deux faces des chromatogrammes (ou des électrophorégrammes) avec une solution de méthanol contenant 1 p.100 (v:v) d'acide acétique. Après séchage des papiers à la température de la pièce, la révélation peut être effectuée.

- Réactif au naphtorésorcinol. Les solutions acides de naphtorésorcinol réagissent, dans certaines conditions, sélectivement avec les acides uroniques. Nous avons obtenu les meilleurs résultats avec le réactif au naphtorésorcinol de DEDONDER (641) (naphtorésorcinol : 100 mg ; acide chlorhydrique 2 N : 20 ml ; éthanol absolu ou N-propanol q.s.p. 100 ml) qui, à la température ordinaire, révèle uniquement les acides uroniques qui apparaissent sous la forme de taches d'un bleu intense sur un fond rose (+).

- Réactif des lactones à l'hydroxylamine. La révélation des lactones est effectuée avec le réactif à l'hydroxylamine de ABDEL-AKHER et SMITH (642). On pulvérise d'abord une solution préparée extemporanément en mélangeant, à volumes égaux, une solution à 7 p.100 (p:v) de chlorhydrate d'hydroxylamine dans le méthanol et une solution à 7,2 g.p.100 (p:v) de potasse dans le méthanol. Puis, au bout de 15 mn, on imprègne le chromatogramme avec une solution de chlorure ferrique à 1 g p.100 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1 p.100 (v:v). L'emplacement des lactones est marqué par l'apparition de taches brun noir.

2 - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Peu de procédés de chromatographie sur couche mince des acides uroniques ont été décrits et notre expérience en la matière est nulle. Nous nous limiterons donc à la description des méthodes qui donnent les meilleurs résultats, en nous fondant sur l'avis des auteurs.

Procédés de STAHL et KALTENBACH (643) :

a -Support : Kieselguhr G imprégné d'acide borique 0,1 N

Système-solvant 1 : benzène/acide acétique/méthanol (20 : 20 : 60)

R_F : Acide glucuronique 0,43

Acide galacturonique 0,36

(+) A 75°C, en atmosphère humide, on révèle, en outre, les pentoses et les 6-désoxy-hexoses (taches bleu-violet), les cétooses libres et conjugués (taches rouge vif).

Système-solvant 2 : méthyléthylcétone/acide acétique/méthanol (60:20:20)

R_F : Acide glucuronique 0,34
Acide galacturonique 0,10

b -Support : Silicagel G/alumine G (1:1)

Système-solvant 1 : n-propanol/acétate d'éthyle/eau/ammoniacale à 25 p.100
(5:1:3:1)

R_F : Acide glucuronique 0,38
Acide galacturonique 0,27

Système-solvant 2 : n-propanol/acétate d'éthyle/eau/ammoniacale à 25 p.100
(6:1:3:1)

R_F : Acide glucuronique 0,27
Acide galacturonique 0,19

Procédés d'OVODOV et coll. (644)

a -Support : 35 g de Silicagel KSK (mesh 200), 2,5 g de gypse, 100 ml de phosphate disodique 0,3 M. Couche de 0,5 mm. Repos de 24 h à la température de la pièce.

Système-solvant 1 : n-butanol/éthanol/acide phosphorique 0,1 M (1:10:5)

R_F : Acide galacturonique 0,80
Acide glucuronique 0,27
Acide mannuronique 0,23

Système-solvant 2 : n-butanol/éthanol/acide chlorhydrique 0,1 N (1:10:5)

R_F : Acide galacturonique 0,16
Acide glucuronique 0,26
Acide mannuronique 0,33

b -Les plaques, préparées suivant a, sont imprégnées de phosphate disodique 0,2 M. Avec le système-solvant 1, les R_F sont les suivants :

Acide galacturonique 0,15
Acide glucuronique 0,29
Acide mannuronique 0,37

3 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNESD'ECHANGEURS D'IONS

a - KHYM et DOHERTY (645) ont décrit une méthode de séparation des acides glucuronique et galacturonique par chromatographie sur colonne de Dowex 1 (mesh 300 ; forme acétate). Les quantités de l'ordre de 10 mg de chacun des deux acides uroniques, en solution dans 10 ml de soude 0,02 M, sont passées sur des colonnes de 0,85 X 12 cm de résine et l'élution est effectuée par le passage d'une solution d'acide acétique 0,15 M (2,5 ml/mn). Les acides uroniques sont dosés par une méthode à l'orcinol-sulfurique. L'acide galacturonique est déplacé le premier ; il est suivi des acides glucuronique et mannuronique dont la séparation ne peut être réalisée. LARSEN et HAUGH (646) ont amélioré la méthode en effectuant l'élution des acides galacturonique, mannuronique et glucuronique à l'aide d'un gradient discontinu d'acide acétique (respectivement : 0,9 à 1,05 M - 1,20 à 1,25 M - 1,25 à 1,40 M)

b - DZIEWIATKOVSKI (647) a amélioré le procédé en utilisant l'Amberlite 401 X 2 (mesh 200-400 ; forme acétate ; 0,9 X 36 cm pour 1 mg environ de chaque acide uronique et lactone). Le développement des acides galacturonique, glucuronique, puis mannuronique (ou iduronique) (Fig. 31 ; p.176) est effectué par le passage d'une solution d'acétate de sodium 0,1 M de pH 5,9 (débit : 0,2 ml/mn). Des fractions de 1 ml sont recueillies dont la teneur en acides uroniques est déterminée par la méthode au carbazol-sulfurique de DISCHE (648). Un procédé analogue a été décrit par SAMUELSON et WICTORIN (649).

c - JOHNSON et SAMUELSON (650) ont adapté l'Auto-analyseur Technicon au dosage automatique des acides galacturonique, glucuronique, guluronique, iduronique et mannuronique, qui peuvent être séparés en une opération. Le principe du mode opératoire est le suivant :

0,8 à 1,3 mg de chaque acide uronique est soumis à l'analyse chromatographique sur des colonnes (6 X 880 mm) de Dowex 1 X 8 grains de 13 à 17 μ) maintenues à 30°C, température fixée par les auteurs (LARSSON,

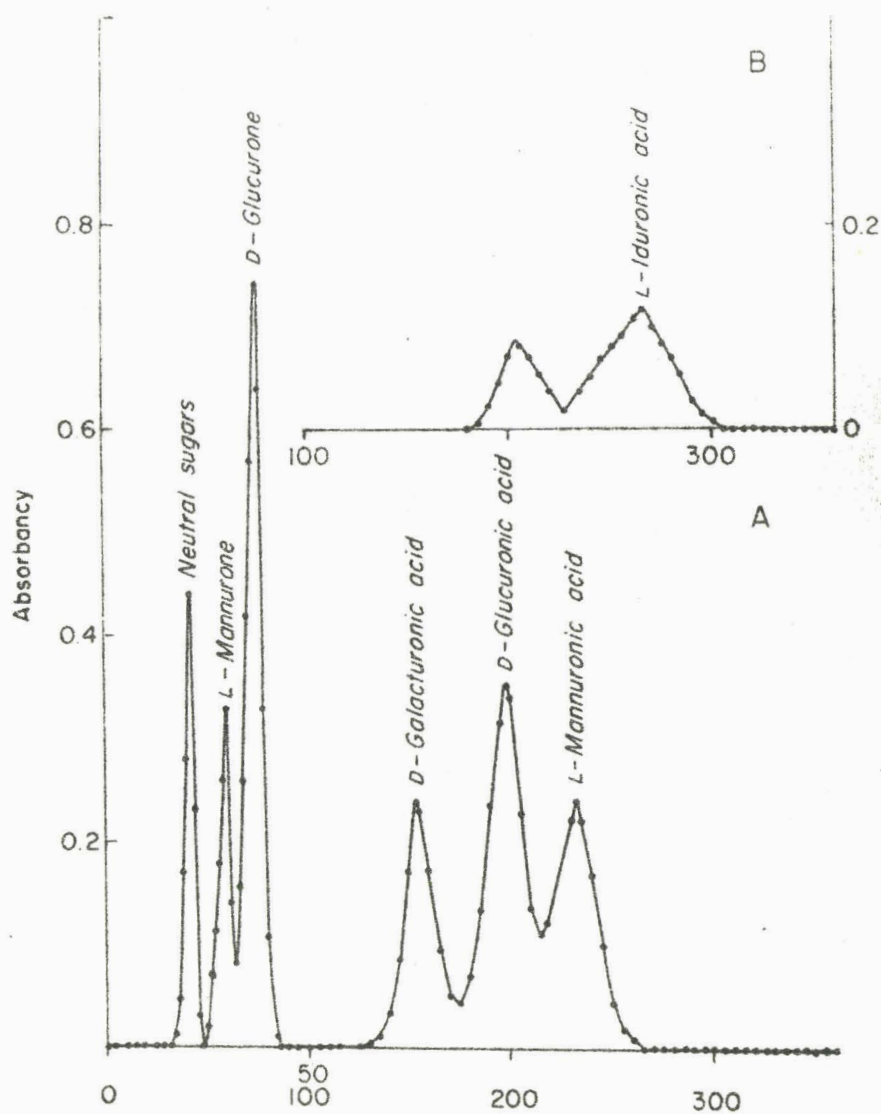


Figure 31

Chromatographie d'acides uroniques (3 à 5 mg d'acides uroniques totaux) sur Amberlite 401 X 2 (voir p. 175) (d'après DZIEWIATOWSKI) (651).

NORSTEDT et SAMUELSON (652) à la suite d'une étude critique qui a montré que les acides uroniques sont détruits à des températures plus élevées. L'élution est effectuée par le passage (1 ml environ p. mn) de solutions d'acétate de sodium 0,05 M de pH 5,9 ou d'acide acétique 1 M. Les acides uroniques sont dosés automatiquement par des réactifs au bichromate ou au carbazole sulfurique dans les conditions décrites par BALAZS, BERNTSEN, KAROSSA et SWANN (653). La figure 32 (p. 178) illustre un résultat obtenu par les auteurs.

4 - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Peu de procédés de séparation par chromatographie en phase gazeuse des acides uroniques sous la forme de dérivés triméthysilylés ont été décrits et nous renvoyons le lecteur aux excellentes revues de CHEMINAT et BRINI (654) et de RAUNHARDT, SCHMIDT et NEUKOM (655).

CHEMINAT et BRINI (656) obtiennent d'excellentes séparations des triméthysilyl-dérivés des acides glucuronique et galacturonique dans les conditions suivantes : chromatographe F et M modèle 720 ; gaz vecteur : hydrogène ; débit : 50 à 75 ml/mn ; température d'injection : 270°C ; température du détecteur : 240°C ; colonnes de cuivre de 4,7 mm de diamètre et de 2 m de longueur ; phases stationnaires : Carbowax 1540 (mesh 80-100 ; lavé aux acides ; traité au diméthylchlorosilane), additionné de 10 p.100 de SE.30 ou de SE.50, ou de 20 p.100 d'Apiezon L ; température de la colonne : de 160 à 210°C (programmation de 1°C p.mn) avec le SE.30 ; de 150 à 160°C (programmation de 0,5°C p.mn) avec le SE.50 ; de 170 à 220°C (programmation de 1°C p.mn) avec l'Apiezon L. Le calcul des facteurs de correction massiques rend la méthode quantitative.

RAUNHARDT et al. (657) se sont livrés à une étude systématique des conditions de séparation des triméthyl-silyl-dérivés des acides glucuronique galacturonique, guluronique et mannuronique et de leurs lactones. L'analyse est effectuée sur des colonnes (3 mm X 2 m) à 2,5 p.100 de SE-52 (à 190°C) à 1 p.100 de SE-30 (à 170°C) sur Chromosorb G, AW-DMCS (mesh 80-100) sous un courant d'azote de 29 à 32 ml/mn, avec un témoin interne

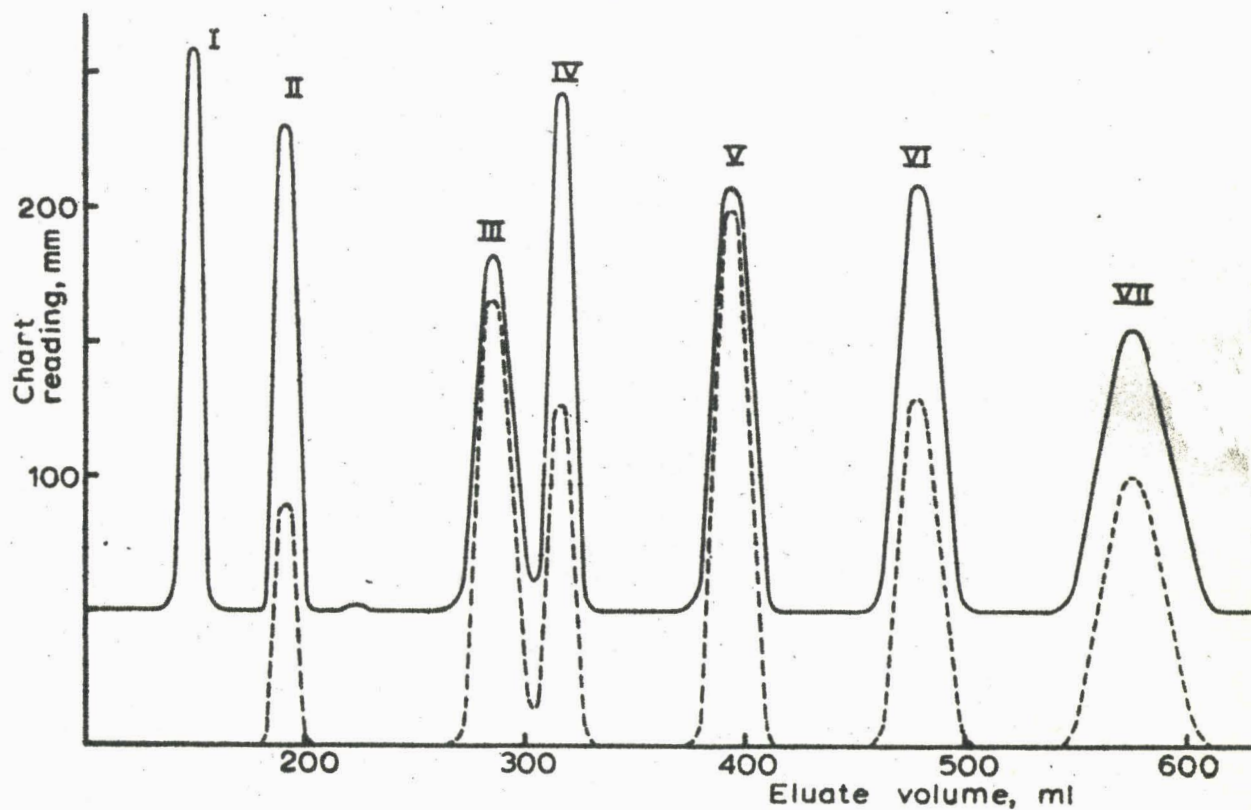


Figure 32

Chromatographie automatique sur Dowex 1 x 8 des acides D-glucoheptonique (I), D-galacturonique (III), L-guluronique (IV), L-iduronique (V), D-mannuronique (VI) et D-glucuronique (VII). En trait plein : dosage au carbazole sulfurique ; en trait pointillé : dosage au bichromate. Elution par l'acide acétique 1 M (0,97 ml/mn) (d'après JOHNSON et SAMUELSON) (658).

de méso-érythritol.

Des conditions analogues ont été appliquées par LEHTONEN et al. (659) à la séparation des acides glucuronique et iduronique libérés par méthanolyse de mycopolyosides acides.

5 - ELECTROPHORESE SUR PAPIER

L'application des méthodes électrophorétiques proposées jusqu'à présent pour identifier les acides uroniques ne nous ayant pas donné entière satisfaction, nous avons effectué une étude systématique pour tenter de séparer, dans une dimension, des mélanges complexes d'acides uroniques présents dans les solutions d'élution par l'acide formique des colonnes d'échangeurs d'anions (voir p. 65).

Nous étions parvenus, après une première série d'expériences, à séparer, par électro-chromatographie bidimensionnelle, les acides glucuronique, galacturonique, mannuronique et guluronique (+) (MONTREUIL, SPIK, DUMAISNIL et MONSIGNY) (661). Le protocole expérimental était le suivant : la séparation est effectuée sur papier Whatman n°1, d'abord par électrophorèse dans une cuve "en toit" (tampon de MICHL (662) de pH 3,9 : pyridine/ acide acétique/eau (3:10:487) ; 7 V/cm pendant 15 h), puis par chromatographie dans le système-solvant de SIDDIQUI et PURVES (663), que nous avons décrit plus haut (voir p.171).

Nous avons perfectionné ce procédé qui n'était pas d'application générale. En effet, la présence de faibles quantités de sucres neutres (oses "neutres" et lactones) et d'impuretés dans les effluents des colonnes de résines utilisées pour purifier les acides uroniques gêne la séparation et l'identification de ces derniers. Nous effectuons une première électrophorèse préparative à pH 3,9 (voir ci-dessus) qui nous permet d'obtenir, par élution, la fraction pure des acides uroniques. Ceux-ci sont séparés par une seconde électrophorèse, effectuée dans une cuve "en toit", sur papier Whatman n°3 dans le tampon boraté de HAUGH et LARSEN (664) (borate

(+) Les acides mannuronique et guluronique sont obtenus par hydrolyse sulfurique de l'acide alginique selon le procédé de HAUGH et LARSEN (660).

de sodium 0,01 M de pH 9,2, 0,005 M en chlorure de calcium), pendant 15 h à 7 V/cm. La révélation est effectuée avec le réactif à l'oxalate d'aniline après élimination des ions borate (voir p. 171). Nous obtenons, de cette manière, d'excellentes séparations des acides galacturonique, glucuronique, guluronique, iduronique et mannuronique (Fig. 33 ; p. 181).

B - IDENTIFICATION DES DERIVES
DES ACIDES URONIQUES

1. - REDUCTION DU GROUPEMENT CARBOXYLIQUE (+)

De nombreux procédés de réduction du groupement carboxylique des acides uroniques libres ou conjugués suivie de l'identification de l'ose "neutre" correspondant, ont été décrits. Ils dérivent des méthodes originales de réduction des acides hexuroniques en hexoses dans les polysaccharides d'ABDEL-AKHER et SMITH (667) et d'ASPINALL, HIRST et MATHESON (668). Cependant, ils n'ont reçu qu'un nombre limité d'applications car ni l'estérification des acides uroniques, ni la réduction des esters ne sont totales. Malgré leur faible rendement, ces procédés permettent toutefois d'identifier les acides uroniques. Leur perfectionnement pourrait permettre de résoudre le problème de l'hydrolyse des liaisons "uronosidyl" posé par la grande stabilité de ces dernières. En effet, les liaisons glycosidiques des oses "neutres" sont labiles et sont aisément coupées quantitativement.

a - Estérification. L'estérification des acides libres ou conjugués peut être effectuée par l'application de diverses méthodes :

- par le méthanol chlorhydrique (CHANEZ et SAG (669) ; JANSEN et JANG (670) ; WOOD (671) ; SCHMIDT et NEUKOM (672)).

- par l'iodure de méthyle agissant soit sur le glucuronate d'argent (GOEBEL et BABERS) (673), soit sur les glucuronolactones en présence de catalyseurs basiques comme la soude, le méthoxyde de sodium, la triméthylamine ou des résines échangeuses d'anions (BOLLENBACK et coll. (674) ;

(+) Revues générales : ASPINALL (665) ; LEWIS, SMITH et STEPHEN (666).

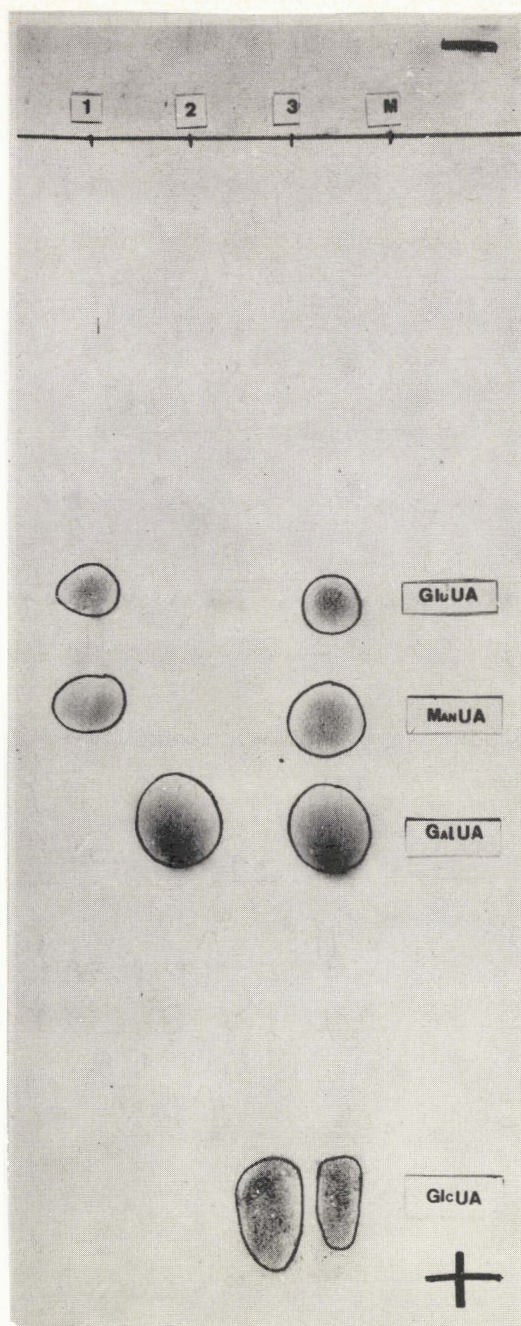


Figure 33

Electrophorèse des acides guluronique (GulUA), mannuronique (ManUA), galacturonique (GalUA) et glucuronique (GlcUA). Cuve "en toit" ; papier Whatman n° 3 ; Tampon de HAUGH et LARSEN (655) de pH 9,2 (borate de sodium 0,01 M ; chlorure de calcium 0,005 M) ; 7 V/cm pendant 15 h. Révélation par l'oxalate d'aniline après élimination du borate (voir p. 171).

TOUSTER et REYNOLDS (675) ; HIRASAKA et UMEMOTO (676)).

- par le diazométhane (JONES et PERRY (677) ; MORELL et LINK (678) ; SELL et LINK (679)).

- par l'oxyde de méthylène (GUY et coll.) (680)

b - Réduction des esters. Elle est réalisée

- par l'hydrure de lithium-aluminium (ABDEL-AKHER et SMITH (681) ; ASPINALL, HIRST et MATHESON (682) ; LYTHGOE et TRIPETT (683)).

- par les borohydrures alcalins (ASPINALL et CAÑAS-RODRIGEZ (684) ; JONES et PERRY (685) ; SMITH et STEPHEN (686) ; WOLFROM et ANNO(687)).

- par le diborane (BROWN, MEAD et SUBDA-RAO (688) ; Mc KEE et DICKEY (689) ; SMITH et STEPHEN (690)).

2. REDUCTION DES ACIDES URONIQUES

EN ACIDES ALDONIQUES

SWEELEY, BENTLEY, MAKITA et WELLS (691) et PERRY et HULYALKAR (692) ont décrit des procédés d'identification et de dosage des acides uroniques préalablement réduits en acides aldoniques :

l'acide glucuronique en acide gulonique

l'acide galacturonique en acide galactonique

l'acide mannuronique en acide mannonique

l'acide iduronique en acide idonique

Les lactones des acides aldoniques sont identifiées par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylsilylés. Les procédés ne paraissent pas être quantitatifs.

a - Procédé de SWEELEY et coll. (693)

Les acides uroniques libres sont d'abord réduits par les borohydrures alcalins. Les acides aldoniques sont lactonisés en milieu acide et les lactones triméthylsilylées sont identifiées par chromatographie en phase gazeuse effectuée dans les conditions expérimentales suivantes :

- Colonnes (0,25 in. x 6 ft) à 3 p.100 de SE 52 sur Chromosorb W ("mesh" 80 - 100) ;

- Température de la colonne 140°C ;

- Gaz vecteur : hydrogène (75 à 150 ml p. mn) ;
- Détection par ionisation de flamme.

b - Procédés de PERRY et HULYALKAR (694)

α - Réduction des acides uroniques libres. Les acides uroniques libres (1 à 10 mg dans 2 ml d'eau) sont d'abord transformés en sel de baryum par chauffage à 65°C, pendant 10 mn, en présence de 150 mg de carbonate de baryum. Il sont ensuite réduits par 50 mg de borohydrure de sodium, à 20°C, pendant 1 h. La solution est purifiée sur 2 g de Rexyn 101 (forme acide) et l'acide borique est éliminé de l'effluent par plusieurs évaporations répétées en présence de méthanol. La lactonisation des acides aldoniques est effectuée par traitement du résidu sec par 0,5 ml d'acide chlorhydrique concentré qui est évaporé, en exsiccateur à la température du laboratoire.

Les aldono-lactones sont enfin triméthylsilylées et identifiées par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes :

- Colonnes de verre (0,5 x 120 cm)) 10 p.100 de polyester sébacique du néopentylglycol sur Chromosorb W (lavé aux acides ; "mesh" 100-200) ;
- Température de la colonne : 176°C ;
- Gaz vecteur : argon (150 ml p. mn).

Le procédé n'est pas quantitatif car les dosages sont effectués avec des erreurs par défaut variant de 5 à 60 p.100.

β - Réduction des acides uroniques conjugués. Les acides uroniques conjugués sont simultanément libérés et réduits par une hydrolyse sulfurique (SO_4H_2 2 N ; 110°C, pendant 40 à 60 h) effectuée en atmosphère réductrice (hydrogène-platine ; 3 à 4 atmosphères). L'hydrolysats est traité par le carbonate de baryum et purifié sur échangeur de cations. Les acides aldoniques sont ensuite lactonisés et identifiés par l'application de la méthode précédente.

3. - REDUCTION DES ACIDES URONIQUES EN POLYOLS

LIN et HASSID (695) ont décrit un procédé de réduction totale des acides uroniques libres en polyols qui sont ensuite peracétylés et identifiés par chromatographie en phase gazeuse.

III - CONCLUSIONS GENERALES

La question de l'identification des acides uroniques est résolue, soit par l'analyse des composés natifs, - en particulier, par chromatographie sur échangeur d'ions et par électrophorèse sur papier -, soit par l'analyse de leurs produits de réduction. Les méthodes de réduction devraient, dans un avenir proche, représenter les procédés de choix pour l'identification et le dosage des acides uroniques. En effet, ce dernier problème n'est pas résolu en raison de la grande stabilité des liaisons "uronosidyl" qui ne peuvent être hydrolysées quantitativement sans provoquer la destruction d'une proportion importante d'acides uroniques. La mise au point d'un procédé de réduction quantitative des groupements carboxyliques des acides uroniques conjugués, en les transformant en oses "neutres" dont les liaisons glycosidiques sont fragiles, devrait permettre d'apporter la solution à ce problème.

CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE
QUANTITATIVES DES OSAMINES ET DE
LEURS DERIVES

Les osamines qui sont les plus répandues et dont se pose le plus fréquemment le problème de l'identification et du dosage sont la D-glucosamine, la D-galactosamine et la D-mannosamine.

C'est pourquoi nous limiterons notre étude à ces trois osamines et à leurs dérivés ; Toutefois, à la fin de ce chapitre, nous décrirons, en outre, quelques procédés d'identification et de dosage de l'acide muramique.

1°) HYDROLYSE DES LIAISONS OSAMINIDYL

L'identification et le dosage des osamines par chromatographie ou par électrophorèse nécessitent l'hydrolyse préalable des liaisons "osaminidyl".

Comme dans le cas des trois types d'oses précédemment étudiés, les principales causes d'erreur dans le dosage des osamines seront donc provoquées soit par une destruction partielle de celles-ci, soit par une hydrolyse incomplète de leurs liaisons de conjugaison. Nous exposerons donc successivement l'état actuel de nos connaissances sur ces deux problèmes, à la lumière des travaux effectués dans différents laboratoires et de nos recherches propres.

I - STABILITE DES OSAMINES
VIS-A-VIS DES ACIDES

La grande stabilité des liaisons "osaminidyl" a amené les auteurs à rejeter d'emblée l'emploi d'acides peu agressifs, comme les acides sulfurique, formique ou acétique, au profit de l'acide chlorhydrique dont l'utilisation est, à présent, universellement adoptée, en association, parfois, avec des résines à échange de cations (ANASTASSIADIS et COMMON (696) ; HAAB et ANASTASSIADIS (697)).

Dans le but de préciser les conditions limites de l'hydrolyse des liaisons "osaminidyl" qu'il était interdit de dépasser sous peine de dégrader les osamines, nous avons étudié la résistance de ces dernières vis-à-vis de l'acide chlorhydrique aux concentrations classiquement utilisées de 4 N :

et de 5,6 N, pendant des temps variables. En effet, les résultats obtenus, par les auteurs (voir, à cet égard, le Tableau XIX ; p. 186 et 187) étaient très disparates et ne permettaient pas de se faire une opinion précise sur la stabilité des osamines en milieu acide.

En outre, nous avons appliqué ce mode opératoire, non seulement aux osamines seules, mais aussi aux osamines associées aux constituants glucidiques et protidiques des glycoprotides, de manière à reproduire le plus exactement possible les conditions d'un hydrolysats. Auparavant, nous avons déterminé l'influence de l'oxygène et des sels de fer sur la stabilité des osamines vis-à-vis de l'acide chlorhydrique par analogie avec les procédés d'hydrolyse des protéines.

A - ETUDE DE LA STABILITE DE LA GLUCOSAMINE DANS DIFFERENTES CONDITIONS D'HYDROLYSE

1° - Mode opératoire. 12 mg de chlorhydrate de glucosamine sont dissous dans 20 ml d'acide chlorhydrique redistillé (+) 4 N ou 5,6 N. Des fractions de 1 ml sont introduites dans des tubes qui sont ensuite scellés, les uns sous vide, les autres en présence d'air.

Dans une autre série d'expérience, nous avons ajouté, à l'acide chlorhydrique redistillé, les quantités d'ions-fer suivantes :

50 µg d'ions-Fe⁺⁺ ou Fe⁺⁺⁺ (++) p. ml d'acide chlorhydrique 4 N ;
2,5 µg d'ions-Fe⁺⁺⁺ p. ml d'acide chlorhydrique 5,6 N.(+++).

Les différentes solutions ont été maintenues à 100°C, pendant des temps variant de 1 à 4 h (dans le cas de l'acide chlorhydrique 4 N) et à 105°C, de 12 à 72 h (dans le cas de l'acide chlorhydrique 5,6 N). Elles ont ensuite été débarrassées de l'acide par une évaporation sous vide effectuée à la température du laboratoire. Les résidus secs ont été repris par de l'eau distillée et les solutions obtenues ont été complétées à 15 ml.

(+) Distillation de l'acide commercial pur R.P., dilué d'un volume égal d'eau distillée et utilisation de l'azéotrope environ 5,6 N distillant à 110°C.

(++) Ces concentrations en fer correspondent, pour fixer les idées, à celles que l'on obtient en hydrolysant les métallo-transferrines.

(+++) Concentration en fer d'un acide chlorhydrique impur non redistillé.

Galactosamine	4	N	100°C	6 h	10 à 14	PARTRIDGE et DAVIS (717)
	4	N	100°C	8 h	12	GRAHAM et GOTTSCHALK (718)
	4	N	100°C	14 h	5	LUDOWIEG et BENMAMAN (719)
	6	N	105°C	16 h	28	YOUNG, SPIZIZEN et CRAWFORD (720)
	6	N	110°C	22 h	47	LUDOWIEG et BENMAMAN (721)
Acide muramique	6	N	105°C	16 h	28	YOUNG, SPIZIZEN et CRAWFORD (722)

(+) Dowex 50, "mesh" 200-400 , forme acide / HCl 0,05 N (1:4).

La concentration en glucosamine a enfin été déterminée par la méthode d'ELSON et MORGAN, modifiée par BELCHER, NUTTEN et SAMBROOK (723). Dans chaque série de dosages, nous avons introduit des témoins "internes" constitués par la solution ^{de} glucosamine non "hydrolysée" après avoir vérifié (voir aussi HARTREE) (724) que l'acide chlorhydrique ne détruisait pas l'osamine au cours de l'évaporation à siccité sous vide.

2° - Résultats. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau XX (p. 189).

On voit que l'acide chlorhydrique 4 N, n'altère pas la glucosamine, au bout de 4 h à 100°C, à la condition qu'il soit exempt de sels de fer et que "l'hydrolyse" soit effectuée à l'abri de l'oxygène de l'air. Au contraire, la présence de sels de fer - principalement de sels ferreux - provoque, même sous vide, la destruction d'une partie importante de l'osamine.

L'acide chlorhydrique 5,6 N, utilisé dans les conditions habituellement employées pour hydrolyser les protéines, est beaucoup plus agressif, principalement quand il contient des sels de fer même à très faible concentration. En outre, l'action néfaste de l'oxygène est nettement plus marquée en présence de sels de fer.

3° - Conclusions. Les résultats que nous avons obtenus montrent la nécessité d'employer, comme l'avait déjà préconisé NEUBERGER (725) de l'acide chlorhydrique redistillé et rigoureusement exempt de sels de fer qui catalysent la destruction des osamines (voir aussi HARTREE) (726). Celle-ci est, en outre, favorisée par la présence d'oxygène (voir aussi LUDOWIEG et BENMAMAN (727) ; WARD, ADAMS-MAYNE et WADE (728) ; WALBORG et WARD (729)). que l'on éliminera, avant de sceller les tubes à hydrolyse, soit par le vide, soit par un barbottage d'azote (LUDOWIEG et BENMAMAN (730) ; WOLFROM, WEISBLAT, KARABINOS, Mc NEELEY et Mc LEAN (731) ; OGSTON (732)) ou d'anhydride sulfureux (PEDERSEN et BAKER) (733).

B - STABILITE DES OSAMINES VIS-A-VIS DE L'ACIDE CHLORHYDRIQUE (+)

Dans une seconde série d'expériences, nous avons appliqué le même mode opératoire pour étudier la stabilité de la glucosamine, de la galactosamine et de la mannosamine vis-à-vis de l'acide chlorhydrique 4 N et 5,6 N exempt de fer et d'oxygène.

(+) Voir NEUBERGER, MARSHALL et GOTTSCHALK (734).

Tableau XX

Influence des sels de fer sur la stabilité de la glucosamine (exprimée en p.100 de récupération de la glucosamine) vis-à-vis de l'acide chlorhydrique 4 N à 100°C, et 5,6 N à 105°C, pendant des temps variables.

Concentration de l'acide	Nature du sel de fer	Conditions de l'hydrolyse	1 h	2 h	3 h	4 h
4 N	Néant	Sous vide En présence d'air	102 99,5	101,5 100	100 100	103 101
	Fe ⁺⁺	Sous vide En présence d'air	100 100	99 97	93 91	92 86
	Fe ⁺⁺⁺	Sous vide En présence d'air	100 99	97 97	96,5 96	94 96
5,6 N			12 h	24 h	48 h	72 h
	Néant	Sous vide En présence d'air	97,5 92	84 81	73 70	65 63
	Fe ⁺⁺⁺	Sous vide	90	83	68	53

1° - Résultats

Les résultats rassemblés dans le Tableau XXI (p. 191) montrent que, dans ces conditions expérimentales, les trois osamines sont stables dans l'acide chlorhydrique 4 N, à 100°C, pendant au moins 4 h. Ces résultats confirment ceux de BOURRILLON et MICHON (735). Ils s'écartent légèrement de ceux d'OGSTON (736) qui évaluait la destruction de la glucosamine dans l'acide chlorhydrique 4 N, à 100°C, à 1 p.100 par heure (voir Tableau XIX ; p. 186 et 187).

Au contraire, l'acide chlorhydrique 5,6 N, dans les conditions d'hydrolyse des protéines, est plus agressif et détruit des proportions d'osamines variables avec la durée de l'hydrolyse et avec la nature de l'osamine, l'ordre décroissant des stabilités étant le suivant : glucosamine, galactosamine, mannosamine. (voir aussi LUDOWIEG et BENMAMAN) (737). Nos résultats concernant la destruction des osamines par l'acide chlorhydrique 5,6 N confirment ceux des autres auteurs (voir Tableau XIX ; p. 186 et 187).

2° - Conclusions

L'hydrolyse d'osaminoglycannes, comme la chitine ou les galactosamino-glycannes d'Aspergillus paraticus (DISTLER et ROSEMAN) (738) et de Chondrococcus columnaris (JOHNSON et CHILTON) (739), destinée à l'identification et au dosage des osamines, peut parfaitement être réalisée dans l'acide chlorhydrique 4 N, à 100°C, pendant des temps variant de 1 à 4 h. En effet, dans ces conditions, les liaisons osaminidyl sont quantitativement hydrolysées (voir p.195) et les osamines libérées ne subissent aucune destruction.

Au contraire, dans les conditions d'hydrolyse des protéines par l'acide chlorhydrique 5,6 N, à 105°C, des proportions importantes d'osamines sont détruites qui varient avec la nature de l'osamine.

Toutefois, l'erreur de dosage pourra être partiellement compensée en extrapolant les courbes d'hydrolyse au temps zéro de cette dernière par un procédé identique à celui que l'on applique aux acides aminés acido-labiles comme la sérine et la thréonine. L'application de cette méthode d'extrapolation a été préconisée par d'autres auteurs comme WARTH (740) ; YOUNG, SPIZIZEN et CRAWFORD (741) ; SANDERSON, STROMINGER et NATHENSON (742) (voir Tableau XIX ; p. 186 et 187).

Tableau XXI

Stabilité des osamines (exprimée en p.100 de récupération des osamines) vis-à-vis de l'acide chlorhydrique 4 N, exempt de fer, à 100°C, sous vide, pendant des temps variables.

Concentration de l'acide	Nature de l'osamine	Durée de l'action de l'acide			
		1 h	2 h	3 h	4 h
4 N	Glucosamine	102	101,5	100	103
	Galactosamine	100	99	100	102
	Mannosamine	100	102	100	100
5,6 N		12 h	24 h	48 h	72 h
	Glucosamine	97,5	84	73	65
	Galactosamine	100	98	94	90
	Mannosamine	98	82	80	69

II - STABILITE DES LIAISONS OSAMINIDYL

De nombreux procédés ont été décrits pour hydrolyser les liaisons osaminidyl et nous avons rassemblé, à titre d'exemple, dans le tableau XXII (p. 193), quelques unes des méthodes qui ont été appliquées par différents auteurs. On jugera, de cette manière, de l'extrême diversité des conditions d'hydrolyse qui s'explique par l'ignorance où l'on se trouve a priori de la stabilité d'un glycanne. En effet, la résistance des liaisons "osaminidyl" à l'hydrolyse acide est liée à la structure chimique de ce dernier. Elle obéit aux règles générales suivantes (voir GARDELL) (743) :

1 - Les liaisons "N-acétylosaminidyl" sont très labiles (voir p. 31). Au contraire, les liaisons "osaminidyl" sont très stables car la présence du proton de la fonction NH_3^+ en 2, joue un effet protecteur (MOGGRIDGE et NEUBERGER (744) ; GOTTSCHALK et ADA (745) ; FOSTER, HORTON et STACEY (746) ; JOHANSEN, MARSHALL et NEUBERGER (747)).

2 - Les liaisons "osaminidyl" sont d'autant plus stables que le glucide auquel elles se rattachent est lui-même plus facilement détruit par l'acide chlorhydrique. Il est indispensable que la concentration de l'acide soit telle que les glucides qui substituent les fonctions réductrices des osamines ne soient pas trop rapidement détruits.

3 - Les osamines sont beaucoup plus stables que les oses neutres en milieu chlorhydrique. En effet, alors que ceux-ci sont détruits par l'acide chlorhydrique 4 N à 100°C au bout de 24 h, une proportion très importante des osamines subsiste dans les mêmes conditions.

4 - Les liaisons "muramyl" sont plus stables que les liaisons "osaminidyl".

RECHERCHES PERSONNELLES. Devant la disparité des méthodes d'hydrolyse, nous avons effectué, au Laboratoire, une étude critique systématique dans le but de préciser les meilleures conditions à appliquer aux glycoprotides pour libérer quantitativement les osamines et nous sommes parvenus à la conclusion que les conditions optimales étaient les suivantes :

HCl 4 N (redistillé et exempt de fer), à 100°C, en tube scellé sous vide, pendant 4 h.

Tableau XXII

Conditions d'hydrolyse de glycannes ou de
glycoprotéides appliquées par différents auteurs.

Nature de la substance étudiée	Concentration de l'acide chlorhydrique	Temps d'hydrolyse	Références
Substance de groupe sanguin	0,5 N	16 h	RONDLE et MORGAN (748)
Glycopeptides	1,5 N	2 h	NUENKE et CUNNINGHAM (749)
Pleuromucoïde	2 N	4 h	BOURILLON et MICHON (750)
Glycoprotéides totaux des tissus	3 N	10 h	SPIRO (751)
Mucopolysaccharides acides	4 N	4 h	MASAMUNE et coll. (752)
Héparine	4 N	15 h	BELCHER <u>et al.</u> (753)
Méthode générale	6 N	8 h	GARDELL (754)
	ou 1 à 4 N	14 h	

Cette conclusion a été tirée sur la base des résultats expérimentaux suivants :

1 - Nous avons dosé, colorimétriquement (méthode d'ELSON et MORGAN) la glucosamine libérée de l'ovomucoïde par des hydrolyses effectuées à 100°C, pendant des temps variant de 1 à 4 h, avec de l'acide chlorhydrique redistillé et exempt de fer, à des concentrations 1 N, 2 N et 4 N.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau XXIII (p. 195). On voit que les valeurs maximales sont données par l'hydrolyse effectuée avec l'acide chlorhydrique 4 N dès après 2 h. Toutefois, par sécurité, nous prolongeons l'hydrolyse pendant 4 h.

2 - L'emploi de l'acide chlorhydrique 5,6 N est à rejeter car il provoque la destruction d'une proportion importante d'osamine. Le tableau XXIV (p. 196) est, à cet égard, démonstratif. Nous y avons rassemblé les résultats des dosages de la glucosamine effectués par différents procédés dans des hydrolysats de l'ovomucoïde réalisés, d'une part, avec de l'acide chlorhydrique 4 N pendant 4 h et, d'autre part, avec de l'acide chlorhydrique 5,6 N, à 105°C pendant 24 h dans les conditions d'hydrolyse de chaînes peptidiques.

3 - Il existe deux types de liaisons "osaminidyl", de stabilités différentes.

Le premier est représenté par les liaisons "osaminidyl" des glycanes eux-mêmes. Ces liaisons sont très labiles et sont quantitativement coupées dans les conditions d'hydrolyse des glycanes (HCl 1,5 à 2 N ; à 100°C ; pendant 1,5 à 2 h).

Le second est constitué par les liaisons amino-acide-glucosamine (de type N- β -aspartyl-glucosaminylamine et O-séryl ou thréonyl-glucosaminide) qui sont nettement plus stables et résistent aux conditions d'hydrolyse précédentes. On voit, en effet, à l'observation de la courbe de la figure 17 (p. 59) et du tableau XXIII (p. 195) que 93 p.100 de la glucosamine sont libérés par l'acide chlorhydrique 2 N en 1 h et que le taux maximal n'est atteint qu'après 2 h d'hydrolyse par HCl 4 N.

4 - Dans tous les cas, pour éviter toute cause d'erreur, il est indispensable d'effectuer une cinétique d'hydrolyse des glycoprotéines par l'acide chlorhydrique 4 N et de tenir compte de la valeur maximale.

Tableau XXIII

Libération de la glucosamine (exprimée en g p.100 g de glycoprotéine)
par hydrolyse de l'ovomucoïde dans différentes conditions.

Durée de l'hydrolyse	Concentration de l'acide chlorhydrique			
	1 N	2 N	4 N	4 N
1 h	10,70	13,74	14,25	14,25
2 h	12,80	14,04	14,7	14,7
3 h	13,80	14,40	14,7	14,7
4 h	13,80	14,25	14,7	14,7

Tableau XXIV

Dosage de la glucosamine (exprimée en g p.100g de glycoprotéine) dans des hydrolysats d'ovomucoïde obtenus dans différentes conditions.

Conditions d'hydrolyse	Méthodes colorimétriques		Méthodes chromatographiques (a)	
	ELSON et MORGAN (b)	GOOD et BESSMAN (c)	Ninhydrine	ELSON et MORGAN (d)
HCl 4 N ; 100°C ; 4 h	14,4	13,6	14,7	14
HCl 5,6 N ; 100°C ; 24 h	12,4	12,1	13,5	12,8

(a) Chromatographie à l'Auto-analyseur Technicon effectuée dans les conditions de dosage des acides aminés présents dans des hydrolysats de glycoprotéines (voir p. 209).

(b) Procédé de BELCHER, NUTTEN et SAMBROOK (755) de dosage des osamines-bases.

(c) Procédé de dosage après N-réacétylation de l'osamine.

(d) Procédé de MONSIGNY (756).

III - CONCLUSIONS

Les conclusions que nous pouvons tirer de nos résultats et de ceux d'autres auteurs à propos de la libération quantitative des osamines présentes dans les glycoprotéines sont les suivantes :

1 - L'acide chlorhydrique 5,6 N, utilisé dans les conditions d'hydrolyse des chaînes peptidiques détruit les osamines dans des proportions qui varient avec la durée de l'hydrolyse : 15 à 20 p.100 après 24 h ; 40 à 50 p.100 après 72 h.

L'acide chlorhydrique 4 N, au contraire, respecte les osamines pendant au moins 4 h, temps suffisant pour libérer quantitativement les osamines conjuguées.

2 - Toutefois, on effectuera systématiquement des cinétiques d'hydrolyse avec l'acide chlorhydrique 4 N, -pendant des temps échelonnés entre 2 et 10 h, par exemple -, et on retiendra les valeurs maximales.

3 - L'oxygène et les sels de fer catalysent la destruction des osamines. Les hydrolyses seront donc toujours effectuées en tubes scellés sous vide ou sous atmosphère d'azote, avec de l'acide chlorhydrique redistillé, exempt de fer.

4 - L'ordre décroissant de stabilité des osamines vis-à-vis de l'acide chlorhydrique est le suivant : acide muramique, glucosamine et galactosamine, mannosamine.

2°) PURIFICATION DES HYDROLYSATS

L'acide chlorhydrique des hydrolysats peut être éliminé de différentes manières :

A - Par évaporation sous vide.

L'élimination de l'acide chlorhydrique est réalisée en exsiccateur en présence de soude, le vide étant maintenu pendant plusieurs jours. Chaque jour, quelques millilitres d'eau bidistillée ou de méthanol sont ajoutés à l'hydrolysat desséché pour faciliter l'évaporation de l'acide chlorhydrique résiduel.

B - Par lyophilisation.

Le procédé de BISERTE et MOSCHETTO (757) est parfaitement applicable dans le cas des osamines et représente, d'ailleurs, le procédé de choix. Il consiste à lyophiliser à -70°C les solutions d'acide chlorhydrique préalablement amenées à une concentration 0,1 à 0,3 N.

C - Par chromatographie sur échangeurs d'ions.

Dans le cas où les osamines sont mêlées à des substances qui risquent d'interférer dans les analyses, on les purifie sur des échangeurs de cations ou d'anions.

a - Purification sur échangeurs de cations. Tous les procédés décrits jusqu'à ce jour dérivent de la méthode originale de BOAS (758). Les hydrolysats sont passés sur des colonnes de résines anioniques (nous utilisons au Laboratoire, la Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50) sous la forme "acide". Après un lavage soigneux des colonnes à l'eau distillée, les osamines, retenues par la résine, sont déplacées avec de l'acide chlorhydrique 0,3 N (+) que l'on élimine ensuite par évaporation sous vide ou par lyophilisation.

SMYTH et UTSUMI (759) ont décrit récemment un procédé d'élution sélective des osamines présentes dans les hydrolysats de glycoprotéines. Les hydrolysats sont passés sur des colonnes de Dowex 2 x 8 et les osamines sont déplacées par un tampon de pH 9 à 1 p.100 d'acétate de N-éthylmorpholine.

b - Purification sur échangeurs d'anions. L'acide chlorhydrique peut encore être éliminé par un passage sur échangeur d'anions comme le Dowex 1 x 8 ("mesh" 100-200 ; forme carbonate) (HARTREE) (760). On prendra alors les plus grandes précautions pour éviter la dégradation des osamines-bases en maintenant, par exemple, la solution effluente à un pH acide et en l'évaporant à siccité par lyophilisation.

(+) On évitera l'emploi de solutions d'élutions basiques qui détruisent les osamines.

3°) CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE DES OSAMINES ET DE LEURS DERIVES

Les différents types de chromatographie et d'électrophorèse sur papier peuvent être appliqués

- I - soit aux osamines elles-mêmes ;
- II - soit à leurs dérivés
 - A - de N-substitution ;
 - B - de réduction : les osaminitols ;
 - C - de dégradation oxydative : les pentoses.

I - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES OSAMINES-BASES

La séparation électrophorétique des osamines n'est pas satisfaisante. Pour être efficace, elle devrait faire appel à des solutions tampons boratées dont l'alcalinité provoque une destruction rapide des osamines qui sont, comme nous l'avons vu plus haut, extrêmement labiles en milieu basique. C'est pourquoi, les auteurs donnent leur préférence à la chromatographie sur papier ou sur colonne en milieu neutre ou acide. En outre, quelques procédés, encore rares, de chromatographie sur couche mince et en phase gazeuse ont été décrits.

1. - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

a - SYSTEMES-SOLVANTS

Dans le cas de la chromatographie préparative destinée à isoler les osamines pour en déterminer les propriétés physico-chimiques et dans le cas de la chromatographie quantitative, on évitera l'emploi de systèmes-solvants basiques qui provoquent la destruction d'une proportion importante de ces composés.

De nombreux systèmes-solvants ont été décrits pour réaliser la séparation chromatographique des osamines, mais bien peu donnent de bonnes résolutions et seules, les chlorhydrates de glucosamine et la galactosamine sont justiciables de cette méthode. Parmi les systèmes-solvants acides que nous avons utilisés, nous n'avons retenu que les deux mélanges suivants qui fournissent des séparations satisfaisantes de ces deux osamines.

Système-solvant n°1 : Pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau

(5:5:3:1) (FISCHER et NEBEL) (761). La saturation de la cuve est réalisée avec un mélange de pyridine/acétate d'éthyle/eau (11:40:6).

D'après KUHN, BISTER et FISCHER (762) sur papier Schleicher et Schüll 2043 b, les $R_{\text{Glucosamine}}$ de quelques D-osamines sont les suivants :

Galactosamine	:	0,91
Allosamine	:	0,97
Gulosamine	:	1,04
Talosamine	:	1,08
Altrosamine	:	1,10
Mannosamine	:	1,13
Idosamine	:	1,29

Système-solvant n°2 : n-butanol/pyridine/acide chlorhydrique 0,1 N (5:3:2)

(MASAMUNE et YOSIZAWA (763) ; BOURRILLON et MICHON (764)). Chromatographie descendante sur papier Schleicher et Schüll 2043 b lavé aux acides.

Nota : Dans certains systèmes-solvants, comme le mélange de n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5), les chlorhydrates d'osamines donnent fréquemment deux taches : l'une correspond au chlorhydrate et l'autre à l'acétate d'osamine (PARTRIDGE (765) ; LEABACK et WALKER (766) ; CRUMPTON (767)).

b - REVELATION

La révélation des osamines peut être effectuée à l'aide de réactifs non spécifiques comme les solutions de sels d'aniline, de nitrate d'argent, de triphényltétrazolium (voir p. 73) ou de ninhydrine. Elle est réalisée spécifiquement par les procédés de PARTRIDGE (768) et de MONSIGNY (769) dont les différentes étapes sont les suivantes :

Procédé de PARTRIDGE (770)

1 - Pulvérisation d'une solution alcaline d'acétylacétone préparée extemporanément en dissolvant 1,5 ml d'acétylacétone dans 50 ml

d'une solution aqueuse de carbonate de sodium cristallisé à 17 g p.100 ml.

2 - Séjour à l'étuve à 105°C pendant 5 mn.

3 - Pulvérisation d'un réactif d'EHRlich modifié (p-diméthylamino-benzaldéhyde 1 g ; éthanol 30 ml ; acide chlorhydrique concentré 30 ml ; n-butanol 180 ml).

4 - Séjour à l'étuve à 90°C pendant 5 à 10 mn.

Les osamines donnent une coloration rose violacé (sensibilité : 5 à 10 µg).

Procédé de MONSIGNY (771)

1 - Les osamines sont d'abord N-réacétylées par pulvérisation d'une solution constituée par le mélange extemporané de 20 ml de tétraborate de sodium 0,05 M, de 20 ml d'éthanol absolu et de 2 ml d'anhydride acétique. Les chromatogrammes sont séchés pendant 30 mn à la température du laboratoire, puis pendant 15 mn à 100°C.

2 - Ils sont ensuite imprégnés par pulvérisation de la solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde de PARTRIDGE (772).

L'emplacement des osamines est marqué par l'apparition de taches violettes.

Nous citerons, en outre, pour mémoire, le procédé de WILLIAMSON et ZAMENHOF (773) dont le principe consiste à désaminer les osamines par l'acide nitreux et à mettre en évidence les "chitoses" formés par un réactif à l'indol. La méthode, qui n'est pas spécifique, est d'application longue et délicate et n'offre pas d'avantage particulier sur les deux techniques précédentes.

c - IDENTIFICATION

L'identification des osamines-bases peut être réalisée :

1 - à l'aide de témoins latéraux ;

2 - en déterminant leur pouvoir rotatoire spécifique (voir Tableau XXV ; p. 202) et leur spectre de diffractions des rayons X (BLIX, SVENNERHOLM et WERNER (774) ; COX et JEFFREY (775)).

Tableau XXV

Constantes physiques des chlorhydrates d'osamines et
des N-acétyl-osamines (KUHN, BISTER et FISCHER) (776).

	P.F.	$[\alpha]_D$ eau
D-Allosamine	-	+ 17°
D-Altrosamine	-	- 14°
D-Galactosamine	178 - 180°C	+ 93°
D-Glucosamine	190 - 210°C	+ 72°
D-Gulosamine	165 - 170°C	+ 14°
D-Idosamine	-	+ 1°
D-Mannosamine	178°C	- 3°
D-Talosamine	151°C	- 6°
N-acétyl-D-allosamine	197°C	- 53°
N-acétyl-D-altrosamine	95 - 97°C	+ 5°
N-acétyl-D-galactosamine	172°C	+ 86°
N-acétyl-D-glucosamine	205°C	+ 41°
N-acétyl-D-gulosamine	-	- 19°
N-acétyl-D-idosamine	-	- 45°
N-acétyl-D-mannosamine	105°C	+ 10°
N-acétyl-D-talosamine	-	- 11°

3 - en précisant les propriétés physico-chimiques de leurs dérivés carbobenzoxylés (CHARGAFF et BOVARNICK (777) ; HEYNS et BECK (778)) ou des bases de SCHIFF obtenues en les condensant avec le 2,4-dinitrobenzaldéhyde (NEUBERGER) (779) ou le 2-hydroxynaphtaldéhyde (JOLLES et MORGAN) (780).

d - DOSAGE

Les procédés de dosage chromatographique que nous avons décrits à propos des oses neutres sont applicables aux osamines. En outre, celles-ci peuvent être spécifiquement dosées dans les éluats de chromatogrammes par les procédés de dosage colorimétrique des osamines que nous avons exposés dans une Monographie antérieure (MONTREUIL et SPIK) (781).

2. - CROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DE VERRE

RADHAKRISHNAMURPHY, KAYMAN et BERENSON (782) ont décrit un procédé de séparation rapide, en 70 mn, de la glucosamine, de la mannosamine et de la galactosamine par chromatographie sur papier de verre imprégné d'acide silicique à l'aide du système-solvant : benzène/pyridine/solution aqueuse de borate de sodium 0,05 M de pH 8,6 (10:9:1). Les valeurs de R_F des trois osamines sont, respectivement, de 0,48 - 0,35 et 0,21.

Le support chromatographique est préparé selon le procédé de BERENSON et DALFERES (783).

3. - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Peu de procédés de chromatographie sur couche mince des osamines ont été décrits. D'après les auteurs, les meilleures séparations des hexosamines sont obtenues avec les systèmes-solvants et les supports suivants :

a - PROCEDES CHROMATOGRAPHIQUES

Procédé de STAHL et KALTENBACH (784)

Support : mélange à parties égales de Silicagel G et d'alumine G.

Systèmes-solvants :

1°) - n-propanol/acétate d'éthyle/eau/ammoniaque à 25 p.100 (5:1:3:1)

Galactosamine R_F : 0,49

Glucosamine R_F : 0,54

2°) - mêmes composants, mais dans les proportions
6:1:3:1.

Galactosamine	R_F	: 0,40
Glucosamine	R_F	: 0,48

Procédé de GUNTHER et SCHWEIGER (785)

Support : M.N. Cellulose

Système-solvant :

pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5:5:1:3)

$R_{Glucosamine}$ de la galactosamine : 0,83

Procédé de MOCZAR et al. (786) (voir p.121)

b - REVELATION

La révélation des osamines sur les chromatoplaques peut être effectuée avec les réactifs que nous avons décrits à propos de la chromatographie sur papier de ces composés (voir p.200). On peut aussi appliquer le procédé de SASLAW et WARAVDEKAR (787) de révélation des acides sialiques par le réactif à l'acide periodique-acide thiobarbiturique que GUNTHER et SCHWEIGER (788) ont adapté aux osamines : les chromatoplaques sont imprégnées par pulvérisation d'une solution acétonique d'acide periodique (1 ml d'une solution de 1,9 g d'acide periodique p.10 ml d'eau + 19 ml d'acétone), maintenues 10 mn à 20°C, puis traitées pendant 2 mn par une solution d'arsénite de sodium à 3,5 p.100 ml d'acide chlorhydrique 1 N. Elles sont ensuite imbibées d'une solution d'acide thiobarbiturique à 0,6 g p.100 ml d'éthanol et portées à 90°C pendant 5 mn. La glucosamine et la galactosamine donnent des colorations, respectivement, jaune et verte.

c - DOSAGE

Dans le procédé d'ESSER (789) des quantités d'osamines comprises entre 0,25 et 2,5 µg peuvent être dosées par dissolution des taches, révélées par un réactif à la ninhydrine, dans une solution méthanolique d'acétate de cadmium (0,5 g p.100 ml).

La méthode de MOCZAR et coll. (790) de dosage densitométrique des oses neutres (voir p.121) est applicable aux osamines préalablement révélées à l'aide d'un réactif au triphényltétrazolium.

4. - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNES D'ECHANGEURS D'IONS

Les différents procédés de chromatographie des osamines sur échangeurs de cations (voir par exemple, EASTOE (791) ; GLEGG et coll. (792) ; MOORE, SPACKMAN et STEIN (793) ; PARTRIDGE et ELSDEN (794) ; RONDLE et MORGAN (795) STRANGE et DARK (796) dérivent tous de la méthode originale de GARDELL (797) qui entre nos mains nous a paru la plus satisfaisante. Elle permet, à la fois, l'identification et le dosage des nombreuses osamines. Toutefois, elle ne réalise pas la séparation de la mannosamine et de la glucosamine.

Récemment, la chromatographie des osamines sur échangeurs d'ions a été adaptée à l'analyse automatique.

a - Procédé de GARDELL (798)

500 µg d'osamines totales en solution dans 0,5 ml d'acide chlorhydrique 0,3 N sont déposés au sommet d'une colonne d'échangeurs de cations (DOWEX 50 x 8 ; "mesh" 200-400 ; 0,7 x 40 cm) préalablement régénérée par l'acide chlorhydrique 4 N (+) et lavée avec 50 à 100 ml d'acide chlorhydrique 0,3 N. Des fractions de 0,5 ml sont recueillies toutes les 10 mn à l'aide d'un collecteur automatique et les osamines sont dosées dans chaque tube, après neutralisation, par la méthode d'ELSON et MORGAN (799), modifiée par BELCHER, NUTTEN et SAMBROOK (800). Des courbes sont ensuite tracées. Les quantités respectives de chaque osamine sont déterminées à ± 5 p.100 près, en effectuant la somme des quantités dosées dans les tubes correspondant à chacun des pics.

Le procédé de GARDELL (801) permet d'obtenir d'excellentes séparations de la glucosamine et de la galactosamine. Toutefois, la mannosamine et la glucosamine donnent un pic unique.

Modifications au procédé de GARDELL

CRUMPTON (802) a modifié la méthode de GARDELL en remplaçant la Dowex 50 x 8 par la Zeo-Carb 225 x 8 et en effectuant l'élution avec de

(+) La résine est conservée dans une solution d'acide chlorhydrique 4 N.

l'acide chlorhydrique 0,33 N. L'auteur a appliqué ce procédé à la séparation de mélanges complexes d'osamines (Fig.34 ; p. 207) et obtenu, en particulier, de bonnes résolutions des osamines suivantes : galactosamine, mannosamine, glucosamine et acide muramique.

PEARSON (803) a effectué une étude critique du comportement chromatographique de la glucosamine et de la galactosamine sur différents échangeurs de cations (Dowex 50 ; Amberlite C G 50 et C G 120) avec divers systèmes-tampons et a tenté d'adapter l'Auto-analyseur Technicon au dosage des osamines par le réactif à la ninhydrine.

b - Procédés automatiques

Bien que, à notre connaissance, trois procédés seulement de dosage automatique par chromatographie sur colonne des osamines aient été décrits dans la littérature, jusqu'à présent, de très nombreux existent, en réalité, car chaque laboratoire adapte le matériel dont il dispose à "l'auto-analyse" des osamines. Toutefois, quelles que soient les méthodes chromatographiques utilisées, tous les auteurs appliquent deux sortes de dosages colorimétriques.

- les uns, non spécifiques, sont effectués avec des réactifs à la ninhydrine et, dans ce cas, les expérimentateurs s'efforcent d'éviter l'interférence des acides aminés en modifiant la composition des tampons d'élution.

- les autres emploient des réactifs spécifiques au p-diméthylaminobenzaldéhyde adaptés à l'auto-analyse, comme, par exemple, dans le procédé de GREGORY et VAN LENTEN (804).

Nous décrirons, à titre indicatif et dans leur principe, les procédés de séparation chromatographique et de dosage automatique des osamines décrits dans la littérature et les méthodes qui ont été mises au point au Laboratoire par MONSIGNY (805).

Procédé de HEYNS, MÜLLER et KIESSLING (805 bis)

La chromatographie est effectuée sur des colonnes (0,4 x 60 cm) de Dowex 50, dans un Auto-analyseur Beckman. L'élution est réalisée, à 60°C, à l'aide d'un tampon citrate 0,4 N en ions sodium, ajusté à pH 1,6 par l'addition d'acide chlorhydrique. Les composés élués sont dosés par un

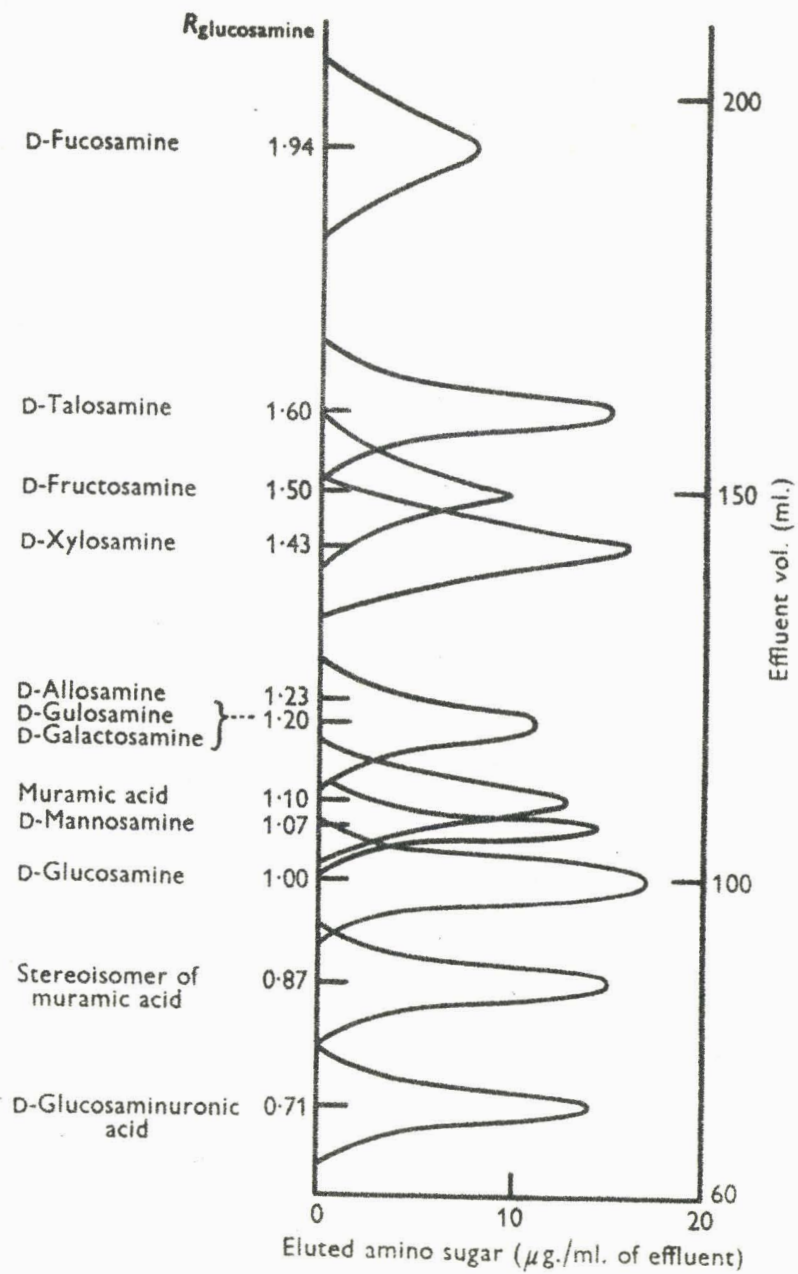


Figure 34

Chromatographie sur Zeo-Carb 225 d'un mélange d'osamines (CRUMPTON) (806)

réactif à la ninhydrine.

L'auteur obtient de bonnes résolutions des composés suivants (dans l'ordre d'élution) : acide 2-amino-glucuronique, glucosamine, mannosamine, galactosamine, gulosamine, idosamine, acide 2-amino-galacturonique. Toutefois, la mannosamine, la galactosamine et la gulosamine ne sont pas parfaitement séparées (+).

Procédé de GREGORY et VAN LENTEN (807)

GREGORY et VAN LENTEN ont adapté l'Auto-analyseur Technicon au dosage chromatographique des osamines. L'élution de ces dernières est effectuée à 60°C, soit avec un tampon borate de pH 7,6, soit avec un tampon phosphate de pH 7. Les osamines sont dosées avec un réactif à la ninhydrine et par une méthode originale de dosage sous la forme de N-acétylosamines. Les auteurs obtiennent une très bonne résolution de la glucosamine, de la galactosamine et de la mannosamine, de la fucosamine, de la talosamine et des acides aminogluconique et amino-galacturonique.

Procédé de BRENDEL, ROSZEL, WHEAT et DAVIDSON (808)

BRENDEL et coll. ont adapté l'Auto-analyseur Technicon au dosage des osamines. Les conditions expérimentales sont les suivantes : colonnes de Dowex 50 x 8 ("mesh" 200-400) ; élution par un gradient de concentration et de pH (tampon d'acétate de pyridine) ; dosage par la ninhydrine. L'ordre d'élution des composés est le suivant :

acide muramique
acides amino-hexuroniques
hexosamines
diamino-hexoses

Le procédé fournit d'excellentes séparations de la glucosamine, de la galactosamine et de la mannosamine. Il a été appliqué par les auteurs (BRENDEL, STEELE, WHEAT et DAVIDSON (809) à l'analyse de mélanges d'acides aminés et d'osamines. Dans ce cas, celles-ci sont dosées, à la fois, par un procédé à la ninhydrine et par une méthode réductimétrique au ferricyanure.

(+) Le procédé a été appliqué par les auteurs à l'identification et au dosage des dérivés méthylés de la galactosamine.

Procédés de MONSIGNY (810)

MONSIGNY a décrit une série de modifications des modalités d'utilisation de l'Auto-analyseur Technicon dans le but précis de doser la glucosamine et la galactosamine, soit dans des hydrolysats de glycoprotéides, soit dans des solutions provenant de l'action de la soude en milieu réducteur, sur des glycoprotides dans lesquels des glycannes sont conjugués à la fraction protidique par des liaisons O-séryl et O-thréonyl-N-acétylosaminidiques. Dans ce cas particulier, la réaction de rupture de ces liaisons par un mécanisme dit de " β -élimination" provoque l'apparition dans les hydrolysats acides, - à côté de la glucosamine, de la galactosamine et des acides aminés classiques -, d'osaminitols et d'acide α -amino-butérique. Les procédés décrits par MONSIGNY permettent d'identifier et de doser ces composés.

Nous décrivons uniquement les modifications apportées aux techniques classiques proposées par la firme Technicon, en particulier au gradient de pH et de force ionique, réalisé dans un "Autograd" à 9 chambres avec les tampons dont la composition est rassemblée dans le Tableau XXVI (p. 210) (+).

α - Séparation simultanée de la glucosamine et des acides aminés.

La composition des gradients G-AA-6 et P-AA-6 (++) utilisés pour séparer simultanément la glucosamine et les acides aminés sont précisées respectivement dans le Tableau XXVII (p. 211) pour la colonne de 0,6 x 130 cm remplie de "Chromobeads A" et dans le Tableau XXVIII (p. 212) pour la colonne de 0,6 x 65 cm, remplie de "Chromobeads B".

Les osamines et les acides aminés sont dosés avec un réactif à la ninhydrine. Simultanément, les osamines sont déterminées spécifiquement à l'aide du procédé d'ELSON et MORGAN adapté à l'auto-analyse et qui nécessite l'emploi des réactifs suivants :

- Solution tamponnée d'acétylacétone :

Acétylacétone		7 ml
Solution $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$	0,66 M	100 ml

Cette solution est stable pendant 24 h.

(+) Les colonnes utilisées sont celles que fournit la firme Technicon : colonnes de "Chromobeads A" (0,6 x 130 cm) et de "Chromobeads B" (0,6 x 65 cm) thermorégulées à 60°C. Afin d'éviter le "vieillessement" des résines, ces dernières sont régénérées, une fois par semaine, par le passage d'une solution, à pH 3, d'EDTA à 1 p.100.

(++) Nomenclature utilisée au Laboratoire.

Tableau XXVI

Composition des tampons utilisés pour préparer
les solutions d'élution des colonnes de chromatographie
de l'Auto-analyseur Technicon.

Tampon de pH 2,75 :

- Citrate trisodique 0,2 M⁽⁺⁾, ajusté à pH 2,75 avec de l'acide chlorhydrique et contenant 10 p.100 (v:v) de méthanol.

Tampon de pH 2,875 :

- Citrate trisodique 0,2 M⁽⁺⁾, ajusté à pH 2,875 avec de l'acide chlorhydrique.

Tampon de pH 3,8 :

- Citrate trisodique 0,2 M⁽⁺⁾, ajusté à pH 3,80 avec de l'acide chlorhydrique.

Tampon de pH 5,0 :

- Citrate trisodique 0,2 M⁽⁺⁾
 - Chlorure de sodium 0,6 M
- On ajuste à pH 5,0 avec de l'acide chlorhydrique.

Tampon de pH 6,10 :

- Citrate trisodique 0,2 M⁽⁺⁾
 - Chlorure de sodium 1 M
- On ajuste à pH 6,10 avec de l'acide chlorhydrique.

(+) en sodium. (Citrate trisodique à 5 H₂O : 89,25 g ; eau q.s.p. : 5 l)

Tableau XXVII

Composition du gradient G-AA-6 pour la séparation
simultanée de la glucosamine et des acides aminés (Colonne de 0,6 x 130 cm).

Compartment	pH 2,875	pH 3,8	pH 5,0	$\frac{\text{Méthanol}}{\text{n-Butanol}}$ 1:1	NaCl 2,5 M
1	70	-	-	5	-
2	75	-	-	-	-
3	75	-	-	-	-
4	60	-	5	-	10
5	-	60	5	-	10
6	-	30	40	-	5
7	-	-	75	-	-
8	-	-	75	-	-
9	-	-	75	-	-

Tableau XXVIII

Composition du gradient P-AA-6 pour la séparation de la glucosamine et des acides aminés (Colonne de 0,6 x 65 cm).

Compartiment	pH 2,75	pH 2,875	pH 3,80	pH 6,10	NaCl 2,5 M	Méthanol
1	38	-	-	-	-	2
2	12	28	-	-	-	-
3	-	40	-	-	-	-
4	-	25	12	-	3	-
5	-	10	27	-	3	-
6	-	-	-	40	-	-
7	-	-	-	40	-	-
8	-	-	-	40	-	-
9	-	-	-	40	-	-

- Solution de soude 1,66 M

- Solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde :

p-diméthylaminobenzaldéhyde	3,2 g
Ethanol	210 ml
HCl pur R.P.	30 ml

A préparer extemporanément.

Dans la figure 35 (p. 214) nous avons schématisé le dispositif d'auto-analyse qui permet d'effectuer les dosages simultanés par le réactif à la ninhydrine (dans les conditions proposées par la firme Technicon) et par le réactif d'ELSON et MORGAN modifié.

β - Séparation simultanée de la glucosamine de la galactosamine et des acides aminés

La composition du gradient P-AA-9 utilisé pour séparer simultanément la glucosamine, la galactosamine et les acides aminés est précisée dans le Tableau XIX (p. 215) pour la colonne de 0,6 x 65 cm. Ce gradient ne permet malheureusement pas une séparation satisfaisante de la phénylalanine et de l'ammoniaque.

5. - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Les osamines peuvent être identifiées et dosées par chromatographie en phase gazeuse des triméthylsilyl-dérivés soit des osamines elles-mêmes, soit de leurs dérivés N-substitués (N-acétylés (voir p.223) ; N-carboéthoxylés (voir p.227)) ; soit de leurs dérivés de réduction (voir p.229).

Le présent paragraphe concerne la chromatographie en phase gazeuse des dérivés silylés des osamines-bases.

Les premières tentatives de dosage des osamines par chromatographie en phase gazeuse ont été effectuées par SWEELEY et coll. (811,812). Toutefois, elles sont demeurées au stade expérimental. Au contraire, les procédés suivants ont reçu quelques applications.

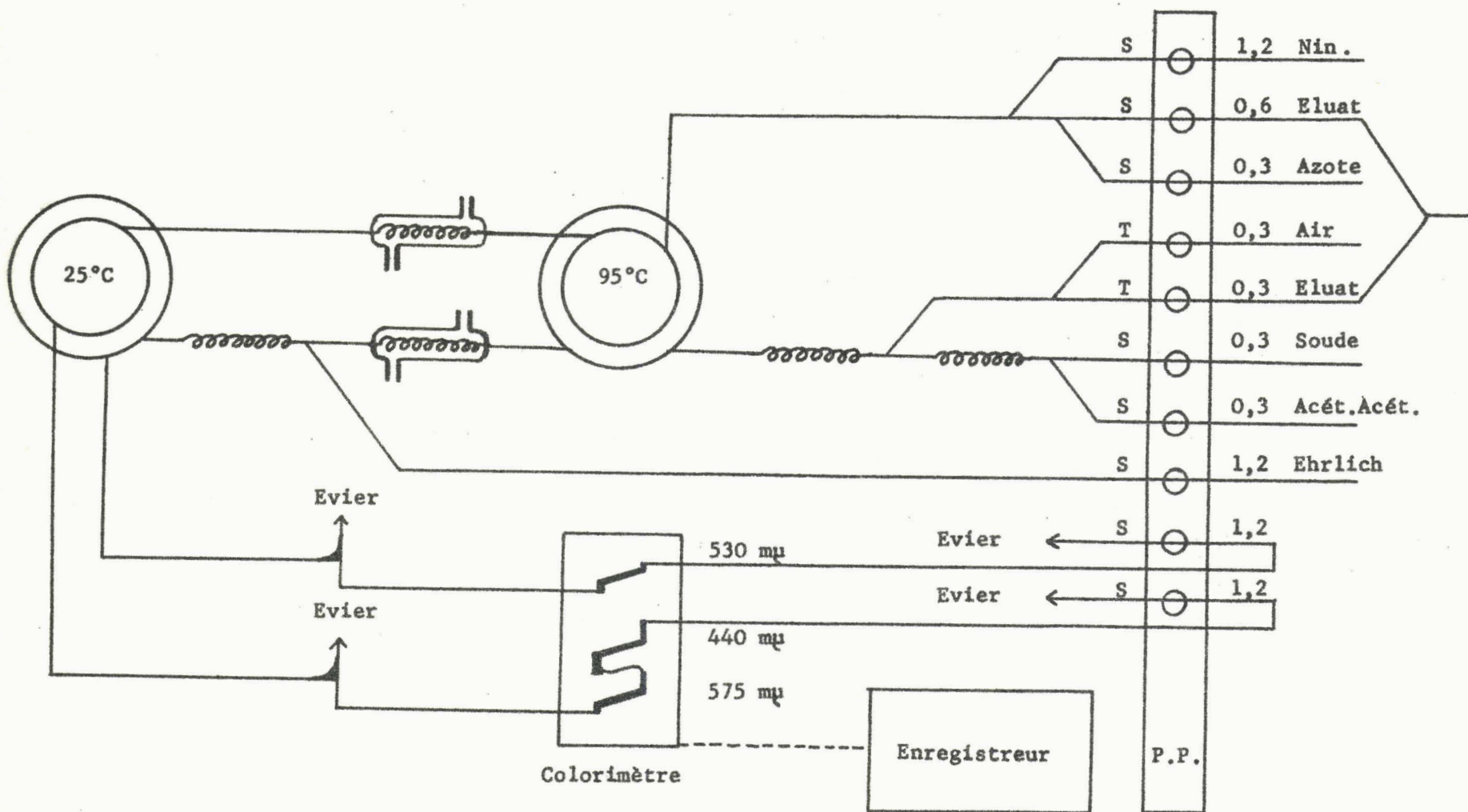


Figure 35

Schéma de dispositif automatique, adapté à l'Auto-analyseur Technicon, de dosage simultané 1) des acides aminés et des osamines par le réactif à la ninhydrine et 2) des osamines seules par le réactif d'ELSON-MORGAN modifié. S : tubes de "Solvaflex" ; T : tubes de "Tygon" ; P.P. : pompe péristaltique. Les nombres précisent le débit des fluides en ml p. mn.

Tableau XXIX

Composition du gradient P-AA-9 pour la séparation simultanée de la glucosamine, de la galactosamine et des acides aminés (Colonne de 0,6 x 65 cm).

Compartment	pH 2,75	pH 2,875	pH 3,80	pH 6,10	NaCl 2,5 M	Méthanol
1	38	-	-	-	-	2
2	12	28	-	-	-	-
3	-	32	5	-	3	-
4	-	25	10	-	5	-
5	-	10	25	-	5	-
6	-	-	-	40	-	-
7	-	-	-	40	-	-
8	-	-	-	40	-	-
9	-	-	-	40	-	-

Procédés de KÄRKKÄINEN et coll.

KÄRKKÄINEN, LEHTONEN et NIKKARI (813,814) et LEHTONEN, KÄRKKÄINEN et HAAHTI (815) ont décrit trois procédés, peu différents les uns des autres, qui permettent d'identifier et de doser, outre des oses neutres et les acides glucuronique et iduronique (voir p. 179), la glucosamine et la galactosamine. Les osamines libérées par une hydrolyse chlorhydrique, sont purifiées sur Dowex 50, triméthylsilylées et analysées en chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes :

- Chromatographe Barber-Colman M 10.
- Colonnes de verre de 4 mm x 6 pieds, traitées par le triméthylchlorosilane et l'hexaméthylidisilazane.
- Phase stationnaire : 3 p.100 de SE-30 sur Gas-Chrom P, siliconé, "mesh" 100-140 .
- Température de la colonne : 140 à 205°C.
- Gaz vecteur : azote , 30 ml p.mn sous 0,5 atm.
- Détection par ionisation de flamme.

Le sorbitol est utilisé comme "témoin interne". Les erreurs de dosage sont de l'ordre de ± 8 p.100.

Procédé de RADHAKRISHNAMURTHY et coll. (816)

RADHAKRISHNAMURTHY et coll. ont décrit un procédé différent du précédent par les modalités de l'analyse en phase gazeuse dont les conditions sont les suivantes :

- Chromatographe F et M, modèle 402.
- Colonnes de verre de 4 ft.
- Phase stationnaire : 15 p.100 d'Apiezon M sur Gas-Chrom CLZ, "mesh" 80 -100 .
- Température de la colonne : 170°C.
- Gaz vecteur : helium, hydrogène ou air.
- Détection par ionisation de flamme.

La précision des dosages est de l'ordre de ± 2 à 4 p.100.

II - CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE
DES DERIVES N-SUBSTITUES DES OSAMINES

A - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES N-ACETYL-OSAMINES (+)

La séparation chromatographique et électrophorétique des N-acétyl-osamines est beaucoup plus aisée que celle des osamines et elle permet d'identifier des dérivés acétylés des trois osamines que les procédés précédents ne parvenaient pas toujours à discriminer : la glucosamine, la galactosamine et la mannosamine. La N-réacétylation des osamines est très simple à réaliser et elle est quantitative. En outre, elle conduit à des dérivés très stables dont le dosage colorimétrique est très sensible et très précis. Le procédé d'identification et le dosage par chromatographie ou par électrophorèse des osamines préalablement N-réacétylées représente donc une méthode très séduisante et très efficace.

I. - N-ACETYLATION DES OSAMINES

a - PROCÉDES "IN VITRO"

De nombreux procédés de N-acétylation par l'anhydride acétique (++) en milieu alcalin ont été proposés. Ils diffèrent par la nature du composé alcalin utilisé pour libérer l'osamine-base de sa "combinaison" sous forme de chlorhydrate :

- acétate d'argent, en présence de méthanol (ZUCKERKANDL et MESSIMER-KLEBERMASS (819) ; WHITE (820)).
- bicarbonate de sodium (ROSEMAN et DAFFNER)(821).
- triméthylamine (PERKINS) (822) ou triéthylamine (KUHN et BISTER) (823).
- soude diluée (LEVY et MC ALLAN)(824).
- Dowex 2 x 8, sous sa forme carbonate (ROSEMAN et LUDOWIEG) (825).

Nous avons effectué une étude critique de ces procédés dans le but de déterminer les meilleures conditions à appliquer pour obtenir une N-acétylation quantitative. Nous avons appliqué les méthodes que nous décrivons ci-dessous à des solutions titrées de chlorhydrate de glucosamine. Nous

(+) Nous avons précisé dans le tableau XV (p. 159) le comportement électrophorétique des N-glycolyl-osamines.
(++) L'emploi du cétène a été préconisé par NEUBERGER et PITT-RIVERS (817) et par WEISSMAN et MEYER (818).

avons ensuite dosé colorimétriquement, par la technique de GOOD et BESSMAN (826) la N-acétylglucosamine formée, dans les effluents de colonnes jumelées d'échangeurs de cations et d'anions.

- Procédé de WHITE (827). Traitement du résidu sec contenant 10 mg de chlorhydrate de glucosamine par 0,25 ml d'anhydride acétique, 0,75 ml de méthanol anhydre et des quantités d'acétate d'argent variant de 1 à 25 mg. La solution est maintenue pendant 24 h à 20°C.

Résultats : La N-acétylation est totale avec des quantités de sel d'argent supérieures à 10 mg.

- Procédés de ROSEMAN et coll. (828,829). A 1 ml de solution contenant 2 mg d'osamine, nous avons ajouté 1,5 ml d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 0,5 g p.100 ml et des quantités d'anhydride acétique variant de 20 à 100 µl. On abandonne la solution pendant 24 h à 20°C.

Résultats : La N-acétylation est complète avec 20 µl d'anhydride acétique. Elle atteint 90 p.100 seulement avec 50 µl et 78 p.100 avec 100 µl. La quantité d'anhydride acétique doit donc être soigneusement déterminée par rapport à la quantité d'osamine à N-acétyler.

- Procédé de LEVVY et MC ALLAN (830). 10 mg d'osamine sont dissous dans 100 µl de soude 1 N (rapport molaire osamine/soude : 1,5, le plus favorable d'après LEVVY et MC ALLAN) et 7,5 µl d'anhydride acétique. La solution est maintenue à 20°C pendant 15 mn.

Résultats : La formation de N-acétylglucosamine est faible puisqu'elle n'excède pas 40 à 70 p.100. Ce résultat s'explique vraisemblablement par la destruction partielle de la N-acétylglucosamine par la soude, avec formation concomitante de dérivés cycliques (chromogènes I,II et III de KUHN).

Nous avons tenté d'améliorer les résultats en traitant la glucosamine par la soude 0,1 N, puis, par 1 ml d'acétone contenant 7,5 µl d'anhydride acétique. Nous ne sommes pas parvenus à dépasser un rendement de 87 p.100.

CONCLUSIONS. Les procédés les plus satisfaisants sont ceux de WHITE (831) et de ROSEMAN et coll. (832,833), probablement parce que la N-acétylation

est effectuée en milieu neutre, dans le premier cas, légèrement acide, dans le second et que l'on évite ainsi la destruction rapide des osamines et des N-acétylosamines en milieu alcalin. Le mode opératoire que nous appliquons est le suivant :

Les hydrolysats sont débarrassés de l'acide chlorhydrique et éventuellement purifiés sur échangeurs de cations, suivant les protocoles que nous avons décrits plus haut (voir p.197). La teneur en osamines du résidu sec est déterminée de manière à préciser les quantités de réactifs, - en particulier, d'anhydride acétique -, à utiliser.

Nous appliquons, ensuite, indifféremment le procédé de WHITE ou de ROSEMAN et coll. Les solutions réactionnelles sont purifiées sur des colonnes (1 x 10 cm) jumelées de Dowex 50 x 8 (forme acide) et de Duolite A-102-D (forme acétate). La solution effluente est évaporée à siccité et les N-acétylglucosamines sont soumises à l'analyse chromatographique ou électrophorétique.

b - PROCEDE DE N-ACETYLATION SUR PAPIER

OHKUMA et SHINOHARA (834) ont décrit un élégant procédé qui consiste à effectuer la N-acétylation des osamines directement sur les chromatogrammes. Nous avons appliqué cette méthode qui donne d'excellents résultats. Toutefois, nous n'avons pas vérifié la quantitativité de la N-acétylation. Le mode opératoire est le suivant :

- 100 µg environ des chlorhydrates d'osamines sont déposés sur les chromatogrammes (papier Whatman n°3 MM imprégnés d'une solution de tétraborate de potassium 0,025 M). Au même endroit, on ajoute 1 goutte d'une solution d'anhydride acétique dans l'acétone (1:1) (v:v).

- On effectue, ensuite, après 10 mn de réaction, une électrophorèse à 6 V/cm pendant 6 h. Dans ce procédé original, OHKUMA et SHINOHARA (835) réalisent une électro-chromatographie bidimensionnelle.

Les résultats apportés par ce procédé doivent être interprétés avec prudence car, selon les auteurs eux-mêmes (OHKUMA et SHINOHARA) (836), des réactions d'épimérisation et de formation de chromogènes par cyclisation des N-acétylosamines ont parfois lieu.

2. - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES N-ACÉTYL-OSAMINESa - SYSTEMES-SOLVANTS

La séparation des dérivés N-acétylés de la glucosamine, de la galactosamine et de la mannosamine n'est pas réalisable d'une manière satisfaisante par l'emploi d'un seul système-solvant. Au contraire, l'utilisation de plusieurs systèmes-solvants permet d'identifier les trois dérivés, par exemple, en combinant l'emploi des systèmes-solvants 1 et 2 ou 2 et 3 décrits dans le Tableau XXX (p.221).

Une étude critique des systèmes-solvants a été effectuée par CRUMPTON (837) qui a étudié le comportement de 11 osamines.

b - REVELATION

Les N-acétylosamines sont révélées spécifiquement (+) par le procédé dit d'EHRlich "indirect" qui tire parti de la formation, en milieu alcalin, de chromogènes à partir des N-acétylosamines. Ces derniers sont mis en évidence, dans un second temps, avec un réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde.

- Procédé de SALTON (838).

Les chromatogrammes sont d'abord imprégnés, par pulvérisation, avec une solution éthanolique de borate de sodium obtenue en mélangeant extemporanément, à volumes égaux, de l'éthanol à 95 p.100 et une solution aqueuse de borate de sodium 0,05 M. Ils sont ensuite portés à 100°C pendant 10 mn en atmosphère humide, puis traités avec le réactif suivant :

Solution fraîche à 2 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde par 100 ml d'acide acétique glacial	10 ml
n-Butanol	30 ml
Acide chlorhydrique concentré	0,4 ml

Ils sont enfin maintenus, pendant 30 à 90 mn à 20°C. Sensibilité de la réaction : 1 µg de N-acétylglucosamine.

(+) Elles se révèlent faiblement avec les réactifs aux sels d'aniline.

Tableau XXX

Comportement chromatographique des N-acétylosamines dans différents systèmes-solvants

Systèmes-solvants	N-acétylglucosamine	N-acétylgalactosamine	N-acétylmannosamine
(1) n-butanol/pyridine/eau (6:4:3) (papier boraté) (a) (b)	17,3 cm	14,3 cm	13,3 cm
(2) n-butanol/pyridine/eau (6:4:3) (papier au chlorure de baryum) (c) (d)	15,6 cm	12,3 cm	16,7 cm
(3) n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) (e)	1,44 (f)	1,38 (f)	1,62 cm

(a) Obtenu en imbibant les chromatogrammes d'une solution de borate de sodium 0,2 M de pH 8 et en laissant sécher les feuilles.

(b) CARDINI et LENOIR (839).

(c) Obtenu en traitant les chromatogrammes avec une solution de chlorure de baryum 0,1 M.

(d) HEYWORTH, PERKINS et WALKER (840).

(e) PARTRIDGE (841).

(f) R_{Glucose}

- Autres procédés. La solution boratée utilisée dans le procédé de SALTON peut être remplacée par des solutions de carbonate de sodium 0,025 M ou 0,05 M (5 mn à 100°C) et la solution chlorhydrique de p-diméthylaminobenzaldéhyde par la solution trichloracétique employée pour révéler les acides sialiques par la réaction d'EHRlich "directe" (voir p. 143).

Nota : 1 - La réaction d'EHRlich "indirecte" n'est pas spécifique des N-acétylosamines car elle a lieu aussi avec l'acide N-acétylneuraminique. Toutefois, la discrimination entre ces deux types de constituants peut être réalisée par l'application de la réaction d'EHRlich "directe" qui est donnée seulement par les acides sialiques.

2 - La fonction "acétamido" des N-acétylosamines permet de révéler ces dernières avec le réactif non spécifique des liaisons CO-NH de RYDON et SMITH (842) éventuellement modifié (PAN et DUTCHER (843) ; MAZUR, ELLIS et CAMMARATA (844) ; POWNING et IRZYKIEWICZ (845)).

c - IDENTIFICATION

L'identification des N-acétylosamines est effectuée comme celle des osamines-bases (voir p. 201). Nous avons précisé dans le tableau XXV (p. 202) quelques unes de leurs propriétés physiques.

d - DOSAGE

Les N-acétylosamines peuvent être dosées dans les éluats de chromatogrammes quantitatifs, soit par des procédés réductimétriques (voir p.89), soit par des méthodes colorimétriques spécifiques comme celle de GOOD et BESSMAN (846).

SALTON (847) a, en outre, décrit un procédé par élution de la coloration développée sur les chromatogrammes eux-mêmes par les N-acétylosamines révélées par le procédé d'EHRlich "indirect". Nous n'avons pas retenu cette méthode en raison de l'instabilité de la coloration.

3. - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

La séparation des N-acétyl-hexosamines par chromatographie sur couche mince peut être réalisée selon le procédé de GÜNTHER et SCHWEIGER (848).

Support : Cellulose MN, imprégnée de tampon borate de pH 8 suivant :

Tétraborate de sodium	0,05 M
Chlorure de sodium	0,05 M
Acide borique	0,2 M

Système-solvant :

Acétate d'éthyle/isopropanol/pyridine/eau (7:3:2:2)

R _f Glucosamine	: N-acétyl-glucosamine	2,95
	N-acétyl-galactosamine	1,65

4. - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

a - Procédé de SWEELEY, BENTLEY, MAKITA et WELLS (849)

SWEELEY et coll. séparent les N-acétyl-glucosamine, galactosamine et mannosamine sous la forme de triméthylsilylés dérivés par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions expérimentales suivantes :

- colonne de SE-52 sur support de Chromosorb W ("mesh" 80-100) lavé aux acides et "silanisé".

colonne à 15 p.100 de succinate de polyéthylène glycol sur Chromosorb W ("mesh" 80-100) lavé aux acides et "silanisé".

- Température de la colonne 160 à 170°C.

b - Procédé de RICHEY, RICHEY et SCHRAER (850)

Les conditions de chromatographie des triméthylsilyl-dérivés des N-acétylglucosamine et galactosamine appliquées par les auteurs sont celles que nous avons décrites à la page 106, à propos des oses.

c - Procédé de KOBATA et ZIRÔ (851)

KOBATA et ZIRÔ ont décrit un procédé de séparation des triméthylsilyl-dérivés des N-acétyl-glucosamine et galactosamine (et de N-acétylglucosaminitol) dont le mode opératoire est le suivant :

- Colonne en U (0,4 x 100 cm) à 11 p.100 de polyester adipique de néopentylglycol sur Chromosorb W ("mesh" 80-100).

- Gaz vecteur : hélium (95 ml/mn).

- Température de la colonne : 193°C.

5. - ELECTROPHORESE SUR PAPIER

a - MODES OPERATOIRES

La séparation électrophorétique des N-acétylosamines est très satisfaisante et on préfère cette méthode à la chromatographie sur papier.

D'excellents résultats sont fournis par le procédé de FOSTER et STACEY (852) : électrophorèse en tampon boraté (tétraborate de sodium : 23,4 g ; soude 1 N : 30 ml ; eau q.s.p. 1000 ml) ; papier Whatman n°3 ; 20 à 25 V/cm pendant 2,5 h. Les résultats obtenus par CRUMPTON (853), à propos de huit N-acétyl-osamines, sont rassemblés dans le tableau XXXI (p. 225).

Au Laboratoire, nous utilisons un tampon boraté (tétraborate de sodium à 1 g p.100 ml d'eau) de pH 9,2 qui est mieux adapté à l'électrophorèse en cuve "en toit". Les électrophorégrammes sont effectués sur papier Arches 304, à 12 V/cm pendant 4 h. Nous obtenons de bonnes séparations des N-acétylglucosamine, galactosamine et mannosamine (Fig. 36 ; p. 226).

b - REVELATION

Quand les électrophorégrammes sont effectués en tampon boraté, il suffit de les maintenir, dès la sortie de la cuve d'électrophorèse, pendant 10 mn à 100°C, puis de les révéler par un réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde (voir p. 201). On réalise, de cette manière, une réaction d'EHRLICH "indirecte".

Les autres procédés de révélation (nitrate d'argent alcalin ; sels d'aniline) ne peuvent être utilisés qu'après avoir éliminé l'acide borique des électrophorégrammes. On y parvient en pulvérisant sur ces derniers, au recto, puis au verso, du méthanol acétique (acide acétique à 5 ml p.100 ml de méthanol) et en les laissant sécher à la température du laboratoire.

Tableau XXXI

Comportement électrophorétique (+) calculé par rapport au glucose (Rm) de quelques N-acétyl-osamines (d'après CRUMPTON) (855).

	Rm
N-acétyl-fucosamine	0,14
N-acétyl-glucosamine	0,23
N-acétyl-xylosamine	0,23
N-acétyl-galactosamine	0,33
N-acétyl-allosamine	0,42
N-acétyl-talosamine	0,60
N-acétyl-gulosamine	0,63
N-acétyl-mannosamine	0,65

(+) Tampon boraté de pH 10 de FOSTER et STACEY (854) ; papier Whatman n° 3 ; 20 à 25 V/cm pendant 2,5 h.

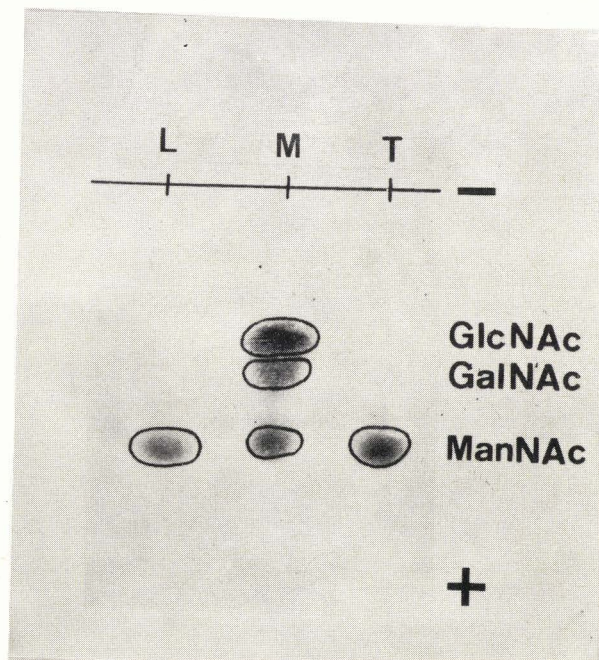


Figure 36

Séparation électrophorétique des N-acétylglucosamine (GlcNAc), galactosamine (GalNAc) et mannosamine (ManNAc) et identification de la N-acétylmannosamine libérée par action de la neuraminyl-aldolase sur des échantillons d'acide N-acétylneuraminique.

B - IDENTIFICATION DE DERIVES DEN-SUBSTITUTION DIVERS1. - DNP-osamines

La glucosamine et la galactosamine peuvent être identifiées par chromatographie de leur DNP-dérivés obtenus, soit par dinitrophénylation des osamines préalablement libérées par hydrolyse chlorhydrique, soit par dinitrophénylation des osamines conjuguées suivie d'une hydrolyse chlorhydrique de l'oside.

La séparation chromatographique est réalisée sur papier (KENT, LAWSON et SENIOR) (856) ou sur colonne de Kieselgur avec un tampon boraté (ANNISON, JAMES et MORGAN) (857).

Dans le cas des osamines libres, nous avons vérifié, avec LESKOWITZ et KABAT (858), que le rendement de la dinitrophénylation était très faible et même, parfois, nul, vraisemblablement à cause de la grande labilité des osamines en milieu alcalin. C'est pourquoi, il est préférable de les réduire, dans un premier temps, par les borohydrures alcalins, et de les caractériser, dans un second temps, sous la forme de DNP-osaminols que l'on identifie par chromatographie sur colonne d'acide silicique et de "Celite" (LESKOWITZ et KABAT) (859).

2. - N-carbo-éthoxy-osamines

Dans un procédé décrit par OATES et SCHRAGER (860), les triméthylsilyl-dérivés des N-carbo-éthoxy-glucosamine et galactosamine sont identifiés et dosés par chromatographie en phase gazeuse (+). Les osamines sont N-carbo-éthoxylées par le chloroformiate d'éthyle dont l'action, selon les auteurs, est quantitative en 15 mn, puis O-triméthylsilylés.

La séparation et le dosage des composés sont effectués dans les conditions suivantes :

- Chromatographe PYE 104, à détection par ionisation de flamme.
- Colonne de verre (3/32 inches x 5 feet).
- Support d'Apiezon L et d'adipate de néopentylglycol sur Chromosorb G ("mesh" 80 -100).
- Gaz vecteur : azote (40 à 45 ml/mn).

(+) Simultanément, les hexoses et désoxyhexoses sont dosés sous la forme de triméthylsilyl-dérivés.

- Température initiale : 130°C

Température finale : 210°C, atteinte à raison de 1,5°C/mn.

3. - N-dansyl-osamines

GALOYAN, MESROB et HOLEYSŮVSKÝ (861) ont décrit un procédé de séparation des N-dansyl-hexosamines par chromatographie en couche mince. Le mode opératoire est le suivant :

a - Dansylation des hexosamines. La réaction du chlorure de l'acide 1-diméthyl-amino-naphtalène-5-sulfonique est effectuée sur des quantités d'osamines de l'ordre de 0,003 à 0,005 μ mole, selon la technique de GRAY et HARTLEY (862) modifiée.

b - Séparation des dérivés d'hexosamines.

Support : Silicagel G imprégné de tétraborate de sodium 0,2 M.

Système-solvant : Pyridine/acétate d'éthyle/eau (61:31:8).

Dansyl-glucosamine R_F : 0,65

Dansyl-galactosamine R_F : 0,50

Les dansyl-hexosamines sont révélées par la lumière ultra-violette (fluorescence jaune).

La méthode de séparation des hexosamines sous forme de dansyl-dérivés constitue une méthode simple, rapide et très sensible à condition qu'il n'existe pas d'acides aminés dans la solution analysée.

III - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES OSAMINITOLS

L'analyse chromatographique des osaminitols présente deux raisons d'intérêt.

En premier lieu, elle facilite la séparation et le dosage des osamines par chromatographie en phase gazeuse. Celle-ci est appliquée aux dérivés triméthylsilylés des osaminitols N-réacétylés et permet d'éviter la formation des anomères α et β -triméthylsilylés. A notre connaissance, un seul procédé, fondé sur ce principe, a été décrit.

En second lieu, elle trouve son application dans l'analyse de mélanges d'osamines et d'osaminitols au cours des études sur la structure des glycannes. Par exemple, dans le cas de liaisons O-séryl ou O-thréonyl-N-acétylglucosaminidiques ou galactosaminidiques, l'action de la soude en

milieu réducteur détache des glycanes dans lesquels co-existent des osamines et des osaminitols. Ces derniers proviennent de la réduction des osamines O-conjuguées.

A - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Dans le procédé d'HOROWITZ et DELMAN (862), les osamines sont d'abord réduites par le borohydrure de sodium et la solution obtenue est débarrassée de l'acide borique par évaporation en présence de méthanol. Les osaminitols sont ensuite N-acétylés par la méthode de WHITE (voir p. 218) et identifiés par chromatographie en phase gazeuse de leurs triméthylsilyl-dérivés dans les conditions expérimentales suivantes :

- Chromatographe Perkin-Elmer 801.

- Colonnes de verre à 10 p.100 de polyester succinique du butanediol sur Celite AW de "mesh" 80-100 (0,25 in./6 ft) ou à 4 p.100 de SE 30 sur "Gas Chrom" PA.W. HMDS de "mesh" 80-100 (0,25 in./3 ft).

- Gaz vecteur : hélium (28 ml à 30 ml/mn).

- Température de l'injecteur : 180-200°C.

Température de la colonne : 210°C.

- Détection par ionisation de flamme.

Ce procédé permet aussi de séparer et de doser simultanément les hexitols. Quand les deux osaminitols sont seuls présents, une séparation rapide est effectuée en programmant la température de 125 à 215°C, à raison de 4°C p. mn.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEURS D'IONS

Procédé de MONSIGNY (863)

MONSIGNY a décrit un procédé de dosage du N-acétyl-glucosaminitol ou du N-acétyl-galactosaminitol présents, en association avec des osamines, dans les hydrolysats de glycanes détachés de glycoprotides par la soude en milieu réducteur.

1° - Principe

Les osaminitols (glucosaminitol ou galactosaminitol) possèdent un volume d'élution identique à celui de la galactosamine lorsqu'on utilise les résines et les gradients décrits plus haut (voir p. 213). C'est pourquoi il est nécessaire de détruire les osamines afin d'éliminer l'interférence

avec l'osaminitol. Les osamines présentes dans les hydrolysats des glycoprotides sont N-acétylées en appliquant la technique de ROSEMAN et LUDOWIEG (864). Les N-acétyl-osamines formées, très instables en milieu alcalin, sont détruites par la soude. Les autres constituants N-acétylés, sont stables dans ces conditions. On les désacétyle par une hydrolyse acide et on les dose à l'Auto-analyseur Technicon.

2° - Mode opératoire

a - Méthode de N-acétylation de ROSEMAN et LUDOWIEG (865) (voir p. 218).

b - Destruction des osamines. La solution, ajustée à pH 7,0, est additionnée d'un volume égal de soude 0,2 N et maintenue au bain-marie bouillant pendant 5 mn.

c - N-désacétylation. Après refroidissement, les solutions sont additionnées de 1 ml d'acide chlorhydrique 4 N et maintenues pendant 2 h à 100°C. L'hydrolysat est évaporé à siccité et le résidu est étudié à l'Auto-analyseur Technicon avec le gradient décrit dans le Tableau XXIX (p. 215) qui permet de séparer l'osaminitol des acides aminés.

IV - ETUDE DES PRODUITS DE LA DESAMINATION OXYDATIVE DES OSAMINES

1. - PRINCIPE

La glucosamine et la galactosamine sont désaminées oxydativement, par la ninhydrine, respectivement, en arabinose et en lyxose (GARDELL, HEIJ-KENJOLD et ROCHNORLUND) (866) dont la séparation chromatographique est aisée à l'aide des systèmes-solvants classiques :

n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5)

R_{Glucose}	arabinose	: 1,2
	lyxose	: 1,4

pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2)

R_{F}	arabinose	: 0,23
	lyxose	: 0,30

n-butanol/éthanol/eau (4:1:1)

R_{Glucose}	arabinose	: 1,26
	lyxose	: 1,55

Ce procédé n'est pas d'application générale car les 2-épimères des 2-désoxy-2-amino-oses donnent le même pentose : la glucosamine et la mannosamine, par exemple, conduisent à l'arabinose.

2. - MODES OPERATOIRES

a - Procédé de GARDELL, HEIJKENJOLD et ROCHNORLUND (867)

A 3 ml d'une solution d'osamines débarassée des oses "neutres" (+) (1 à 5 mg), on ajoute 2 ml d'une solution de ninhydrine (0,48 g de ninhydrine dans 100 ml de citrate de sodium 0,1 M de pH 4,7). On maintient à 100°C pendant 30 mn.

La solution obtenue est filtrée et purifiée par un passage sur un échangeur de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide ; 1,8 x 5cm), puis d'anions (Duolite A 40 ; "mesh" 25-50 ; forme formiate ; 1,8 x 5 cm). Le liquide effluent, débarrassé de la ninhydrine et des produits de dégradation des acides aminés, est évaporé à siccité et le résidu est soumis à la séparation chromatographique dans les systèmes-solvants décrits plus haut. La révélation des taches de pentoses est effectuée à l'aide du réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (868) (coloration rose).

Le procédé n'est pas quantitatif et ne permet pas de doser les osamines. Il ne peut fournir qu'une approximation quant aux proportions relatives des osamines présentes dans un hydrolysats.

b - Procédé de STOFFYN et JEANLOZ (869)

α - Un procédé analogue a été décrit par STOFFYN et JEANLOZ. Il diffère par la composition de la solution de ninhydrine (solution aqueuse à 2 p.100 (p:v) de ninhydrine et 4 p.100 (v:v) de pyridine) et par l'absence de purification de la solution réactionnelle qui est déposée telle quelle sur le chromatogramme. Le système-solvant utilisé est composé de n-butanol/éthanol/eau (4:1:1)

β - Un procédé plus simple encore a été décrit par les mêmes auteurs. Il consiste à pulvériser sur la tache déposée sur le chromatogramme une solution à 2 g de ninhydrine pour 100 ml d'éthanol à 95°C contenant 4 p.100 (v:v) de pyridine et à maintenir le chromatogramme à 80°C pendant 3 h.

(+) Obtenue, par exemple, par élution chlorhydrique de l'échangeur de cations utilisé pour purifier un hydrolysats d'oside ou de glycoprotéide (voir p. 65)

dans un récipient clos contenant une solution aqueuse de pyridine à 50 p.100 (v:v). Les chromatogrammes sont développés comme précédemment.

c - Procédé de BYCHKOV et KOLESNIKOVA (870)

BYCHKOV et KOLESNIKOVA ont décrit un procédé de désamination quantitative des hexosamines qui permet de déterminer ces dernières en dosant les pentoses formés par chromatographie quantitative sur papier.

Les hexosamines (5 mg) en solution dans 0,5 ml d'eau et 0,5 ml de pyridine sont désaminées par 50 mg de ninhydrine, en tube scellé, par chauffage à 100°C pendant 30 mn. Les pentoses sont séparés par plusieurs chromatographies sur papier successives dans le système-solvant n-butanol/éthanol/eau (4:1:1) et dosés colorimétriquement par la méthode de DISCHE et SHETTLES (871) à la cystéine-sulfurique.

4°) DOSAGE COLORIMETRIQUES ET ENZYMATIQUES DE LA GLUCOSAMINE, DE LA GALACTOSAMINE ET DE LA MANNOSAMINE EN MELANGE

Dans le cas de mélanges de glucosamine et de galactosamine, - et aussi, pour certains procédés, de mannosamine -, on peut ne pas avoir recours à des procédés chromatographiques ou électrophorétiques pour doser chacune de ces osamines. Il existe, en effet, des méthodes qui permettent de doser colorimétriquement ou enzymatiquement chacune des osamines d'une manière spécifique. Nous citerons, par exemple, les méthodes de CESSI et SERAFFINI-CESSI (871 bis) et de LUDOWIEG et BENMAMAN (871 ter). Cette dernière est précise à 1 p.100 près et nous a donné des résultats très satisfaisants.

I - PROCEDES COLORIMETRIQUES

A - PROCEDE DE ROSEMAN ET DAFFNER

Un premier procédé consiste à associer les méthodes d'ELSON et MORGAN (872) de dosage des osamines et de MORGAN et ELSON (873) de dosage des N-acétyl osamines. Il est fondé sur le fait que la glucosamine et la galactosamine donnent, à quantités égales, la même intensité de coloration avec la méthode d'ELSON et MORGAN (874), tandis que leurs N-acétyl-dérivés fournissent des intensités de coloration différentes (AMINOFF, MORGAN et WATKINS (875) ; REISSIG, STROMINGER et LELOIR (876)). Ce procédé ne nous paraît pas satisfaisant ni dans son principe, - car les osamines ne donnent pas toujours la même intensité de coloration -, ni dans son application qui a conduit ROSEMAN et DAFFNER (877) à la conclusion que l'ovomucoïde renfermait 7 résidus de galactosamine et 15 résidus de glucosamine alors qu'il est bien établi, à présent, que seule, cette dernière est présente dans l'ovomucoïde. Une modification apportée par RADHAKRISHNAMURTHY et BERENSON (878) n'a pas amélioré la précision.

B - PROCEDE DE GOOD ET BESSMAN (879)

Pour éliminer la principale cause d'erreur des procédés de ROSEMAN et de RADHAKRISHNAMURTHY apportée par les différences d'absorbance molaire donnée par les osamines dans les réactions colorées, GOOD et BESSMAN (880) ont introduit des termes de correction qui, selon les auteurs, conduisent à des résultats satisfaisants.

Nous n'avons pas effectué d'étude critique des méthodes précédentes. Au contraire, à la suite d'essais satisfaisants, nous appliquons couramment, au Laboratoire, les procédés suivants.

C - PROCEDE DE CESSI ET SERAFFINI-CESSI (881)

1. - PRINCIPE

Ce procédé colorimétrique permet de doser la glucosamine et la galactosamine en mélange. Il est fondé sur l'observation de TRACEY (882) que la réaction de l'acétylacétone en milieu boraté provoque une diminution de la coloration donnée par la glucosamine, plus importante (- 75 p.100) que celle de la galactosamine (- 50 p.100).

Dans le procédé de CESSI et SERAFFINI-CESSI (883), la coloration donnée par la glucosamine est seulement 1 p.100 de celle que fournit une quantité égale de galactosamine. Les osamines-bases, obtenues par action de la triéthylamine sur les chlorhydrates, sont condensées avec l'acétylacétone. Le produit de la réaction est traité à chaud par un tampon boraté de pH 8. Dans ces conditions, seule la galactosamine donne du 2-méthylpyrrole qui est recueilli par distillation et dosé par le p-diméthylaminobenzaldéhyde. La connaissance de la concentration de la solution en osamines totales, déterminée par la méthode d'ELSON et MORGAN, permet de connaître, par différence, le taux de glucosamine.

2. - REACTIFS

- Méthanol anhydre
- Solution témoin des chlorhydrates de glucosamine et de galactosamine.

- Solution d'acétylacétone et de triéthylamine :

Acétylacétone	25 ml
Triéthylamine	25 ml

Pyridine	1 ml
Méthanol	49 ml

Cette solution doit être préparée au moment de l'emploi.

- Solution boratée ajustée à pH 8

Tétraborate de potassium à 4 H ₂ O	50,2 g
Acide borique	40,6 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

- Solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde

p-diméthylaminobenzaldéhyde	0,8 g
Acide chlorhydrique	3,5 ml
Ethanol absolu q.s.p.	100 ml

3. - MODE OPERATOIRE

1 ml de l'hydrolysate renfermant 10 à 50 µg d'osamines est évaporé à siccité, sous vide, dans des tubes fermés par un bouchon rodé muni d'un robinet.

On ajoute, ensuite, 1 ml du réactif à l'acétylacétone et on maintient les tubes bouchés à 55°C pendant 16 h. La solution est évaporée sous vide.

On ajoute alors 6 ml de la solution boratée et on porte le mélange à 100°C pendant 20 mn. On distille ensuite à 35°C et on recueille les deux premiers millilitres dans un tube jaugé à 10 ml dans lequel on a préalablement introduit 8 ml de la solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde. La coloration qui se développe est stable au delà de 30 mn pendant plusieurs heures. L'absorbance des solutions est déterminée à 545 mµ.

Parallèlement, on dose les osamines totales par la méthode d'ELSON et MORGAN (884), modifiée par BELCHER et coll. (885) en introduisant dans chaque série de dosages des "témoins internes" constitués par des solutions titrées de glucosamine, d'une part, et de galactosamine, d'autre part. Ces témoins sont destinés à éliminer la cause d'erreur due aux différences d'absorbance données par des quantités égales des deux osamines. On peut alors, connaissant le taux de galactosamine, calculer celui de la glucosamine.

4. - RESULTATS

CESSI et SERAFFINI-CESSI ont précisé les absorbances données par différents composés à la concentration de 1 mM par ml de solution finale

D-galactosamine	14 200
D-glucosamine	180
D-mannosamine	1 400
N-acétyl-D-glucosamine	140
Glycocolle	2
Alanine	2
Lysine	3
Tyrosine	0
Proline	0
Hydroxyproline	10

On voit que l'absorbance donnée par la glucosamine est négligeable. Au contraire, la présence de mannosamine risque d'introduire une cause d'erreur. D'autre part, les protides n'interfèrent pas.

D - PROCEDE DE LUDOWIEG ET BENMAMAN (886)1. - PRINCIPE

Dans un premier temps, on dose les osamines totales à l'aide de réactifs qui donnent la même absorbance molaire avec chacune des osamines .

Dans un second temps, on dose sélectivement la galactosamine ou la mannosamine en tirant parti de la différence de réactivité de ces deux osamines, d'une part, et de la glucosamine, d'autre part, vis-à-vis de l'acétylacétone, à 0°C. Le mécanisme de la réaction a été démontré par LUDOWIEG et BENMAMAN : à 0°C, la glucosamine est transformée en un composé qui a été identifié par chromatographie à une céto-imine et qui ne réagit pas avec le réactif d'EHRlich ; au contraire, la galactosamine ou la mannosamine donnent des chromogènes qui fournissent une coloration rose avec ce réactif.

2. - DOSAGE DES OSAMINES TOTALES

a - Réactifs.

- Solution alcaline d'acétylacétone :

Acétylacétone 3 ml

Solution de carbonate de sodium 0,7 M q.s.p. 100 ml

Le pH de la solution est ajusté à 9,8 avec du carbonate de sodium solide. La solution doit être préparée extemporanément, et n'est stable que pendant 1 heure.

- Réactif d'EHRlich :

p-diméthylaminobenzaldéhyde 3,2 g

Acide chlorhydrique concentré 60 ml

Ethanol à 95 p.100 60 ml

- Solutions titrées d'hexosamines à 50 et 100 μg p. ml
d'acide chlorhydrique 0,3 N.

b - Mode opératoire.

A 0,5 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0,3 N renfermant au maximum 100 μg de chlorhydrate d'hexosamines, on ajoute 1 ml de la solution alcaline d'acétylacétone. Les tubes bouchés sont placés au bain-marie à 80°C pendant 1 h. Après refroidissement à 20-25°C pendant 5 mn, on ajoute 5 ml d'éthanol à 90 p.100 et 1 ml du réactif d'EHRlich. Après un repos d'1 h à l'obscurité, l'absorbance des solutions est mesurée à 535 μm .

c - Résultats

Les observations que nous avons effectuées et les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

1°) Les absorbances et les spectres donnés par les deux osamines varient d'un dosage à l'autre. Il est donc indispensable de tracer systématiquement les spectres d'absorption et de déterminer la longueur d'onde pour laquelle les absorbances sont identiques. Cette longueur d'onde peut varier de 527 μm à 549 μm . Les dosages doivent donc être effectués à la longueur d'onde ainsi déterminée et non pas à 535 μm , comme le préconisent les auteurs.

2°) Comme l'ont montré aussi LUDOWIEG et BENMAMAN, le chlorure de sodium diminue l'intensité des colorations.

3°) La loi de BEER est vérifiée pour des quantités d'hexosamines comprises entre 10 et 100 µg.

4°) L'interférence des protéines est éliminée par un passage des hydrolysats sur des colonnes de Dowex 50 W x 8, selon le procédé de BOAS (887), modifié par ROSEMAN et DAFFNER (888).

3. - DOSAGE SPECIFIQUE DE LA GALACTOSAMINE OU DE LA MANNOSAMINE

a - REACTIFS

Voir p.236.

b - MODE OPERATOIRE

Des tubes renfermant 0,5 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0,3 N contenant au maximum 200 µg de chlorhydrate d'hexosamines, sont placés dans un bain de glace : 1 ml de la solution alcaline d'acétylacétone est ajouté dans chacun des tubes qui sont maintenus, bien bouchés, dans de la glace pilée, au réfrigérateur à 0°C. Au bout de 18 h, on ajoute 10 ml d'éthanol à 90 p.100 dans les tubes maintenus en permanence dans la glace et 1 ml du réactif d'EHRlich. Les tubes, convenablement agités, sont placés à 60°C pendant 30 mn, rapidement refroidis à 20-25°C, et maintenus pendant 1 h à cette température. Les absorbances sont mesurées à 525 mµ.

c - RESULTATS

1°) Les absorbances données par 100 µg des chlorhydrates de glucosamine, de galactosamine et de mannosamine sont les suivantes :

Glucosamine	0,01
Galactosamine	0,37
Mannosamine	0,94

L'interférence de la glucosamine est donc très faible. Cependant, quand la quantité de glucosamine est élevée par rapport à la galactosamine ou à la mannosamine, il est important de tenir compte de l'interférence de la glucosamine et d'effectuer des corrections.

2°) Les colorations ne sont pas stables et les mesures doivent être effectuées rapidement.

3°) La loi de BEER est vérifiée par des quantités d'hexosamines comprises entre 10 et 200 µg.

4°) LUDOWIEG et BENMAMAN ont montré que l'intensité de coloration croît avec la durée de l'incubation à 0°C. Toutefois, l'interférence de la glucosamine est minimale après 18 h.

5°) Le chlorure de sodium augmente l'intensité de la coloration donnée par la glucosamine et par la galactosamine et diminue celle que fournit la mannosamine.

II - PROCEDES ENZYMATIQUES

Des procédés de dosages enzymatiques ont été décrits dont nous nous bornerons à exposer les principes.

La plupart d'entre eux sont fondés sur la phosphorylation spécifique de la D-glucosamine en D-glucosamine-6-phosphate par des hexokinases de diverses origines (cerveau, levure) en présence d'ATP (HARPUR et QUASTE (889) ; BROWN (890) ; GRANT et LONG (891)). SLEIN (892) précipite le glucosamine-6-phosphate sous la forme de sels de baryum ou de zinc et dose la galactosamine résiduelle. JOHNSTON (893) a montré que ce type de fractionnement n'était pas quantitatif et il préconise d'éliminer spécifiquement la galactosamine par un passage sur Dowex-50 et de doser le glucosamine-6-phosphate dans le liquide effluent par la méthode d'ELSON et MORGAN. Une cause d'erreur est apportée par la présence de mannosamine qui est phosphorylée en 6 par l'hexokinase. LUDERITZ et coll. (894) l'éliminent en N-réacétylant spécifiquement le glucosamine-6-phosphate par un enzyme d'acétylation et dosent le composé formé par une méthode dérivée du procédé de dosage des N-acétylosamines de MORGAN et ELSON.

Un autre procédé spécifique consiste à traiter le glucosamine-6-phosphate par des désaminases extraits du rein du Porc (LELOIR et CARDINI) (895,896) ; ou d'Escherichia Coli (COMB et ROSEMAN) (897,898) qui l'hydrolysent en ammoniac et en fructose-6-phosphate dosé ensuite colorimétriquement :

Certains procédés font appel à des enzymes d'oxydation. IMANAGA (899) par exemple, oxyde la D-glucosamine en acide D-glucosaminique à l'aide d'un extrait de Pseudomonas fluorescens et la dose en déterminant la quantité d'oxygène consommé. En outre, il détermine, colorimétriquement, la quantité de D-galactosamine non oxydée.

SEMPERE, GANCEDO et ASENSIO (900) dosent, par une méthode colorimétrique, la D-galactosamine et la N-acétyl-D-galactosamine en présence d'autres osamines, - et en l'absence de galactose -, avec la galactose-oxydase.

5° - IDENTIFICATION ET DOSAGE DE L'ACIDE MURAMIQUE

L'acide muramique est plus stable vis-à-vis des acides que les osamines et l'hydrolyse quantitative de ses liaisons est effectuée dans des conditions variables suivant les auteurs :

HCl 4 N, 105°C, 4 h (RICHMOND et PERKINS) (901)

HCl 2 N, 121°C, 2 h (PARK et THOMPSON) (902)

HCl 6 N, 105°C, 15 h (PARK et THOMPSON) (903)

La purification des hydrolysats est effectuée dans les conditions que nous avons décrites à propos des osamines (voir p. 197) et l'acide muramique est séparé des autres osamines et dosé par chromatographie sur papier ou sur colonne et par électrophorèse.

A - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

STROMINGER, PARK et THOMPSON (904) ont décrit (Tableau XXXII ; p. 240) plusieurs systèmes-solvants qui permettent de séparer l'acide muramique et la glucosamine.

L'acide muramique est révélé avec les réactifs classiques à l'oxalate d'aniline, à la ninhydrine et au nitrate d'argent. Son produit de N-réacétylation est mis en évidence par la réaction d'EHRlich "indirecte" (voir p. 200). En outre, le réactif à la diphénylamine trichloracétique de HOUGH, JONES et WADMAN (905) permet de différencier la N-acétylglucosamine, qui donne une coloration gris verdâtre, de l'acide N-acétyl-muramique qui donne une coloration rose.

Tableau XXXII

Chromatographie sur papier de la glucosamine et de l'acide muramique dans différents systèmes-solvants d'après STROMINGER, PARK et THOMPSON (906).

	Butanol/acide acétique/eau (4:1:5)	Phénol/eau (3:1)	Alcool amylique tertiaire/eau/ Acide formique (4:2:1)	Butanol/ éthanol/eau (4:1:1) (+)
Glucosamine	0,11	0,36	0,22	19,5
Acide muramique	0,36	0,49	0,78	15,3

(+) Distances parcourues en cm.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNES

PERKINS et ROGERS (907) séparent la glucosamine de l'acide muramique par chromatographie des hydrolysats chlorhydriques sur une colonne de charbon "Celite". Le mode opératoire est le suivant :

L'hydrolysat, dilué avec de l'eau, est passé sur une colonne de 5 mm de diamètre contenant 0,5 g d'un mélange, en proportions égales, de charbon (NORITAA) et de "Celite", préalablement lavés avec de l'acide chlorhydrique 2 N. Les osamines sont déplacées par le passage de 10 ml d'eau distillée et l'acide muramique par le passage de 10 ml d'une solution aqueuse d'éthanol à 5 p.100 (v:v).

STROMINGER, PARK et THOMPSON (908) séparent la glucosamine de l'acide muramique par chromatographie sur colonne de Dowex 50-H ("mesh" 200 à 400), l'élution étant effectuée par de l'acide chlorhydrique 0,8 N.

Dans le procédé de CRUMPTON (909), l'emploi du Zeo-Carb 225 (élution par HCl 0,33 N) permet de séparer la glucosamine de l'acide muramique et les stéréo-isomères de ces derniers.

Nota. STROMINGER, PARK et THOMPSON (910) désaminent par la ninhydrine l'acide muramique et identifient le composé formé par chromatographie sur papier.

L'acide N-acétylmuramique peut être identifié et dosé par chromatographie en phase gazeuse (GHUYSEN et STROMINGER) (911).

C - ELECTROPHORESE

La séparation électrophorétique de la glucosamine et de l'acide muramique peut être réalisée dans des tampons de pH 2,2 - 2,8 ou 4,5. Selon STROMINGER, PARK et THOMPSON (912), les distances parcourues en cm sont les suivantes (électrophorèse sur papier Whatman n° 1, à 1,3 V/cm pendant 2,5 h).

	pH 2,2	pH 2,8	pH 4,5
Glucosamine	9,1	8,8	8,4
Acide muramique	5,1	1,6	0,1

6° - CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions générales que nous pouvons tirer des études que nous avons effectuées à propos des procédés d'identification et de dosage des osamines sont les suivantes :

A - Comme dans le cas des autres types d'oses, la libération des osamines de leurs conjugaisons est un compromis entre la coupure quantitative des liaisons "osaminidyl" et la destruction des composés. Toutefois, grâce à la stabilité particulière des osamines en milieu acide, le problème de l'hydrolyse des liaisons "osaminidyl" est à présent résolu, - au moins dans le cas de la glucosamine, de la galactosamine et de la mannosamine qui ont fait l'objet de nos travaux -, sous réserve d'observer les conditions suivantes.

1 - Les hydrolyses doivent être effectuées en tubes scellés, sous vide, avec de l'acide chlorhydrique redistillé, exempt de sels de fer.

2 - Les osamines sont stables au moins pendant 4 h, vis-à-vis de l'acide chlorhydrique 4 N, à 100°C.

Elles sont partiellement détruites dans les conditions d'hydrolyse des chaînes peptidiques (HCl 5,6 N, à 100°C pendant 1, 2 et 3 jours). Toutefois, l'extrapolation des droites au temps zéro de l'hydrolyse permet d'éliminer en partie l'erreur par défaut. L'ordre décroissant de stabilité des osamines est le suivant : glucosamine, galactosamine, mannosamine.

3 - Les liaisons des osamines présentent des stabilités différentes vis-à-vis des acides. Les liaisons N-acétylosaminidiques sont très labiles. Au contraire, les liaisons osaminidiques sont stables. Les plus résistantes sont les liaisons N-(β -aspartyl)-osaminylaminiques et O-séryl et O-thréonylosaminidiques. Il est donc difficile de prévoir les conditions d'hydrolyse totale d'un glycanne et il est nécessaire d'effectuer systématiquement une étude de la cinétique de libération des osamines et de choisir les valeurs maximales. Au Laboratoire, nous dosons les osamines libérées par HCl 4 N, à 100°C, pendant 1, 2, 3, 4 et 6 heures.

B - Dans le cas de l'identification et du dosage de la glucosamine, de la galactosamine et de la mannosamine, le procédé de choix est actuellement l'électrophorèse des osamines préalablement N-réacétylées par les procédés de WHITE ou de ROSEMAN et coll. (voir p. 218) qui sont quantitatifs.

Les autres procédés ne permettent pas toujours de discriminer la glucosamine de la mannosamine. Toutefois, quand, seules, la glucosamine et la galactosamine sont présentes, ils donnent d'excellents résultats et leur application est simple. Il s'agit de la chromatographie sur papier et des procédés de GARDELL de désamination oxydative et de chromatographie sur colonne d'échangeurs de cations. Quant à la chromatographie sur couche mince et à la chromatographie en phase gazeuse, elles sont encore au stade expérimental de la mise au point.

C - Dans certains cas, des procédés colorimétriques permettent d'identifier et de doser rapidement et avec précision la glucosamine et la galactosamine en mélange. On évite ainsi l'application longue et toujours délicate des méthodes chromatographiques ou électrophorétiques. Les procédés les plus satisfaisants, à notre avis, sont ceux de CESSI et SERAFFINI-CESSI (voir p. 233) et de LUDOWIEG et BENMAMAN (voir p. 235) à condition d'apporter certaines modifications que nous avons décrites.

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

- ABDEL-AKHER M. et SMITH F., Nature, 1950, 166, 1037, (667,681)
- ABDEL-AKHER M. et SMITH F., J. Amer. Chem. Soc., 1951, 3, 5859 et 1951, 75, 5359. (642)
- ABRAHAMSON S., FISCHMEISTER I. et SVENNERHOLM L., Arkiv Kemi, 1961, 18, 435 (495)
- ABRAMS A., J. Biol. Chem., 1958, 230, 949, (502)
- ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol. 1965, 47, 1881, (22, 24,93,102)
- ADAMS G.A., in "Methods in Carbohydrate Chemistry", WHISTLER R.L., Academic Press éd., New York, London, 1965, V, 269, (582,595,620). 595,620)
- ADRIAN J., Ann. Nutr. Aliment. , 1965, 19, 27, (65,78)
- ALBERS P. et FREISKORN R., Ann., 1959, 622, 150, (261)
- ALVSAKER E. et GJESSING E.T., Acta Chem. Scand. 1964, 18, 2255, (237)
- AMINOFF D., Biochem. J., 1961, 81, 384, (384,390,396,409,424,569)
- AMINOFF D., MORGAN W.T.J. et WATKINS W.M., Biochem. J., 1950, 46, 426, (504,507,516) et Biochem. J., 1952, 51, 379, (875)
- ANASTASSIADIS P.A. et COMMON R.H., Can. J. Biochem. Physiol., 1958, 36, 413, (591,608,613,617,696)
- ANDERSON E., RUSSEL F.H. et SEIGLE L.W., J. Biol. Chem., 1963, 113, 683, (604)
- ANDERSON D.M.W. et STODDART J.F., Carbohydrate Res., 1966, 1, 417, (377g)
- ANDREWS P. et JONES J.K.N., J. Chem. Soc., 1954, 4134 et 1955, 583, (26)
- ANGELL S.F., NORRIS W. et RESCH C.E., Biochem. J., 1936, 30, 2146, (598)
- ANNISON E.F., JAMES A.T. et MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1951, 48, 477, (857)
- AQVIST S.E.G., Acta Chem. Scand., 1951, 5, 1031, (329)
- ARREGUÍN B., Anal. Chem., 1959, 31, 1371, (244)
- ARWIDI B. et SAMUELSON O., Anal. Chim. Acta, 1964, 31, 462, (339,343)
- ARWIDI B. et SAMUELSON O., Svensk Kemisk Tidskrift, 1965, 77, 84, (340,344)

- ASPINALL G.O., in "Methods in Carbohydrate Chemistry", WHISTLER R.L., Academic Press, New York, London, 1965, V, 395, (665)
- ASPINALL G.O. et CAÑAS-RODRIGUEZ A., J. Chem. Soc., 1958, 4020, (684)
- ASPINALL G.O., HIRST E.L. et MATHESON N.K., J. Chem. Soc., 1956, 989, (668,682)
- ASPINALL G.O. et TELFER R.G.J., J. Chem. Soc., 1955, 1106, (29)
- ATTERFELT P., BLOHME I., NORRBY A. et SVENNERHOLM L., Acta Chem. Scand., 1958, 12, 359, (492)
- AVIGAD G., ZELIKSON R. et HESTRIN S., Biochem. J., 1961, 80, 57, (205)
- AYRAULT-JARRIER M., CHEFTEL R.I. et POLONOVSKI J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 811, (406)
- AYRES A., DINGLE J., PHILIPPS A., REID W.W. et SOLOMONS G.L., Nature, 1952, 170, 834, (628)
- BAAR S., Biochem. J., 1954, 58, 175, (274)
- BACON J.S.D., Biochem. J., 1959, 73, 507, (204)
- BACON E. et BACON J.S.D., Biochem. J., 1954, 58, 396, (60)
- BACON J.S.D. et EDELMAN J., Biochem. J., 1951, 48, 114, (218)
- BADDILEY J., J. Roy. Inst. Chem., 1962, 366, (18)
- BAILEY R.W., Intern. Ser. Monog. Pure Appl. Biol., Biochem. Div., Pergamon Press éd., 1965, 4, Oligosaccharides, (31)
- BALAKRISHNAN S. et MC ILWAIN H., Biochem. J., 1961, 81, 72, (410)
- BALAZS E.A., BERNTSEN K.O., KAROSSA J. et SWANN D.A., Anal. Biochem., 1965, 12, 547, (653)
- BANCHER E., SCHERZ H. et KAINDL K., Mikrochim. Ichnoanal. Acta, 1964, 652, (318)
- BARKER S.A., FOSTER A.B., STACEY M. et WEBBER J.M., J. Chem. Soc., 1958, 2218, (30)
- BARRY G.T., J. Exptl. Med., 1958, 107, 507, (425)
- BARRY G.T., HAMM J.D. et GRAHAM M.G., Nature, 1963, 200, 806, (426)
- BARRY V.C. et MITCHELL P.W.D., J. Chem. Soc., 1954, 4020, (242)
- BARTLEY W., Biochem. J., 1953, 53, 305, (539)
- BARTLETT J.K., HOUGH L. et JONES J.K.N., Chem. Ind., 1951, 76, (295)

- BAYER E., Gas Chromatography, Elsevier éd., Amsterdam, 1961, (534)
- BELCHER R., Submicro-methods of organic analysis, Elsevier éd., Amsterdam, 1966, 112, (540)
- BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.M., Analyst., 1954, 79, 201, (148,723, 753,755,800,885)
- BERENSON G.S. et DALFERES E.R.jr., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 58, 34, (783)
- BERGGÅRD I. et ODIN L., Arkiv. Kemi., 1958, 12, 581, (385)
- BEVENUE A. et WILLIAMS K.T., J.Chromatog., 1959, 2, 199, (266)
- BEZKOROVAINY A., Arch. Biochem. Biophys., 1963, 101, 66, (461)
- BINKLEY W.W., Adv. Carb. Chem., 1955, 10, 55, (319,325)
- BISERTE G. et DASSONVILLE B., Clin. Chim. Acta, 1956, 1, 49, (557 bis)
- BISERTE G. et MOSCHETTO Y., Communication personnelle (757)
- BISHOP C.T., Canad. J. Chem., 1956, 34, 1255, (53)
- BISHOP C.T., in D. GLICK, Methods of Biochemical Analysis, Interscience Publishers, New York, N.Y., 1962, 10, 1 (364)
- BLASS J., MACHEBOEUF M. et NUNEZ G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1950, 32, 130, (270,296)
- BLIX G., Acta Chem. Scand., 1948, 2, 467, (126,144)
- BLIX G., Proc. 4th Int. Cong. Biochem. Vienna, 1958, 1, 94, (563)
- BLIX G., GOTTSCHALK A. et KLENK E., Nature, 1957, 179, 1088, (5)
- BLIX G. et LINDBERG E., Acta. Chem. Scand., 1960, 14, 1809, (28,382,462,483)
- BLIX G., LINDBERG E., ODIN L. et WERNER I., Nature, 1955, 175, 340, (491,493)
- BLIX G., LINDBERG E., ODIN L. et WERNER I., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1956, 61, 1, (27,463,472,484,488,490,497,564)
- BLIX G., SVENNERHOLM L. et WERNER L., Acta Chem. Scand., 1952, 6, 358, (774)
- BLOCK R.J., DURRUM E.L. et ZWEIG G., A manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, 2nd Ed. Academic Press, New York, 1958, 215, (525, 531,537)
- BOAS N.F., J. Biol. Chem., 1953, 204, 553, (164,703,709,758,887)
- BOESEKEN J., Adv. Carbohyd. Chem., 1949, 4, 189, (346)

- BOGGS L., CUENDET L., EHRENTAL I., KOCH R. et SMITH F., Nature, 1950, 166, 520, (197)
- ⁿBOHM P. et BAUMEISTER L., Z. Physiol. Chem., 1955, 300, 153, (480)
- BOLLENBACK G.N., LONG J.W., BENJAMIN D.G. et LINDQUIST J.A., J. Amer. Chem. Soc. 1955, 77, 3310, (674)
- BOLTON C.H., CLAMP J.R., DAWSON G. et HOUGH L., Carbohydr. Res., 1965, 1, 333, (371,377 m)
- BOLTON C.H., CLAMP J.R. et HOUGH L., Biochem. J., 1965, 96, 5 c, (371)
- BOURRILLON R., Bull. Soc. Chim. Fr., 1965, 268, (186)
- BOURRILLON R. et MICHON J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 267, (187,735, 750,764)
- BRAGG P.D. et HOUGH L., Biochem. J., 1961, 78, 11, (83,248)
- BRENDEL K., ROSZEL N.O., WHEAT R.W. et DAVIDSON E.A., Anal. Biochem., 1967, 18, 147, (808)
- BRENDEL K., STEELE R.S., WHEAT R.W. et DAVIDSON E.A., Anal. Biochem., 1967, 18, 161, (809)
- BRISSAUD L., ROUDIER A., LHOSTE P. et EBERHARD L., Mém. Services Chim. Etat (Paris), 1950, 35, 57, (599)
- BRITTON H.G., Biochem. J., 1959, 73, 19 P., (200)
- BROWN D.H., Biochim. Biophys. Acta, 1951, 7, 487, (890)
- BROWN H.C., MEAD E.J. et SUBBA-RAO B.C., J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 6209, (688)
- BRUNETTI P., JOURDIAN G.W. et ROSEMAN S., J. Biol. Chem., 1962, 237, 2447, (554,576)
- BRUNETTI P., SWANSON A. et ROSEMAN S., Methods Enzymol., 1963, 6, 465, (556, 579,581)
- BRYANT F. et OVERELL B.T., Nature, 1951, 167, 361, (180)
- BUHLER D.R., THOMAS R.C., CHRISTENSEN B.E. et WANG C.H., J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 481, (170,174)
- BUTLER W.T. et CUNNINGHAM L.W., J. Biol. Chem., 1965, 240, PC 3449, (24 b)
- BYCHKOV S.M. et KOLESNIKOVA M.F., Biokhimiya, (traduction anglaise), 1966, 31, 465, (870)

- CABEZAS J.A., Rev. esp. Fisiol, 1965, 21, 125, (476)
- CARDINI C.E. et LELOIR L.F., J. Biol. Chem., 1957, 225, 317, (561,839)
- CASSIDY J.T., JOURDIAN G.W. et ROSEMAN S., J. Biol. Chem., 1965, 240, 3501, (433,434,439)
- CESSI C. et SERAFINI-CESSI F., Biochem. J., 1963, 88,132, (871 bis, 881,883)
- CHANEY A. et WOLFROM M.L., Anal. Chem., 1956, 28, 1614, (505)
- CHANEZ M. et SAG G., Bull. Soc. Chim. Fr., 1959, 1500, (669)
- CHAPUT M., MICHEL G. et LEDERER E., Experientia, 1961, 17, 107. et Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 310, (17)
- CHARGAFF E. et BOVARNICK M., J. Biol. Chem., 1937, 118, 421, (777)
- CHARLSON A.J., NUNN J.R. et STEPHEN A.M., J. Chem. Soc., 1955, 269, 1428, (25)
- CHEFTEL R.I., CLOAREC L., MORETTI J., RAFELSEN M. et JAYLE M.F., Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 993, (407)
- CHEMINAT A. et BRINI M., Bull. Soc. Chim. Fr., 1966, 1, 80, (365,654,656)
- CHOSSON A., MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., C. R. Acad. Sci., 1962, 255, 3261, (92,101)
- CLAMP J.R., DAWSON G. et HOUGH L., Biochem. J., 1966, 100, 35 c, (377 n)
- CLAMP J.R., DAWSON G. et HOUGH L., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 148, 342, (377 o)
- CLAMP J.R. et PUTNAM F.W., J. Biol. Chem., 1964, 239, 3233, (103)
- CLARKE E.G.C. et HUMPHREYS D.J., Biochem. J., 1966, 98, 36 P, (238)
- COHN W.E., in COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O., Methods in Enzymology, Academic Press. éd., New York,1957, 3, 724, (165)
- COLOMBO P., CORBETTA D., PIROTTA A., RUFFINI G. et SARTORI A., J. Chromatog. 1960, 3, 343, (262)
- COMB D.G. et ROSEMAN S., J. Biol. Chem., 1960, 235, 2529, (452,555,577,578,580)
- COMB D.G. et ROSEMAN S., in COLOWICK et KAPLAN N.O., Methods in Enzymology, 1962, 5, 422, (897)
- COOPER J.A.D., SMITH W., BACILA M. et MEDINA H., J. Biol. Chem., 1959, 234, 445, (234)

- CORNILLOT P., Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 42, (596, 605)
- COURTOIS J.E., LABAT J. et BARANCOURT N., Ann. Biol. Clin., 1963, 5-6, 383, (378,415,419)
- COX C.G. et JEFFREY G.A., Nature, 1939, 143, 984, (775)
- CRUMPTON M.J., Biochem. J., 1959, 72, 479, (767,802,806,837,853,855,909)
- CUNNINGHAM L.W., FORD J.D. et SEGREST J.P., J. Biol. Chem., 1967, 242, 2570 (24 c)
- DAHLBERG J. et SAMUELSON O., Acta Chem. Scand., 1963, 17, 2136, (338)
- DAIN J.A., WEICKER H., SCHMIDT G. et THANNHAUSER S.S. in "Cerebral Sphingolipidoses", ARONSON S.M. et VOLK B.W., Academic Press éd., 1962, p. 289 (435)
- DANEHY J.P. et PIGMAN W., Adv. Food Res., 1951, 3, 241, (66)
- DANISHEFSKY I., EIBER H.B. et CARR J.J., Arch. Biochem. Biophys., 1960, 90, 114, (606)
- DASSONVILLE B.N., Thèse Doct. Méd., Lille, 1955, (558)
- DATE J.W., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1958, 10, 149 et 444, (274 bis)
- DAWSON G. et CLAMP J.R., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1967, 26, 349, (24 g)
- DE K.K. et TIMELL T.E., Carbohydrate Res., 1967, 4, 177, (584)
- DEDONDER R., C.R. Acad. Sci., 1950, 230, 997, (191,219,221,225)
- DEDONDER R., Bull. Soc. Chim. France, 1952, 19, 874, (641)
- DEDONDER R., in Monographies de Chimie Organique. III. Chromatographie, 2, 1, Masson éd., Paris, 1960, (188 a, 250,254)
- DENT C.E., Biochem. J., 1947, 41, 240 et 1948, 43, 169, (303)
- DESCAMPS J., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci. (sous presse) (24 h)
- DI FERRANTE N. et RICH C., Clin. Chim. Acta, 1956, 1, 520, (607)
- DISCHE Z., J. Biol. Chem., 1947, 167, 189, (597,648)
- DISCHE Z. et SHETTLES L.B., J. Biol. Chem., 1948, 175, 595, (281,871)
- DISTLER J.J. et ROSEMAN S., J. Biol. Chem., 1960, 235, 2538, (738)
- DIXON A.S., Biochem. J., 1955, 59, XXI et 1955, 60, 165, (81)

- DRAPRON R. et GUILBOT A., Ann. Technol. Agric., 1962, 11, 175, (280)
- DREYWOOD R., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 1946, 18, 499, (277)
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SPITH F., Nature, 1951, 168, 167 et Anal. Chem., 1956, 28, 350, (279,336)
- DUFF R.B. et EASTWOOD D.J., Nature, 1950, 165, 848, (106,290)
- DUNSTAN S. et GILLAM A.E., J. Chem. Soc., 1949, 140, (600)
- DYGERT S., LI L.H., FLORIDA D. et THOMA J.A., Anal. Biochem., 1965, 13, 367, (293)
- DZIEWIATKOWSKI D., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 56, 167, (589,614,619,647,651)
- EASTOE J.E., Nature, 1954, 173, 540, (791)
- EEGRIWE E., Z. Anal. Chem., 1932, 89, 121, (546)
- ELLIS G.P., Adv. Carb. Chem., 1959, 14, 63, (67)
- ELLIS G.P. et HONEYMAN J., Adv. Carb. Chem., 1955, 10, 95, (35)
- ELSON L.A. et MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1933, 27, 1824, (73,125,143,147,799, 872,874,884)
- ESSER K., J. Chromatog., 1965, 18, 414, (789)
- EYLAR E.H. et JEANLOZ R.W., J. Biol. Chem., 1962, 237, 622, (21,23)
- FAILLARD H., Z. Physiol. Chem., 1957, 307, 62, (427,442)
- FAILLARD H., Z. Physiol. Chem., 1959, 317, 257, (443,447)
- FISCHER E., Ber., 1890, 23, 3687 et 1895, 28, 3024, (47,48)
- FISCHER-JØRGENSEN P., Dansk Tidsskr. Farm., 1950, 24, 1, (241)
- FISCHER F.G., DÖRFEL H.Z., Z. Physiol. Chem., 1955, 301, 224, (626)
- FISCHER F.G. et NEBEL H.G., Z. Physiol. Chem., 1955, 302, 10, (761)
- FISCHMEISTER I., Ark. Kemi., 1958, 13, 247, (496,500)
- FLEURY P., COURTOIS J.E. et MALANGEAU P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1953, 35, 537, (194,229)
- FLOOD A.E., HIRST E.L. et JONES J.K.N., Nature, 1947, 160, 86, (282)
- FOLKES B.F., GRANT R.A. et JONES J.K.N., J. Chem. Soc., 1950, 2136, (699)

- FOSTER A.B., in WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., "Methods in Carbohydrate Chemistry", Academic Press éd., New York, 1962, 1, 51, (376)
- FOSTER A.B. et HORTON D., J. Chem. Soc., 1958, 1890, (54)
- FOSTER A.B., HORTON D. et STACEY M., J. Chem. Soc., 1957, 81, (746)
- FOSTER A.B. et STACEY M., J. Appl. Chem., 1953, 3, 19, (852, 854)
- FRAHN J.L. et MILLS J.A., Austr. J. Chem., 1959, 12, 65, (212,375)
- FROMMHAGEN L.H., Anal. Chem., 1956, 28, 1203, (235)
- FRONTALI L., LEONI L. et TECCE G., Quad. Nutriz. Ital., 1961, 20, 94 (347)
- FUJIMOTO K., MATSUDA K., et ASO K., Tohoku J. Agr. Res., 1962, 13, 61, (33)
- GAETJENS E. et BĀRĀNY M., Biochim. Biophys. Acta, 1966, 117, 176, (535)
- GAILLARD B.D.E., Nature, 1953, 171, 1160, (150)
- GALOYAN A.A., MESROB B.K. et HOLEYSŮVSKÝ V., J. Chromatog., 1966, 24, 440, (861)
- GARDELL S., Acta Chem. Scand., 1951, 5, 1011, (330,353 bis)
- GARDELL S., Acta Chem. Scand., 1953, 7, 201, (117,328,345)
- GARDELL S., Acta Chem. Scand., 1953, 7, 207, (797,798,801)
- GARDELL S., Determination of Hexosamines in GLICK D., Methods of Biochem. Anal., 1958, 6, 289, Interscience éd.; (743,754)
- GARDELL S., HEIJKENSJOLD F. et ROCHNORLUND A.E., Acta Chem. Scand., 1950, 4, 970, (866,867)
- GEE M. et MC CREADY R.M., Anal. Chem., 1957, 29, 257, (214,623)
- GHUYSEN J.M. et STROMINGER J.L., Biochemistry, 1963, 2, 1110 et 1963, 2, 1119, (20,911)
- GIBBONS R.A., Biochem. J., 1962, 82, 32 P, (428,444)
- GIBBONS R.A., Analyst, 1962, 87, 178, (510,547,548,551,552)
- GIBBONS R.A., Biochem. J., 1963, 89, 380, (386,393,395,397,414,417,429,432,438, 441,445,446,448,451,459,559)
- GIBBONS R.A. et ROBERTS G.P., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, 106, 218, (413)
- GLEGG R.E. et EIDINGER D., Anal. Chem., 1954, 26, 1365, (85,94)
- GLEGG R.E., EIDINGER D. et LEBLOND C.P., Science, 1953, 118, 614, (84,94,792)

- GOA J., Acta Chem. Scand., 1961, 15, 1975, (403)
- GOEBEL W.F. et BABERS F.H., J. Biol. Chem., 1934, 106, 63, (673)
- GOOD T.A. et BESSMAN S.P., Anal. Biochem., 1964, 9, 253, (826,846,879,880)
- GOT R., BOURRILLON R. et MICHON J., Bull. Soc. Chim., Biol., 1960, 42, 41, (146 b)
- GOT R., GOUSSAULT Y. et FONT J., Carbohydrate Res., 1966, 3, 157, (24 d)
- GOTTSCHALK A., Nature, 1950, 170, 662, (149)
- GOTTSCHALK A., Nature, 1953, 172, 808 et Biochem. J., 1955, 61, 298, (458)
- GOTTSCHALK A., Biochem. J., 1955, 61, 298, (470)
- GOTTSCHALK A., The Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances Cambridge University Press éd., 1960, (387,464,485,498)
- GOTTSCHALK A., Proc. Internat. Cong. Biochem., 6th, New York, 1964, Symp. I, Section II, (450)
- GOTTSCHALK A. et ADA G.L., Biochem. J., 1956, 62, 681, (111,118,155,745)
- GOTTSCHALK A. et SIMMONDS D.H., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 42, 141, (401)
- GRAHAM E.R.B. et GOTTSCHALK A., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 38, 513 (718)
- GRAHAM E.R.B., MURPHY W.H. et GOTTSCHALK A., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 74, 222, (400)
- GRANT P.T., Pregl's Quantitative Organic Microanalysis 5th Eng.éd., Churchill, London, 1951, (506,517)
- GRANT P.T. et LONG C., Biochem. J., 1952, 50, XX, (891)
- GRANZER E., Z. Physiol. Chem., 1962, 328, 277, (473)
- GREENE F.L., MORRIS P., et RICHMOND V., Analyt. Chem. 1958, 30, 1164, (223)
- GREGORY J.D. et VAN LENTEN L., Automation in Analytical Chemistry, Technicon Symposium, 1966, 620, (804,807)
- GUILLOUX E. et BEAUGIRAUD S., Bull. Soc. Chim. Fr., 1965, 259, (307)
- GUNTHER H. et SCHWEIGER A., J. Chromatog., 1965, 17, 602, (785,788,848,)
- GUSTAVSON C., SUNDMAN J. et LINDH T., Paper et Timber, 1951, 33, 1 et C.A., 1951, 45, 4175, (263)

- GUY R.C.E., HOW M.J., STACEY M. et HEIDELBERGER M., J. Biol. Chem., 1967, 242, 5106, (680)
- HAAB W. et ANASTASSIADIS P.A., Can. J. Biochem. Physiol., 1961, 39, 671, (592, 609,618,697,704,705,714,715,716)
- HAAS H.J. et SEELIGER A., J. Chromatog., 1964, 13, 573, (245)
- HAIS I.M. et MACEK K., Paper Chromatography, Academic Press éd., New York, 1963, (188 d, 251,255)
- HAKOMORI S. et JEANLOZ R.W., Communication personnelle (304)
- HALL R.H., Anal. Biochem., 1962, 4, 395, (322)
- HALLÉN A., Acta Chem. Scand., 1960, 14, 2249, (353)
- HAMMETT L.P., Physical Organic Chemistry, Mc GRAW Hill, New York, 1940, (513)
- HAMPTON H.A., HAWORTH W.N. et HIRST E.L., J. Chem. Soc., 1929, 1739, (108)
- HARPUR R.P. et QUASTEL J.H., Nature, 1949, 164, 693, (889)
- HARTREE E.F., Anal. Biochem., 1964, 7, 103, (708,724,726,760)
- HASHIMOTO Y., TSUIKI S., NISIZAWA K. et PIGMAN W., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, 106, 233, (411)
- HASKELL T.H. et HANESSIAN S., Nature, 1963, 199, 1075, (12)
- HASSEL O. et OTTAR B., Acta Chem. Scand., 1947, 1, 929, (34)
- HAUGH A. et LARSEN B., Acta Chem. Scand. 1961, 15, 1395, (664,655,665)
- HAUGH A. et LARSEN B., Acta Chem. Scand., 1962, 16, 1908, (586,660)
- HAWORTH W.N., Ber., 1932, 65 A, 43, (41)
- HAWORTH W.N., HIRST E.L. et OLIVER E., J. Chem. Soc., 1934, 1917, (109)
- HAWTHORNE J.R., Nature, 1947, 160, 714, (286)
- HAY G.W., LEWIS B.A. et SMITH F., J. Chromatog., 1963, 11, 470, (317)
- HEFTMANN E., Chromatography, Reinhold Publishing Corporation éd., New York, 1961, (188 c,252,256)
- HESTRIN S., J. Biol. Chem., 1949, 180, 249, (529,541)
- HEUSER E. et JAYME G., J. Prakt. Chem., 1923, 105, 232, (110)
- HEYNS K. et BECK M., Ber, 1957, 90, 2443, (778)

- HEYNS K., KIESSLING G., LINDENBERG W., PAULSEN H. et WEBSTER M., Chem. Ber., 1959, 92, 2435, (10)
- HEYNS K., MÜLLER G. et KIESSLING G., Z. Physiol. Chem., 1966, 346, 108, (805 bis)
- HEYNS K. et PAULSEN H., Veränderungen der Nahrung durch industrielle und Haushaltmässige Verarbeitung, Steinkopf éd., Darmstadt, 1960, (68)
- HEYWORTH R., PERKINS H. et WALKER P.G., Nature 1961, 190, 261, (840)
- HIATT H.H., in STANBURY J.B., WYNGAARDEN J.B. et FREDRICKSON D.S., Metabolic Basis of Inherited Diseases, Mc GRAW-HILL éd., New York, 1960, 121, (175)
- HIRASAKA Y., Yakugaku Zasshi, 1963, 83, 960, (636,637)
- HIRASAKA Y. et UMEMOTO K., Yakugaku Zasshi, 1962, 82, 1676, (676)
- HIRST E.L. et JONES J.K.N., J. Chem., Soc., 1949, 1659, (283)
- HIRST E.L. et JONES J.K.N., Discussions Faraday Soc., 1949, 7, 268, (220)
- HIRST E.L. et JONES J.K.N. in Modern Methods of Plant analysis, Springer-Verlag éd., Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1955, (622)
- HIRST E.L., MC GILVRAY D.I. et PERCIVAL E.G.V., J. Chem. Soc., 1950, 1297, (222)
- HODGE J.E., Agr. Food Chem., 1953, 1, 928, (69)
- HOFFMAN P., LINKER A. et MEYER K., Science, 1956, 124, 1252, (588,615)
- HÖRMANN H. et JOSEPH K.T., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 100, 598, (527,528)
- HORNING E.C., MOSCATELLI E.A. et SWEELEY C.C., Chem. Ind., 1959, 751, (373)
- HOROWITZ M.I. et DELMAN M.R., J. Chromatog., 1966, 21, 300, (862)
- HOUGH L., Methods of Biochem. Anal., 1957, 1, 205, (188 f)
- HOUGH L., JONES J.K.N. et WADMAN W.H., Nature, 1948, 196, 448, (324)
- HOUGH L., JONES J.K.N. et WADMAN W.H., J. Chem. Soc., 1950, 1702, (211,213,215, 629,905)
- HUGUES R.C. et JEANLOZ R.W., Biochemistry, 1964, 3, 1535, (273)
- HULME A.C., Nature, 1953, 171, 610, (171,182)
- IMANAGA Y., J. Biochem., 1963, 53, 80 (899)
- IMMERS J. et VASSEUR E., Nature, 1950, 165, 898 et Acta Chem. Scand., 1952, 6, 363, (79)
- INGLE R.B. et MINSHALL E., J. Chromatog, 1962, 8, 369, (260)

- INGOLD C.K., Structure and Mechanism in Organic Chemistry, Cornell University Press, Ithaca, 1953, (514)
- ISBELL H.S. et FRUSH H.L., J. Research. Natl. Bur. Standards, 1951, 46, 132, (37)
- IVANOV V.I. et SOKOVA K.M., Chem. Abstr., 1949, 43, 2548, (199)
- JAMES A.T. et MARTIN A.J.P., Biochem. J., 1952, 50, 679, (533)
- JAMIESON G.A., Biochim. Biophys. Acta, 1966, 121, 326, (475)
- JANSEN E.F. et JANG R., J. Amer. Chem. Soc., 1946, 68, 1475, (670)
- JAYME G. et HAHN G., Angew. Chem., 1960, 72, 520, (313)
- JEANLOZ R.W., Communication personnelle, (99)
- JERMYN M.A. et ISHERWOOD F.A., Biochem. J., 1949, 44, 402, (185)
- JOHANSEN P.G.; MARSHALL R.D. et NEUBERGER A., Biochem. J., 1960, 77, 239, (701,747)
- JOHNSON J.L. et CHILTON W.S., Science, 1966, 152, 1247, (739)
- JOHNSTON I.R., Biochem. J., 1963, 86, 254, (893)
- JOHNSTON C.C. et MASON M., J. Biol. Chem., 1962, 237, 30, (593)
- JOHNSON S. et SAMUELSON O., Anal. Chim. Acta, 1966, 36, 1, (650,658)
- JOLLES Z.E. et MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1940, 34, 1183, (780)
- JONES J.K.N., J. Chem. Soc., 1950, 3292, (105)
- JONES J.K.N. et NICHOLSON W.H., J. Chem. Soc., 1958, 27, (57)
- JONES J.K.N. et PERRY M.B., J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 2787, (677,685)
- JONES J.K.N. et WISE E.L., J. Chem. Soc. 1952, 2750, (630)
- JOURDIAN G.W. et ROSEMAN S., J. Biol. Chem., 1962, 237,2442, (557,560)
- KABAT E.A., BASSETT E.W., PRYZWANSKY K., LLOYD K.O., KAPLAN M.E. et LAYUG E.J., Biochemistry, 1965, 4, 1485, (24 a)
- KARKAS J.D. et CHARGAFF E., J. Biol. Chem., 1964, 239, 949, (388,391,392,398, 416,418,421,422)
-
KARKKAINEN J., LEHTONEN A. et NIKKARI T., J. Chromatog., 1965, 20, 457, (813)
-
KARKKAINEN J.E., HAAHTI E.O. et LEHTONEN A.A., Anal. Chem., 1966, 38, 1316, (814)

- KATHAN R.H. et WINZLER R.J., J. Biol. Chem., 1963, 238, 21, (440)
- KENT P.W., LAWSON G. et SENIOR A., Science, 1951, 113, 354, (856)
- KHYM J.X. et DOHERTY D.G., J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 3199, (645)
- KHYM J.X. et ZILL L.P., J. Amer. Chem. Soc., 1951, 73, 2399, (349,360)
- KHYM J.X. et ZILL L.P., J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 2090, (350,352,361)
- KLEIN B. et WEISSMAN M., Clin. Chem., 1964, 10, 741, (239)
- KLENK E. et UHLENBRUCK G., Z. Physiol. Chem., 1957, 307, 266, (544,545)
- KLEVSTRAND R. et NORDAL A., Acta Chem. Scand., 1950, 4, 1320, (192, 226,479)
- KOBATA A. et ZIRÔ S., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 107, 406, (851)
- KOHN P., WINZLER R.J. et HOFFMAN R.C., J. Biol. Chem., 1962, 237, 304, (379)
- KONARSKA A. Dipl. Et. Sup., Lille, 1967, (268)
- KOWKABANY G.N., Adv. Carb. Chem., 1954, 9, 303, (188 e)
- KUHN R. et BISTER W., Ann. Chem. 1958, 617, 92, (823)
- KUHN R., BISTER W. et FISCHER H., Ann. Chem., 1958, 617, 109, (762,776)
- KUHN R. et BROSSMER R., Angew. Chem., 1956, 68, 211 et 1956, 89, 2013, (449)
- KUHN R. et BROSSMER R., Chem. Ber., 1956, 89, 2471, (6)
- KUHN R. et WEYGAND F., Ber., 1937, 70, 769, (75)
- LABAT J. et BERGER N., Ann. Biol. Clin., 1966, 24,839, (450 bis)
- LAIDLAW R.A. et REID S.G., J. Chem. Soc., 1951, 1830, (107)
- LAMPORT D.T.A., Nature, 1967, 216, 1322, (24 j)
- LARSEN B. et HAUGH A., Acta Chem. Scand., 1961, 15, 1397, (646)
- LARSSON U.B., NORSTEDT I. et SAMUELSON O., J. Chromatog., 1966, 22, 102, (652)
- LARSSON L.I. et SAMUELSON O., Acta Chem. Scand, 1966, 19, 1357, (341,342,348)
- LAUNER H.F. et WILSON W.K., J. Res. Nat. Bur. Stand., 1939, 22, 471, (601)
- LEABACK D.H. et WALKER P.G., Biochem. J., 1957, 67, 22 P, (766)
- LEDERER E. et LEDERER M., Chromatography, Elsevier éd., New York, 1957, (188 b, 253,257)

- LEHTONEN A., KÄRKKÄINEN J. et HAAHTI E., J. Chromatog., 1966, 24, 179, (659, 815)
- LELOIR L.F. et CARDINI C.E. in S.P. COLOWICK et N.O. KAPLAN, Methods in Enzymology, Academic Press éd., 1962, 18 418, (895)
- LEMIEUX R.U., BISHOP C.T. et PELLETIER G.E., Can. J. Chem., 1956, 34, 3609, (323)
- LESKOWITZ S. et KABAT E.A., J. Amer. Chem. Soc., 1954, 76, 4887, (859)
- LESTER-SMITH E. et PAGE J.E., J. Soc. Chem. Ind., 1948, 67, 48, (152)
- LEVY G.A. et MC ALLAN A., Biochem. J., 1959, 73, 127, (824,830)
- LEWIS B.A., SMITH F. et STEPHEN M., in "Methods in Carbohydrate Chemistry", WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., Academic Press éd., New York, London, 1963, II, 68, (666)
- LIN T.Y. et HASSID W.Z., J. Biol. Chem., 1966, 241, 3282 (624,633,695)
- LINDERSTRÖM-LANG K. et HOLTER H., C.R. Lab. Carlsberg., 1933, 19, n°14 (285)
- LÜDERITZ O., SIMMONS D.A.R., WESTPHAL O. et STROMINGER J.L., Anal. Biochem., 1964, 9, 263, (894)
- LUDEWIG S. et GLOVER E.S., Arch. Biochem. Biophys., 1966, 113, 661, (426 bis)
- LUDOWIEG J. et DORFMAN A., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 38, 212, (519,521,522)
- LUDOWIEG J. et BENMAMAN J.D., Anal. Biochem., 1967, 19, 80, (702,712,719,721, 727,730,737,871 ter,886)
- LYTHGOE B. et TRIPPETT S., J. Chem. Soc., 1950, 1983, (683)
- MAILLARD L.C., Compt. Rend., 1912, 154, 66 et Ann. Chim., 1916, 5, 258, (64)
- MALPRESS F.H. et MORRISON A.B., Nature, 1949, 164, 963, (151)
- MARAIS J.P., DE WITT J.L. et QUICKE G.V., Anal. Biochem., 1966, 15, 373, (294)
- MARKHAM R. et SMITH J.D., Biochem. J., 1952, 52, 552, (562)
- MARKOVIĆ O., Chem. Zvesti, 1964, 18, 28, (572)
- MARSH C.A. in DUTTON G.T., Glucuronic acid, free and combined, Academic Press. éd., New York, 1967, p. 4, (583,621,625)
- MASAMUNE H. et SATAKE M., Tohoku J. Exptl. Med., 1959, 69, 167, (638,639,640)
- MASAMUNE H. et YOSIZAWA Z., Tohoku J. Exptl. Med., 1957, 65, 169, (752,763)

- MATSUZAKI K., WARD K.jr. et MURRAY M., Tappi, 1959, 42, 474, (46)
- MATTËSSON M. et SAMUELSON O., Acta Chem. Scand., 1958, 12, 1395, (334)
- MATTSON A.M. et JENSEN C.O., Anal. Chem., 1950, 22, 182, (298)
- MAZUR R.H., ELLIS B.W. et CAMMARATA P.S., J. Biol. Chem., 1962, 237, 1619, (844)
- MC COMB E.A. et MC CREADY R.M., Anal. Chem., 1957, 29, 819, (530,542,543)
- MC CREADY R.M. et MC COMB E.A., Anal. Chem., 1954, 26, 1645, (264)
- MC FARREN E.F., BRAND K. et RUTKOWSKI H.R., Anal. Chem., 1951, 23, 1146, (265)
- MC GUIRE J.E. et BINKLEY S.B., Biochemistry, 1964, 3, 247, (423,456)
- MC KEE S.C. et DICKEY E.E., J. Org. Chem., 1963, 28, 1561, (689)
- MICHL H., Monatsh. Chem., 1951, 82, 489, (662)
- MICHON J. et BOURRILLON R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 277, (120,122, 136,138,140,146 a)
- MOCZAR E., MOCZAR M., SCHILLINGER G. et ROBERT L., J. Chromatog., 1967, 31, 561, (377 f,786,790)
- MOGGRIDGE R.C.G., et NEUBERGER A., J. Chem. Soc., 1938, 745, (508,515,744)
- MONSIGNY M., Thèse Doct. Sci., Lille, 1968, (756,769,771,805,810,863)
- MONTREUIL J. Bull. Soc. Chim. Biol., 1949, 31, 1639, (130)
- MONTREUIL J., 3è Coll. Hôp. St Jean, Brugges, 1955, 209, (160)
- MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, 39, Suppl. 3, 395, (145,161,300)
- MONTREUIL J., ADAM-CHOSSON A. et SPIK G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 1867, (15,93)
- MONTREUIL J. et BISERTE G., C.R. Soc. Biol., 1957, 151, 1898 et Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 959, (8,408,430)
- MONTREUIL J. et CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3071, (90,91,100,102)
- MONTREUIL J. et SCHEPPLER N. Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 13, (89,104, 115,119,121,127,135,139,139 bis,163,301)
- MONTREUIL J., SCRIBAN R. et MULLET S., Brasserie, 1959, 150, 63, (302,565)
- MONTREUIL J. et SPIK G., Microdosage des glucides, Fasc 1 : Méthodes colorimétriques de dosages des glucides totaux, Laboratoire de Chimie Biologique, Fac. Sci., éd., Lille, 1963, (2,566,597 bis,781)

- MONTREUIL J., SPIK G. et CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3493, (14)
- MONTREUIL J., SPIK G., DUMAISNIL J. et MONSIGNY M., Bull. Soc. Chim. Fr., 1965, 239, (4,131,258,661)
- MONTREUIL J., SPIK G. et KONARSKA A., Méthodes Chromatographiques de Dosage des Osés "Neutres", Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille, 1967, (269,274 ter,301 bis,303 bis,309 bis,320 bis,320 ter,377 a,377 b,377 c,377 d,377 l)
- MOORE S., SPACKMAN D.H. et STEIN W., Anal. Chem., 1958, 30, 1185, (793)
- MORA P.T. et WOOD J.W., J. Amer. Chem., Soc., 1958, 80, 685, (63)
- MORELL S., BAUER L. et LINK K.P., J. Biol. Chem., 1934, 105, 15, (610)
- MORELL S. et LINK K.P., J. Biol. Chem., 1933, 100, 385, (678)
- MORGAN W.T.J. et ELSON L.A., Biochem. J., 1934, 28, 988, (509,873)
- MORGAN W.T.J. et KING H.K., Biochem. J., 1943, 37, 640, (133)
- MUKHERJEE S. et SRIVASTAVA H.C., Nature, 1952, 169, 330 (217)
- MUNOZ E., Thèse, Inst. Politecnico Nacional, Mexico, 1955, (243)
- MURACHI T., Biochemistry, 1964, 3, 933, (707)
- MURPHY W.H. et GOTTSCHALK A., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 52, 349, (402)
- NELSON N., J. Biol. Chem., 1944, 153, 375, (124,142,289,377 j)
- NELSON W.A.G. et PERCIVAL E.G.V., J. Chem. Soc., 1942, 58, (611)
- NEUBERGER A., Biochem. J., 1938, 32, 1435, (779)
- NEUBERGER A., Communication personnelle à HARTREE E.F., Anal. Biochem., 1964, 7, 103, (725)
- NEUBERGER A. et MARSHALL R.D. in GOTTSCHALK A., Glycoproteins, Elsevier éd., Amsterdam, London, New York, 1960, 190, (259,377,465,503)
- NEUBERGER A., MARSHALL R.D. et GOTTSCHALK A., Glycoproteins, Elsevier éd., Amsterdam, London, New York, 1966, 158, (405,734)
- NEUBERGER A. et PITT-RIVERS R.V., J. Chem. Soc., 1939, 122, (817)
- NICOT C., CHEFTEL R.I. et MORETTI J., J. Chromatog, 1967, 31, 565, (377 h)

- NOGGLE G.R., in PIGMAN W., *The Carbohydrates*
Academic Press éd., New York, 1957, 602, (230,231)
- NOGGLE G.R. et ZILL L.P., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, 41, 21, (351)
- NORDAL A. et OISETH D., *Acta Chem. Scand.*, 1951, 5, 1289, (469,471)
- NUENKE R.H. et CUNNINGHAM L.W., *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 2452, (749)
- OAKLEY E.T., WEISSBECKER L. et RESNIK F.E., *Anal. Chem.*, 1965, 37, 380, (536)
- OATES M.D.G. et SCHRAGER J., *Biochem. J.*, 1965, 97, 697, (368)
- OATES M.D.G. et SCHRAGER J., *J. Chromatog.*, 1967, 28, 232, (860)
- OERTEL G.W., *J. Chromatog.*, 1962, 8, 486 (634)
- OGSTON A.G., *Anal. Biochem.*, 1964, 8, 337, (698,700,732,736)
- OHKUMA S. et SHINOHARA T., *Proc. Japan Acad.*, 1963, 39, 686, (834)
- OHKUMA S. et SHINOHARA T., *Nature*, 1964, 202, 593, (835)
- OHKUMA S. et SHINOHARA T., *Nature*, 1965, 206, 513, (836)
- OHNO Y. et WARD K. jr., *J. Org. Chem.*, 1961, 26, 3928, (45)
- OST H., *Angew. Chem.*, 1905, 18, 1170, (44)
- OTTING W., *Ann.* 1961, 640, 44, (240)
- OVODOV Y.S., EVTUSHENKO E.V., VASKOVSKY V.E., OVODOVA R.G. et SOLOV'EVA T.F.,
J. Chromatog., 1967, 26, 111, (644)
- PACSU E. et MORA P.T., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, 72, 1045, (55)
- PAINTER T.J., *Chem. Indust.*, 1960, 1214, (95)
- PAINTER T.J. et MORGAN W.T.J., *Nature*, 1961, 191, 39, (96, 512)
- PAINTER T.J., WATKINS W.M. et MORGAN W.T.J., *Nature*, 1962, 193, 1042, (97)
- PAINTER T.J., REGE V.P. et MORGAN W.T.J., *Nature*, 1963, 199, 569, (98)
- PAN S.C. et DUTCHER J.D., *Anal. Chem.*, 1956, 28, 5836, (843)
- PAQUIN R. et PERCHERON F., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1963, 45, 101, (9,412)
- PARTRIDGE S.M., *Biochem. J.*, 1948, 42, 238, (184,196,631,765,841)
- PARTRIDGE S.M., *Biochem. J.*, 1948, 42, 251, (112,153,159)

- PARTRIDGE S.M., Nature, 1949, 164, 443, (206,208)
- PARTRIDGE S.M., Biochemical Society Symposia, 1949, 3, 52,
(190,207,209,216,635,768,770,772,868)
- PARTRIDGE S.M. et DAVIS H.F., Nature, 1950, 165, 62, (717)
- PARTRIDGE S.M. et ELSDEN D.F., Biochem. J., 1961, 80, 34 P, (794)
- PAQUIN R. et PERCHERON F., Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 101, (9)
- PASTUKA G., Z. Anal. Chem., 1961, 179, 427, (314)
- PAUL R., C.R. Acad. Sci., 1933, 197, 1652 et Bull. Soc. Chim. Fr., 1934, 1,
971, (40)
- PAULSON J.C. et DEATHERAGE F.E., J. Biol. Chem., 1953, 205, 909, (82)
- PEARSON C.H., Biochem. J., 1963, 88, 540, (803)
- PEAT S., WHELAN W.J., EDWARDS T.E. et OWEN O., J. Chem. Soc., 1958, 586, (62)
- PEDERSEN J.W. et BAKER B.E., J. Sci. Food Agr., 1954, 5, 549, (733)
- PERCHERON F., Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 1161 et C.R. Acad. Sci. Paris,
1962, 255, 2521 et Bull. Soc. Chim. Fr., 1965, 255, (193,227,228)
- PERCHERON F., Bull. Soc. Chim. Fr. 1963, 1684, (482)
- PERKINS H.R., Biochem. J., 1963, 86, 475 et 1963, 89, 104 P, (13,822)
- PERKINS H.R. et ROGERS H.J., Biochem. J., 1959, 72, 647, (907)
- PERRY M.B. et HULYALKAR R.K., Can. J. Biochem., 1965, 43, 573, (692,694)
- PHILLIPS D.M.P., Biochem. J., 1963, 87, 258, (526 b,538)
- PHILLIPS D.M.P., Biochem. J., 1963, 86, 397, (524,526 a)
- PHILIPPU A.J., Anal. Chem., 1959, 31, 1615, (297)
- PHILLIPS J.D. et POLLARD A., Nature, 1953, 171, 41, (172,183)
- PIGMAN W., in PIGMAN W., The Carbohydrates, Academic Press éd., New York,
1957, 406, (36,70)
- PIGMAN W., Exp. Ann. Biochim. Méd., 1963, 24, 67, (16)
- POWNING R.F. et IRZYKIEWICZ H., J. Chromatog., 1965, 17, 621, (845)

- PRIDHAM J.B., *Anal. Chem.*, 1956, 28, 1967 (272)
- PRIMA A.M., ZHBANKOV R.G. et MARUPOV R., *Zh. Strukt. Khim.*, 1964, 5, 845, (236)
- PUSZTAI A. et MORGAN W.T.J., *Biochem. J.*, 1961, 78, 135, (383)
- PUTNAM E.W., *Methods in Enzymol.*, 1957, 3, 62, (532)
- QUICK R.H., *Anal. Chem.*, 1957, 29, 1438, (284)
- RADHAKRISHNAMURTHY B. et BERENSON G.S., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, 101, 360, (587,616)
- RADHAKRISHNAMURTHY B. et BERENSON G.S., *Clin. Chim. Acta*, 1964, 10, 562, (878)
- RADHAKRISHNAMURTHY B., DALFERES E.R. et BERENSON G.S., *Anal. Biochem.* 1966, 17, 545, (816)
- RADHAKRISHNAMURTHY B., KAYMAN H. et BERENSON G.S., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, 99, 534, (782)
- RAFELSON M.E., *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 1963, 24, 121, (437 bis)
- RAGAZZI E. et VERONEZE G., *El Farmaco*, 1963, 18, 152, (310)
- RANDERATH K., in "Thin-layer Chromatography" Academic Press éd., New York, 1963, (308)
- RAUNHARDT O., SCHMIDT H.W.H. et NEUKOM H., *Helv. Chim. Acta*, 1967, 50, 1267, (655,657)
- REBENFELD L. et PACSU E., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1953, 75, 4371, (176,181)
- REEVES R.E., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, 72, 1499 et *Adv. Carb. Chem.*, 1951, 6, 107, (38)
- REISSIG J.L., STROMINGER J.L. et LELOIR L.F., *J. Biol. Chem.*, 1955, 217, 959, (876)
- REYNOLDS T.M., *Adv. Food Res.*, 1963, 12, 1, (71)
- RIBADEAU-DUMAS B. et ALAIS C., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1961, 43, 377, (454)
- RICHARDS E.L., *Biochem. J.*, 1956, 64, 639, (76)
- RICHEY J.M., RICHEY H.G. et SCHRAER R., *Anal. Biochem.*, 1964, 9, 272, (369,850)
- RICHMOND M.H. et PERKINS H.R., *Biochem. J.*, 1962, 85, 580, (901)
- RICKETTS C.R., *J. Chem. Soc.*, 1954, 4031, (51)

- RICKETTS C.R. et ROWE C.E., J. Chem., Soc., 1955, 3809, (52)
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1931, 25, 1062, (129,276)
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1940, 34, 931, (132)
- RINK M. et HERRMANN S., J. Chromatog., 1963, 12, 415, (247)
- RONDLE C.J.M. et MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1955, 59, XIII, (795)
- RONDLE C.J.M. et MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1955, 61, 586, (748)
- ROSEMAN S. et DAFFNER I., Anal. Chem., 1956, 28, 1743, (821,829,833,877,888)
- ROSEMAN S., ABELES R.H. et DORFMAN A., J. Biol. Chem., 1952, 36, 232, (166, 173,177)
- ROSEMAN S. et LUDOWIEG J., J. Amer. Chem. Soc., 1954, 76, 301, (825,828,832, 864,865)
- RÜCKERT H. et SAMUELSON O., Svensk Kem. Tidskr., 1954, 66, 337 et Acta Chem. Scand., 1957, 11, 315, (333)
- RYDON H.N. et SMITH P.W.G., Nature, 1952, 169, 922, (842)
- RZECZYCKI W., Acta Bioch. Polonica, 1959, 6, 171, (381,574)
- SAIFER A. et GERSTENFELD S., Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 467, (380)
- SALTON M.R.J., Biochim. Biophys. Acta, 1959, 34, 308, (838,847)
- SALTON M.R.J., Nature, 1960, 185, 966, (232)
- SAMUELSON O., in "Ion Exchange Separations in Analytical Chemistry", J. Wiley & sons, New York éd. et Almqvist et Wiksell, Stockholm éd., 1962 (332,335)
- SAMUELSON O. et SJÖSTRÖM E., Svensk Kem. Tidskr, 1952, 64, 305, (331)
- SAMUELSON O. et SWENSON B., Acta Chem. Scand., 1962, 16, 2056, (337)
- SAMUELSON O. et WICTORIN L., Svensk Papperstid, 1964, 67, 555, (649)
- SANDERSON A.R., STROMINGER J.L. et NATHENSON S.G., J. Biol. Chem., 1962, 237, 3603, (742)
- SASLAW D. et WARAVDEKAR V.S., Arch. Biochem. Biophys., 1960, 90,245, (787)
- SAWARDEKER J.S. et SLONEKER J.H., Anal. Chem., 1965, 37, 947, (370)
- SAWARDEKER J.S., SLONEKER J.H. et JEANS A., Anal. Chem., 1965, 37, 1602, (374)
- SCHMID K., Biochim. Biophys. Acta; 1954, 14, 437, (86)

- SCHMIDT H.W. et NEUKOM H., *Helv. Chim. Acta*, 1964, 47, 865, (672)
- SCHULTZE H.E., SCHMIDTBERGER R. et HAUPT H., *Biochem. Z.*, 1958, 329, 490, (87)
- SCHWEIGER A., *J. Chromatog.*, 1962, 9, 374, (305)
- SEAVER J.L. et KERTESZ Z.I., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1946, 68, 2178, (77)
- SELL H.M. et LINK K.P., *J. Biol. Chem.*, 1938, 125, 229, (679)
- SEMPERE J.M., GANCEDO C. et ASENSIO C., *Anal. Chem.*, 1965, 12, 509, (900)
- SHALLENBERGER R.S. et MOORES R.G., *Anal. Chem.*, 1957, 29, 27, (292)
- SHIELDS R. et BURNETT W., *Anal. Chem.*, 1960, 32, 885, (278)
- SHU P., *Can. J. Res.*, 1950, 28 B, 527, (291)
- SIDDIQUI R. et PURVES C.B., *Can. J. Chem.*, 1963, 41, 382, (627,663)
- SILBERMAN H.C., *J. Org. Chem.*, 1961, 26, 1967, (49,58,61)
- SIMONART P. et GODIN P., *Bull. Soc. Chim. Belges*, 1951, 60, 446, (632)
- SLEIN M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1952, 80, 646, (892)
- SMITH F. et STEPHEN A.M., *Tetrahedron Letters*, 1960, 7, 17, (686,690)
- SMITH H. et ZWARTOUW H.T., *Biochem. J.*, 1956, 63, 447, (501)
- SMYTH D.S. et UTSUMI S., *Nature*, 1967, 216, 332, (24 i,759)
- SOMOgyi M., *J. Biol. Chem.*, 1945, 160, 61, (123,141,288,377 k)
- SØRENSEN M., *Rec. Trav. Chim. Lab. Carlsberg Ser. Chim.*, 1938, 22, 487, (713)
- SOWDEN J.C., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1954, 76, 4487, (178)
- SOWDEN J.C., *Soil. Sci.*, 1959, 88, 138, (706)
- SPECK J.C.jr., *Adv. Carb. Chem.*, 1958, 13, 63, (156)
- SPIK G., *Dipl. Et. Sup., Lille*, 1963, (1)
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., *C.R.Acad. Sci.*, 1966, 263, 893, (24 e)
- SPIK G. et MONTREUIL J., *Chromatographie Symposium III*, Arscia éd., Bruxelles
(sous presse) (24 f)
- SPIK G. et MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 50, (3)

- SPIRO R.G., J. Biol. Chem., 1959, 234, 742, (751)
- SPIRO R.G., J. Biol. Chem., 1962, 237, 646, (520)
- SPIRO M.J. et SPIRO R.G., J. Biol. Chem., 1962, 237, 1507, (399,404)
- SPOEHR H.A., Arch. Biochem., 1947, 14, 153, (585)
- STAHL E. et KALTENBACH U., in "Thin-Layer Chromatography", STAHL E., Academic Press éd., New York, 1965, (309,643,784)
- STANEK J., CERNY M., KOCOUREK J. et PACAK J., in "The Monosaccharides", Academic Press éd., New York, 1963, 763, (72)
- STARY Z., WARDI A. et TURNER D., Biochim. Biophys. Acta, 1964, 83, 242, (590)
- STEIN W.H. et MOORE S., J. Biol. Chem., 1948, 176, 337, (327)
- STOFFYN P.J. et JEANLOZ R.W., Arch. Biochem. Biophys., 1954, 52, 373, (869)
- STRANGE R.E. et DARK F.A., Nature, 1956, 177, 186, (796)
- STROMINGER J.L., PARK J.T. et THOMPSON R.E., J. Biol. Chem., 1959, 234, 3263, (902,903,904,906,908,910,912)
- SUNDMAN J., Paperi ja Puu, 1950, 32, 306, (157,158)
- SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L., Nature, 1958, 181, 1154, (468,477,478,570)
- SVENNERHOLM L., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1956, 61, 75, (394,453,457,460, 486,489)
- SVENNERHOLM L., Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24, 604, (571)
- SWEELEY C.C., Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 97, (249,366)
- SWEELEY C.C., BENTLEY R., MAKITA M. et WELLS W.W., J. Amer. Chem. Soc., 1963, 85, 2497, (367,691,693,811,849)
- SWEELEY C.C. et WALKER B., Anal. Chem., 1964, 36, 1461, (812)
- SYAMANANDA R., STAPLES R.C. et BLOCK R.J., Contrib. Boyce Thompson Inst., 1962, 21, 363, (362)
- TAUFEL K., IWAINSKY H. et RUTTLOFF H., J. Prakt. Chem., 1956, 4, 89, (50)
- TETTAMANTI G., BERTONA L., BERRA B. et ZAMBOTTI V., Nature, 1965, 206, 192, (553)
- THOLEY G. et WURTZ B., Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 769, (315)
- THOMPSON A., WOLFROM M.L. et QUINN E.J., J. Amer. Chem. Soc., 1953, 75, 3003, (59)

- TILLMANS J. et PHILIPPI K., *Biochem. Z.*, 1929, 215, 36, (128,275)
- TOLBERT N.E. et ZILL L.P., *Arch. Biophys. Bioch.*, 1954, 50, 392, (88)
- TORE J.P., *J. Chromatog.*, 1963, 12, 413, (246)
- TOUSTER O. et REYNOLDS V.H., *J. Biol. Chem.*, 1952, 197, 863 (675)
- TRACEY M.V., *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, 17, 159, (882)
- TRAMS E.G. et LAUTER C.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 60, 350, (437)
- TREVELYAN W.E., PROCTER D.P. et HARRISON J.S., *Nature*, 1950, 166, 444,
(188,195,198,203)
- TURTON C.N., BEBBINGTON A., DIXON S. et PACSU E., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1955,
77, 2565, (56)
- UNGAR E. et JAGER R., *Chem. Ber.*, 1903, 36, 1222, (602)
- VAJNA S., *Sugar Ind. Abstr.* 1951, 13, 122 et *Cukoripar*, 1951, 4, 136, (168)
- VASSEUR E et IMMERS J., *Arkiv. Kemi*, 1949, 1, 253, (74,80)
- VOMHOF D.W., TRUITT J. et TUCKER T.C., *J. Chromatog.*, 1966, 21, 355, (316,
377 1)
- WALBORG E.F. et CHRISTENSSON L., *Anal. Biochem.*, 1965, 13, 186, (357)
- WALBORG E.F., CHRISTENSSON L. et GARDELL S., *Anal. Biochem.*, 1965, 13, 177,
(355,356,363)
- WALBORG E.F. et WARD D.N., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 78, 304, (354,729)
- WALDI D., *J. Chromatog.*, 1965, 18, 417, (311)
- WALLENFELS K.W., *Naturwissenschaften*, 1950, 37, 491, (189,201,202,271)
- WARD D.N., ADAMS-MAYNE M. et WADE J., *Acta Endocrinol.* 1961, 36, 73, (728)
- WARREN L., *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 1971, (389,420,568)
- WARREN L., *Nature*, 1960, 186, 237, (481)
- WARREN L., *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 83, 129, (7)
- WARREN L. et FELSENFELD H., *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 1423, (455)
- WARREN L. et SPICER S.S., *Feder. Proc.*, 1960, 19, 147, (431)
- WARTH A.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 101, 315, (710,740)

- WEBER P., BORNSTEIN I. et WINZLER R.J., *Anal. Biochem.*, 1966, 14, 100, (358,359)
- WEIDEL W. et PELZER H., *Adv. Enzymol.*, 1964, 26, 193, (19,20 bis)
- WEISSMANN B. et MEYER K., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1954, 76, 1753, (818)
- WERNER I. et ODIN L., *Experientia*, 1949, 5, 233, (113)
- WERNER I. et ODIN L., *Upsala Läkarefören Försh*, 1949, 54, 71, (154)
- WERNER I. et ODIN L., *Acta Soc. Med. Upsaliensis*, 1952, 57, 71 (567,573,575)
- WHISTLER R.L. et DURSO D.F., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, 72, 677, (321)
- WHISTLER R.L. et CORBETT W.M., in "The Carbohydrates", PIGMAN W., Academic Press éd., New York, 1957, 641, (43)
- WHISTLER R.N. et RICHARDS G.N., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1958, 80, 4888, (594)
- WHITE T., *J. Chem. Soc.*, 1940, 428, (372,820,827,831)
- WHITE A.A. et HESS W.C., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, 64, 57, (210)
- WHITE L.M. et SECOR G.E., *Science*, 1957, 125, 495, (233)
- WHITEHOUSE M.W. et ZILLIKEN F., in "Methods of Biochem. Anal.", GLICK D., Interscience éd., New York, 1955, 2, 290, (466,474,487,499,549,550)
- WILLIAMSON A.R. et ZAMENHOF S., *Anal. Biochem.*, 1963, 5, 47, (773)
- WILLIAMSON A.R. et ZAMENHOF S., *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 2255, (11)
- WINZLER R.J., in *Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*, J. A Churchill éd., Londres, 1958, 245, (134)
- WISE C.S., DIMLER R.J., DAVIS H.A. et RIST C.E., *Anal. Chem.*, 1955, 27, 33, (224)
- WOHNLICH J.J., *Ztsch. Anal. Chem.*, 1956, 2, 1950 et *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1962, 44, 567, (267)
- WOLFROM M.L. et ANNO K., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1952, 74, 5583, (687)
- WOLFROM M.L., DE LEDERKREMER R.M. et SCHWAB G., *J. Chromatog.*, 1966, 22, 474, (306,312)
- WOLFROM M.L. et KARABINOS J.V., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1945, 67, 679, (612)
- WOLFROM M.L. et THOMPSON A., in "The Carbohydrates", PIGMAN W., Academic Press éd., New York, 1957, 188, (32,39,42)

- WOLFROM M.L. et THOMPSON A., Meth. Carb. Chem., 1962, 1, 448, (518)
- WOLFROM M.L., WEISBLAT D.I., KARABINOS J.V., MC NEELEY W.H. et MC LEAN J., J. Amer. Chem. Soc., 1943, 65, 2077, (731)
- WOOD H.B.Jr, Meth. Carb. Chem., 1963, 2, 57, (671)
- WOOLF L.I., Nature, 1953, 171, 841, (169)
- YAMASHINA I., Acta Chem. Scand., 1956, 10, 1666, (114,116)
- YORSTON F.H., Pulp and Paper Mag. Can., 1948, 50, 108, (167)
- YOUNG F.E., SPIZIZEN J. et CRAWFORD I.P., J. Biol. Chem., 1963, 238, 3122, (711,720,722,741)
- YOUNGBURN G.E., J. Biol. Chem., 1927, 73, 599, (603)
- ZELEZNICK L.D., J. Chromatog., 1964, 14, 139, (326)
- ZERBAN F.W., SATTLER L., ROSENTHAL G. et GLAUBACH A., Sugar, 1952, 47, 33, (179)
- ZILLIKEN F. et WHITEHOUSE M.W., Adv. Carb. Chem., 1958, 13, 237, (467)
- ZUCKERKANDL F. et MESSINER-KLEBERMASS L., Biochem. Z., 1931, 236, 19, (819)

