

N° d'ordre : 168

50 376
1968
71

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DES SCIENCES

50.376
1968
71

MÉMOIRES PRÉSENTÉS

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

PAR

Michel MONSIGNY

PREMIER MÉMOIRE

LA LIAISON GLYCANNE-PROTIDE DANS LES GLYCOPROTÉINES PROCÉDÉS D'ÉTUDE ET APPLICATIONS

DEUXIÈME MÉMOIRE

RÉSOLUTION DE QUELQUES PROBLÈMES ANALYTIQUES POSÉS PAR LA PRÉSENCE DES OSAMINES DANS LES GLYCOPROTIDES



PRÉSENTÉS LE 30 MARS 1968 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M.M. J. MONTREUIL. Président
E. LEDERER, Rapporteur
E. SÉGARD,
J.M. GHUYSEN, Membre invité

UNIVERSITE DE LILLE

FACULTE DES SCIENCES

DOYENS HONORAIRES : MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU, J. TILLIEU

PROFESSEURS HONORAIRES : MM. ARNOULT, BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, P. GERMAIN, KAMPE DE FERIET, LAMOTTE, LELONG, KOURGANOFF, Mme LELONG, MM. MAZET, A. MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, ROIG, ROSEAU, HOUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY.

DOYEN : M. DEFRETIN, Professeur de Biologie Marine

ASSESEURS : MM. HEUBEL, Professeur de Chimie Minérale
LEBRUN, Professeur de Radioélectricité

PROFESSEURS :

| | |
|-------------------------|--------------------------------|
| M. BACCHUS Pierre | Astronomie et Calcul Numérique |
| M. BEAUFILS Jean-Pierre | Chimie Générale |
| M. BONNEMAN Pierre | Chimie Industrielle |
| M. BECART Maurice | Physique |
| M. BLOCH Vincent | Psychophysiologie |
| M. BONTE Antoine | Géologie appliquée |
| M. BOUGHON Pierre | Mathématiques |
| M. BOUISSET Simon | Physiologie Animale |
| M. BOURIQUET Robert | Botanique |
| M. CELET Paul | Géologie Générale |
| M. CONSTANT Eugène | Radioélectricité |
| M. CORSIN Pierre | Paléobotanique |

| | |
|---------------------------|-----------------------------|
| M. DECUYPER Marcel | Mathématiques |
| M. DEDEGKER Paul | Mathématiques |
| M. DEHORS Roger | Physique Industrielle |
| M. DELATTRE Charles | Géologie Générale |
| M. DELEAU Paul | Géologie et Minéralogie |
| M. DELHAYE Michel | Chimie Physique et Minérale |
| M. DESCOMBES Roger | Mathématiques |
| M. DURCHON Maurice | Zoologie |
| M. FOURET René | Physique |
| M. GABILLARD Robert | Radioélectricité |
| M. GLACET Charles | Chimie Organique |
| M. GONTIER Gérard | Mécanique des Fluides |
| M. HEIM de BALZAC Henri | Zoologie |
| M. HOCQUETTE Maurice | Botanique |
| M. LEBEGUE André | Botanique C.S.U. AMIENS |
| Mme LEBEGUE Georgette | Physique C.S.U. AMIENS |
| M. LEFEBVRE Henri | Chimie Appliquée |
| Mlle LENOBLE Jacqueline | Physique |
| M. LIEBART Robert | I.U.T. |
| M. LINDER Robert | Botanique |
| M. LUCQUIN Michel | Chimie Physique |
| M. MARION Ernest | Chimie C.S.U. AMIENS |
| M. MARTINOT-LAGARDE André | Mécanique des Fluides |
| Mlle MARQUET Simone | Mathématiques |
| M. MENNESSIER Guy | Géologie C.S.U. AMIENS |
| M. MONTARIOL Frédéric | Chimie Minérale Appliquée |
| M. MONTREUIL Jean | Chimie Biologique |
| M. MORIAMEZ Michel | Physique |
| M. MOUVIER Gérard | Chimie SAINT-QUÉNTIN |
| M. PARREAU Michel | Mathématiques |
| M. PEREZ Jean-Pierre | Physique |

| | |
|---------------------------|---------------------------|
| M. PHAM MAU QUAN | Mathématiques |
| M. POUZET Pierre | Calcul Numérique |
| M. PROUVOST Jean | Géologie et Minéralogie |
| M. SAVARD Jean | Chimie Générale |
| M. SCHILTZ René | Physique |
| M. SCHALLER François | Zoologie |
| Mme SCHWARTZ Marie-Hélène | Mathématiques |
| M. TILLIEU Jacques | Physique Théorique |
| M. TRIDOT Gabriel | Chimie Minérale Appliquée |
| M. VAZART Bernard | Botanique AMIENS |
| M. VIVIER Emile | Zoologie C.S.U. AMIENS |
| M. WATERLOT Gérard | Géologie et Minéralogie |
| M. WERTHEIMER Raymond | Physique Générale |

MAITRES DE CONFERENCES :

| | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| M. ATTEIA Marc | Calcul Numérique |
| M. BELLET Jean | Physique |
| M. BENABOU Jean | Mathématiques |
| M. BILLARD Jean | Physique |
| M. BOILLET Pierre | Physique |
| M. BUI TRONG LIEU | Mathématiques |
| M. CHERRUAULT Yves | Mathématiques |
| M. CHEVALIER Alfred | Mathématiques C.S.U. AMIENS |
| M. DERCOURT Jean-Michel | Géologie et Minéralogie |
| M. DEVRAINNE Pierre | Chimie Minérale |
| Mme DIXMIER Suzanne | Mathématiques AMIENS |
| Mme DRAN Raymonde | Chimie Organique |
| M. DUQUESNOY Alain | Chimie AMIENS |
| M. GOUDMAND Pierre | Chimie Physique |
| M. GUILBAUT Pierre | Physiologie Animale |
| M. GUILLAUME Jean | Botanique |
| M. HANGAN Théodor (associé) | Mathématiques |
| M. HENRY Lucien | Physique AMIENS |
| M. HERZ Jean-Claude | Calcul Numérique |

| | |
|-----------------------------|---|
| M. HEYMAN Michel | Physique C.S.U. AMIENS |
| M. HUARD de la MARRE Pierre | Calcul Numérique |
| M. JOLY Robert | Zoologie C.S.U. AMIENS |
| M. LABLACHE-COMBIER Alain | Chimie Générale |
| M. LACOSTE Louis | Botanique |
| M. LAMBERT Gérard | Physique SAINT-QUENTIN |
| M. LANDAIS Jean | Chimie Organique |
| M. LEHMAN Daniel | Mathématiques |
| Mme LEHMAN Josiane | Mathématiques |
| M. LEROY Jean-Marie | Chimie Minérale Appliquée |
| M. LOUCHEUX Claude | Chimie Physique |
| M. MAES Serge | Physique |
| M. METTETAL Christian | Zoologie AMIENS |
| M. MONTEL Marc | Physique C.S.U. VALENCIENNES |
| M. NGUYEN PHONG CHAU | Mathématiques SAINT-QUENTIN |
| M. PANET Marius | Electromécanique |
| M. PARSY Fernand | Mathématiques Appliquées |
| M. SAADA Georges | Physique |
| M. SEGARD Emile | Chimie Biologique |
| M. TUDO Joseph | Chimie Minérale Appliquée C.S.U. AMIENS |
| M. VAILLANT Jean | Mathématiques |
| M. VIDAL Pierre | Physique Industrielle |
| Mme ZINN-JUSTIN Nicole | Mathématiques |

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 |
| GENERALITES | 6 |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">LES DIFFERENTS TYPES DE LIAISON GLUCIDE-PROTIDE</div> | 7 |
| I - <u>LIAISON DE TYPE ESTER</u> | 7 |
| II - <u>LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES</u> | 8 |
| 1 - <u>Mycoside C₂ du Mycobacterium avium</u> | 8 |
| 2 - <u>Mucines sous-maxillaires</u> | 8 |
| 3 - <u>Glycosylamino-glycannes de la substance fondamentale</u> | 11 |
| a - <u>Héparine</u> | 11 |
| b - <u>Acides chondroïtines sulfuriques</u> | 11 |
| α - Liaison O-glycosidique de la sérine | 11 |
| β - Liaison O-glycosidique de la sérine et de la thréonine | 11 |
| γ - Liaison O-séryl-xylosidique | 11 |
| - Liaison O-séryl et O-thréonyl-N-acétyl- -galactosaminidique | 11 |
| 4 - <u>Lactotransferrine humaine</u> | 11 |
| 5 - <u>Substances de groupes sanguins</u> | 12 |
| 6 - <u>Tropocollagène</u> | 12 |
| 7 - <u>Glycoprotides de la membrane basale glomérulaire</u> | 12 |
| 8 - <u>Globulines γA</u> | 12 |
| 9 - <u>Globulines γG</u> | 12 |
| 10 - <u>Extensine</u> | 12 |
| III - <u>LIAISONS DE TYPE AMIDE</u> | 13 |

| | |
|--|----|
| IV - <u>LIAISONS GLYCOSYLAMINIQUES</u> | 15 |
| 1 - <u>Ovallumine</u> | 15 |
| 2 - <u>Orosomucoïde</u> | 15 |
| 3 - <u>Ovomucoïde</u> | 15 |
| 4 - <u>Transferrine</u> | 15 |
| 5 - <u>Lactotransferrine</u> | 16 |
| 6 - <u>Globulines</u> YG | 17 |
| 7 - <u>Fibrinogène</u> | 17 |

| |
|---|
| <u>PROCEDES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE</u> <u>DU POINT D'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE</u> |
|---|

| | |
|---|----|
| 1° - <u>PROCEDES DE DEGRADATION DU TYPE 1</u> | 18 |
| I - <u>RUPTURE ENZYMATIQUE DES LIAISONS GLUCIDE-PROTIDE</u> | 19 |
| II - <u>RUPTURE CHIMIQUE DES LIAISONS GLUCIDE-PROTIDE</u> | 19 |
| A - <u>Réduction des liaisons esters</u> <u>par le borohydrure de lithium</u> | 19 |
| B - <u>Rupture des liaisons esters</u> <u>par les solutions alcalines</u> | 26 |
| 1° - <u>Hydrolyse alcaline</u> | 27 |
| 2° - <u>Hydroxylaminolyse</u> | 27 |
| C - <u>Rupture des liaisons O-glycosidiques</u> <u>par des solutions alcalines</u> | 29 |
| 1° - <u>RESULTAT DE LA " β -ELIMINATION"</u> | 30 |
| 2° - <u>ETUDE DES GLYCANNES DETACHES PAR LA " β -ELIMINATION"</u> | 32 |
| 3° - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES "DEHYDRO-AMINO-ACIDES"</u> | 33 |
| a - <u>Mesures dans l'ultra-violet</u> | 33 |
| b - <u>Hydrolyse directe des "déhydro-peptides"</u> | 35 |

Identification des acides α cétoniques formés au cours de l'hydrolyse

| | |
|--|----|
| c - <u>Hydrolyse des "déhydro-protides" préalablement modifiés</u> | 36 |
| α - <u>Réduction des déhydro-protides conjugués</u> | 38 |
| β - <u>Addition d'acide sulfureux sur la déhydro-alanine conjuguée</u> | 40 |
| γ - <u>Addition de thioacétate de sodium sur la déhydroalanine conjuguée</u> | 40 |
| 2° - <u>PROCEDES DE DEGRADATION DU TYPE 2</u> | 40 |
| 1° <u>Exploration de la structure du groupement glycanique des glycoprotides</u> | 41 |
| 2° <u>Exploration du point d'attache glycanne-protide</u> | 42 |
| 3° - <u>PROCEDES DE DEGRADATION DU TYPE 3</u> | 43 |
| A - <u>PROCEDES DE DEGRADATION ENZYMATIQUE</u> | 43 |
| B - <u>PROCEDES DE DEGRADATION CHIMIQUE</u> | 44 |
| 1° - <u>Hydrolyse acide du glycanne</u> | 44 |
| 2° - <u>Dégradation récurrente de SMITH</u> | 45 |
| 4° - <u>PROCEDES DE DEGRADATION DU TYPE 4</u> | 47 |
| 1° - <u>Hydrolyse enzymatique</u> | 47 |
| 2° - <u>Dégradation chimique</u> | 48 |
| a - <u>Hydrazinolyse</u> | 48 |
| b - <u>Hydrolyse alcaline</u> | 48 |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"><u>LE PROBLEME DU POINT D'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE</u> <u>DANS L'OVOMUCOÏDE</u></div> | 49 |
| <u>TRAVAUX PERSONNELS</u> | 58 |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"><u>RECHERCHES SUR LES CONJUGUES</u> <u>GLUCOSAMINE-AMINO-ACIDE ET</u> <u>SUR LEURS DERIVES</u></div> | 59 |

| | | |
|--|--|----|
| <u>1 - RECHERCHES SUR LA</u> | | |
| <u>N-(β-L-ASPARTYL)-N-ACETYL-GLUCOSAMINYLAMINE</u> | | 59 |
| A - | <u>STABILITE EN MILIEU ACIDE DE LA N-(β-ASPARTYL)-</u> <u>N-ACETYL-GLUCOSAMINYLAMINE</u> | 60 |
| B - | <u>COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE ET ELECTROPHORETIQUE</u> <u>DE LA N-(β-ASPARTYL)-N-ACETYL- GLUCOSAMINYLAMINE ET DE</u> <u>SES DERIVES</u> | 62 |
| 1° - | <u>Mode opératoire</u> | 62 |
| | a - <u>Chromatographie sur papier</u> | 62 |
| | b - <u>Electrophorèse sur papier</u> | 64 |
| 2° - | <u>Résultats</u> | 64 |
| C - | <u>CONCLUSIONS</u> | 65 |
| <u>2 - RECHERCHES SUR LES</u> | | |
| <u>O-SERYL ET O-THREONYL-β-N-ACETYLGLUCOSAMINIDES</u> | | |
| <u>ET SUR LE MECANISME DE LA "β-ELIMINATION"</u> | | 66 |
| <u>I - SYNTHESE DES O-SERYL ET</u> | | |
| <u>O-THREONYL-β-N-ACETYLGLUCOSAMINIDES</u> | | 66 |
| <u>ETAPE I</u> | | 68 |
| <u>PREPARATION DE LA O-PERACETYL-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE</u> | | 68 |
| A - | <u>MODE OPERATOIRE</u> | 68 |
| 1 - | <u>PROCEDE DE JONES</u> | 68 |
| | a - <u>Principe</u> | 68 |
| | b - <u>Technique</u> | 68 |
| 2 - | <u>PROCEDE DE FINDLAY, LEVVY et MARSH</u> | 69 |
| | a - <u>Principe</u> | 69 |
| | b - <u>Technique</u> | 69 |
| | c - <u>Commentaires</u> | 70 |
| 3 - | <u>PROCEDE PERSONNEL</u> | 71 |
| | a - <u>Principe</u> | 71 |
| | b - <u>Technique</u> | 71 |
| | c - <u>Commentaires</u> | 72 |

| | |
|--|----|
| B - <u>RESULTATS</u> | 72 |
| C - <u>CONCLUSIONS</u> | 74 |
| <u>ETAPE 2</u> | |
| <u>PREPARATION DE LA 1-α-CHLORO-3,4,6-TRI-O-ACETYL-N-ACETYL-</u> | |
| <u>D-GLUCOSAMINE</u> | |
| A - <u>PRINCIPE</u> | 75 |
| B - <u>METHODES</u> | 76 |
| 1 - <u>TENTATIVE DE SYNTHESE DE L'ACETO-BROMO-N-ACETYLGUCOSAMINE</u> | 76 |
| a - <u>MODE OPERATOIRE</u> | 76 |
| b - <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u> | 76 |
| 2 - <u>SYNTHESE DE L'ACETO-CHLORO-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE</u> | 78 |
| a - <u>MODE OPERATOIRE</u> | 78 |
| b - <u>RESULTATS</u> | 80 |
| c - <u>CONCLUSIONS</u> | 82 |
| <u>ETAPE 3</u> | |
| <u>SYNTHESE DES O-(N-CARBOBENZOXY)SERYL ET THREONYL-O-PERACETYL-</u> | |
| <u>N-ACETYL-D-GLUCOSAMINIDES</u> | |
| A - <u>PRINCIPE</u> | 82 |
| B - <u>METHODES</u> | 82 |
| 1 - <u>PROCEDE DE JONES ET AL. A L'OXYDE D'ARGENT</u> | 83 |
| 2 - <u>PROCEDE PERSONNEL AU CARBONATE D'ARGENT</u> | 84 |
| 3 - <u>PROCEDE PERSONNEL AUX SELS MERCURIQUES</u> | 84 |
| a - <u>Condensation avec les N-carbobenzoxy-amino-acides</u> | 84 |
| b - <u>Condensation avec les esters benzyliques des</u> | |
| <u>N-carbobenzoxy-amino-acides</u> | 85 |
| C - <u>RESULTATS</u> | 86 |
| D - <u>CONCLUSIONS</u> | 88 |
| <u>ETAPES 4 ET 5</u> | |
| <u>PASSAGE AUX O-SERYL ET O-THREONYL</u> | |
| <u>-β-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINIDES</u> | |
| | 89 |

| | |
|---|-----|
| A - <u>PRINCIPE</u> | 89 |
| B - <u>METHODES</u> | 89 |
| 1 - <u>Débenzylation et N-décarboboxylation simultanées</u> | 89 |
| 2 - <u>O-désacétylation</u> | 90 |
| C - <u>CRITERES DE PURETE</u> | 90 |
| D - <u>RESULTATS</u> | 91 |
| E - <u>PURIFICATION DES O-SERYL ET O-THREONYL-β-N- ACETYLGLUCOSAMINIDES</u> | 94 |
| <u>CONCLUSIONS</u> | 94 |
| II - <u>ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DES O-SERYL ET O-THREONYL-β-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINIDES</u> | |
| 1°) <u>COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE ET ELECTROPHORETIQUE</u> | 96 |
| 2°) <u>ACTION DE L'ACIDE CHLORHYDRIQUE</u> | 99 |
| A - <u>MODE OPERATOIRE</u> | 99 |
| B - <u>RESULTATS</u> | 99 |
| C - <u>CONCLUSIONS</u> | 101 |
| 3°) <u>ACTION DE LA SOUDE</u> | 102 |
| A - <u>PREPARATION DES β-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINIDES DE LA SERINAMIDE ET DE LA THREONINAMIDE</u> | 102 |
| 1 - <u>PRINCIPE</u> | 102 |
| 2 - <u>MODE OPERATOIRE</u> | 103 |
| a - <u>Estérification</u> | 103 |
| b - <u>Amidation</u> | 103 |
| 3 - <u>RESULTATS</u> | 103 |
| B - <u>ACTION DE LA SOUDE SUR LES N-ACETYL-GLUCOSAMINIDES DE LA SERINE ET DE LA THREONINE ET SUR LEURS DERIVES AMIDES</u> | 104 |
| 1 - <u>MODE OPERATOIRE</u> | 104 |
| 2 - <u>RESULTATS</u> | 104 |

| | |
|---|-----|
| 3 - <u>DISCUSSION</u> | 104 |
| <u>MECANISME DE LA β-ELIMINATION</u> | 104 |
| 4 - <u>CONCLUSIONS</u> | 107 |
| 4°) <u>COMPORTEMENT DE LA LIAISON GLYCOSIDIQUE AU COURS DE DES REACTIONS DE DEGRADATION D'EDMAN</u> | 109 |
| A - <u>MODE OPERATOIRE</u> | 109 |
| B - <u>RESULTATS</u> | 110 |
| C - <u>CONCLUSIONS</u> | 110 |
| 5°) <u>ACTION DE L'HYDRAZINE SUR LES N-ACETYLGLUCOSAMINIDES</u> | 110 |
| III - <u>CONCLUSIONS GENERALES</u> | 112 |
| <u>RECHERCHES SUR LES MODALITES DE LA LIAISON GLYCANNE-PROTIDE DANS L'OVOMUCOIDE</u> | 114 |
| 1° - <u>HYDROLYSE PRONASIQUE DE L'OVOMUCOIDE ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES</u> | 114 |
| I - <u>MATERIEL ET METHODES</u> | 114 |
| A - <u>L'OVOMUCOIDE</u> | 114 |
| B - <u>HYDROLYSE PRONASIQUE</u> | 115 |
| 1° - <u>Principe</u> | 115 |
| 2° - <u>Mode opératoire</u> | 115 |
| C - <u>ISOLEMENT ET PURIFICATION DES GLYCOPEPTIDES</u> | 116 |
| 1° - <u>Principe</u> | 116 |
| 2° - <u>Mode opératoire</u> | 116 |
| a - <u>Purification sur échangeurs d'ions</u> | 116 |
| b - <u>Purification par chromatographie sur gel de dextrane</u> | 117 |
| c - <u>Fractionnement par chromatographie sur résine échangeuse de cations</u> | 117 |
| d - <u>Sous-fractionnement électrophorétique de la fraction α</u> | 120 |

| | |
|--------------------------|-----|
| II - <u>RESULTATS</u> | 120 |
| III - <u>DISCUSSIONS</u> | 122 |
| IV - <u>CONCLUSIONS</u> | 124 |

2° - COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE
DES FRACTIONS GLYCOPROTIDIQUES PRESENTES
DANS LES HYDROLYSATS PRONASIQUES DE
L'OVOMUCOIDE

125

| | |
|--|-----|
| I - <u>MATERIEL ET METHODES</u> | 125 |
| A - <u>COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES</u> | 125 |
| B - <u>COMPOSITION MOLAIRE</u> | 125 |
| 1 - <u>DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DES GLYCOPROTEIDES</u> | 125 |
| a - <u>Application de la formule de SVEDBERG</u> | 126 |
| b - <u>Application de la loi de STOKES</u> | 127 |
| c - <u>Procédé chimique</u> | 127 |
| α - <u>Principe</u> | 127 |
| β - <u>Mode opératoire</u> | 127 |
| 2 - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE DES OSES ET DES ACIDES</u> <u>AMINES CONSTITUANT LES GLYCOPROTEIDES</u> | 128 |
| a - <u>Identification et dosage des oses</u> | 128 |
| b - <u>Identification et dosage des acides aminés</u> | 129 |
| II - <u>RESULTATS</u> | 129 |
| III - <u>DISCUSSION</u> | 134 |
| IV - <u>CONCLUSIONS</u> | 138 |

3° - STRUCTURE DE LA FRACTION
PEPTIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES PRESENTS DANS LES
HYDROLYSATS PRONASIQUES DE L'OVOMUCOIDE

139

| | |
|---|-----|
| I - <u>MATERIEL ET METHODES</u> | 139 |
| A - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX</u> | 139 |

| | |
|--|-----|
| B - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX</u> | 140 |
| 1° - <u>Action de la leucine amino-peptidase</u> | 140 |
| 2° - <u>Diazotation des glycoprotides</u> | 140 |
| 3° - <u>Oxydation periodique</u> | 141 |
| 4° - <u>Procédé de dinitrophénylation</u> | 141 |
| a - <u>Isolement des DNP-glycoprotides</u> | 142 |
| b - <u>Hydrolyse des DNP-glycoprotides et analyse des hydrolysats</u> | 142 |
| 5° - <u>Dégradation d'EDMAN</u> | 142 |
| a - <u>Principe</u> | 143 |
| b - <u>Mode opératoire</u> | 143 |
| 1 - <u>Préparation des dérivés phénylthiohydantoïniques</u> | 143 |
| 2 - <u>Analyse de la phase organique</u> | 143 |
| 3 - <u>Analyse de la phase aqueuse</u> | 145 |
| II - <u>RESULTATS</u> | 146 |
| A - <u>FRACTION α_3</u> | 146 |
| B - <u>FRACTION α_4</u> | 148 |
| C - <u>FRACTION β</u> | 150 |
| III - <u>DISCUSSION</u> | 152 |
| IV - <u>CONCLUSIONS</u> | 154 |
| 4° - <u>NATURE DE LA LIAISON GLYCANNE-PROTIDE DANS LES PREPARATIONS D'OVOMUCOIDE</u> | |
| I - <u>MATERIEL ET METHODES</u> | 154 |
| A - <u>IDENTIFICATION DE LA "N-β-ASPARTYL-GLUCOSAMINYLAMINE" ET DE SES DERIVES</u> | 155 |
| 1 - <u>A partir d'un glyco-amino-acide</u> | 155 |
| 2 - <u>A partir d'un PTH-aspartyl-glycane</u> | 156 |
| B - <u>RECHERCHES DES LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES</u> | 156 |

| | |
|--|-----|
| 1° - <u>Action des alcalis sur les glycopeptides natifs</u> | 156 |
| 2° - <u>Action des alcalis sur les glycoprotides réamidés</u> | 157 |
| C - <u>RECHERCHE DES LIAISONS ESTERS</u> | 157 |
| II - <u>RESULTATS</u> | 158 |
| A - <u>FRACTION α_3</u> | 158 |
| B - <u>FRACTION α_4</u> | 159 |
| C - <u>FRACTION β</u> | 159 |
| D - <u>FRACTION γ</u> | 162 |
| III - <u>DISCUSSION</u> | 162 |
| IV - <u>CONCLUSIONS</u> | 163 |
| <u>CONCLUSIONS GÉNÉRALES</u> | 165 |
| RECHERCHES, DANS LE CADRE D'UN TRAVAIL D'EQUIPE, SUR LES MODALITES DE LA LIAISON GLYCANNE-PROTIDE DANS DIVERSES GLYCOPROTEINES | 167 |
| 1. - <u>GLOBULINES γ G</u> | 167 |
| I - <u>GLOBULINES γ G DU SERUM ET DU COLOSTRUM DE LA VACHE</u> | 167 |
| A - <u>MODE OPERATOIRE</u> | 167 |
| B - <u>STRUCTURE DES GLYCOPEPTIDES I</u> | 168 |
| C - <u>NATURE DE LA LIAISON</u> | 170 |
| D - <u>CONCLUSIONS</u> | 171 |
| II - <u>GLOBULINES γ G SÉRIQUES HUMAINES</u> | 171 |
| A - <u>MODE OPERATOIRE</u> | 171 |
| B - <u>STRUCTURE DU GLYCOPEPTIDE II</u> | 173 |
| C - <u>CONCLUSIONS</u> | 174 |

| | |
|---|-----|
| 2. - TRANSFERRINE HUMAINE | 176 |
| A - <u>MODE OPERATOIRE</u> | 176 |
| B - <u>RESULTATS</u> | 176 |
| C - <u>CONCLUSIONS</u> | 178 |
| 3. - LACTOTRANSFERRINE HUMAINE | 179 |
| A - <u>MODE OPERATOIRE</u> | 179 |
| B - <u>RESULTATS</u> | 180 |
| C - <u>CONCLUSIONS</u> | 183 |
| 4. - GLOBULINES γA DU LAIT DE FEMME | 183 |
| A - <u>MODE OPERATOIRE</u> | 183 |
| 1° - <u>ISOLEMENT ET ETUDE DE LA COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES</u> | 183 |
| 2° - <u>ACTION DE LA SOUDE SUR LES GLYCOPEPTIDES</u> | 184 |
| a - <u>Protocole expérimental</u> | 185 |
| b - <u>Fractionnement et étude des composés libérés par l'action de la soude</u> | 185 |
| B - <u>RESULTATS</u> | 185 |
| C - <u>CONCLUSIONS</u> | 187 |
| 5. - CONCLUSIONS | 188 |
| CONCLUSIONS GENERALES | 189 |
| BIBLIOGRAPHIE | 196 |
| APPENDICE TECHNIQUE | 210 |
| TABLE DES MATIERES DE L'APPENDICE TECHNIQUE | 211 |

INTRODUCTION

Les glycoprotides sont des composés naturels ou artificiels qui résultent de la conjugaison d'une fraction glucidique appelée glycanne avec une fraction protidique. Suivant la nature de cette dernière, on distingue 3 classes de glycoprotides :

- les glyco-amino-acides,
- les glycopeptides,
- les glycoprotéines,

qui résultent de l'association d'un glucide avec, respectivement, un acide aminé, un peptide ou une protéine.

La structure moléculaire d'un glycoprotide pose donc trois problèmes :

- celui de la structure du glycanne,
- celui de la structure du groupement protidique,
- celui des modalités de la liaison du glycanne avec le protide.

C'est à ce dernier problème que nous nous sommes attachés.

Nos recherches s'inscrivent dans le cadre du travail d'équipe qui est réalisé au Laboratoire sur la constitution des glycoprotéines. Elles ont essentiellement porté sur le problème des modalités de la liaison glucide-protide dans ces composés.

Notre but était de mettre au point des procédés originaux d'exploration de la structure du point d'attache ose-acide aminé susceptibles d'être appliqués par les autres membres de l'équipe qui travaillaient sur les glycoprotéines les plus diverses, comme l'orosomucoïde, la transferrine, la lactotransferrine et les globulines immunes.

Nous nous sommes personnellement attaché à l'étude de l'ovomucoïde pour deux raisons. La première est que cette glycoprotéine du blanc d'oeuf présente des caractéristiques physico-chimiques voisines des composés précédents, qu'elle se prépare facilement en quantités élevées et qu'elle représente donc un excellent matériau pour mettre au point des techniques dont l'application est ensuite étendue à d'autres substances. La seconde est qu'il existait, au moment où ces recherches nous furent confiées, une "énigme de l'ovomucoïde".

En effet, le sujet avait été abordé par Madame ADAM-CHOSSON qui avait conclu à l'existence, dans l'ovomucoïde, de deux types d'attache glycanne-protide. D'après l'auteur, deux chaînes glycaniques étaient conjuguées par une liaison β -N-aspartyl-N-acétylglucosylaminique (voir p. 49) et deux autres par une liaison O-thréonyl-N-acétylglucosaminidique (ADAM-CHOSSON) (1). Toutefois, en tentant d'apporter la preuve directe de l'existence de ce dernier type de liaison, nous avons obtenu des résultats qui infirmaient les conclusions d'ADAM-CHOSSON.

Aussi, avons-nous repris les travaux de cet auteur en nous efforçant de mettre au point des procédés qui permettent de déterminer sans ambiguïté la nature du point d'attache, en posant comme principe que la démonstration ne pouvait être apportée que par l'isolement et l'identification des deux "partenaires" conjugués : l'ose et l'acide aminé.

L'exposé des travaux que nous avons effectués et des résultats que nous avons obtenus comportera donc trois parties :

1 - Nous décrirons, d'abord, les propriétés des deux "chaînes de conjugaison" ose-amino-acide qui sont le plus couramment présents dans les glycoprotéides d'origine animale et dont l'existence avait été envisagée dans l'ovomucoïde par ADAM-CHOSSON : la β -N-aspartyl-N-acétyl-glucosaminylamine et les O-séryl et O-thréonyl-N-acétylglucosaminides. Cette première série de recherches nous a permis, en outre, de démontrer le mécanisme de la " β -élimination". Elle a fait l'objet des notes et mémoires suivants :

- J. MONTREUIL, M. MONSIGNY et M. Th. BUCHET, Action des alcalis sur les O-séryl et O-thréonyl- β -N-acétyl-D-glucosaminides. Mécanisme de la " β -élimination", C.R. Acad. Sci.; 1967, 264, 2068

- M. MONSIGNY, M. Th. BUCHET et J. MONTREUIL, Propriétés des O-séryl et O-thréonyl-N-acétylglucosaminides de synthèse et de leur dérivés : comportements chromatographique et électrophorétique ; stabilité vis-à-vis des acides et des alcalis. Chromatographie Symposium IV, Société Belge des Sciences Pharmaceutiques, éd., Bruxelles (sous presse).

- M. MONSIGNY, Réduction quantitative des déhydro-amino-acides formés au cours de la rupture des liaisons O-glycosidiques des β -hydroxy-amino-acides par " β -élimination", Bull. Soc. Chim. Biol. (sous presse).

2 - Nous décrirons ensuite les résultats que nous avons obtenus en appliquant, à l'ovomucoïde, les procédés que nous avons mis au point et qui infirment l'existence de liaisons O-thréonyl-N-acétyl-glucosaminidiques dans ce dernier. Ces résultats ont été rapportés dans les notes et mémoires suivants :

- M. MONSIGNY et J. MONTREUIL, Nature du point d'attache glycanne-protéide dans l'ovomucoïde, C. R. Acad. Sci. , 1966, 262, 1780

- M. MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et J. MONTREUIL, Détermination de la nature du point d'attache glycanne-protéine dans les préparations d'ovomucoïde de Poule, Bull. Soc. Chim. Biol. (sous presse)

3 - Nous exposerons enfin, d'une manière condensée, les résultats qui ont été obtenus, en travail d'équipe, par différents membres du Laboratoire, grâce à l'application, à divers glycoprotéides, des protocoles expérimentaux que nous avons mis au point à propos de l'ovomucoïde. La contribution que nous avons apportée à ces recherches nous a permis de participer aux notes et mémoires suivants :

- G. SPIK, M. MONSIGNY et J. MONTREUIL, Etude sur les glycoprotéides. Mise en évidence d'une liaison de l'acide aspartique avec le groupement mucopolysidique dans la transferrine humaine. C. R. Acad. Sci. , 1965, 260, 4282.

- G. SPIK, M. MONSIGNY et J. MONTREUIL, Etudes sur les glycoprotéides. Mise en évidence d'une liaison de l'acide aspartique et de la glucosamine dans la transferrine humaine. C. R. Acad. Sci., 1965, 261, 1137.

- N. DUQUESNE, M. MONSIGNY et J. MONTREUIL, Etudes sur les glycoprotéides. Nature du point d'attache glycanne-protéine dans les globulines γG du sérum de Boeuf. C. R. Acad. Sci., 1965, 261, 1430.

- N. DUQUESNE, M. MONSIGNY et J. MONTREUIL, Etudes sur les glycoprotéides. Nature du point d'attache glycanne-protéine dans les globulines γG du sérum humain. C. R. Acad. Sci., 1966, 262 D, 2536.

- G. SPIK, M. MONSIGNY et J. MONTREUIL, Etude sur les glycoprotéides. Mise en évidence d'une liaison de l'acide aspartique et de la glucosamine et d'une liaison O-thréonyl-glycosidique dans la lactotransferrine humaine. C. R. Acad. Sci., 1966, 263 D, 893.

- J. DESCAMPS, M. MONSIGNY et J. MONTREUIL, Mise en évidence de liaisons O-séryl et O-thréonyl-N-acétylgalactosaminidiques et β -N-aspartyl-N-acétylglucosaminylaminiques dans les globulines γA du lait de Femme. C. R. Acad. Sci., (sous presse).

- A. CHERON, M. MONSIGNY, N. ANTONY et J. MONTREUIL, Nature de la liaison glycanne-protéine dans les globulines γG du colostrum de Vache. Bull. Soc. Chim. Biol., à paraître.

Enfin, l'ensemble des résultats que nous avons obtenus a fait l'objet de la revue générale suivante :

- M. MONSIGNY, Etude sur les glycoprotéides. L'analyse chromatographique automatique dans l'étude du point d'attache glucides-acides aminés dans les glycoprotides. Symposium 1965, Compagnie Technicon, France.

Nous ferons précéder l'exposé de nos travaux personnels par un chapitre dans lequel nous exposerons brièvement l'état actuel de nos connaissances sur les modalités de la liaison glucide-protéine dans les glycoprotéines, les moyens d'exploration de cette dernière et le problème du point d'attache glycanne-protide dans l'ovomucoïde tel qu'il se présentait au moment où nous avons commencé nos travaux.

GENERALITES

- 1° - Les différents types de liaisons glucide-protide.
- 2° - Les procédés d'exploration de la structure des points d'attache glucide-protide.
- 3° - Le problème du point d'attache glycanne-protide dans l'ovomucoïde.

| |
|--|
| <p>LES DIFFERENTS TYPES DE LIAISON GLUCIDE-PROTIDE</p> |
|--|

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 ce motif structural et que l'on pouvait distinguer quatre types de liaisons :

- I - Liaisons "ester"
- II - Liaisons O-glycosidiques
- III - Liaisons "amide"
- IV - Liaisons glycosylaminiques.

En général, les deux premiers types de liaisons passent pour être très labiles en milieu alcalin et en milieu acide, tandis que les deux autres sont stables en milieu alcalin et relativement résistants à l'hydrolyse acide.

I - LIAISON 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 (GOTTSCHALK et MURPHY (2) ; GOTTSCHALK, MURPHY et GRAHAM (3) ; GRAHAM, MURPHY et GOTTSCHALK (4) ; MURPHY et GOTTSCHALK (5) ; GOTTSCHALK (6)) 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. 1 ; p. 9).

Dans les deux glycopeptides du mycoside C₂ de Mycobacterium avium (Fig. 2 ; p. 9) le carboxyle C-terminal de la D-alanine estérifie l'hydroxyle semi-acétique du 6-désoxy-L-talose, dans l'un, du 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose, dans l'autre (CHAPUT, MICHEL et LEDERER) (7) (+).

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 de la réduction du groupement carboxylique de l'acide aminé engagé dans la liaison ester en fonction alcoolique primaire (voir p. 19).

II - 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, hydroxylysine ou hydroxyproline). Ce type de liaison a été mis en évidence dans les glycoprotéides suivants :

1 - Mycoside C₂ de Mycobacterium avium, dans lequel le 3,4-di-O-méthyl-L-rhamnose est conjugué à la D-allo-thréonine (Fig. 2 ; p. 9) (8) ; mycoside C_b de Mycobacterium butyricum dans lequel le 6-désoxy-L-talose est conjugué à la D-allo-thréonine. (VILKAS, ROJAS, DAS, WOLSTENHOLME et LEDERER) (9).

2 - Mucines sous-maxillaires

Dans les mucines sous-maxillaires, des liaisons O-thréonyl ou O-séryl-N-acétylgalactosaminides (Fig. 3 ; p. 10) ont été mises en évidence par PIGMAN (10) ; HERMAN, HARBON, ROSSIGNOL et CLAUSER (11) ; HARBON, HERMAN-BOUSSIER et CLAUSER (12) ; HARBON, HERMAN, ROSSIGNOL, JOLLES et CLAUSER (13) ; ANDERSON, SENO, SAMPSON, RILEY, HOFFMAN et MEYER (14) ; BHAVANANDAN, BUDDECKE,

(+) JOLLES, NGUYEN TRUNG LUONG GROS et LEDERER (7 bis) ont caractérisé, dans la cire C_b de Mycobacterium tuberculosis, une liaison ester entre l'alanine ou l'acide glutamique et l'arabinose ou le galactose.

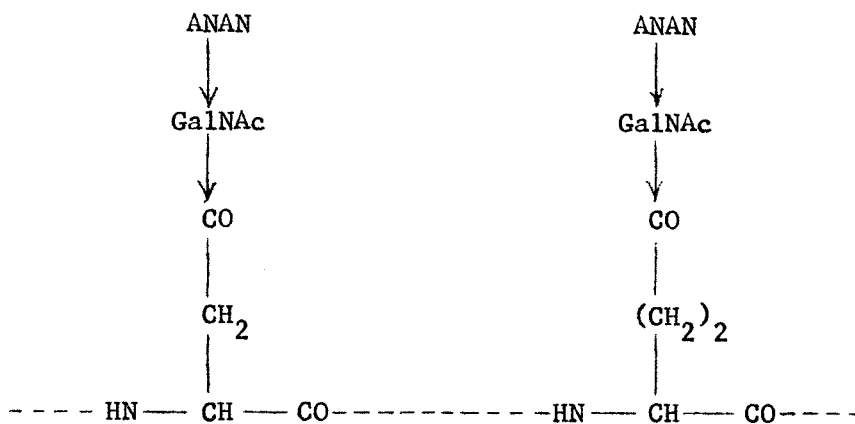


Figure 1

Liaison glycanne-protide de type "ester" décrite par GOTTSCHALK et al. dans la mucine sous-maxillaire du Mouton.

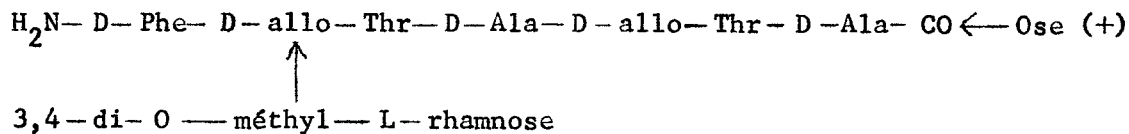


Figure 2

Les différents types de liaison glycanne-protide dans le mycoside C₂ de Mycobacterium avium (CHAPUT, MICHEL et LEDERER).

(+) 6-désoxy-L-talose ou 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose

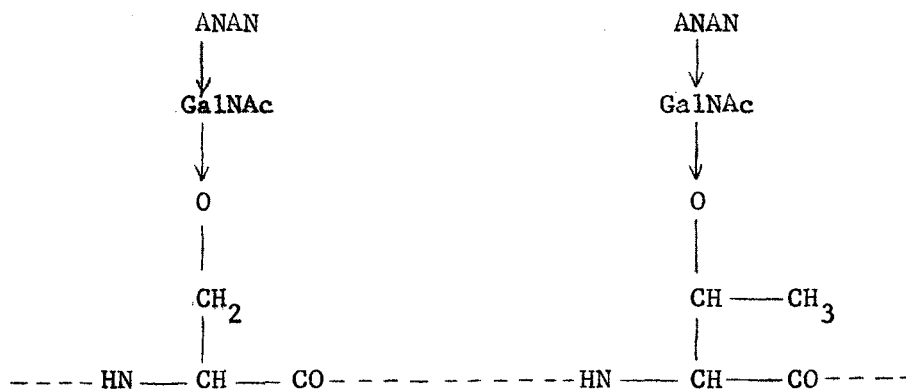


Figure 3

Liaisons glycanne-protide de type O-glycosidique dans les mucines sous-maxillaires du Mouton, du Boeuf et du Porc.

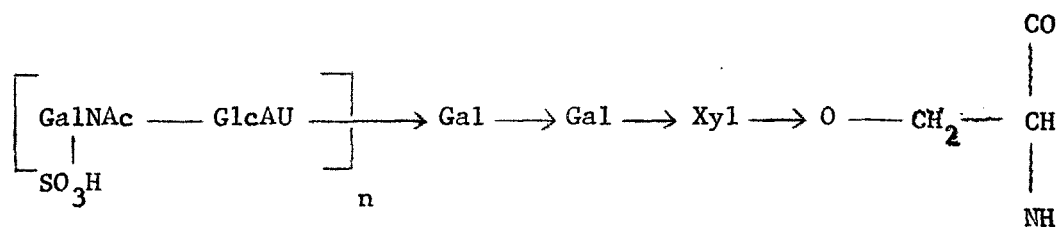


Figure 4

Liaison xylosidique de la protéine et de la chaîne glycanne dans l'acide chondroïtine sulfurique B.

CARUBELLI et GOTTSCHALK (15) ; TANAKA et PIGMAN (16) ; CARUBELLI, BHAVANANDAN et GOTTSCHALK (17) ; BEST, BHAVANANDAN et GOTTSCHALK (18) ; GOTTSCHALK (19) ; ADAMS (20, 21) ; BERTOLINI, TETTAMANTI et PIGMAN (22) ; BERTOLINI et PIGMAN (23) ; CASTELLANI, ZONTA, BALDUINI et LATERZA (24) ; BHARGAVA et GOTTSCHALK (25).

3 - Glycosylamino-glycannes de la substance fondamentale

Dans les mucopolyosides acides de la substance fondamentale, le glycanne est attaché au protide par une liaison O-séryl-xylosidique : (Fig. 4 ; p. 10).

a - Héparine dans laquelle l'existence d'une liaison O-glycosidique de la sérine a été démontrée par MUIR (26) ; RODÉN (27) ; LINDAHL, et RODÉN (28). Ultérieurement, l'ose fut identifié au xylose par LINDAHL, CIFONELLI, LINDAHL et RODÉN (29) ; LINDAHL (30) ; LINDAHL et RODÉN (31) ; KAPLAN (32).

b - Acides chondroitines sulfuriques

α - Liaison O-glycosidique de la sérine : ANDERSON, HOFFMAN et MEYER (33, 34) ; CASTELLANI, ZONTA et DE LUCA (35) ; RODÉN (36) ; RODÉN, GREGORY et LAURENT (37) ; GREGORY, LAURENT et RODÉN (38).

β - Liaison O-glycosidique de la sérine et de la thréonine : SENO, MEYER, ANDERSON et HOFFMAN (39) ; MEYER, SENO, ANDERSON, LIPPMAN et HOFFMAN (40) ; ANDERSON, SENO, SAMPSON, RILEY, HOFFMAN et MEYER (41) ;

γ - Liaison O-séryl-xylosidique : LINDAHL et RODÉN (42) ; RODÉN et ARMAND (43) ; KATSURA et DAVIDSON (44) ; MARLER et DAVIDSON (45).

δ - Liaison O-séryl et O-thréonyl-N-acétyl-galactosaminidique : BRAY, LIEBERMAN et MEYER (46).

4 - Lactotransferrine humaine où un groupement glycannique est conjugué à la fonction hydroxylée de la thréonine (SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (47) ; SPIK et MONTREUIL (48) ; GOT, GOUSSAULT et FONT (49)) (voir p. 180).

5 - Substances de groupes sanguins. La présence de liaisons O-séryl et O-thréonyl-N-acétylgalactosaminidiques a été démontrée dans les substances de groupes sanguins par KABAT, BASSETT, PRYZWANSKY, LLOYD, KAPLAN et LAYUG (50) ; SPRINGER, NAGAI et TEGTMEYER (51) ; LLOYD et KABAT (52) ; KOCHETKOV, DEREVITSKAYA et KARA-MURZA (53, 54) ; WINZLER, HARRIS, PEKAS et JOHNSON (55). En outre, une liaison O-séryl (ou O-thréonyl) galactosidique a été mise en évidence par KABAT, BASSETT, PRYZWANSKY, LLOYD, KAPLAN et LAYUG (56) ; LLOYD et KABAT (57).

6 - Tropocollagène dans lequel le galactose est conjugué à la fonction hydroxylée de la δ -hydroxy-lysine (BUTLER et CUNNINGHAM (58) ; et CUNNINGHAM, FORD et SEGREST (59)).

7 - Glycoprotéines de la membrane basale glomérulaire où une liaison α -glucosido-1,2- β -galactoside de l'hydroxylysine a été caractérisée par SPIRO (60).

8 - Globulines γ A isolée du sérum de myélomateux (DAWSON et CLAMP (61) ; KO, CLAMP, DAWSON et CEBRA (62)) et du lait de Femme (DESCAMPS, MONSIGNY et MONTREUIL) (63) (voir p 183) : liaisons O-séryl et O-thréonyl-N-acétylgalactosaminides.

9 - Globulines γ G du Lapin dont une "chaîne lourde" porte un résidu de N-acétylgalactosamine lié à un résidu de thréonine (SMYTH et UTSUMI) (64).

10 - "Extensine", glycoprotéide végétal extrait de la Tomate dans lequel existent des liaisons O-hydroxy-prolyl de l'arabinose (LAMPART) (65).

Nota. Bien que les acides teichoïques, constituants des parois bactériennes, ne soient pas, à proprement parler, des glycoprotéides, nous préciserons qu'il s'agit de chaînes polyphosphoribityl ou polyphosphoglycéryl sur lesquelles se greffent par des liaisons O-glycosidiques des oses ou des osides et par des liaisons "esters" des restes d'alanine.

III - LIAISONS DE TYPE AMIDE

Dans les mucopeptides de la muréine, constituant de la paroi de nombreuses bactéries, le glycane est uni à la chaîne peptidique par une liaison amide qui met en jeu le groupement carboxylique de l'acide muramique et la fonction amine de l'alanine (Fig. 5 ; p. 14) (+).

- 1 - Aerobacter aerogenes (JUSIČ) (68).
- 2 - Aerobacter cloacae (SCHOCHER, JUSIČ et WATSON (69) ; SCHOCHER, BAYLEY et WATSON (70)).
- 3 - Bacillus megatherium (BRICAS, GHUYSEN et DEZELEE) (71).
- 4 - Diplococcus pneumoniae (LIU et GOTSCHLICH) (72).
- 5 - Escherichia coli (PRIMOSIGH, PELZER, MAASS et WEIDEL (73) ; PELZER (74)).
- 6 - Micrococcus lysodeikticus (GHUYSEN (75) ; BRUMFITT, WARDLAW et PARK (76) ; PERKINS et ROGERS (77) ; GHUYSEN (78) ; SALTON et GHUYSEN (79) ; LEUTGEB et WEIDEL (80) ; CZERKAUVSKI, PERKINS et ROGERS (81) ; MIRELMAN et SHARON (82)).
- 7 - Salmonella galbinarum (WEIDEL, FRANK et LEUTGEB) (83).
- 8 - Staphylococcus aureus (souche Copenhague) (GHUYSEN, TIPPER, BIRGE et STROMINGER (84) ; GHUYSEN et TIPPER (85) ; PARK et STROMINGER (86) ; TIPPER, STROMINGER et ENSIGN (87)).
- 9 - Streptococcus Groupe 14, type A (HEYMANN, MANNIELLO et BARKULIS) (88).
- 10 - Streptomyces albus G (PETIT, MUNOZ et GHUYSEN) (89).
- 11 - Streptomyces faecalis (Souche ATCC 9790) (GHUYSEN, BRICAS, LEYH-BOUILLE, LACHE et SHOCKMAN) (90).

(+) Voir les revues générales de WEIDEL et PELZER (66) et de SALTON (67).

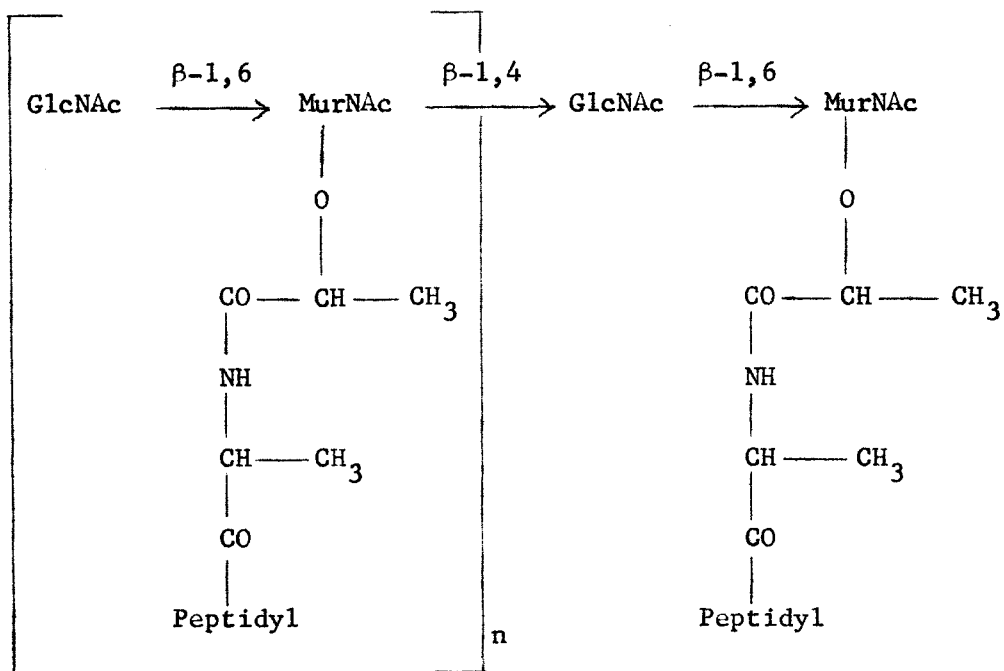


Figure 5

Mode de liaison du glycanne et de la fraction peptidique dans un muropeptide isolé de la paroi d'*Escherichia coli* (in WEIDEL et PELZER) (91).

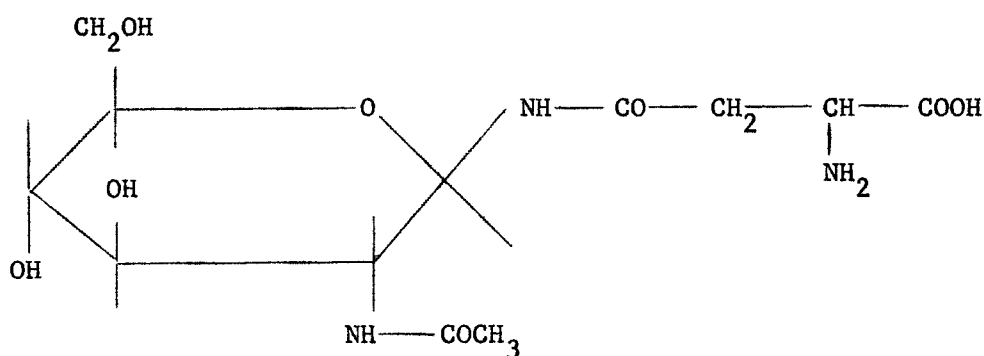


Figure 6

Formule du 2 acétamido-1- β (L-aspartamido) -1,2-desoxy-D-glucopyranose ou 1-N-(β -aspartyl)-1,2-didéoxy-2-acétamido-glucosylamine (NEUBERGER et al. ; YAMASHINA et al.).

- 12 - Streptomyces pyogenes (Groupe A) (HEYMANN, ZELEZNICK et MANNIELLO (92) ; MUNOZ, GHUYSEN, LEYH-BOUILLE, PETIT, HEYMANN, BRICAS et LEFRANCIER (93) ; MUNOZ, GHUYSEN et HEYMANN (94)).

IV - 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. Le 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 ou 1-N-(β -aspartyl)-1,2-didéoxy-2-acétamido-glucosylamine (Fig. 6 ; p. 14).

Ce type de liaison a été caractérisé, sans ambiguïté, dans les glycoprotéides suivants :

- 1 - Ovalbumine (YAMASHINA et MAKINO (95) ; YAMASHINA et IZUMI (96) ; MARKS, MARSHALL et NEUBERGER (97) ; FLETCHER, MARSHALL et NEUBERGER (98) ; YAMASHINA, BAN-I et MAKINO (99) ; MARSHALL et NEUBERGER (100) ; TSUKAMOTO, YAMAMOTO et MIYASHITA (101) ; BOGDANOV, KAVERZNEVA et ANDREJEVA (102) ; MONTGOMERY, LEE et WU (103) ; MONTGOMERY, WU et LEE (104) ; YAMASHINA, MAKINO, BAN-I et KOJIMA (105)).
- 2 - Orosomucoïde du sérum humain (YAMASHINA, MAKINO, BAN-I et KOJIMA (106) HUGUES et JEANLOZ (107) ; FOURNET (108)) et du sérum de Cobaye (CUNNINGHAM et SIMKIN) (109).
- 3 - Ovomucoïde (TANAKA (110) ; MONTREUIL, BISERTE et CHOSSON (111) ; MONTREUIL, SPIK, CHOSSON, SEGARD et SCHEPPLER (112) ; MONTREUIL, CAS-TIGLIONI, ADAM-CHOSSON, CANER et QUEVAL (113) ; ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (114)).
- 4 - Transferrine (SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (115) ; SPIK et MONTREUIL (116)).

- 5 - Lactotransferrine (SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (117) ; SPIK et MONTREUIL (118)).
- 6 - Globulines γ G du sérum humain (ROTHFUS et SMITH (119) ; DUQUESNE, MONSIGNY et MONTREUIL (120) ; du sérum bovin (DUQUESNE, MONSIGNY et MONTREUIL) (121) ; et du colostrum de Vache (CHERON, MONSIGNY, ANTONY et MONTREUIL) (122) (voir p. 167)).
- 7 - Fibrinogène (MESTER, MOCZAR, VASS et SZABADOS (123) ; HASCHE-MEYER, CYNKIN, HAN et TRINDLE (124)).

En outre, l'existence de ce type de liaison est posé en hypothèse dans les glycoprotéines suivantes : haptoglobine (CHEFTEL, CLOAREC, MORETTI et JAYLE) (125), Taka-amylase A (ANAI, IKENAKA et MATSUSHIMA) (126) ; globulines γ A du sérum de myélomateux (DAWSON et CLAMP) (127) et du lait de Femme (DESCAMPS, MONSIGNY et MONTREUIL) (128) (voir p. 183) ; céruléoplasmine (JAMIESON) (129) ; thyroglobuline (CHEFTEL, BOUCHILLOUX et LISSITZKY (130) ; SPIRO (131) ; MURTHY, RAGHUPATHY et CHAIKOFF (132)) ; albumine de l'Orge (HOCHSTRASSER) (133) ; hémagglutinine du Haricot (LIS, SHARON et KATCHALSKI) (134).

PROCEDES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE
DU POINT D'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE

L'étude du point d'attache glycanne-protide dans un glycoprotide pose deux problèmes : l'un concerne la nature de la liaison et l'autre, l'identification de l'ose et de l'acide aminé impliqués dans cette liaison. Ces deux problèmes peuvent être abordés de quatre façons différentes. Si, en effet, nous schématisons un glycoprotide de la manière suivante (Fig. 7) :

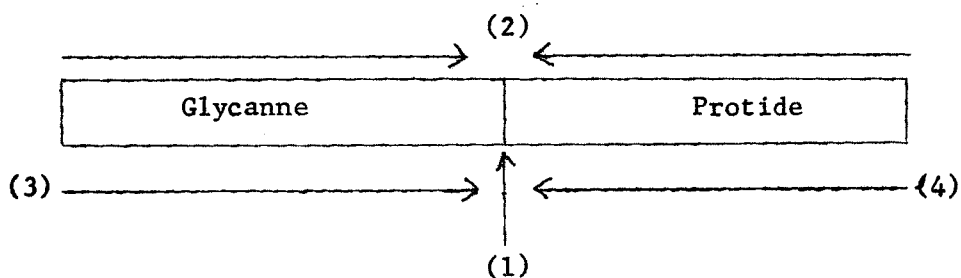


Figure 7

on voit que la dégradation de la molécule peut être envisagée selon quatre types différents.

Dégradation du type 1. Les procédés enzymatiques et chimiques de dégradation de ce type permettent de dissocier la fraction glucidique de la fraction peptidique. L'apparition de fonctions nouvelles peut alors fournir des renseignements sur les modalités de la liaison glucide-protéine.

Dégradation du type 2. Dans ce type de dégradation, essentiellement réalisé par des agents chimiques d'hydrolyse, comme les acides dilués ou les résines polystyrènes-sulfonées, on attaque, à la fois, le groupement osidique et la fraction protéique des glycoprotides dans l'espoir de parvenir au fragment ultime constitué par l'association d'un ose et d'un acide aminé.

Dégradation du type 3. Les procédés d'hydrolyse du type 3 utilisent à la fois les agents chimiques et les enzymes. Ils doivent logiquement conduire à des produits de dégradation formés par l'association d'un ose avec le protide intact.

Dégradation du type 4. La dégradation enzymatique de la fraction protéique représente la méthode de choix pour déterminer l'acide aminé impliqué dans la liaison glucide protéine, car l'enzyme sera incapable de scinder la liaison non peptidique ose-acide aminé et l'on obtient de cette manière, le groupement osidique intact auquel demeure attaché l'acide aminé qui l'unit à la chaîne peptidique. Dans deux cas particuliers seulement, une hydrolyse alcaline permet d'obtenir un glyco-amino-acide.

1° - PROCEDES DE DEGRADATION DU TYPE 1

Les procédés de dégradation du type 1 permettent de dissocier le point d'attache glucide-protide en faisant apparaître les fonctions de l'ose, d'une part, et de l'acide aminé, d'autre part, engagées dans la liaison. On peut, de cette manière, identifier l'ose et l'acide aminé conjugués et préciser la nature de la liaison. Appliqués aux glycoprotéines natives, les procédés de dégradation du type 1 sont essentiellement chimiques, puisque les enzymes sont, en général, incapables d'hydrolyser la liaison glucide-protéine. Au contraire, l'hydrolyse enzymatique sera parfaitement applicable aux glycoprotides constitués par l'association d'un ose et d'un protide ou d'un glycoside et d'un acide aminé.

I - RUPTURE ENZYMATIQUE DES LIAISONS GLUCIDE-PROTIDE

Le procédé n'est applicable qu'aux produits de la dégradation profonde d'une glycoprotéine déjà effectuée soit par voie chimique, soit par voie enzymatique (procédés du type 2, 3 et (ou) 4).

Nous avons illustré par des schémas quelques résultats qui ont été obtenus à propos de la muréine (Fig. 8 ; p. 20), des mucines sous-maxillaires (Fig. 9 ; p. 21) et de la N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine (+) (Fig. 10 ; p. 22).

II - RUPTURE CHIMIQUE DES LIAISONS GLUCIDE-PROTIDE

L'hydrolyse chimique de la liaison glucide-protide permet de mettre en évidence les liaisons esters et les liaisons O-glycosidiques des β -hydroxy-amino-acides.

Les liaisons esters sont spécifiquement coupées par le borohydrure de lithium. Les deux types de liaisons sont rompues par les solutions alcalines.

A - Réduction des liaisons esters par le borohydrure de lithium.

On sait, depuis les travaux de NYSTROM, CHAIKEN et BROWN (136) et de CHIBNALL et REES (137) que le borohydrure de lithium réduit les fonctions esters en respectant les fonctions amides et peptidiques. Cette réaction a trouvé une première application dans la détermination des groupements C-terminaux des protéines (CHIBNALL et REES) (138).

(+) KAVERZNEVA (135) est parvenue à rompre la liaison de l'aspartyl-glycane de l'ovalbumine dans lequel le groupement glucidique est resté intact.

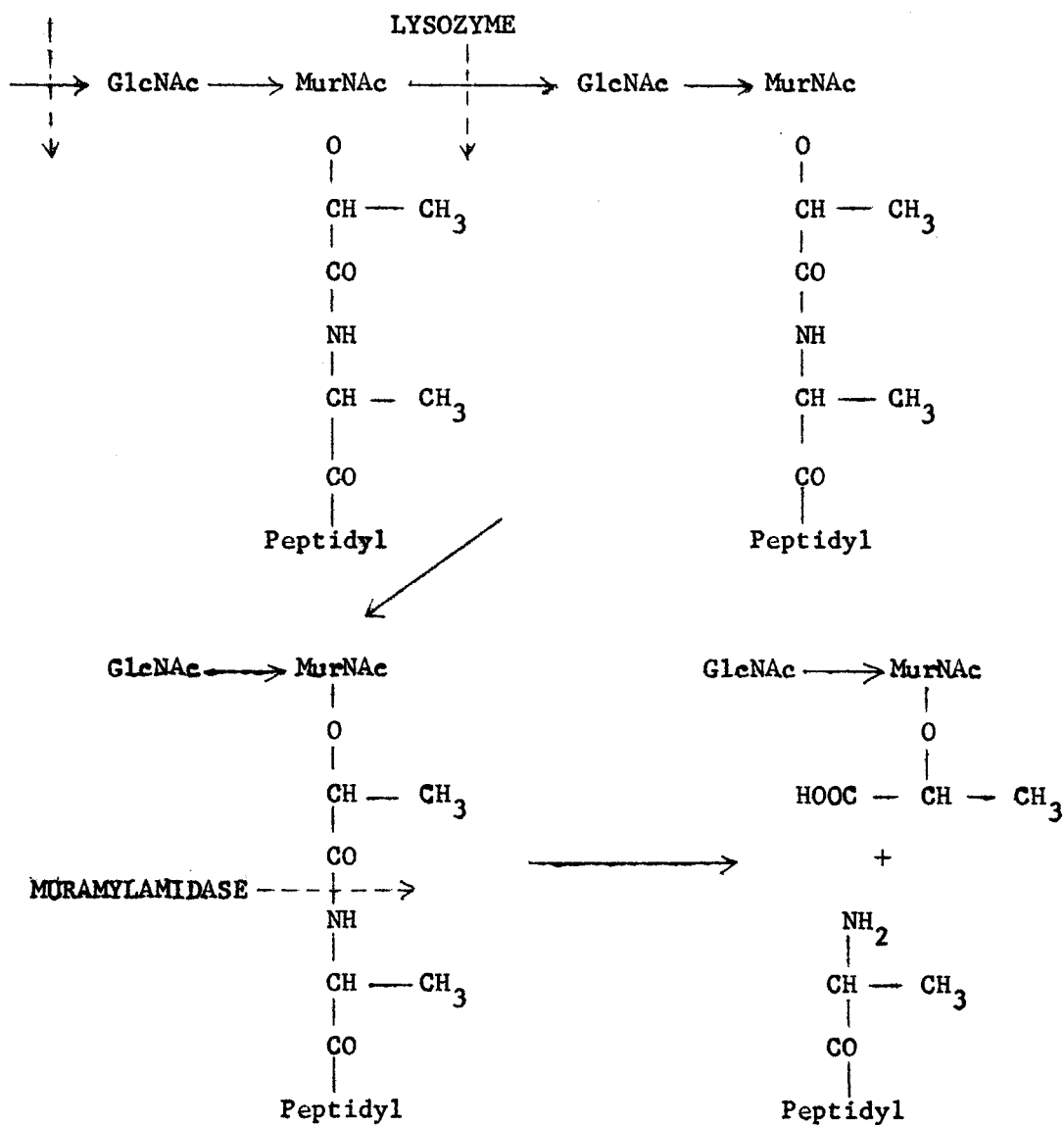


Figure 8

Mise en évidence d'une liaison amide de l'acide N-acétylmuramique et de l'alanine dans les muuropeptides par l'action combinée du lysozyme et de la muramylamidase (de *Streptomyces albus* G, p.e.) (GHUYSEN) (139).

MurNac = acide N-acétylmuramique dont nous avons dégagé le reste "lactyl".

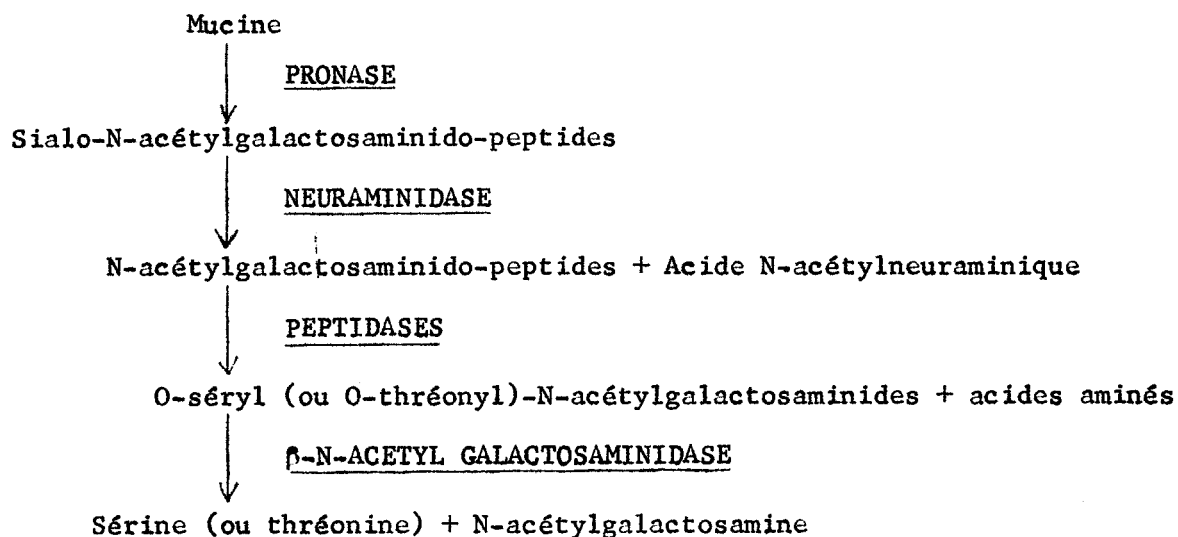


Figure 9

Mise en évidence de liaisons O-séryl et O-thréonyl-N-acétyl-β-galactosaminides dans la mucine sous-maxillaire ovine (BHAVANANDAN, BUDDECKE, CARUBELLI et GOTTSCHALK (140) ; BEST, BHAVANANDAN et GOTTSCHALK (141) ; GOTTSCHALK (142)).

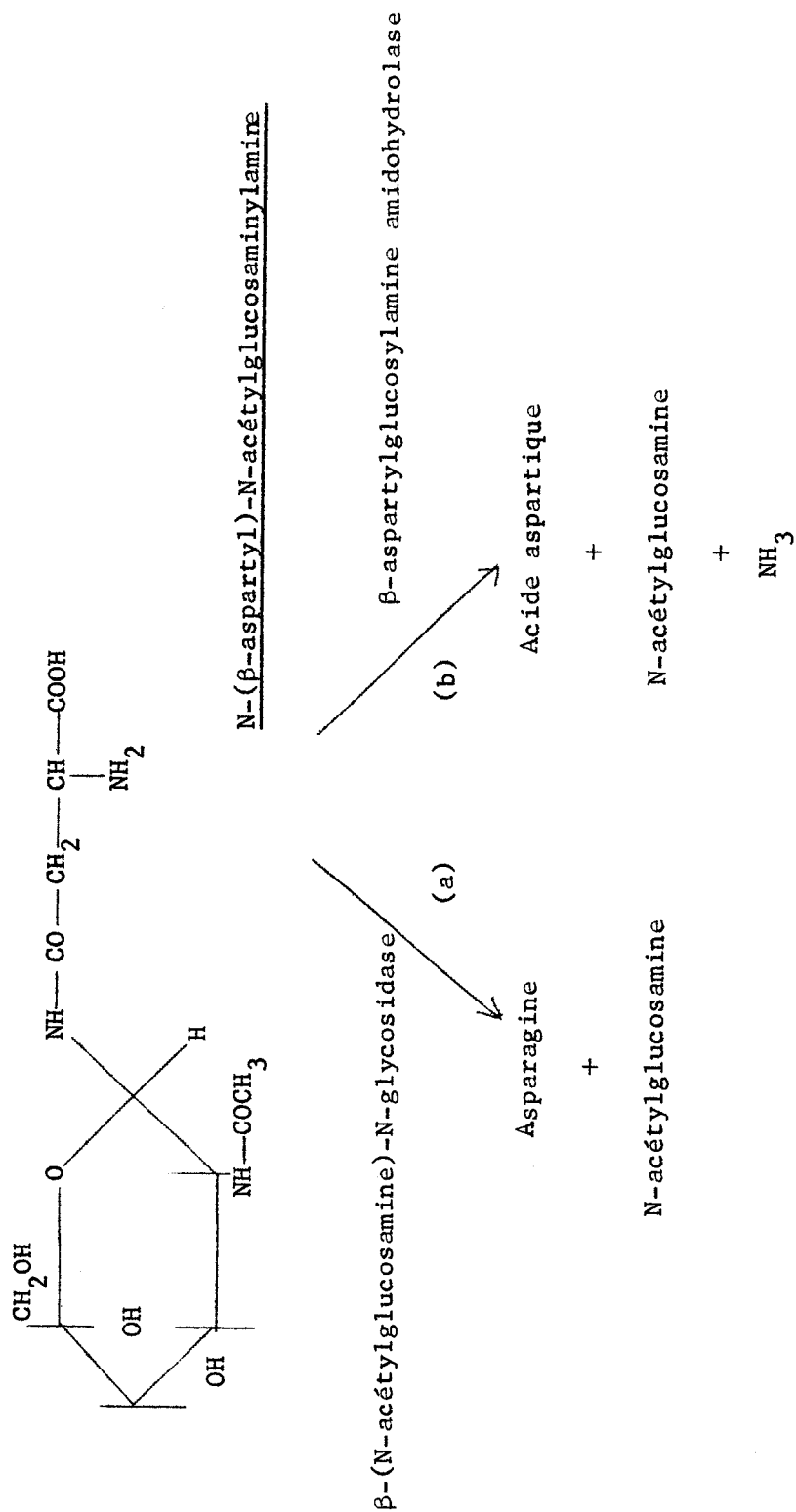


Figure 10

Hydrolyse enzymatique de la N-(β-aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine

(a) selon MURAKAMI et EYLAR (143) ;

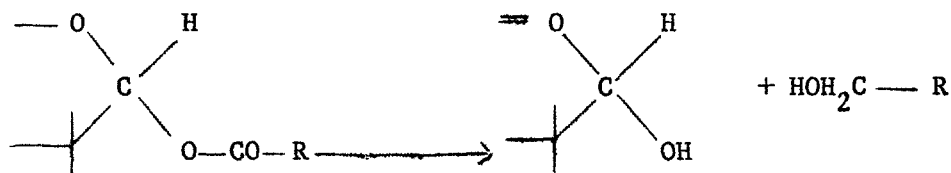
(b) selon ROSTON, CAYGILL et JEVONS (144) ; MAKINO, KOJIMA et YAMASHINA (145) ; CLAMP, DAWSON, HOUGH et KHAN (146) et MAHADEVAN et TAPPEL (147).

L'emploi du borohydrure de lithium dans la détermination du point d'attache glucide-protéine a été introduit par GOTTSCHALK (148) et par GOTTSCHALK et MURPHY (149) pour démontrer l'existence de liaisons "esters glycosidiques" de l'acide aspartique et de l'acide glutamique dans les mucines sous-maxillaires ovine et bovine (voir Fig. 1 ; p. 9). Selon GOTTSCHALK le borohydrure de lithium réduit spécifiquement en fonction alcoolique le groupement carboxylique de l'acide aminé qui est engagé dans la liaison ester et qui peut être, de cette manière, aisément identifié. Lorsque l'acide aminé "estérifie" la fonction réductrice de l'ose impliqué dans la liaison glucide-protéine, le borohydrure respecte la fonction semi-acétalique. Les réactions de clivage des liaisons esters par le borohydrure se schématisent donc, selon GOTTSCHALK, de la manière suivante :

- cas d'un ester "vrai"



- cas d'un ester "glycosidique"



Dans les deux cas, l'acide aspartique est réduit en homosérine et, l'acide glutamique, en acide α -amino- β -hydroxy-n-valérique (Fig. 11 ; p. 24). Le mécanisme de la réaction est précisé dans la figure 12 (p. 25).

L'application de ce mode opératoire a permis à GOTTSCHALK et al. de démontrer l'existence de liaisons esters des acides aspartique et glutamique et de la N-acétylgalactosamine dans les mucines sous-maxillaires du Mouton et du Boeuf et, à JOLLES et al., de caractériser des liaisons esters de la phénylalanine dans la caséine kappa bovine.

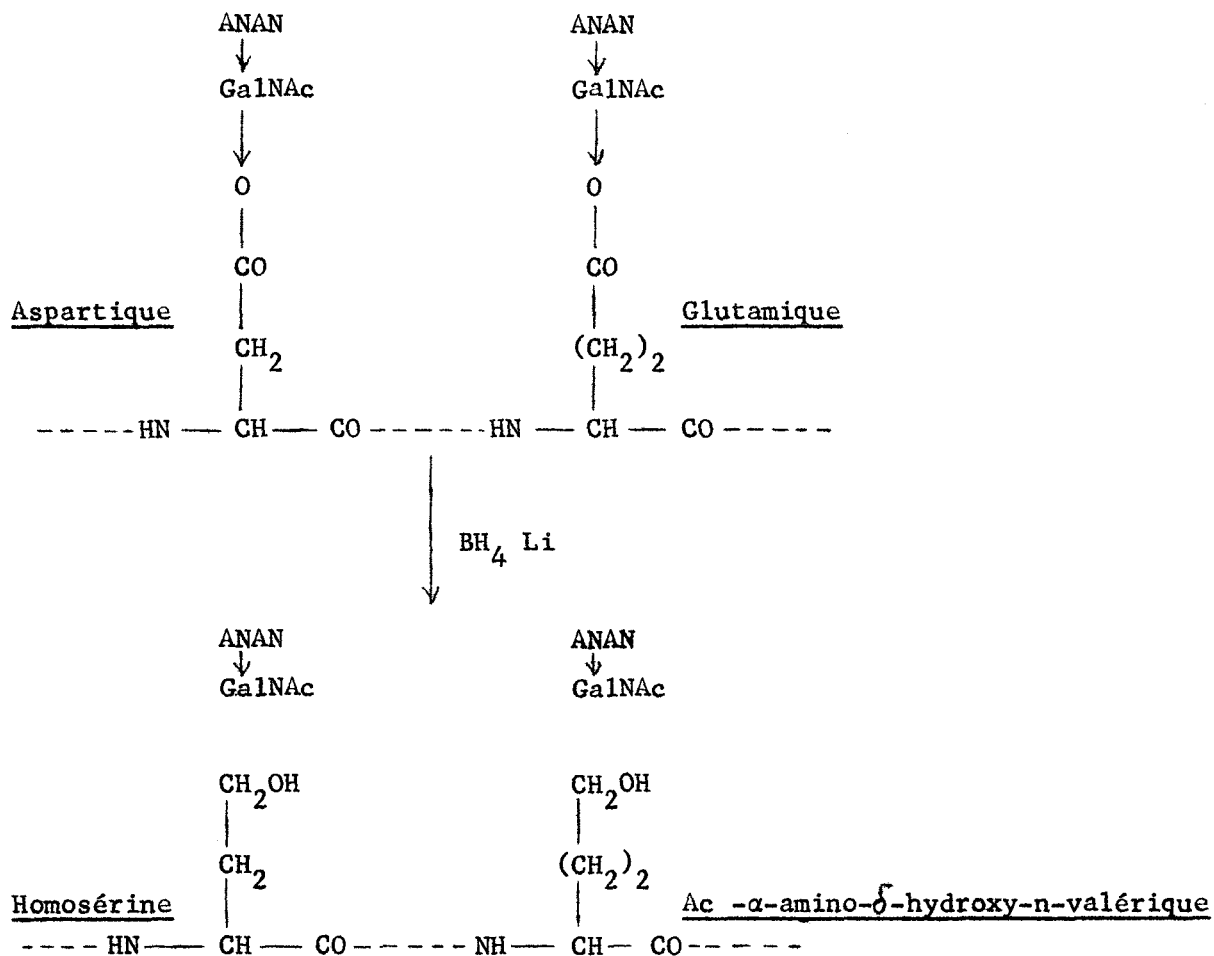
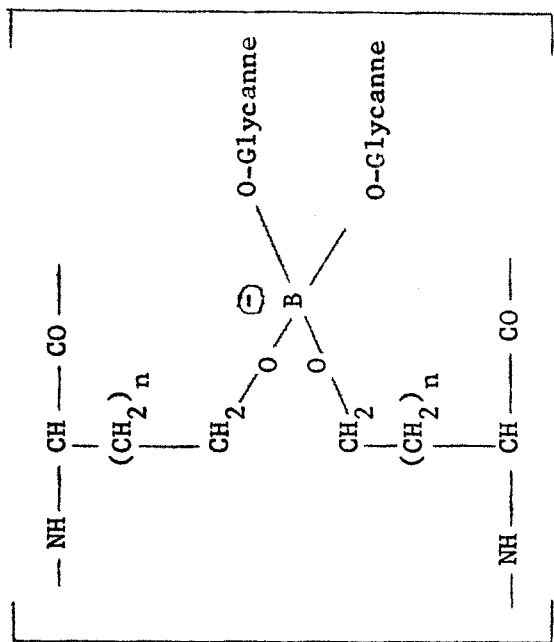


Figure 11

Action du borohydruure de lithium sur les mucines sous-maxillaires du Mouton et du Boeuf. Mise en évidence de liaison "esters glycosidiques" de la N-acétylgalactosamine et des acides aspartique et glutamique. (GOTTSCHALK (150) ; GOTTSCHALK et MURPHY (151)).



Li⁺

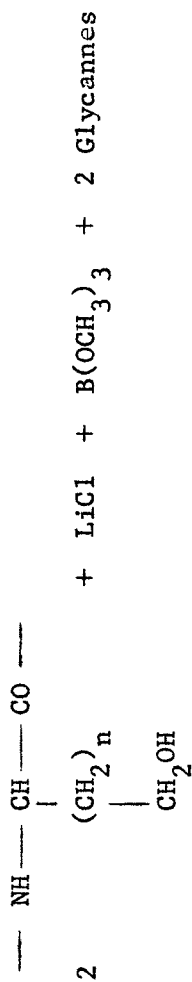
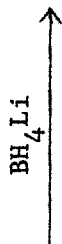
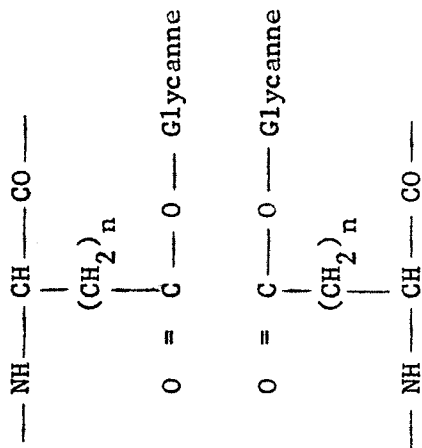


Figure 12

Mécanisme de la réduction des acides aspartique (n=1) et glutamique (n=2) conjugués par une liaison "esters glycosidiques" (d'après GOTTSCHALK (152) et GOTTSCHALK et MURPHY (153)).

B - Rupture des liaisons esters
par les solutions alcalines.

La rupture des liaisons esters peut être réalisée 1°) par hydrolyse alcaline, 2°) par hydroxylaminolyse.

1° - Hydrolyse alcaline

L'hydrolyse des liaisons glucide-protide de type ester est effectuée, grâce à leur grande labilité, dans des conditions relativement douces :

- NaOH 0,1 N ou 0,2 N, à 100°C, pendant 5 mn
0,01 N, à 80°C, pendant 4 h
0,05 N, à 100°C, pendant 0,5 h
- Ba(OH)₂ 0,01 N ou à pH 11,5 à 80°C pendant 15 mn
- Li OH 0,18 N à 100°C pendant 40 mn
- CO₃Na₂ 0,04 N à 100°C pendant 20 mn.

La réaction est du premier ordre. Selon GOTTSCHALK, ses constantes seraient les suivantes, dans le cas des mucines sous-maxillaires :

- avec NaOH 0,1 N à 100°C $k = 2,37 \times 10^{-1} \text{ mn}^{-1}$
- avec NaOH 0,2 N à 100°C $k = 4,9 \times 10^{-1} \text{ mn}^{-1}$

L'hydrolyse alcaline des liaisons esters des glycoprotides s'accompagne de la destruction de l'ose terminal réducteur. C'est pourquoi, elle doit être réalisée en milieu réducteur (BH₄Na). On peut ainsi déterminer la nature de l'ose engagé dans la liaison puisqu'il est, au fur et à mesure de l'hydrolyse, transformé en un polyol dont l'identification est aisée.

L'application de ce procédé a permis de mettre en évidence des liaisons esters de l'acide aspartique et de l'acide glutamique dans les mucines sous-maxillaires (GOTTSCHALK (154) ; GOTTSCHALK et MURPHY (155) ; GOTTSCHALK, MURPHY et GRAHAM (156) ; GRAHAM, MURPHY et GOTTSCHALK (157)), de la cystine dans l'ovomucoïde (MONTREUIL, BISERTE et GHOSSON) (158),

de polyribitol-phosphates (ou de polyglycérol-phosphates) et d'acides aminés dans les acides teichoïques. En outre, selon GIBBONS et ROBERTS (159), des liaisons esters existeraient dans le mucus cervical de la Vache, mais les auteurs n'ont pas précisé la nature de ces dernières.

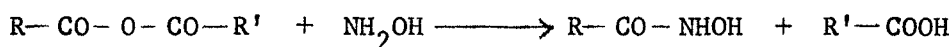
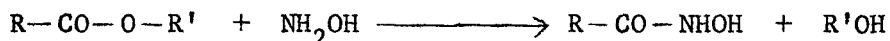
Spécificité de la réaction. Nous verrons plus loin (p. 29) que les solutions alcalines sont capables, dans certaines conditions, de rompre des liaisons O-glycosidiques des β -hydroxy-amino-acides. Toutefois, la vitesse de la réaction de lyse de ces dernières est environ 200 fois inférieure à celle des liaisons esters (GRAHAM, MURPHY et GOTTSCHALK) (160) :

$$\text{avec Na OH } 0,1 \text{ N à } 100^{\circ}\text{C} \quad k = 1,89 \times 10^{-3} \text{ mn}^{-1}$$

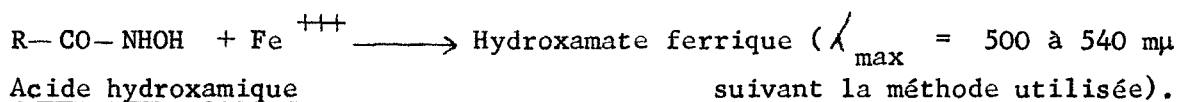
La détermination des constantes des réactions de lyse alcaline des glycoprotides est donc nécessaire. Elle apporte, en effet, des renseignements précieux sur la nature des liaisons alcali-labiles présentes dans les composés et met à l'abri de toute cause d'erreur d'interprétation.

2° - Hydroxylaminolyse (+)

Le principe de la méthode est fondé sur la propriété que possèdent les dérivés des acides organiques (esters et anhydrides) de réagir avec l'hydroxylamine en donnant des acides hydroxamiques que l'on dose sous la forme de complexes ferriques. Le mécanisme des réactions est précisé dans les schémas suivants :



puis



(+) On trouvera une excellente revue générale de la question dans la thèse de S. HARBON (161).

Le protocole expérimental peut se résumer de la manière suivante :

1 - Les glycoprotides sont traités par une solution d'hydroxylamine à des températures variant de 20 à 100°C pendant des temps allant de 5 mn à 35 h :

- Hydroxylamine 1,6 M ; pH 12,8 ; à 20 - 50 ou 80°C ; pendant quelques minutes à plusieurs heures (HARBON (162) ; HARBON, HERMAN-BOUSSIER et CLAUSER (163) ; HERMAN-BOUSSIER, HARBON et CLAUSER (164)).
- Hydroxylamine 4 M ; pH 12,2 ; à 37°C (GOTTSCHALK et MURPHY (165) ; GRAHAM et GOTTSCHALK (166) ; GOTTSCHALK, MURPHY et GRAHAM (167)).
- Hydroxylamine 1 M ; pH 12 ; à 37°C ; pendant 7 h (ADAMS) (168).
- Hydroxylamine pH 8 ; 20°C (BLIX) (169).
- Hydroxylamine 2 M ; pH 11 - 11,2 ; pendant 5,5 à 35 h (KAVERZNEVA et LAPUK) (170).

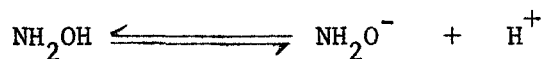
La réaction est arrêtée par l'addition d'acide chlorhydrique.

2 - Les hydroxamates formés sont dosés sous la forme de complexes ferriques par les procédés de HESTRIN (171) ou de SCHWEET (172). Ils peuvent être identifiés, après purification sur échangeurs d'ions, par chromatographie sur papier (HARBON) (173).

Spécificité de la réaction. L'action de l'hydroxylamine ne semble pas se porter spécifiquement sur les liaisons esters. BERGMAN (174), GALLOP et al. (175) ont démontré que certaines liaisons amides et peptidiques étaient coupées et que la réaction s'accompagnait de la formation d'hydroxamates.

En outre, l'hydroxylamine coupe certaines liaisons O-glycosidiques, comme celles de la sérine et de la thréonine, par un mécanisme de "β-élimination" identique à celui que nous invoquerons plus loin pour expliquer l'action des solutions alcalines sur ces liaisons (voir p.29). Selon HARBON, HERMAN-BOUSSIER et CLAUSER (176), la coupure de ces liaisons serait réalisée plus par la soude présente dans le milieu réactionnel que

par l'hydroxylamine. Cependant, pour GRAHAM, MURPHY et GOTTSCHALK (177), ce phénomène s'expliquerait par une "activation" de l'hydroxylamine par la soude qui déplacerait vers la droite l'équilibre de dissociation :



$$k = 2,3 \cdot 10^{-3} \text{ mn}^{-1} \quad \text{avec l'hydroxylamine à pH 12,2.}$$

$$k = 0,6 \cdot 10^{-3} \text{ mn}^{-1} \quad \text{avec la soude à pH 12,2.}$$

Toutefois, quel que soit le mécanisme de l'action de l'hydroxylamine en milieu alcalin, la réaction d'hydroxylaminolyse des liaisons esters est plusieurs centaines de fois plus rapide que celle des liaisons O-glycosidiques et l'on évitera, là encore, toute erreur d'interprétation en effectuant l'hydroxylaminolyse à pH et à force ionique constants de manière à déterminer les constantes de vitesse des réactions (HARBON, HERMAN-BOUSSIER et CLAUSER) (178).

C - Rupture des liaisons O-glycosidiques par les solutions alcalines

Depuis les travaux de MEYER et de RODEN sur les acides chondroïtine-sulfuriques, d'une part (voir p. 11), de GOTTSCHALK et coll. et de FIGMAN et coll. sur les mucines sous-maxillaires ovine et bovine, d'autre part (voir p. 8), on sait qu'il existe, dans ces glycoprotéines, des liaisons O-séryl et O-thréonyl-glycosidiques qui sont très labiles en milieu alcalin et dont l'hydrolyse s'accompagne d'une modification structurale du β -hydroxy-amino-acide engagé dans la liaison par un mécanisme dit de " β -élimination".

Les conditions d'action des solutions alcalines varient suivant les auteurs :

- NaOH 0,5 N, à 2°C, pendant 7 à 20 h (ANDERSON, HOFFMAN et MEYER) (179, 180) ; (ANDERSON, SENO, SAMPSON, RILEY, HOFFMAN et MEYER) (181) ;

- NaOH 0,5 N, à 0°C, pendant 68 h (BHAVANADAN, BUDECKE, CARUBELLI et GOTTSCHALK) (182) ; (CARUBELLI, BHAVANANDAN et GOTTSCHALK) (183) ; (BEST, BHAVANANDAN et GOTTSCHALK) (184) ;

- KOH 0,45 N à 20°C, pendant 20 h (ANDERSON, SENO, SAMPSON, RILEY, HOFFMAN et MEYER) (185) ;

- solutions alcalines de pH 12,8, et de force ionique 1,6 à 70°C, pendant 45 mn (HARBON, HERMAN, ROSSIGNOL, JOLLES et CLAUSER) (186).

Le meilleur procédé consiste à effectuer des hydrolyses cinétiques qui sont prolongées jusqu'à ce que le taux de destruction des β -hydroxy-amino-acides reste constant ; NaOH 0,1 N, à 5°C, pendant des temps variant de 1 à 10 jours (TANAKA, BERTOLINI et PIGMAN) (187) ou NaOH 0,1 N, à 20°C, pendant des temps variant généralement de 1 à 6 jours (Procédé appliqué au laboratoire).

1° - RESULTAT DE LA " β -ELIMINATION"

Comme le mécanisme intime de la " β -élimination" n'était pas connu au moment où nous avons entrepris nos travaux et que, d'autre part, nous l'avons nous-même élucidé, nous le décrirons en détail dans la partie de notre mémoire réservée à nos travaux personnels (voir p.104). Nous nous bornerons donc à préciser, pour l'instant, que la soude provoque la rupture des liaisons O-glycosidiques des β -hydroxy-amino-acides. Les glycanes sont libérés et les β -hydroxy-amino-acides sont transformés en "déhydro-amino-acides" par l'élimination "interne" d'une molécule d'eau dont la formation fait intervenir leur fonction " β -hydroxyle".

Dans le cas des O-glycosides de la sérine et de la thréonine conjuguées dans des chaînes peptidiques, on voit que l'action des alcalis détache la fraction glucidique et transforme la sérine en acide 2-amino-2-propénoïque (ou "déhydro-alanine" ou acide α -amino-acrylique) et la thréonine en acide 2-amino-2-buténoïque (Fig. 13 ; p. 31) qui restent conjugués au sein de la chaîne peptidique.

L'étude de l'action des alcalis sur les glycoprotéines pose donc deux problèmes : 1) celui de l'isolement et de l'étude de la structure du glycanne libéré qui permettra d'identifier l'ose engagé dans la liaison O-glycosidique ; 2) celui de l'identification et du dosage des "déhydro-amino-acides".

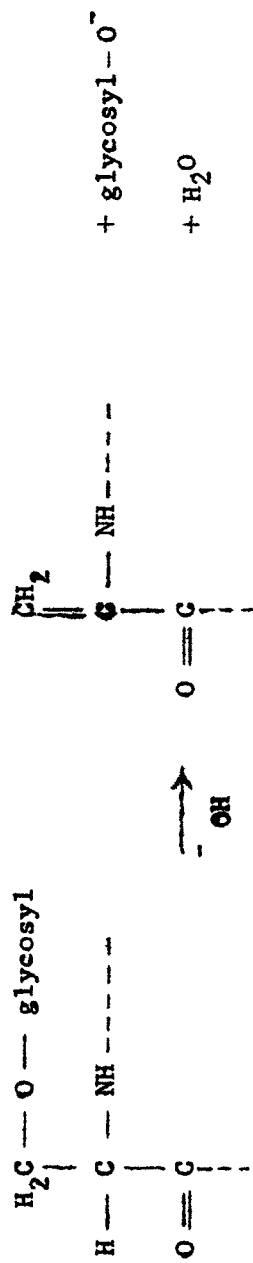
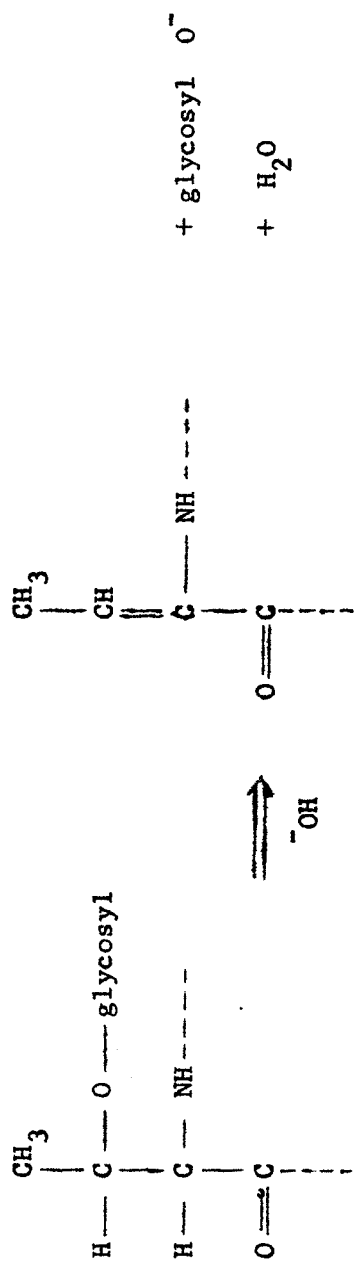
O-séryl-glycosideAcide 2-amino-2-propénoïque conjuguéO-thréonyl-glycosideAcide 2-amino-2-buténoïque conjugué

Figure 13

Rupture par " β -élimination" des liaisons O-séryl et O-thréonylglycosidiques d'un glycoprotide.

2° - ETUDE DES GLYCANNES DETACHES PAR LA "β-ELIMINATION"

L'isolement des glycanes libérés par l'action des alcalis est un problème particulier à chaque glycoprotéide et nous nous limiterons à exposer le principe des techniques qui ont été appliquées à une glycoprotéine (la mucine sous-maxillaire) et à des glycopeptides de la lactotransferrine.

Dans le cas de l'action des solutions alcalines sur des glycoprotéines natives, la disproportion entre les masses moléculaires des glycanes libérés et de la protéine est telle que le problème de l'isolement des fractions glucidiques peut être facilement résolu par la dialyse ou par la chromatographie sur gels de Sephadex. En appliquant ces procédés, GOTT-SCHALK, MURPHY et GRAHAM (188) sont parvenus à isoler les unités diholosidiques détachées par la soude de la mucine sous-maxillaire ovine.

Dans le cas des glycopeptides, la question se complique du fait que les glycanes libérés par les alcalis possèdent des masses moléculaires voisines de celles des glycopeptides restés intacts. Cette particularité exclut l'emploi de la dialyse et de la chromatographie de filtration sur gel. On peut alors tirer parti des différences de charges portées par les glycanes et par les glycopeptides et appliquer des procédés électrophorétiques. SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (189) ont pu, de cette manière, séparer le glycanne "neutre", détaché par l'action de la soude sur les glycopeptides de la lactotransferrine, des glycopeptides stables de caractère cationique, à pH acide (voir p. 182).

L'application, aux glycanes ainsi isolés, des procédés classiques de détermination des oses en position réductrice terminale, -l'identification du polyol provenant de la réduction de ce dernier, en particulier, permet d'identifier les oses impliqués dans des liaisons O-glycosidiques avec la protéine.

En général, l'action des solutions alcalines est effectuée en milieu réducteur de manière à ce que la rupture de la liaison glycanne-protéide s'accompagne de la réduction de la fonction semi-acétalique de l'ose

conjugué. Ce dernier est donc, à la fois, "stabilisé" vis-à-vis de l'alcali et désigné, par la modification qu'il a subie, comme le glucide engagé dans la liaison avec la protéine.

Les conditions dans lesquelles est effectuée la rupture réductrice des O-glycosyl-protides varient avec les auteurs. Elles sont celles qui ont été précisées à la page 29, à la différence près que du borohydrure de sodium ou de potassium est ajouté à la solution alcaline à une concentration environ 0,3 M. Par exemple, TANAKA, BERTOLINI et PIGMAN (190) réalisent la rupture réductrice de la mucine sous-maxillaire bovine avec une solution 0,1 N en soude et 0,3 M en borohydrure de sodium, à 5°C, pendant des temps échelonnés de 24 à 216 h (voir la figure 14 ; p. 34).

3° - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES "DEHYDRO-AMINO-ACIDES"

L'instabilité des acides 2-amino-2-propénoïque et 2-amino-2-buténoïque ne permet pas de les caractériser dans les hydrolysats chlorhydriques des glycoprotides préalablement traités par la soude. En effet, dans les conditions d'hydrolyse des protides conjugués (HCl 5,6 N, à 105°C, pendant 24 à 72 h), ils sont désaminés oxydativement et se transforment en acides α -acétoniques (BERGMANN et GRAFE (191) ; CLARKE et INOUE (192) ; RILEY, TURNBULL et WILSON (193) ; PATCHORNIK et SOKOLOVSKY (194, 195)) : acide pyruvique ($\text{CH}_3\text{-CO-COOH}$), dans le cas de la "déhydro-alanine", acide α -céto-butyrique ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CO-COOH}$), dans le cas de l'acide-2-amino-2-buténoïque. Les déhydro-amino-acides présents dans les chaînes peptidiques seront donc identifiés par des procédés "indirects".

a - Mesures dans l'ultra-violet

La formation de déhydro-amino-acides au sein de la molécule protéique s'accompagne d'une augmentation de l'absorbance des solutions réactionnelles à 240 - 241 m μ (MECHAM et OLCOTT) (196) due aux déhydro-amino-acides qui possèdent une absorbance élevée et spécifique à cette longueur d'onde (coefficient d'extinction molaire : 5.300) (CARUBELLI, BHAVANANDAN et GOTTSCHALK) (197). On peut donc aisément suivre le développement de la réaction d'hydrolyse. Toutefois, notre expérience personnelle nous permet

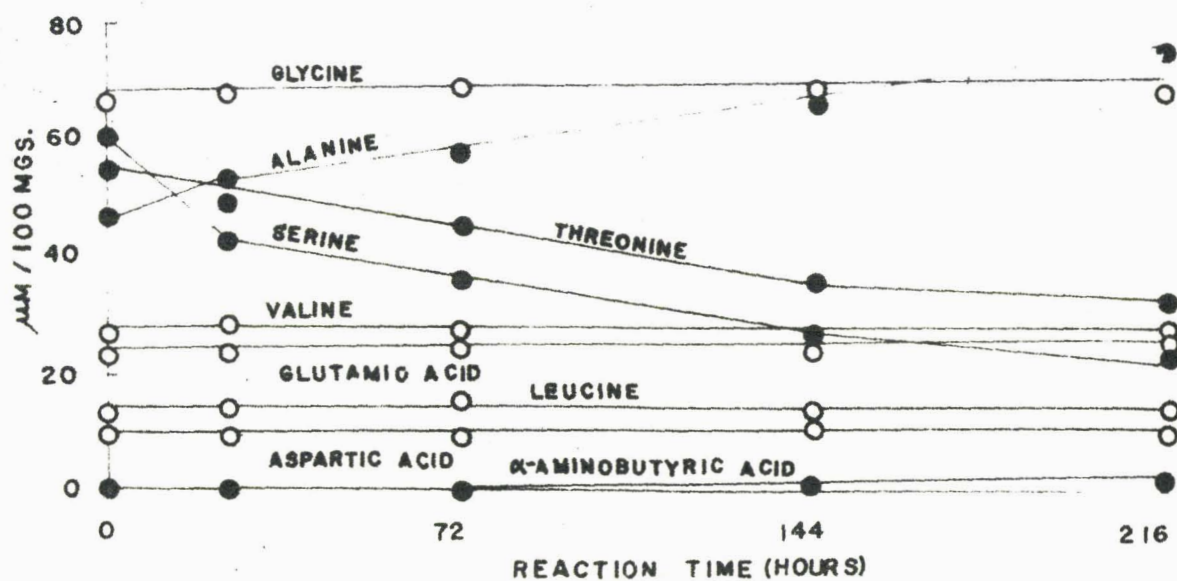


Figure 14

Modification de la teneur (en μM p.100 mg) en sérine et en thréonine, d'une part, en alanine et en acide α -aminobutyrique, d'autre part, de la mucine sous-maxillaire bovine traitée par la soude 0,1 N en présence de borohydrure de sodium 0,3 M (d'après TANAKA, BERTOLINI et PIGMAN) (198).

d'émettre de sérieuses réserves sur la valeur de ce procédé dont l'application doit se limiter, d'une part, à l'étude de glycopeptides et non à celle de glycoprotéines qui, en milieu basique, interfèrent dans une large mesure dans l'absorption de l'ultra-violet et, d'autre part, à l'observation de l'évolution de la réaction, en excluant toute prétention de dosage.

b - Hydrolyse directe des "déhydro-protides"

Après l'action des solutions alcalines, les produits de la réaction sont purifiés sur des échangeurs d'ions ou fractionnés de manière à isoler, d'une part, les fractions glycaniques libérées et, d'autre part, la fraction protidique. Celle-ci est hydrolysée dans les conditions classiques (HCl 5,6 N ; à 100-105°C ; pendant 24 à 72 h) et les acides aminés sont dosés généralement par chromatographie automatique sur colonne, à l'aide d' "Auto-Analyseurs". On compare ensuite la composition en amino-acides des protides natifs et des protides modifiés et la diminution du taux des hydroxy-amino-acides apporte un sérieux argument à l'existence de liaisons O-glycosidiques engageant ces derniers. La figure 14 (p. 34) est à cet égard très démonstrative : elle montre, en fonction du temps d'action de la soude sur la mucine sous-maxillaire bovine, la ~~diminution~~ **de la sérine et de la thréonine.**

Toutefois, la plus grande prudence devra être observée dans l'interprétation des résultats. En effet, les rares travaux qui ont été effectués jusqu'à présent sur la spécificité de l'action des solutions alcalines sur les hydroxy-amino-acides conjugués montrent que ceux-ci subissent une destruction partielle, même quand leur groupement hydroxylé n'est pas substitué. BHAVANANDAN, BUDECKE, CARUBELLI et GOTTSCHALK (199) ont montré que l'action de la soude 1 N, à 0°C, pendant 68 h, sur la séryl-glycyl-glycinamide et sur la séryl-leucyl-leucine s'accompagnait de la perte de 10 p.100 de sérine. HARBON, HERMAN, ROSSIGNOL, JOLLES et CLAUSER (200) sont parvenus à la même conclusion à propos du lysozyme dont 15 p.100 de la sérine et de la thréonine sont détruits à pH 12,8 (force ionique 1,6 ; à 70°C ; pendant 45 mn).

Identification des acides α -cétoniques formés au cours de l'hydrolyse

L'identification des acides α -cétoniques formés au cours de l'hydrolyse de déhydro-protides apporte une confirmation à la présence de déhydro-amino-acides.

ADAMS (201, 202) HARBON (203) et HARBON, HERMAN et CLAUSER (204) ont adapté aux "déhydro-protides" (+) le procédé de PATCHORNIK et SOKOLOVSKY (205, 206) appliqué par ces auteurs à des composés de synthèse. Ils réalisent l'hydrolyse des déhydro-protides par l'acide chlorhydrique 2,5 à 4 N, en présence d'o-phénylène-diamine, à 110°C, pendant 18 h environ et identifient par chromatographie sur papier ou sur couche mince les quinoxalins (Fig. 15 ; p. 37) extraits par le chloroforme ou par l'acétate d'éthyle.

ADAMS (207) a décrit un deuxième procédé dans lequel l'hydrolyse est effectuée par l'acide sulfurique 3 N en présence de 2,4-dinitrophénylhydrazine. Les acides α -cétoniques sont identifiés par chromatographie sur papier sous la forme de 2,4-dinitrophénylhydrazones.

Nos recherches personnelles sur la question ont montré que le procédé n'était applicable que dans la mesure où les glucides sont en faible proportion dans les milieux réactionnels car ils interfèrent dans la réaction avec l'o-phénylène-diamine ou la 2,4-dinitrophénylhydrazine. Quand la concentration en glucides est élevée, il est indispensable de les séparer des déhydro-protides avant d'effectuer l'hydrolyse de ces derniers en présence d'o-phénylène-diamine ou de 2,4-dinitrophénylhydrazine (voir le chapitre des travaux personnels ; p.187).

c - Hydrolyse des "déhydro-protides" préalablement modifiés

La stabilisation des déhydro-amino-acides peut être réalisée, avant d'effectuer l'hydrolyse chlorhydrique, par réduction ou par addition

(+) Nous appelons "déhydro-protides" la fraction protidique d'une glycoprotéine qui a été dissociée par " β -élimination" en milieu alcalin.

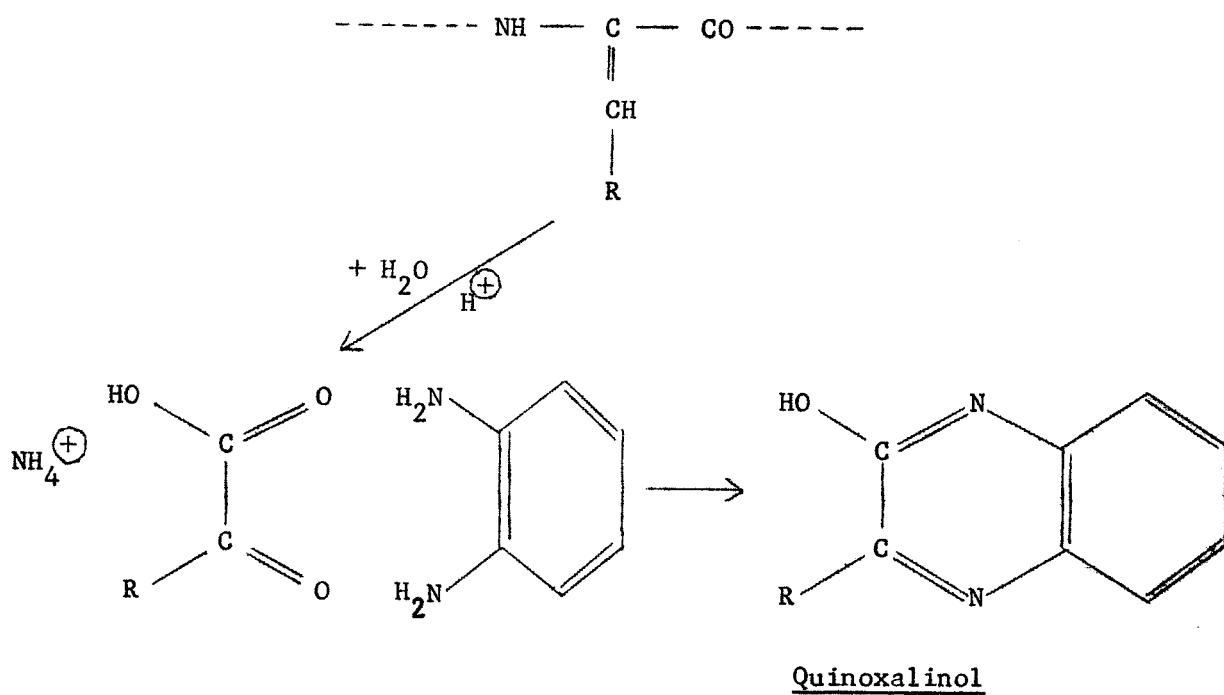


Figure 15

Formation de quinoxalins par action de l'o-phénylène-diamine sur des acides α -cétoniques produits par l'hydrolyse acide des "déhydro-protides".

d'acide sulfureux ou de thioacétate de sodium. Le premier procédé est applicable à tous les déhydro-amino-acides conjugués ; le second est limité à la déhydro-alanine. Les schémas des réactions sont précisés dans la figure 16 (p. 39).

α - Réduction des "déhydro-protides" conjugués

Les acides 2-amino-2-propénoïque et 2-amino-2-buténoïque conjugués dans des chaînes peptidiques peuvent être réduits, respectivement, en alanine et en acide α -amino-butyrique, avant l'hydrolyse chlorhydrique des protides. Différents procédés de réduction ont été proposés :

1) réduction par le borohydrure de sodium ou de potassium ajouté aux solutions alcalines (voir p.33).

2) réduction par le borohydrure effectuée dans les conditions décrites à la p. 33, suivie d'une seconde réduction de la solution réactionnelle par un mélange de borohydrure de sodium et de chlorure de palladium, effectuée à 27-28°C pendant 1 heure (TANAKA et PIGMAN) (208).

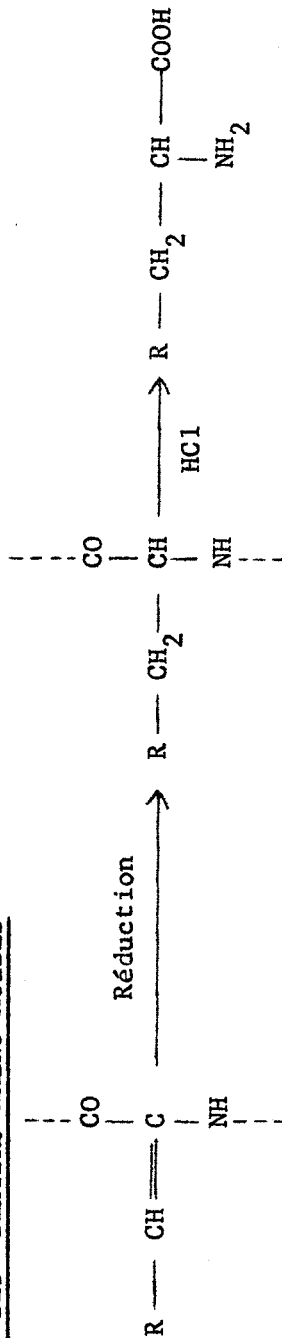
3) hydrogénation catalytique en présence de platine adsorbé sur charbon de la fraction adialysable des glycoprotides préalablement traités par la soude diluée (ANDERSON, SENO, SAMPSON, RILEY, HOFFMAN et MEYER) (209).

4) hydrogénation, en présence du catalyseur d'ADAMS (210) à l'oxyde de platine, réalisée au cours de l'action même des solutions alcalines (ANDERSON, SENO, SAMPSON, RILEY, HOFFMAN et MEYER) (211).

Dans tous les cas, la réduction est incomplète et porte, en outre, essentiellement sur la "déhydro-alanine" (voir Fig. 14 ; p. 34) vraisemblablement à cause de la protection de la double liaison par le radical méthyle de l'acide 2-amino-2-buténoïque. Nous avons obtenu les meilleurs résultats avec le procédé de réduction de TANAKA et PIGMAN (212) (réduction de 80 p. 100 de la "déhydro-alanine" et de 30 à 40 p.100 de l'acide 2-amino-2-buténoïque (+)). C'est pourquoi nous nous sommes attaché à mettre au point

(+) 80 à 85 p.100 d'après TANAKA et PIGMAN (213).

REDUCTION DES "DEHYDRO-AMINO-ACIDES"



ADDITION DE L'ACIDE SULFUREUX ET DU THIOACETATE DE SODIUM SUR LA "DEHYDRO-ALANINE" CONJUGUEE

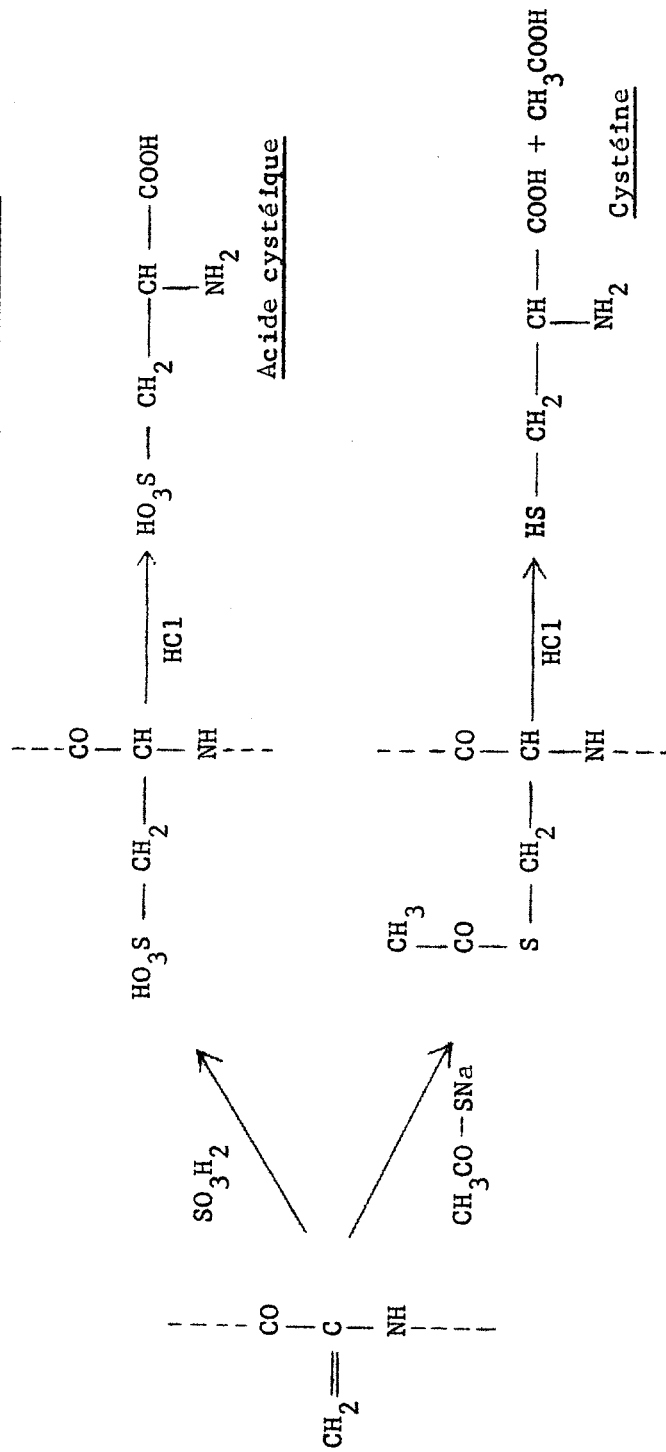


Figure 16

La modification des déhydro-amino-acides conjugués dans les déhydro-protides avant l'hydrolyse chlorhydrique de ces derniers.

un procédé de réduction plus efficace. Nous y sommes parvenu en utilisant le sodium et l'ammoniac (voir ~~le chapitre des travaux personnels~~ ; p.211).

β - Addition d'acide sulfureux sur la déhydro-alanine conjuguée

HARBON, HERMAN, ROSSIGNOL, JOLLES et CLAUSER (214) effectuent l'hydrolyse alcaline des liaisons O-glycosidiques à pH 9 pendant 24 h en présence de sulfite de sodium 0,1 M. Ce substituant nucléophile se fixe sur la double liaison de la déhydro-alanine conjuguée. Celle-ci est transformée en acide cystéique (Fig. 16 ; p. 39) qui est ensuite aisément identifié et dosé dans les hydrolysats chlorhydriques. L'acide 2-amino-2-buténoïque ne donne pas lieu à la formation d'un dérivé sulfoné, probablement par un empêchement stérique dû à la présence du radical méthyle au voisinage de la double liaison.

γ - Addition de thioacétate de sodium sur la déhydro-alanine conjuguée

L'action des alcalis sur les glycoprotéines en présence de thioacétate de sodium s'accompagne d'une réaction d'addition de ce dernier sur la double liaison de la "déhydro-alanine" conjuguée qui est transformée en S-acétyl-cystéine (Fig. 16 ; p. 39). Celle-ci est libérée par l'hydrolyse chlorhydrique de la protéine sous la forme de cystéine (ZIOUDROU, WILCHEK et PATCHORNIK) (215).

2° - PROCEDES DE DEGRADATION DU TYPE 2

Les dégradations de ce type sont réalisées uniquement par des agents chimiques d'hydrolyse qui attaquent, à la fois, le groupement glycanique et la fraction peptidique. On obtient, de cette manière des oses et des osides mêlés à des acides aminés et à des peptides. Dans certaines conditions d'hydrolyse, on réalise une dégradation poussée du glycanne et du peptide en respectant la liaison glucide-protide et on réussit parfois, ~~principalement dans~~ les cas où l'hydrolyse s'adresse à des glyco-amino-acides, à obtenir un composé formé uniquement de l'ose et de l'acide aminé conjugués.

La dégradation récurrente simultanée du glycanne et du protide est effectuée en milieu acide. Elle fournit deux séries de résultats. Les uns concernent l'exploration de la structure de la fraction glucidique et nous les exposerons très brièvement. Les autres intéressent les modalités de l'attache glucide-protide.

1° - Exploration de la structure du groupement glycanne des glycoprotides

Le problème de la structure du glycanne des glycoprotides sort de nos préoccupations et nous nous limiterons à un très court exposé des méthodes employées et des résultats obtenus.

L'hydrolyse acide ménagée des groupements glycanne est généralement effectuée par des acides dilués (HCl 0,1 à 1 N ou SO_4H_2 0,1 à 2 N), à 100°C, pendant des temps variant de quelques minutes à plusieurs heures. On obtient de cette manière, -mêlés à des produits de la dégradation du protide que l'on élimine, avec l'agent d'hydrolyse, par un passage sur des colonnes d'échangeurs d'ions-, des oses et une faible proportion d'osides. Les acides dilués réalisent donc une dégradation progressive du glycanne en libérant préférentiellement des oses. L'étude de la cinétique de libération de ces derniers au cours de l'hydrolyse apporte donc des renseignements précieux sur les positions relatives des oses dans la molécule glycanne (MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK) (216).

L'hydrolyse ménagée des groupements glycanne par les échangeurs de cations polystyrène-sulfonés fournit principalement des osides. Ce type de dégradation représente donc le procédé de choix pour obtenir des quantités élevées d'osides dont l'isolement et l'étude de la structure sont le prélude à la reconstitution de la molécule glycanne (MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK) (217).

L'hydrolyse par les acides ou par les échangeurs de cations a été largement utilisée par de nombreux auteurs pour explorer la structure du glycanne de divers glycoprotéides : orosomucoïde (EYLAR et JEANLOZ (218) ; JEANLOZ (219) ; JEANLOZ et EYLAR (220) ; SONNET (221) ; WINZLER (222)) ; ovomucoïde (BRAGG et HOUGH (223) ; CHATTERJEE et MONTGOMERY (224) ; MONTREUIL, CHOSSON et SCHEPPLER (225) ; MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (226)) ;

ovalbumine (LEE et MONTGOMERY (227));; fétuine (SPIRO) (228) ; fibrinogène (MESTER, MOCZAR et LAKI) (229) ; haptoglobine (JAYLE) (230) ; glycoprotéine α_2 -Ba du sérum humain (KAMIYAMA et SCHMID) (231).

2° - Exploration du point d'attache glycanne-protide

L'emploi exclusif ou combiné des acides et des résines polystyrène-sulfonées a permis d'obtenir des composés formés uniquement d'un ose et d'un acide aminé dont la connaissance de la structure a permis d'élucider le problème des modalités de l'attache glycanne-protéine dans diverses glycoprotéines.

Dans certains cas, l'hydrolyse a été effectuée sur les glycoprotéines natives. Ce procédé est rarement appliqué car l'isolement de faibles proportions de glyco-amino-acides mêlés à des quantités élevées de produits de dégradation glucidiques et protidiques est singulièrement délicat. Il a toutefois permis à MASAMUNE (232) d'isoler un éther de la sérine et de la N-acétyllactosamine à partir d'une substance de groupe sanguin et à BOGDANOV, KAVERZNEVA ET ANDREJEVA (233) d'obtenir la N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine (voir Fig. 6 ; p. 14) à partir de l'ovalbumine.

En général, l'hydrolyse acide ménagée est appliquée à des glycoprotides dont la fraction peptidique est simple. Les meilleures conditions sont remplies quand un seul acide aminé ou dérivé d'acide aminé est conjugué à la fraction glycanne. Dans ce cas, en effet, la dégradation de cette dernière s'effectue dans des conditions d'hydrolyse qui respectent la liaison ose-acide aminé. Une technique couramment employée au laboratoire consiste à hydrolyser par l'acide chlorhydrique 1,5 N, à 100°C, pendant 1,5 h, les glyco-amino-acides obtenus par dégradations protéinasiqes des glycoprotéines ou les PTH-dérivés de glyco-amino-acides obtenus par le procédé de dégradation récurrente d'EDMAN appliqué à des glycopeptides (voir p.143). Dans le premier cas, on obtient l'ose attaché à l'acide aminé et, dans le second cas, l'ose attaché au PTH-dérivé de l'acide aminé. Nous avons largement appliqué à l'étude de la liaison glycanne-protéine de nombreuses glycoprotéines. Les protocoles expérimentaux que nous avons appliqués et les résultats que nous avons obtenus sont décrits dans le chapitre réservé à nos travaux personnels (voir p. 156).

3° - PROCEDES DE DEGRADATION DU TYPE 3

La fraction glycanique peut être dégradée par voie enzymatique ou par voie chimique.

A - PROCEDES DE DEGRADATION ENZYMATIQUE

Ces procédés mettent en oeuvre des osidases spécifiques. Ils ont reçu, jusqu'à présent, peu d'applications en raison des imperfections des méthodes d'hydrolyse enzymatique dues, en particulier, au défaut de préparation d'enzymes, comme les galactosidases, mannosidases, fucosidases, N-acétylosaminidases, capables d'hydrolyser en totalité les glycannes.

Dans ce type de dégradation, il convient de ranger la méthode de BARKER, PARDOE, STACEY et HOPTON (234) fondé sur l'hydrolyse récurrente du glycanne par des enzymes adaptatifs excrétés par Rhodopseudomonas palustris n° 3574, au fur et à mesure de l'apparition de nouveaux types de liaisons osidiques. On voit ainsi se libérer successivement, à partir de l'orosomucoïde par exemple, en fonction de leur position dans la molécule, l'acide N-acétylneuraminique, le fucose, le galactose, la N-acétylglucosamine. Le procédé ne permet toutefois pas d'accéder au dernier ose de la chaîne glycanique conjugué au protide.

L'utilisation du lysozyme se place dans cette catégorie d'hydrolyse. Appliquée à l'étude de glycopeptides de parois de bactéries comme Micrococcus lysodeikticus (GHUYSEN et SALTON (235) ; SALTON et GHUYSEN (236)), elle a conduit, d'une part, à l'isolement de l'unité diholosidique de répétition (N-acétyl-glucosaminido-1,6-acide N-acétylmuramique) et, d'autre part, à un glycopeptide formé d'une unité diholosidique unie par une fonction amide, que clive une amidase spécifique (voir Fig. 8 ; p. 20), jetée entre l'acide N-acétylmuramique et l'alanine en position N-terminale dans la chaîne peptidique.

Nous pouvons encore citer, pour l'exemple, la dégradation par une neuraminidase des unités diholosidiques des glycopeptides obtenus par action de la pronase sur la mucine sous-maxillaire ovine qui conduit à la formation

de β -N-acétylgalactosaminido-peptides (voir p.21) et du DNP-glycopeptide de l'ovalbumine par l'émulsine qui a permis à LEE, WU et MONTGOMERY (237) d'isoler la N-(β -DNP-aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine.

B - PROCEDES DE DEGRADATION CHIMIQUE

1° - Hydrolyse acide du glycanne

Les procédés classiques d'hydrolyse acide des osides (acides chlorhydrique ou sulfurique 1 ou 2 N, pendant des temps variant de 1 à 2 h, par exemple) sont parfaitement applicables à la dégradation complète des glycanes conjugués à la condition évidente que la liaison de l'ose et du protide soit relativement stable. Leur utilisation est particulièrement précieuse dans le cas de glyco-amino-acides car on obtient alors, comme nous l'avons vu plus haut (voir p.42), l'ose conjugué à un acide aminé. Dans le cas de glyco-oligopeptides, on réalise d'abord la dégradation récurrente de la chaîne oligo-peptidique, soit par voie enzymatique à l'aide d'exopeptidase et l'on parvient alors à un glyco-amino-acide, soit par voie chimique en appliquant par exemple, la méthode d'EDMAN dont le produit final de réaction est le PTH-dérivé d'un glyco-amino-acide (voir p.143).

Par ce procédé, la β -(N-aspartyl)-glucosaminylamine native ou sous la forme de DNP- ou de PTH-dérivés a été identifiée dans les produits de l'hydrolyse acide des glycoprotides obtenus par hydrolyse protéinasique des glycoprotéines suivantes :

- orosomucoïde : hydrolyse par HCl 2 N ; à 100°C ; pendant 20 mn de l'aspartyl-glycanne (YAMASHINA, MAKINO, BAN-I et KOJIMA) (238) ;

- ovalbumine : -hydrolyse de l'aspartyl-glycanne par HCl 2 N ; à 100°C ; pendant 20 mn (YAMASHINA, BAN-I et MAKINO) (239), pendant 25 mn (TSUKAMOTO, YAMAMOTO et MIYASHITA) (240) ou pendant 12 mn (FLETCHER, MARSHALL et NEUBERGER (241) ; MARSHALL et NEUBERGER (242)).

-hydrolyse de l'aspartyl-glycanne par SO_4H_2 2 N, à 100°C, pendant 20 mn (BOGDANOV, KAVERZNEVA et ANDREJEVA) (243).

-hydrolyse du DNP-aspartyl-glycane par HCl 0,1 N, à 100°C, pendant 3 h et identification de la N-(β -DNP-aspartyl)-glucosaminylamine (LEE et MONTGOMERY (244) ; MONTGOMERY, LEE et WU (245)).

- ovomucoïde : hydrolyse par SO_4H_2 2 N, à 100°C, pendant 20 mn du DNP-aspartyl-glycane et identification d'un composé formé de glucosamine et de l'acide DNP-aspartique (TANAKA) (246).

Au laboratoire, nous avons, les premiers, démontré sans ambiguïté l'existence de liaisons N-(β -aspartyl)-glucosaminylamine en caractérisant ce composé ou son PTH-dérivé parmi les produits de l'hydrolyse par HCl 1,5 N, à 100°C, pendant 1,5 h des aspartyl-glycannes ou des PTH-aspartyl-glycannes ou des PTH-aspartylglycannes obtenus à partir des hydrolysats pronasiques des glycoprotéines suivantes : transferrine, lactotransferrine, ovomucoïde, globulines γG des sérums humain et bovin, globulines γG du colostrum de Vache, globulines γA du lait de Femme (voir p. 3 et le chapitre des travaux personnels, p.154 et p.167).

2° - Dégradation récurrente de SMITH

GOLDSTEIN, HAY, LEWIS et SMITH (247) ont décrit un procédé de dégradation récurrente de la fraction glycannique des glycoprotides dont le principe du mode opératoire, illustré par la figure 17 (p. 46) est le suivant : la fraction glucidique est d'abord oxydée par l'acide periodique qui transforme les oses conjugués porteurs de fonctions α -glycoliques en dialdéhydes ; dans un second temps, les fonctions aldéhydiques sont réduites en fonctions alcooliques par le borohydrure de potassium ; dans un troisième temps, le glycoprotide modifié est traité, à 20°C pendant 24 h, par l'acide chlorhydrique 0,1 N qui hydrolyse les liaisons "glycosidiques" labilisées par la transformation des oses en acétals linéaires. Ce mode opératoire est répété le nombre de fois nécessaire pour oxyder, réduire, puis libérer tous les oses, sauf celui qui est lié au protide et qui pourra, de cette manière, être identifié.

Le procédé de dégradation récurrente de SMITH n'est applicable

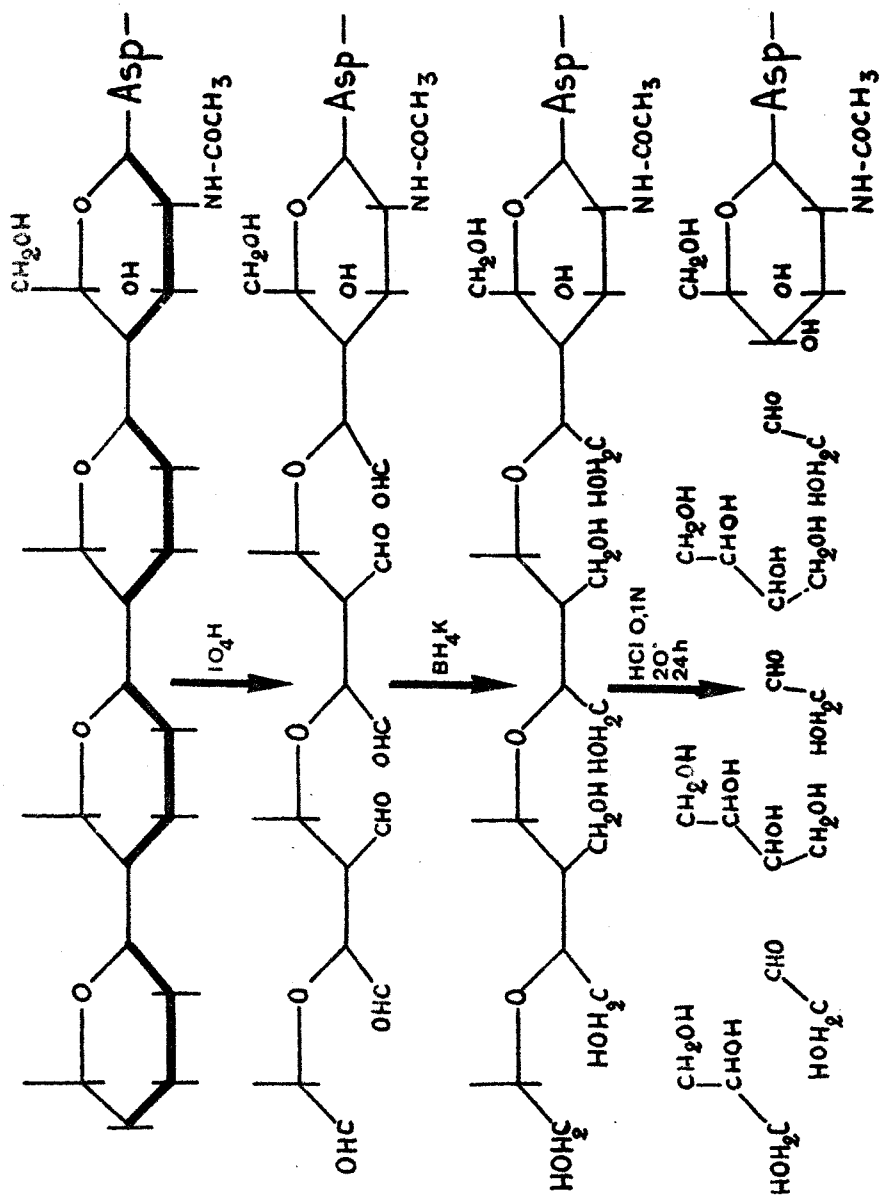


Figure 17

Dégradation récurrente des polyisopides par
le procédé de SMITH.

qu'aux glycoprotides dont la fonction réductrice de l'ose pénultième est conjuguée avec une fonction hydroxyle de l'ose terminal de telle manière que ce dernier ne possède plus de fonction α -glycolique. Cette condition est réalisée par exemple, lorsque l'ose pénultième est conjugué avec l'hydroxyle en 3 ou en 4 d'une N-acétylhexosamine ou avec l'hydroxyle en 3 d'un hexose "neutre".

Ce procédé a été appliqué aux glycopeptides obtenus par dégradation protéasique des glycoprotéines suivantes : globulines γ G humaines (ROTHFUS (248) ; ROTHFUS et SMITH (249)) ; ovomucoïde (CHATTERJEE et MONTGOMERY) (250) ; ovalbumine (MONTGOMERY, WU et LEE) (251) ; orosomucoïde (JEANLOZ) (Communication personnelle). Les résultats n'ont pas apporté de renseignements précis sur la nature du point d'attache glycanne-protide dans ces glycopeptides, car les auteurs ne sont pas parvenus à l'ultime chaînon. Cependant, MAKINO et YAMASHINA (252) ont récemment démontré la valeur de la méthode en isolant par dégradation récurrente de l'aspartyl-glycanne obtenu par hydrolyse protéasique poussée de l'ovalbumine, la N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine. Les auteurs ont précisé les conditions qu'il fallait observer pour parvenir jusqu'à ce composé : utiliser les aspartyl-glycannes ; éviter la "suroxydation" par l'acide periodique ; isoler et purifier les produits de la dégradation après chaque étape. Le rendement est très élevé puisque MAKINO et YAMASHINA ont obtenu 65 p.100 de la quantité théorique de N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine. Les auteurs proposent même ce mode opératoire pour préparer des quantités importantes de ce composé.

IV - PROCEDES DE DEGRADATION DU TYPE 4

1° - Hydrolyse enzymatique

La dégradation de la fraction protéique des glycoprotéines par des protidases diverses est le procédé le plus couramment appliqué pour déterminer la nature de l'acide aminé impliqué dans la liaison glycanne-protéine. L'hydrolyse est d'abord réalisée par des endopeptidases employées seules ou associées : pepsine, trypsine, chymotrypsine, papaïne, nagarse, pronase. Les hydrolysats sont ensuite fractionnés en combinant l'emploi

de la chromatographie sur échangeurs d'ions, la filtration sur gel de dextranses (Sephadex) et l'électrophorèse préparative de zone. On parvient généralement à isoler un ou plusieurs glycoprotides constitués par le glycanne intact conjugué soit à un seul amino-acide, soit à un peptide dont on achève la dégradation jusqu'à l'acide aminé conjugué au glycanne, par hydrolyse récurrente. Celle-ci est réalisée soit par voie enzymatique, avec des exopeptidases (carboxypeptidases A et B, leucine-amino-peptidase, prolinase, prolidase), soit par voie chimique (dégradation d'EDMAN, par exemple).

Dans le second temps, on applique au glyco-amino-acide ou à son dérivé l'une des techniques d'hydrolyse de la fraction glycannique que nous avons décrites dans le paragraphe précédent (voir p. 44) de manière à parvenir à un composé constitué uniquement par l'association d'un ose et d'un acide aminé.

2° - Dégradation chimique

a - Hydrazynolyse. MURPHY (253) a décrit un procédé de dégradation de la fraction peptidique des glycoprotéines par l'hydrazine anhydre (à 100°C, pendant 4 h) qui coupe sélectivement les fonctions peptidiques et respecte les fonctions O-glycosidiques. La méthode a été appliquée à la mucine sous-maxillaire ovine par GRAHAM, MURPHY et GOTTSCHALK (254). Elle a conduit à l'isolement de galactosaminides de la sérine.

b - Hydrolyse alcaline. SPIRO (255) et CUNNINGHAM, FORD et SEGRETT (256) ont tiré parti de la stabilité des liaisons O-hydroxy-lysyl-*oxide* (voir p.104) du collagène pour dégrader très profondément par la soude (0,1 N, à 37°C, pendant 16 h ou 2 N, à 90°C, pendant 10 h) la fraction protéique. Ils ont obtenu, de cette manière, le O-hydroxy-lysyl.

LAMPORT (257) a isolé un O-hydroxy-prolyl-arabinoside parmi les produits de dégradation barytique (baryte 0,43 N ; 90°C ; pendant 8 h) des parois de Lycopersicon esculentum.

| |
|--|
| LE PROBLEME DU POINT D'ATTACHE GLYCANNE-PROTIDE DANS L'OVOMUCOIDE |
|--|

Au moment où nous avons repris les travaux d'ADAM-CHOSSON, le problème de la nature du point d'attache glycanne-protide dans l'ovomucoïde subsistait. Pour le décrire d'une manière précise, tel qu'il se posait en 1964, nous nous proposons de retracer l'évolution qu'ont subie, au Laboratoire, les recherches et les idées sur cette question.

En 1963, MONTREUIL, BISERTE et CHOSSON (258) décrivent l'isolement, par chromatographie sur SE-cellulose, associée à l'électrophorèse préparative sur papier, à partir d'hydrolysats pronasiques d'ovomucoïde, -purifiés sur échangeurs de cations et d'anions et sur Sephadex-, de 3 glycoprotides (glycoprotides α_4 , β et γ) dont la composition est précisée dans le tableau I (p. 50).

Rapidement la structure du composé β devint le problème de structure principal. En effet, les quantités de glycoprotides α_4 et γ dont disposaient les auteurs étaient trop faibles pour qu'ils puissent envisager une étude de structure complète. Toutefois, la nature des acides aminés engagés dans les liaisons glycanne-protide de ces composés fut précisée : acide aspartique dans le glycoprotide α_4 ; acide aspartique et cystéine, liée par une liaison ester très alcali-labile, dans le glycoprotide γ . Mais les modalités même de la conjugaison et la nature des oses engagés dans celle-ci restaient indéterminées.

Dans le cas du glycopeptide β , les résultats étaient ambigus et plusieurs schémas de structure furent successivement proposés par ADAM-CHOSSON et al.

A la suite d'une première série de recherches, MONTREUIL, BISERTE et CHOSSON (259) proposèrent un schéma (Fig 18 a ; p. 51) dans lequel l'acide aspartique et la thréonine étaient liés au même groupement glycanne, l'acide aspartique, vraisemblablement par une liaison "asparaginy-glucosamine, la thréonine, par une liaison éther-oxyde. En effet :

Tableau I

Composition molaire en glucides et en acides aminés des glycoprotides α_4 , β et γ isolés des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde (ADAM-CHOSSON) (260) ; (MONTREUIL, BISERTE et CHOSSON) (261).

| | α_4 | β | γ |
|----------------------------|------------|---------|----------|
| Galactose | 1 | 1 | 1 |
| Mannose | 3 | 5 | 5 |
| N-acétylglucosamine | 4 | 9 | 9 |
| Acide N-acétylneuraminique | 1 | 0 | 0 |
| Acide aspartique | 1 | 1 | 1 |
| Thréonine | 0 | 1 | 0 |
| Cystine | 0 | 0 | 1 |

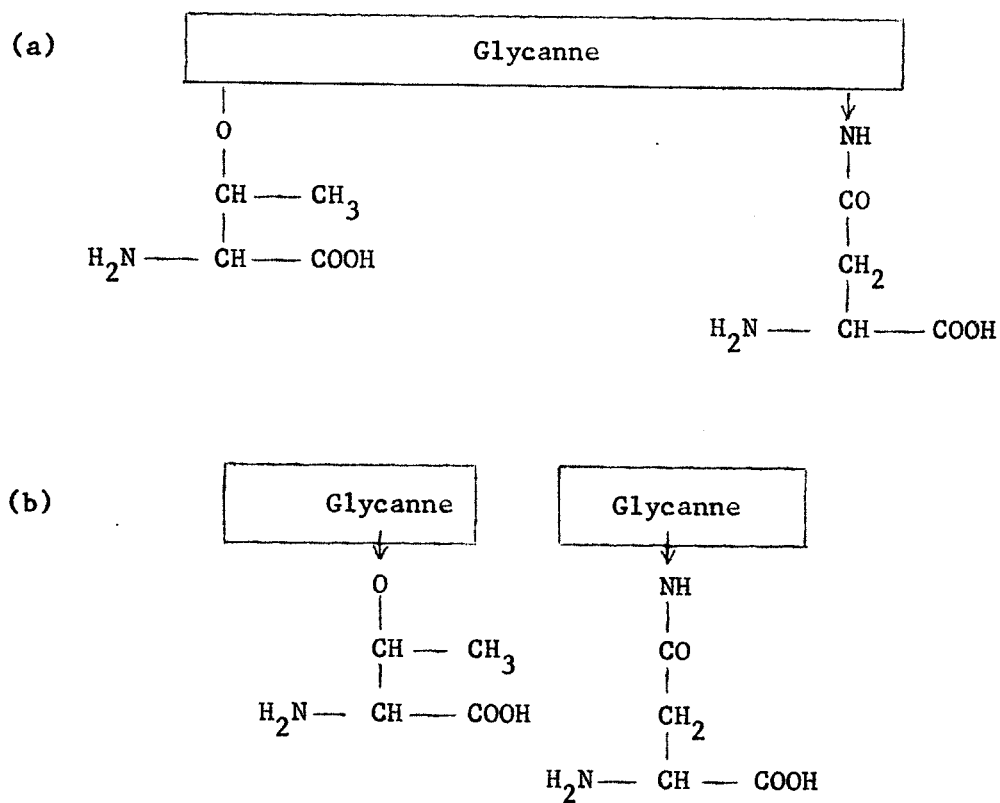


Figure 18

a - l'application du procédé de dinitrophénylation de SANGER conduisait au DNP-aspartique et à la DNP-thréonine, en proportions égales ;

b - la carboxypeptidase et l'aminopeptidase ne libéraient aucun des acides aminés ;

c - le glycoprotide β étant stable vis-à-vis de la soude, l'acide aminé n'était pas uni au glycanne par une liaison ester.

Associant ces résultats à ceux qui concernaient le glycoprotide γ , les auteurs proposèrent deux schémas de structure de l'ovomucoïde (Fig.19 ; p. 53).

Dans une seconde série de travaux, ADAM-CHOSSON (262), ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (263), MONTREUIL, CASTIGLIONI, ADAM-CHOSSON, CANER et QUEVAL (264) infirmaient cette structure et proposaient le schéma b (Fig.18 ; p. 51) dans lequel la thréonine était attachée à un glycanne par une liaison N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylaminique.

En effet :

a - l'hydrolyse acide partielle du glycoprotide β (HCl 1,5 N ; 100°C ; 1,5 h) conduisait à une fraction β_I , isolée par électrophorèse préparative sur papier. Cette fraction, non réductrice, possède la composition molaire suivante :

2 résidus de glucosamine
1 résidu d'acide aspartique
1 résidu de thréonine

b - l'oxydation periodique de cette fraction était sans action sur la thréonine, ce qui impliquait le blocage de la fonction hydroxylée de cette dernière. Les auteurs parvinrent de cette manière à la conclusion que le composé βI était un mélange de deux glyco-amino-acides : la N-(β -aspartyl)-glucosaminylamine et le O-thréonyl-glucosaminide.

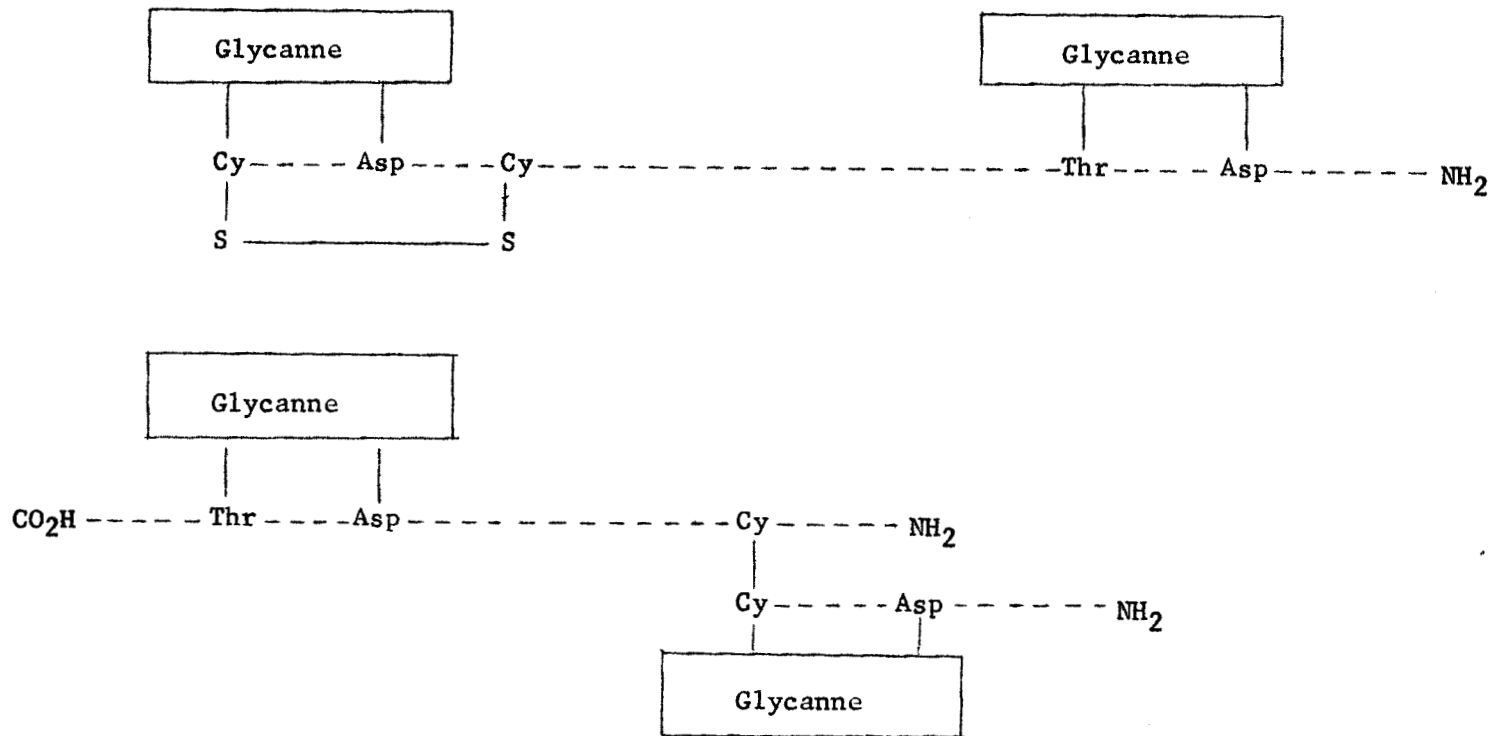


Figure 19

Schémas de structure de l'ovomucoïde proposés par MONTREUIL, BISERTE et CHOSSON (265).

Dans son mémoire de thèse, ADAM-CHOSSON (266) concluait à l'existence, dans l'ovomucoïde de 4 chaînes glycaniques dont 2 étaient unies à la protéine par des liaisons O-thréonyl-N-acétylglucosaminidiques et 2 autres par des liaisons N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamines (Fig. 20 ; p. 55).

Enfin, pour expliquer la présence des glycoprotides α_4 , β et γ et en se fondant sur la composition en glucides de ces derniers MONTREUIL, CASTIGLIONI, ADAM-CHOSSON, CANER et QUEVAL (267) et ADAM-CHOSSON (268) avaient émis l'hypothèse de l'existence de trois glycoprotéines dans les préparations d'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH : l'ovomucoïde "proprement dit" qui fournissait le glycoprotide β ; l'allo-ovomucoïde qui donnait le glycoprotide γ et l'ovoglycoprotéine de KETTERER (269) qui conduisait au glycoprotide α_4 .

Tel était, au Laboratoire l'état des travaux concernant l'ovomucoïde au moment où nous avons commencé nos recherches. Très rapidement, nous fûmes amené à remettre en question l'existence des liaisons O-thréonyl-glycosidiques ainsi que l'homogénéité des glycoprotides α_4 , β et γ , sur la base des résultats suivants :

1 - La substitution de la chromatographie quantitative des acides aminés par l'Auto-Analyseur Technicon aux méthodes peu sensibles de la chromatographie et de l'électrophorèse sur papier employées par ADAM-CHOSSON et al., nous montra que la composition des glycoprotides α_4 , β et γ n'était pas simple. Cette observation fut à la base de notre démonstration de l'existence, dans les hydrolysats pronasiques d'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH, de 10 glycoprotides et non de 3.

2 - Les recherches qui avaient conduit à la conclusion qu'il existait des liaisons O-thréonyl-glycosidiques reposaient uniquement sur l'analyse du produit de l'hydrolyse acide partielle du glycoprotide β (Composé β I). D'après les auteurs, il s'agissait, comme nous l'avons précisé plus haut, d'un mélange de O-thréonyl-glucosaminide et de N-(β -aspartyl)-glucosaminylamine. Or, les premiers résultats que nous avons

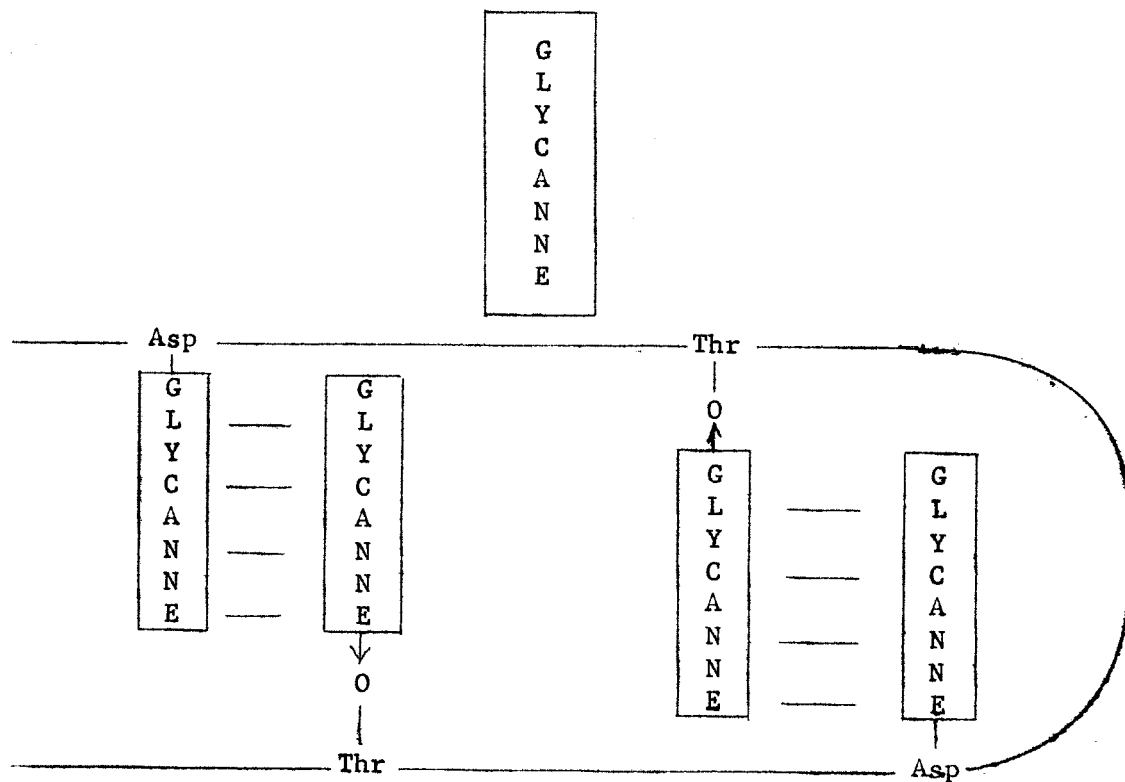


Figure 20

Schéma hypothétique proposé par ADAM-CHOSSON pour la structure de l'ovomucoïde.

— — — Liaisons hydrogène.

obtenus dès l'application de procédés plus précis infirmèrent cette conclusion. En effet, :

a - L'application de la méthode de dinitrophénylation de SANGER fournit, certes, le DNP-aspartique et la DNP-thréonine en proportions équimolaires, mais le dosage des acides aminés libres dans les hydrolysats chlorhydriques des DNP-glycopeptides, -dosage qui n'avait pas été effectué dans les expériences antérieures-, montre l'existence d'acide aspartique et de thréonine en proportions équimolaires (voir p. 150). La composition des hydrolysats chlorhydriques des DNP-glycopeptides β n'était donc pas :

DNP-aspartique + DNP-thréonine (1 : 1)

mais devenait :

DNP-aspartique + DNP-thréonine + aspartique + thréonine (1:1:1:1).

b - L'oxydation périodique ne laisse pas intacte la thréonine, mais en détruit environ la moitié (voir p. 152).

c - Des N-acétylosaminidases spécifiques sont sans action sur le composé β_I N-réacétylé (+).

d - La soude ne détache pas de glycanne de l'ovomucoïde natif (voir p.162). Rappelons, à ce sujet, que l'application, aux glycoprotéines, de la réaction de "β-élimination" est postérieure aux résultats d'ADAM-CHOSSON et contemporaine du début de nos travaux.

Ces observations préliminaires ont été à l'origine de la décision que nous avons prise de mettre au point ou d'appliquer d'autres procédés plus sensibles et plus précis, à l'exploration du point d'attache glucide-protide dans les glycoprotéines. En outre, nous avons posé en hypothèse de travail

(+) Ces réactions ont été effectuées dans le Laboratoire de Monsieur le Professeur J. M. GHUYSEN à qui nous adressons nos très vifs remerciements.

que la meilleure preuve que nous pourrions apporter à de telles déterminations était d'isoler, parmi les produits de la dégradation profonde de l'ovomucoïde, les deux partenaires dans la liaison glycanne-protide : un ose lié à un amino-acide.

Dans le cas particulier de l'ovomucoïde, il s'agissait essentiellement pour nous de démontrer si la N-(β -aspartyl)-glucosaminylamine et le O-thréonylglucosaminide pouvaient coexister dans le "composé" β_I . Pour parvenir à ce but, il était indispensable de connaître la stabilité des liaisons de ces composés vis-à-vis de l'acide chlorhydrique 1,5 N, à 100°C, pendant 1,5 h et leur comportement électrophorétique dans les systèmes-tampons utilisés pour isoler le composé β_I (voir p.155).

Le premier chapitre de l'exposé de nos travaux personnels concernera donc les propriétés des O-séryl et O-thréonyl- β -N-acétylglucosaminides, dont nous avons été amené à réaliser la synthèse, et de la N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine.

TRAVAUX PERSONNELS

RECHERCHES SUR LES CONJUGUES
GLUCOSAMINE-AMINO-ACIDE
ET SUR LEURS DERIVES

1 - RECHERCHES
SUR LA
N-(β -L-ASPARYL)-N-ACÉTYL-GLUCOSAMINYLAMINE

L'existence d'une liaison N-(β -L-aspartyl)-N-acétylglucosaminy-amine entre glycanne et protéine dans les glycoprotéines a été suggérée pour la première fois par YAMASHINA et MAKINO (270) sur la base des résultats fournis par l'étude des glycopeptides de l'ovalbumine. En particulier, l'hydrolyse acide des aspartyl-glycannes libérait une mole d'ammoniac par mole d'acide aspartique. Pour expliquer ce résultat, les auteurs proposèrent les deux schémas de liaison glycanne-acide aminé suivants :

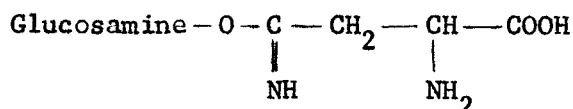


Schéma I
Type imino-éther

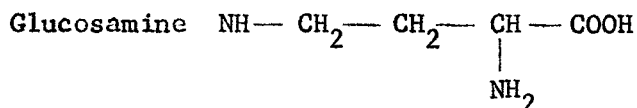


Schéma II
Type amide

Rapidement, les mêmes auteurs démontrèrent la réalité du schéma II en comparant les propriétés physico-chimiques du composé obtenu par hydrolyse acide partielle (HCl 2 N ; 100°C ; 1 h) de l'aspartyl-glycanne de l'ovalbumine avec celle de la N-(β -L-aspartyl)-N-acétyl-glucosaminyamine préparée par synthèse chimique (YAMASHINA, BAN-I et MAKINO) (270 bis).

Simultanément, MARKS, MARSHALL et NEUBERGER (271) parvinrent à la même conclusion.

Depuis, plusieurs procédés de synthèse de la N-(β -L-aspartyl)-N-acétylglucosamine ont été proposés par TSUKAMOTO, YAMAMOTO et MIYASHITA (272), YAMAMOTO, MIYASHITA et TSUKAMOTO (273), MARSHALL et NEUBERGER (274),

YOSHIMURA et HASHIMOTO (275), YAMASHINA, MAKINO, BAN-I et KOJIMA (276), BOLTON et JEANLOZ (277), BOLTON, HOUGH et KHAN (278) et par KOCHETKOV, MOLOTSOV et DEREVITSKAYA (279). En outre, plusieurs procédés de préparation du composé à partir de l'aspartyl-glycane de l'ovalbumine ont été décrits : par hydrolyse acide partielle (MARSHALL et NEUBERGER (280) ; BOGDANOV, KAVERZNEVA et ANDREJEVA (281) ; YAMAMOTO et TSUKAMOTO (282)) et par dégradation récurrente de SMITH (MAKINO et YAMASHINA) (283) (voir p.47).

Les propriétés de la N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosamine sont bien connues. Nous les avons rassemblées dans le Tableau II (p. 61). On trouvera, en outre, les caractéristiques des spectres dans l'infra-rouge dans les mémoires de YAMASHINA, BAN-I et MAKINO (284), de BOGDANOV, KAVERZNEVA et ANDREJEVA (285), de TSUKAMOTO, YAMAMOTO et MIYASHITA (286) et de YAMAMOTO, MIYASHITA et TSUKAMOTO (287),

Grâce à l'obligeance des Professeurs YAMASHINA, MARSHALL et NEUBERGER, -auxquels nous exprimons notre reconnaissance-, nous avons pu disposer d'échantillons de N-(β -L-aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine pour effectuer nos expérimentations. Celles-ci ont uniquement porté 1) sur la stabilité, dans les conditions d'hydrolyse acide partielle que nous appliquions aux glycoprotides, et 2) sur le comportement chromatographique et électrophorétique a) du composé natif et N-désacétylé, b) des PTH-dérivés du composé natif et N-désacétylé, c) du "Composé β I " d'ADAM-CHOSSON (voir p.155).

A - STABILITE EN MILIEU ACIDE DE LA N-(β -ASPARTYL)-N-ACETYLGLUCOSAMINYLAMINE

Nous avons étudié l'action, sur le composé et sur son PTH-dérivé préparé dans les conditions décrites à la page 142 , de l'acide chlorhydrique 1,5 N à 100°C pendant des temps variant de 0 à 2 h. Les hydrolysats ont été soumis à l'analyse électrophorétique à pH 3,9 (voir ci-dessous ; paragraphe 2).

Tableau II

Propriétés physiques de la N-(β -L-aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine.

POINT DE FUSION

1 - Composé cristallisé "anhydre" (en aiguilles) dans l'éthanol aqueux à chaud

255 - 266°C (TSUKAMOTO et al. (288) ; YAMAMOTO et al. (289) ; YAMASHINA et al. (290)).

2 - Composé cristallisé avec 1 H₂O (en plaquettes) dans l'éthanol aqueux froid

215 - 223°C (Références précédentes ; MARKS et coll. (291) ; YAMAMOTO et al. (292) ; MARSHALL et al. (293)).

200°C (BOGDANOV et al.) (294).

POUVOIR ROTATOIRE

1 - En solution dans l'eau

Composé "anhydre" : + 22,4° à 26,4° (TSUKAMOTO et al. (295) ; YAMAMOTO et al. (296) et YAMASHINA et al. (297)).

Composé à 1 H₂O : + 18,6° à 23,7° (Références précédentes ; MARSHALL et al. (298) ; BOGDANOV et al. (299)).

2 - En solution dans HCl 2 N

Composé à 1 H₂O : + 25,7° (MARSHALL et al.) (300).

Résultats :

- a. - La N-désacétylation du composé natif est totale au bout de 45 mn.
- b. - L'hydrolyse du composé natif est totale au bout de 2 à 3 h.
- c. - Dans le PTH-dérivé, aussi bien la fonction acétamido- que la fonction glycosylamine sont un peu plus stables : la N-désacétylation est complète au bout d'environ 2 h ; l'hydrolyse totale n'est effective qu'après environ 4 h.

Conclusions :

Dans les conditions d'hydrolyse acide partielle que nous appliquons aux glycoprotides, persiste dans les hydrolysats, la N-(β -aspartyl)-glucosaminylamine. Les meilleurs rendements sont obtenus avec les PTH-aspartyl-glycannes dont les hydrolysats, effectués dans les conditions précédentes, renferment, à la fois, les PTH-dérivés de la N-(β -L-aspartyl)-glucosaminylamine et de son produit de N-désacétylation.

B - COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE ET ELECTROPHORETIQUE DE LA N-(β -L-ASPARTYL)-N-ACETYLGLUCOSAMINYLAMINE ET DE SES DERIVES

Nous avons étudié le comportement chromatographique et électrophoretique, -dans les systèmes-solvants ou dans les tampons utilisés par ADAM-CHOSSON et al.-, des composés décrits dans le Tableau III (p. 63), susceptibles de se trouver dans les hydrolysats acides partiels d'aspartyl-glycannes ou de PTH-aspartyl-glycannes. Dans tous les cas, nous avons utilisé pour révéler les composés des réactifs à la ninhydrine, à l'oxalate d'aniline, à l'acide periodique-benzidine, à l'azoture de sodium-iode et le réactif d'ELSON et MORGAN décrits dans l'Appendice technique (voir p. 211).

1° - Mode opératoirea - Chromatographie sur papier

Nous avons employé le système-solvant : n-butanol/acide acétique/

Tableau III

Comportement chromatographique et électrophorétique de la N-(β -L-aspartyl)-N-acétyl-glucosaminylamine et de ses dérivés.

| Composés | Comportement chromatographique (a) | Comportement électrophorétique (b) | Coloration donnée par les réactifs (c) | | | | |
|---|------------------------------------|------------------------------------|--|------------|-------------------------|------------------------------|-----------------|
| | | | Oxalate d'aniline | Ninhydrine | Periodate-benzidine (d) | Azoture de sodium-iodure (e) | ELSON et MORGAN |
| Acide aspartique | 1 | 0 | - | pourpre | - | - | jaune |
| Glucosamine | 0,9 à 1,1 | 1 | brun | pourpre | + | - | mauve |
| N-(β -L-aspartyl)-N-acétyl-glucosaminylamine | 0,57 | 0,40 | - | bleu | + | - | - |
| N-(β -L-aspartyl)-glucosaminylamine | 0,30 | 0,80 | - | bleu | + | - | jaune |
| PTH-aspartique | 5,6 | 0 | - | - | - | + | - |
| N-(β -PTH-aspartyl)-N-acétyl-glucosaminylamine | 4 à 5 | 0,35 | - | - | + | + | - |
| N-(β -PTH-aspartyl)-glucosaminylamine | 1,8 | 0,75 | - | pourpre | + | + | jaune |
| "Composé β I" d'ADAM-CHOSSON (f) | | 0,80 | - | pourpre | + | - | jaune |

(a) Migration relative à l'acide aspartique.

(b) Rapports de la distance qui sépare l'acide aspartique du composé à la distance qui sépare l'acide aspartique de la glucosamine.

(c) Voir Appendice technique (p.)211

(d) Coloration : blanc sur fond bleu.

(e) Coloration : blanc sur fond brun.

(f) Voir p. 52 .

eau (4:1:5); sur papier Whatman n°1. La chromatographie descendante est prolongée pendant 36 h.

b - Electrophorèse sur papier

Les séparations électrophorétiques ont été effectuées sur papier Arches 304 dans les conditions suivantes : cuve "en toit" ; 10 V/cm, pendant 4 h ; solution tampon pH 3,9 de MICHL (301) : pyridine/acide acétique/eau (3:10:387).

2° - Résultats

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le Tableau III (p. 63) et illustrés par la figure 24 (p.100). Nous pouvons les résumer de la manière suivante :

a - En électrophorèse, la N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine se comporte comme un composé neutre. Au contraire, son produit de N-désacétylation possède une migration cathodique qui est nettement inférieure à celle de la glucosamine et qui est identique à celle du "Composé β_I " d'ADAM-CHOSSON.

b - La chromatographie sur papier fournit d'excellentes séparations, sauf dans le cas du "Composé β_I " d'ADAM-CHOSSON qui donne des taches mal définies et des "traînées" chromatographiques.

c - Certains réactifs donnent des colorations spécifiques. Les plus intéressantes sont celles que fournissent :

α - Les réactifs à la ninhydrine : coloration gris-bleu, identique à celle que donne l'asparagine, avec les "asparaginyldérivés" (voir, à ce propos, FLETCHER, MARSHALL et NEUBERGER) (302) ;

β - Le réactif d'ELSON et MORGAN : coloration jaune avec les composés renfermant de la glucosamine conjuguée.

Dans le cas du "Composé β_I " d'ADAM-CHOSSON, la coloration pourpre obtenue avec le réactif à la ninhydrine n'est pas incompatible avec la co-existence d' "asparaginyldérivés" (N-(β -aspartyl)-glucosaminylamine) et

du O-thréonylglucosaminide, la coloration donnée par celui-ci interférant avec celle que fournit le composé précédent.

C - CONCLUSIONS

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'étude de la stabilité en milieu acide et du comportement chromatographique et électrophorétique que nous avons effectuée, à la fois, sur le "Composé β_I " d'ADAM-CHOSSON et sur la N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine et ses dérivés, sont les suivantes :

1° - Dans les conditions de dégradation acide du glycoprotide β de l'ovomucoïde, la N-(β -aspartyl)-glucosaminylamine peut parfaitement être présente parmi les produits d'hydrolyse.

2° - La N-(β -aspartyl)-glucosaminylamine peut effectivement être l'un des constituants du "Composé βI " d'ADAM-CHOSSON et al. comme l'avaient suggéré ces auteurs, l'autre composé étant alors, comme nous l'avons vu, (voir p.54), le O-thréonylglucosaminide. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons préparé ce dernier et étudié sa stabilité en milieu acide et son comportement chromatographique et électrophorétique afin de les comparer à ceux du "Composé β_I " d'ADAM-CHOSSON.

2 - RECHERCHES
SUR LES
O-SERYL ET O-THREONYL- β -N-ACETYLGLUCOSAMINIDES
ET SUR LE
MECANISME DE LA " β -ELIMINATION"

I - SYNTHESE DES O-SERYL ET
O-THREONYL- β -N-ACETYLGLUCOSAMINIDES

La synthèse des β -N-acétylglucosaminides des hydroxy-amino-acides (sérine et thréonine) a comporté les 4 étapes suivantes, que nous avons illustrées par la figure 21 (p. 67).:

- Etape 1 : Synthèse de l'anomère β du 2-acétamido-0-1,3,4,6-tétra-acétyl-2-déoxy-D-glucopyrannose (O-peracétyl-N-acétyl-D-glucosamine).
- Etape 2 : Passage à l'anomère α du 1-chloro-2-acétamido-0-3,4,6-triacétyl-2-déoxy- α -glucopyrannose (α -chloro-O-peracétyl-N-acétylglucosamine).
- Etape 3 : Synthèse des esters benzyliques des O-(N-carbobenzoxy)-L-séryl et L-thréonyl-O-peracétyl- β -N-acétyl-D-glucosaminides par condensation de l' α -chloro-O-peracétyl-N-acétylglucosamine avec le dérivé "N-carbobenzoxylé" des β -hydroxy- α -amino-acides.
- Etape 4 : N-décarbobenzoylation et débenzylation des esters benzyliques des O-(N-carbobenzoxy) séryl- et thréonyl-O-peracétyl- β -N-acétylglucosaminides.
- Etape 5 : O-désacétylation des séryl- et thréonyl-O-peracétyl- β -N-acétylglucosaminides.

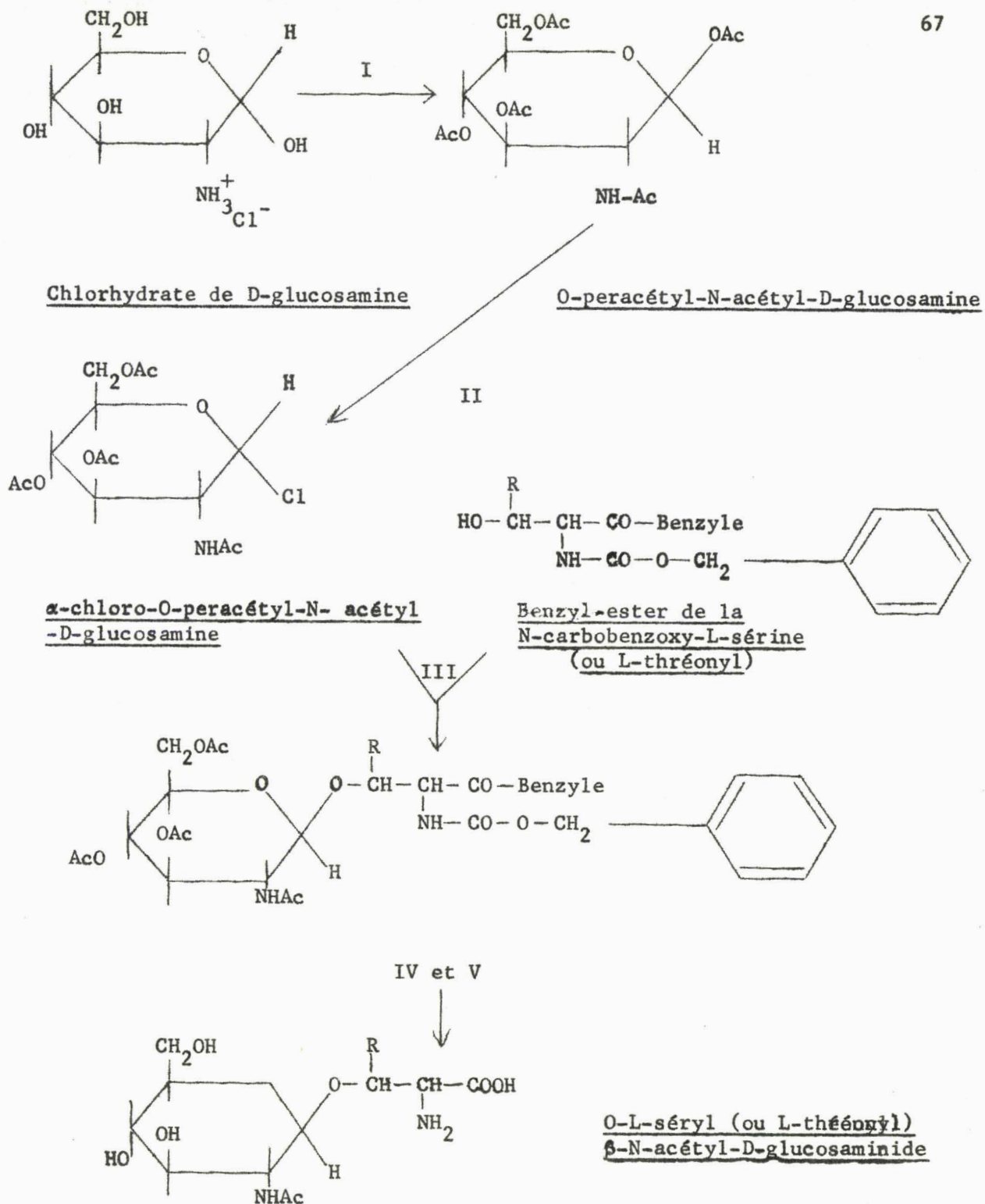


Figure 21

Schéma de la synthèse des O-séryl et O-thréonyl- β -N-acétyl-D-glucosaminides.

ETAPE 1PREPARATION DE LA O-PERACETYL-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE

A la suite de l'étude bibliographique concernant la préparation de la "peracétylglucosamine", à laquelle nous nous sommes livré, nous avons retenu les procédés de JONES et al. (303), FINDLAY et al. (304) qui sont le plus couramment appliqués par les auteurs et nous les avons soumis à une étude critique portant principalement sur le rendement et sur la pureté de la "peracétylglucosamine" obtenue à la suite de laquelle nous avons adopté un protocole expérimental qui améliore le rendement des méthodes précédentes.

A - MODE OPERATOIRE1 - PROCÉDE DE JONES et al. (305)

a - Principe. La glucosamine est peracétylée par l'anhydride acétique en présence de chlorure de zinc à 70-80°C. L'anhydride en excès est neutralisé par le bicarbonate de sodium et la peracétylglucosamine est précipitée par addition d'eau distillée. On obtient, dans ces conditions expérimentales, l'"acétyl-anomère" β .

b - Technique. 36 g de chlorure de zinc anhydre finement pulvérisé sont dissous dans 250 ml d'anhydride acétique. A la solution maintenue au bain-marie entre 70° et 80°C, on ajoute en 10 mn, par petites portions et sous agitation constante 30 g de chlorhydrate de glucosamine préalablement séché sous vide.

Après dissolution complète, la solution rouge-brun obtenue est versée sur 400 g environ de glace pilée et agitée pendant 5 mn. La précipitation de la "peracétylglucosamine" est effectuée en neutralisant le mélange par l'addition prudente d'une quantité calculée de bicarbonate de sodium (388,5 g), en présence de quelques millilitres de n-octanol pour éviter au maximum la formation d'une mousse abondante.

Le mélange est abandonné pendant 15 heures à 0°C. Le précipité qui s'est formé est lavé plusieurs fois sur filtre avec de l'eau glacée afin d'éliminer le chlorure de zinc et l'acétate de sodium produit au cours de la réaction. Le précipité est ensuite lyophilisé ou séché sous vide, à la température du laboratoire, en présence de soude.

Purification de la peracétylglucosamine. Le précipité est dissous à froid dans la quantité minimale de chloroforme pur. On ajoute ensuite de l'éther de pétrole jusqu'à l'apparition d'un louche et on achève la précipitation en maintenant le mélange à + 4°C pendant 18 à 24 h.

2 - PROCEDE DE FINDLAY, LEVY et MARSH

a - Principe. Le principe est identique à celui de la méthode précédente à la différence près que la peracétylation est effectuée à plus basse température (45-50°C) et que l'excès d'anhydride acétique est neutralisé par la soude.

b - Technique. 20 g de chlorhydrate de glucosamine anhydre sont ajoutés, en 30 mn, sous agitation constante à une solution de 16,6 g de chlorure de zinc anhydre dans 106 ml d'anhydride acétique. La température du mélange est maintenue à 45-50°C pendant toute la durée de l'opération et jusqu'à dissolution complète de la glucosamine.

La solution obtenue est versée dans un volume égal de glace pilée, sous agitation, et le mélange est maintenu à basse température pendant 10 mn. On ajoute ensuite goutte à goutte, en 30 mn, une solution de soude (64 g de soude en pastilles dans 200 ml d'eau distillée). Le mélange est constamment agité et maintenu entre 40 et 50°C. La précipitation de la "peracétylglucosamine" est obtenue en maintenant le mélange pendant 18 h à 0°C. Le précipité est filtré sur entonnoir de Büchner et débarrassé des sels en excès par un lavage soigneux à l'eau distillée glacée. Il est ensuite séché comme précédemment.

Purification de la peracétylglucosamine. Bien que l'halogénéation de la peracétylglucosamine puisse être effectuée, selon FINDLAY et coll. (306), sur un produit relativement impur, nous avons été amené à purifier certaines de nos préparations afin, d'une part, de déterminer les constantes physico-chimiques d'un produit purifié et, d'autre part, de vérifier l'observation précédente de FINDLAY et coll. Le mode opératoire est identique à celui que nous avons décrit ci-dessus.

c - Commentaires. Une expérience prolongée de la méthode de FINDLAY et coll. nous permet de préciser quelques détails techniques dont l'application augmente sensiblement le rendement des réactions :

1. - Le matériel et les produits utilisés doivent être anhydres.
2. - Une addition très régulière de la glucosamine dans le milieu réactionnel et une agitation constante de ce dernier améliorent considérablement les rendements.
3. - Le chlorure de zinc en excès doit être éliminé avant de verser la solution sur la glace pilée. Dans le cas contraire, le précipité de peracétylglucosamine se prend en une masse de consistance gommeuse, due probablement à la formation d'hydrate de zinc et les rendements diminuent notablement.
4. - L'addition de la solution de soude est interrompue quand le milieu réactionnel présente un trouble persistant. Nous avons observé que le pH de la solution atteignait alors une valeur de 4 à 5. Au delà de ce pH, il apparaît un précipité jaunâtre qui se présente, comme dans le cas précédent, sous la forme d'une masse gommeuse dont l'extraction conduit à des rendements dérisoires.

3 - PROCEDE PERSONNEL

a - Principe. Nous avons considérablement amélioré les rendements en peracétylglucosamine en mettant au point un mode opératoire qui est un compromis entre ceux de JONES et de FINDLAY. Nous avons modifié les conditions de température de la manière suivante : au lieu d'opérer d'emblée à 70°C, comme dans le procédé de JONES, par exemple, nous faisons réagir l'anhydride acétique, d'abord à 45°C, comme dans le procédé de FINDLAY, puis à 55 - 60°C, pour terminer par un court maintien à 90°C. En outre, nous neutralisons l'anhydride acétique, à 0°C, par le bicarbonate de sodium, comme dans la méthode de JONES, et non par la soude qui introduit un risque de O-désacétylation.

b - Technique. 50 g de chlorure de zinc anhydre, finement pulvérisé, sont dissous dans 320 ml d'anhydride acétique, en maintenant la température au bain-marie à 45°C. A la solution obtenue, on ajoute, -en 30 mn environ, de façon continue, et en laissant la température s'élever à 55 - 60°C-, 60 g de chlorhydrate de glucosamine finement pulvérisé et préalablement séché sous vide. Après complète dissolution, la température du mélange est portée, au bain-marie, à 90°C, jusqu'à l'apparition d'une teinte légèrement brune (5 à 10 mn). La solution, refroidie à 60°C, est versée, sous agitation continue, sur un mélange de glace pilée (750 ml) et de bicarbonate de sodium (390 g). La température atteint alors - 10°C environ. La précipitation de la peracétylglucosamine commence à se stade. On laisse reposer le mélange pendant 18 h à 4°C. Le précipité blanc formé est recueilli sur un entonnoir de Büchner, et dissous dans le minimum de chloroforme. La phase organique est lavée deux fois avec un volume égal d'eau distillée, à 2°C et deshydratée par agitation avec du sulfate de magnésium anhydre. Elle est ensuite concentrée à un faible volume. La peracétylglucosamine est finalement précipitée par l'addition d'éther de pétrole.

Nota. La pureté des préparations est systématiquement contrôlée par chromatographie sur couche mince de Silicagel, dans le système-solvant de TATE et BISHOP (307) modifié (benzène/méthanol/chloroforme) (92:8:2). La révélation est effectuée par l'acide sulfurique et par le réactif à l'hydroxylamine

ferrique de TATE et BISHOP (308) (Voir Appendice technique ; p.211). En outre, le dosage des radicaux acétyl est effectué par différents procédés qui sont décrits dans l'Appendice technique (p.211).

c - Commentaires. L'application de ce procédé nous a toujours conduit à un rendement satisfaisant que l'on peut attribuer aux raisons suivantes :

1. - La solution de chlorure de zinc dans l'anhydride acétique, maintenue à 45°C, ne brunit pas, et ne subit qu'une réaction secondaire de décomposition limitée.

2. - L'élévation spontanée de la température pendant l'addition de chlorhydrate de glucosamine et le maintien de la solution aux environs de 55 - 60°C permet une peracétylation rapide. Le mélange réactionnel reste jaune clair pendant toute la manipulation, indiquant que les dégradations sont minimales.

3. - La peracétylglucosamine est plus stable dans le milieu réactionnel que le chlorhydrate, et le traitement à 90°C, en fin d'expérience, permet l'inversion de l'anomère α en anomère β qui se forme préférentiellement à cette température.

4. - La neutralisation par un mélange de glace et de bicarbonate de sodium, permet d'éviter la mousse et réduit au minimum les réactions d'hydrolyse des liaisons esters.

B - RESULTATS

Nous avons rassemblé, dans le tableau IV (p. 73), les résultats concernant, d'une part, les rendements que nous avons obtenus et, d'autre part, les principales propriétés des préparations que nous avons effectuées. Nous pouvons les résumer de la manière suivante :

1 - Après 3 ou 4 tentatives d'application du procédé de JONES et al., nous avons renoncé à son emploi car une seule préparation nous a fourni un composé cristallisé, avec un rendement très faible.

Tableau IV

Rendement et propriétés de préparations de "peracétylglucosamine" obtenue par les procédés de JONES et al. (309), de FINDLAY et al. (310) et par une méthode personnelle.

| Procédés de préparation | Rendements (en p.100) | $\left[\begin{matrix} \alpha \\ \end{matrix} \right]_D^{25}$ (+) | P. F. | Nombre de résidus "O-acétyl" (++) |
|--|-------------------------------------|--|-----------|--|
| JONES <u>et al.</u>(311) | | | | |
| Résultats de JONES <u>et al.</u> dérivé α -acéto | 56 | + 91° | 139°C | |
| dérivé β -acéto | 52 | + 3° | 192°C | |
| Résultats personnels | 11,1 | + 15° | 138°C | |
| FINDLAY <u>et al.</u> (312) | | | | |
| <u>"Précipité lyophilisé"</u> | | | | |
| Résultats de FINDLAY <u>et al.</u> | 28 | + 1,5° (à 22°C) | 188-189°C | |
| Résultats personnels | 11,1 à 27,6 (moyenne : 20 p.100) | | | |
| <u>Précipité recristallisé</u> | | | | |
| | 3 à 12 (moyenne : 10 p.100) | - | - | 4,3 à 5 |
| Préparation n°1 | 9,4 | + 1,75° | 177°C | |
| Préparation n°2 | 4,6 | + 7,52° | 175°C | 4,3 |
| Préparation n°3 | 12 | + 15,80° | 171-172°C | 5 |
| Préparation n°4 | 9,5 | + 27,50° | 168-171°C | |
| Préparation n°5 | 14,5 | + 42,40° | 164-165°C | |
| <u>Procédé personnel</u> | | | | |
| Préparation n°1 | 45 | + 15° | 171°C | 4 |
| Préparation n°2 | 50 | + 17° | 169°C | 4 |
| Préparation n°3 | 55 | + 20° | 171°C | 4 |
| Préparation n°4 | 90 | + 26° | 168°C | 4 |

(+) En solution chloroformique

(++) La technique de dosage des "O-acétyl" est décrite dans l'Appendice (p. 211).

2 - L'application de la méthode de FINDLAY et coll. nous a donné un premier précipité ("précipité lyophilisé") avec un rendement voisin de celui des auteurs. La recristallisation de ce précipité conduit, avec des rendements très variables, à des préparations dont les propriétés physiques, -point de fusion et pouvoir rotatoire spécifique-, sont mal définies. Ces anomalies s'expliquent probablement par la présence, dans les préparations, des deux anomères α et β -acétylés dans des proportions variables. L'expérience ayant montré que la co-existence des deux anomères n'avait pas d'influence sur les rendements en dérivés α -chloré, il est inutile de purifier les préparations.

3 - L'application de notre procédé conduit à des rendements élevés en per-acétylglucosamine qui atteignent 50 à 90 p.100. La détermination du pouvoir rotatoire spécifique des préparations nous permet de préciser que les anomères α et β sont présents dans le rapport 1 : 4, ce qui correspond à un rendement de 42 à 65 p.100 en anomère β qui intervient seul dans la forme de l' α -chloro-peracétylglucosamine.

C - CONCLUSIONS

L'application d'un procédé original nous a permis d'obtenir avec des rendements satisfaisants des préparations pures de 1, 3, 4, 6-tétra-O-acétyl-N-acétyl-D-glucosamine à partir de laquelle nous avons synthétisé le dérivé 1- α -chloro-3,4,6-tri-O-acétyl-N-acétyl-D-glucosamine.

ETAPE 2

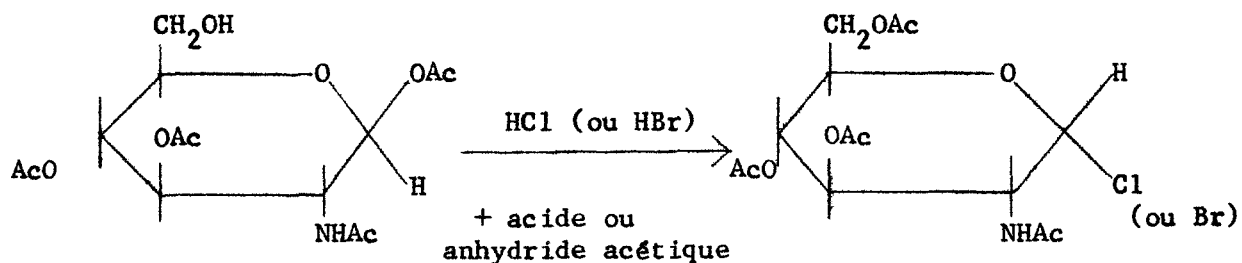
PREPARATION DE LA 1- α -CHLORO-3,4,6-TRI-O-ACETYL-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE

Les procédés classiques de synthèse des osides dérivent du procédé général décrit par KOENIGS et KNORR (313) en 1901. Ils tirent parti de la réactivité des dérivés acéto-halogénés des oses. En général, le dérivé bromé est utilisé préférentiellement au dérivé chloré à cause de sa réactivité plus élevée. Dans le cas de la N-acétylglucosamine, l'instabilité du dérivé bromé ne permet pas son emploi et les synthèses de N-acétylglucosaminides ne

peuvent être effectuées qu'à partir du dérivé chloré. Cependant, nous avons tenté de préparer le dérivé bromé.

A - PRINCIPE

Dans les deux cas, le principe de la réaction de synthèse des dérivés acéto-halogénés des oses, est identique : traité par un hydracide halogéné, le dérivé peracétylé d'un ose est transformé en un dérivé peracéto-1-halogéné, la substitution de l'acétyle en 1 par l'halogène s'accompagnant d'une inversion de WALDEN. La réaction s'écrit, dans le cas de la O-peracétyl-N-acétyl-D-glucosamine :



β -1-acétyl-~~3,4~~ 6-tri-O-acétyl-
N-acétyl-glucosamine

α -1-chloro (ou bromo)-~~3,4~~ 6-tri-
O-acétyl-N-acétyl-D-glucosamine

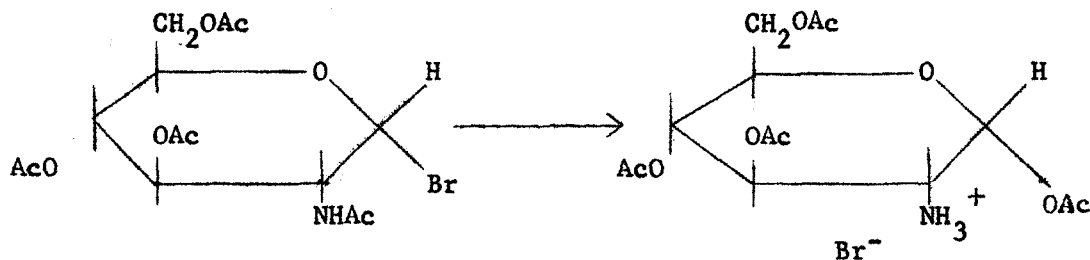
B - METHODES1 - TENTATIVE DE SYNTHÈSE DE L'ACÉTO-BROMO-N-ACÉTYLGLUCOSAMINEa - MODE OPERATOIRE

Nous avons appliqué le procédé de MOGGRIDGE et NEUBERGER (314) décrit pour synthétiser les méthyl-N-acétylglucosaminides.

10 g de β -1-acétyl-2,3,6-tri-O-acétyl-N-acétyl-D-glucosamine sont dissous dans 30 ml d'acide acétique saturé d'acide bromhydrique (+). Le mélange est maintenu pendant 15 à 18 h à la température du laboratoire. Il est ensuite additionné de 80 ml de chloroforme refroidi et la solution obtenue est "extraite" deux fois dans une ampoule à décanter avec une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium. La phase chloroformique est séchée à l'aide de sulfate de sodium anhydre et concentrée sous pression réduite en un sirop jaune pâle. L'addition, à ce dernier, d'un faible volume d'acétate d'éthyle provoque la cristallisation d'un composé qui est recristallisé une ou deux fois. On obtient, de cette manière, 80 mg de cristaux.

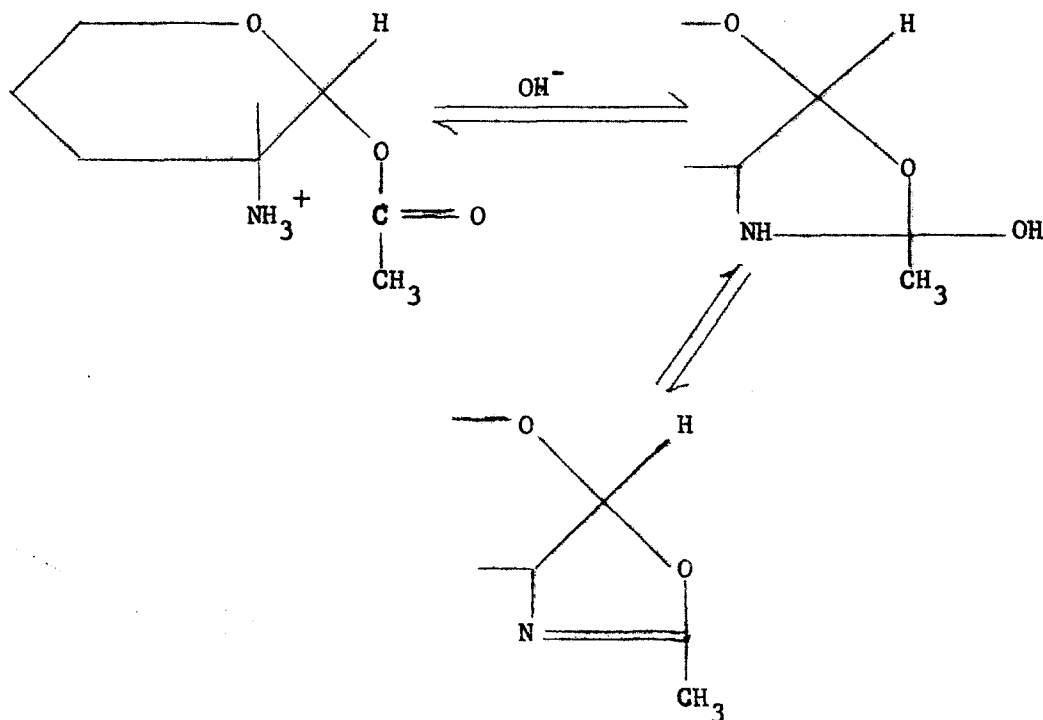
b - RESULTATS ET DISCUSSION

Le composé recristallisé n'est pas l' α -1-bromo-3,4,6-tri-O-acétyl-N-acétyl-D-glucosamine attendu, mais le bromhydrate de 1,3,4,6-tétra-O-acétyl-glucosamine. Un résultat identique a été obtenu par d'autres auteurs (voir, par exemple, INOUE et al (315) ; LEABACK et WALKER (316) ; MICHEEL et al. (317)). Il s'explique par l'instabilité de l'acéto-bromo-N-acétylglucosamine qui subit une "acylmigration" (INOUE et al. (318) ; MOGGRIDGE et al. (319)), favorisée par la présence d'eau et par la recristallisation :



(+) L'acide bromhydrique a été préparé par action du brome sur le tétrahydronaphtalène et séché par passage sur une colonne de sulfate de sodium anhydre..

En outre, le bromhydrate de O-peracétylglucosamine subit ultérieurement une lente conversion en une oxazoline (INOUYE et al. (320) ; WHITE (321)). Le mécanisme est le suivant :



La grande instabilité de l'acéto-bromo-N-acétylglucosamine explique le très faible rendement des réactions de synthèse. Nous avons tenté d'améliorer celui-ci de différentes manières :

- 1 - en évitant au maximum la présence d'eau dans les milieux réactionnels ;
- 2 - en remplaçant l'acide acétique par de l'anhydride acétique, comme dans le procédé de synthèse du dérivé "1-chloro" (voir p.78) ;
- 3 - en dissolvant d'abord la glucosamine dans l'acide acétique

et en saturant ensuite en acide bromhydrique.

Tous les essais, auxquels nous nous sommes livré, ont échoué. Ultérieurement, nous avons tenté de condenser directement, avec les N-carbobenzoxy-hydroxy-amino-acides, le sirop jaune pâle, sans le recristalliser, comme dans le cas de la synthèse du méthyl-N-acétylglucosaminide réalisée par MOGGRIDGE et NEUBERGER (322). Nous n'avons pu réaliser la condensation.

c - CONCLUSIONS

La préparation, à partir de la O-peracétyl-N-acétyl-D-glucosamine, du dérivé 1-bromo-O-peracétylé conduit à des rendements dérisoires. Les composés obtenus sont, en outre, mal définis. Il s'agit de mélanges de faibles quantités de 1-bromo-3,4,6-tri-O-acétyl-N-acétylglucosamine avec des proportions plus importantes de bromhydrate de 1,3,4,6-tétra-O-acétylglucosamine et de l'oxazoline qui se forme à partir de ce dernier. Il n'est donc pas surprenant que les préparations que nous avons obtenues, au cours d'essais que nous avons réalisés, se soient révélés impropres à la synthèse des N-acétylglucosaminides de la sérine et de la thréonine.

C'est pourquoi nous nous sommes orienté vers la synthèse du dérivé acéto-chloré de la N-acétylglucosamine dont la stabilité est supérieure et dont plusieurs auteurs avaient décrit des procédés de préparation avec des rendements satisfaisants.

2 - SYNTHESE DE L'ACETO-CHLORO-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE

Plusieurs méthodes de synthèses de l'acéto-chloro-N-acétylglucosamine ont été décrites qui fournissent, pour la plupart, des rendements de l'ordre de 40 p.100. Notre choix s'est porté sur le procédé de LEABACK et WALKER (323) dont le mode opératoire était le plus simple.

a - MODE OPERATOIRE

40 g de O-peracétyl-N-acétyl-D-glucosamine recristallisée sont suspendus dans 200 ml d'anhydride acétique. Dans le mélange maintenu à 0°C,

on fait passer un courant d'acide chlorhydrique gazeux sec (+) jusqu'à dissolution complète du produit. La solution est maintenue à la température du laboratoire pendant 16 h, puis additionnée de 500 ml de chloroforme. Le mélange refroidi est extrait avec deux volumes d'une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium ajoutée par petites portions, en refroidissant la mixture sous un courant d'eau froide après chaque addition. La solution chloroformique est ensuite lavée deux fois avec de l'eau glacée (++) , séchée sur sulfate de magnésium anhydre, décolorée par le charbon et concentrée sous pression réduite. On obtient un sirop qui, extrait avec de l'éther anhydre sans peroxydes (++) , abandonne des cristaux blancs. Ceux-ci sont dissous à chaud dans l'acétate d'éthyle. La solution, filtrée et additionnée d'éther de pétrole fournit, après 24 h à + 4°C, de l'acéto-chloro-N-acétyl-D-glucosamine qui cristallise en "houppes" caractéristiques.

Nota 1 - Nous avons appliqué le même mode opératoire à la O-peracétyl-N-acétylglucosamine obtenue par lyophilisation (voir p.74).

2 - Chacune des préparations obtenues a été soumise à l'analyse par chromatographie en couche mince (voir Appendice p.211) sur Silicagel dans le système-solvant benzène/méthanol/chloroforme (85:8:7). La révélation des composés était effectuée par le réactif à l'acide sulfurique et par le procédé de TATE et BISHOP (324). Nous avons de cette façon, suivi la purification de nos préparations, car le comportement chromatographique de la "peracétylglucosamine" (R_F : 0,18) est nettement différent de celui de l'acéto-chloro-N-acétylglucosamine (R_F : 0,41).

(+) L'acide chlorhydrique a été préparé par l'action de l'acide sulfurique sur le chlorure de sodium. Il a été desséché par passage dans de l'acide sulfurique concentré, puis dans une colonne de chlorure de calcium sec.

(++) Le dérivé acéto-chloré de la N-acétylglucosamine est insoluble dans l'eau froide et dans l'éther.

b - RESULTATS

Nous avons rassemblé nos résultats dans le tableau V(p.81) . On voit que les rendements des préparations effectuées à partir de "peracétylglucosamine" recristallisée sont supérieurs à ceux des synthèses réalisées à partir de "peracétylglucosamine" lyophilisée. Les meilleurs rendements ont été obtenus à partir de peracétylglucosamine préparée par notre procédé grâce à la présence d'une proportion élevée de l'anomère β (voir p. 74). En outre, les valeurs des rendements, du point de fusion et du pouvoir rotatoire spécifique correspondent à celles de l' α -1-chloro-3,4,6-tri-O-acétyl-N-D-glucosamine données par les auteurs.

c - CONCLUSIONS

L'acéto-chloro-N-acétyl-D-glucosamine se prépare, avec les meilleurs rendements, à partir de la "O-peracétyl-N-acétyl-D-glucosamine" préparée selon le mode opératoire que nous avons décrit. Elle s'obtient dans un état de pureté très satisfaisant qui peut être aisément défini par l'application de la chromatographie en couche mince. Les rendements élevés que l'on obtient s'expliquent, comme nous l'avons vu, par la stabilité du dérivé chloré qui est supérieure à celle du dérivé bromé. Toutefois, pour empêcher la formation du chlorhydrate de 1,3,4,6-tétra-O-acétyl-N-acétyl-D-glucosamine, on utilisera des solvants anhydres et on évitera l'emploi du nitrométhane et de l'acétonitrile qui catalysent la conversion principalement en milieu acide.

En outre, la détermination des constantes physiques du composé obtenu nous permet de conclure qu'il s'agit de l' α -1-chloro-3,4,6-tri-O-acétyl-N-acétyl-D-glucosamine.

Tableau V

Rendement et propriétés physico-chimiques des préparations d' α -1-chloro-3,4,6-tri-O-acétyl-N-acétyl-D-glucosamine.

| Produits de départ | Rendements | PF (en °C) | $[\alpha]_D^{22}$ (en °C) | Nombre de résidus acétylés |
|--|----------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| Peracétylglucosamine recristallisée (p. 69) | Moyenne : 41 p.100 | 115 à 125 (th : 124) (+) | 114 à 119 (th : 116) (+) | 3 (th : 3) |
| Peracétylglucosamine lyophilisée (p. 74) | Moyenne : 25 p.100 | - | - | - |
| Peracétylglucosamine, préparée par notre procédé personnel (p. 74) | Moyenne : 65,5 p.100 | 117 à 123 | 114 à 118 | 3,0 à 3,1 |

(+) Valeurs de JONES et al. (325)

ETAPE 3SYNTHESE DES O-(N-CARBOBENZOXY) SERYL- ET THREONYL-O-PERACETYL- β -N-ACETYL-D-GLUCOSAMINIDESA - PRINCIPE

La synthèse des glycosides est effectuée, comme nous l'avons vu plus haut, par la réaction de condensation, dite de KOENIGS et KNORR, entre l'halogène d'un ose acéto-halogéné et l'hydrogène d'une fonction alcoolique portée par un autre composé dont les autres fonctions, susceptibles de réagir, ont été préalablement protégées. Dans le cas particulier de nos recherches, la synthèse a été réalisée, suivant le schéma III de la figure 21 (p. 67), en condensant l' α -chloro-O-peracétyl-N-acétyl-D-glucosamine avec les esters benzylques des N-carbobenzoxy-sérine et thréonine.

La réaction de condensation s'accompagne d'une inversion de WALDEN de la fonction glycosidique. La synthèse d'un β -glycoside sera donc effectuée à partir du dérivé α -chloré (ou bromé) et celle d'un α -glycoside, à partir du dérivé β -chloré (ou bromé). Elle nécessite, en outre, l'emploi de catalyseur qui sont généralement des sels d'argent (carbonate ou oxyde) ou de mercure (acétate, bromure, chlorure, cyanure ou oxyde mercurique).

B - METHODES

Jusqu'à présent, deux procédés de synthèse de N-acétyl-D-glucosaminides d'hydroxy-amino-acides ont été décrits. Il s'agit, d'une part, de la préparation de l'ester méthylique du O-L-séryl- β -N-acétyl-D-glucosaminide réalisée par JONES, PERRY, SHELTON et WALTON (326) qui utilisent, comme catalyseurs, l'oxyde d'argent et l'iode et, d'autre part, de la synthèse des O-L-DNP-thréonyl et O-L-DNP-séryl- β -N-acétyl-D-glucosaminides décrit par VERCELLOTTI et LUETZOW (327).

Nous avons appliqué le mode opératoire de JONES et al. et tenté d'améliorer la méthode en apportant les modifications suivantes :

- Remplacement de l'oxyde d'argent par le carbonate, puis, des sels d'argent par des catalyseurs mercuriques ;
 - Utilisation des esters benzyliques des carbobenzoxy-hydroxy-amino-acides au lieu de leurs esters méthyliques.
- On évite ainsi la saponification qui provoque une importante β -élimination car la débenzylation s'effectue par hydrogénation catalytique.

1 - PROCEDE DE JONES et al. (328) A L'OXYDE D'ARGENT-IODE

Nous avons appliqué le procédé de JONES et al. à la synthèse du glycoside de la sérine et nous l'avons étendu à la préparation du glycoside de la thréonine.

1 g d' α -chloro-O-peracétyl-N-acétyl-D-glucosamine et 700 mg de N-carbобенzoxy-L-sérine ou L-thréonine (NBC ou PIERCE) sont dissous dans 50 ml de chloroforme pur exempt d'éthanol (voir Appendice ; p.211) additionné de 1 ml de diméthyl-sulfoxyde pour faciliter la dissolution des produits. A la solution obtenue, on ajoute 10 g de sulfate de calcium anhydre ("Driérite"), 50 mg d'iode et 1 g d'oxyde d'argent fraîchement préparé. Le mélange est agité, pendant 7 jours, à l'obscurité et à la température du laboratoire. Il est ensuite filtré sur Celite préalablement imbibée de chloroforme et la filtrat est décoloré par addition d'une solution saturée d'hyposulfite de sodium. La phase chloroformique est recueillie dans une ampoule à décanter et on y joint les 3 extraits chloroformiques de la phase aqueuse.

La solution chloroformique est enfin concentrée sous pression réduite à 35-40°C en un sirop jaunâtre que nous avons tenté de cristalliser en le reprenant dans l'acétate d'éthyle et en ajoutant à la solution de l'éther de pétrole et de l'éthanol. Les faibles rendements, en produits d'ailleurs impurs, que nous avons obtenus nous ont conduit à modifier le procédé de JONES et al., en substituant, à l'oxyde d'argent et à l'iode, le carbonate d'argent pour essayer d'améliorer la méthode.

2 - PROCEDE PERSONNEL AU CARBONATE D'ARGENT

Nous avons appliqué à la synthèse du N-acétylglucosaminide de la sérine et de la thréonine un mode opératoire qui est identique au précédent, à la différence près que l'oxyde d'argent et l'iode, sont remplacés par 5 g de carbonate d'argent préparé extemporanément suivant le protocole décrit dans l'Appendice (p. 211). Cette modification n'a pas apporté d'amélioration sensible des rendements et de la pureté des produits.

3 - PROCEDE PERSONNEL AUX SELS MERCURIQUES

a - Condensation avec les N-carbobenzoxy-amino-acides

Dans un mémoire récent, SCHROEDER et GREEN (329) ont décrit un procédé de préparation d'alkyl- β -glucosides par condensation de l'acéto- α -bromo-glucose avec des alcools, en présence d'oxyde jaune de mercure et de bromure mercurique. Selon les auteurs, le procédé fournit des rendements très élevés grâce à une régénération permanente du bromure mercurique ~~considéré~~ considéré comme le catalyseur de la réaction, par action sur l'oxyde mercurique de l'acide bromhydrique libéré au cours de la condensation de KOENIGS et KNORR.

La méthode présente, en outre, l'avantage d'être plus rapide, moins onéreuse et de ne pas exiger l'obscurité. C'est pourquoi, nous avons tenté de l'appliquer à la préparation du O-séryl-N-acétylglucosaminide en remplaçant le bromure mercurique par le chlorure mercurique puisque le composé de départ était, non pas le dérivé α -bromé, mais le dérivé α -chloré de la O-peracétyl-N-acétyl-D-glucosamine.

Le mode opératoire est le suivant :

60 mg de N-carbobenzoxy-L-sérine ou L-thréonine, 100 mg de chlorure mercurique sont dissous dans 30 ml de chloroforme pur (voir Appendice ; p.211). A la solution ~~obtenue~~ obtenue et additionnée de 5 g de Driérite et de 1 g d'oxyde jaune de mercure, on ajoute 1 g d' α -chloro-O-peracétyl-N-acétyl-D-glucosamine dissous dans 20 ml de chloroforme pur. Après une agitation continue de 60 à 90 h, le mélange est filtré sur Célite, concentré

sous vide, repris par 20 ml de chloroforme pur et filtré de nouveau sur Celite. Le filtrat est décoloré par le charbon et concentré sous vide, à 30 -35°C, jusqu'à obtenir un sirop qui est purifié par chromatographie sur colonne (3 X 50 cm) de silice ("Silicagel français") TOUZART et MATIGNON ; "mesh" 100-200) L'élution est effectuée par le passage de 500 ml d'un mélange de benzène et de chloroforme (9:1) qui élimine les dérivés acétylés de la glucosamine, puis de 1 500 ml d'un mélange de benzène , de chloroforme et de méthanol (9:1:1) qui fournit les produits de condensation accompagnés des N-carbobenzoxy-amino-acides non conjugués.

L'expérience nous ayant montré que la purification de la seconde fraction provoque des pertes de rendement et que la présence des N-carbobenzoxy-dérivés libres de la sérine et de la thréonine ne gêne nullement la préparation puis l'isolement des O-séryl et O-thréonyl-N-acétylglucosaminides, nous utilisons, dans la 4^e étape, la seconde fraction native.

Ce procédé, comme le précédent, n'a pas augmenté les rendements et la qualité des préparations. Finalement, nous nous sommes arrêté à une méthode qui n'améliore pas le rendement de la glycosidation, mais qui permet d'éviter, comme nous l'avons précisé plus haut (voir p. 83) des pertes au cours de l'élimination de tous les substituants des O-hydroxy-amino-acides-N-acétylglucosaminides.

Le mode opératoire consiste à remplacer l'ester méthylique des N-carbobenzoxy-amino-acides par l'ester benzylique. En effet, l'élimination du "reste benzylique" s'effectue par l'hydrogénation catalytique et non par saponification comme dans le cas des esters méthyliques.

b - Condensation avec les esters benzyliques des N-carbobenzoxy-amino-acides

Le protocole expérimental est identique au précédent, à la différence près que nous employons les esters benzyliques que nous préparons par le procédé de BENISHAI et BERGER (330) :

A une solution de 8 g de N-carbobenzoxy-sérine, (ou thréonine) dans 75 ml de benzène (redistillé sur CaO), on ajoute 10 ml d'alcool benzylique redistillé et 0,75 g d'acide p-toluène sulfonique. Le mélange est maintenu, pendant 3 h, à l'ébullition à reflux, dans un appareil de DEAN et STARK, qui permet

d'éliminer l'eau sous forme d'azéotrope avec le benzène. Après refroidissement, la solution est lavée deux fois avec une solution aqueuse de bicarbonate de potassium à 5 p.100, puis séchée ensuite sur sulfate de sodium anhydre, et enfin évaporée sous pression réduite à 40°C. L'excès d'alcool benzylique est éliminé par plusieurs co-distillations avec le chloroforme. L'ester benzylique du N-carbobenzoxy-amino-acide est précipité de la solution chloroformique par l'addition d'éther de pétrole. La pureté des esters est vérifiée par chromatographie sur couche mince de Silicagel G, dans les systèmes-solvants : benzène/chloroforme/méthanol (85:7:8) et n-butanol/acide acétique/pyridine/eau (15:3:10:2) (EHRHART et CRAMER) (331). Nous avons précisé dans le tableau VI (p. 87) le comportement chromatographique des N-carbobenzoxy-sérine (et thréonine) et de leurs esters benzyliques.

C - RESULTATS

Les faibles quantités de substance pure que nous avons obtenues, quel que soit le procédé de synthèse utilisé (+), ne nous ont pas permis de déterminer les constantes physiques classiques, comme le point de fusion et le pouvoir rotatoire spécifique, et nous avons poursuivi la synthèse des N-acétyl-glucosaminides en partant des fractions d'élution des colonnes de silice sans tenter de les purifier.

Toutefois, nous les avons soumises au contrôle de la chromatographie en couche mince (voir Appendice ; p.211) et les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

1 - Dans la plupart des cas, plusieurs taches ont été caractérisées, parmi lesquelles on identifie celles des dérivés carbobenzoxylés des hydroxy-amino-acides et les N-acétyl-glucosaminides.

(+) Nous avons aussi appliqué, sans obtenir de résultats plus satisfaisants, les procédés d'ANGYAL et SHELTON (332) (condensation avec les O-trityl-dérivés de la sérine et de la thréonine) et de DEREVITSKAYA et al. (333) (condensation dans le benzène, à reflux, en présence de carbonate d'argent).

Tableau VI

Comportement chromatographique sur couche mince des N-carbobenzoxy-sérine et thréonine et de leurs esters benzyliques.

| Composés | R _F (+) | |
|--------------------------|--------------------|-------------------|
| | Système-solvant a | Système-solvant b |
| N-carbobenzoxy-sérine | 0 | 0,60 |
| N-carbobenzoxy-thréonine | 0 | 0,70 |
| Esters benzyliques : | | |
| N-carbobenzoxy-sérine | 0,40 | 0,90 |
| N-carbobenzoxy-thréonine | 0,45 | 0,90 |

(+) Système solvant a : benzène/chloroforme/méthanol (85:7:8).

Système-solvant b : n-butanol/acide acétique/pyridine/eau (15:3:10:2).

2 - D'après l'intensité des taches de ces derniers, nous avons pu estimer les rendements des préparations et nous parvenons à la conclusion que les sels mercuriques sont les catalyseurs les plus satisfaisants. Une meilleure précision est obtenue à l'examen des électrophorégrammes des hydrolysats chlorhydriques partiels (voir p.60) qui fournissent des quantités variables de O-séryl ou de O-thréonyl-glucosaminide. On élimine, de cette manière, l'interférence de toutes les impuretés. Les taux les plus élevés de glucosaminides ont été obtenus par condensation avec les esters benzyliques des N-carbobenzoxy-amino-acides en présence de sels mercuriques.

D - CONCLUSIONS

L'application de différents procédés de condensation de KOENIGS et KNORR en vue de la préparation de O-peracétyl-N-acétylglucosaminides de la carbobenzoxysérine (procédés de JONES et al., d'ANGYAL et SHELTON, de DEREVITS-KAYA et al., et trois procédés personnels) nous permettent de conclure à la plus grande efficacité des catalyseurs mercuriques. Toutefois, les rendements restent très faibles. Ce résultat s'explique par la faible réactivité des dérivés chloro-acétylés des oses comparée à celle des dérivés bromés. Malheureusement, pour les raisons que nous avons exposées plus haut (voir p.76), l'emploi de ces derniers reste, pour le moment, interdit malgré la récente description par FLOWERS et JEANLOZ (334) d'un procédé de synthèse d'un N-acétylglucosaminide (le N-acétylglucosaminido-1,6-acide N-acétylmuramique) à partir de l' α -bromo-N-O-peracétylglucosamine. Nous avons, en effet, appliqué sans obtenir de meilleurs résultats, la méthode de FLOWERS et JEANLOZ dont le principe est le suivant : préparation de l'acéto-bromo-N-acétylglucosamine sans l'isoler du milieu réactionnel dans lequel on réalise la condensation des hydroxy-dérivés, en présence de nitrométhane et de cyanure mercurique.

ETAPES 4 et 5PASSAGE AUX O-SERYL et O-THREONYL- β -N-ACÉTYL-D-GLUCOSAMINIDESA - PRINCIPE

Le passage des esters benzyliques des N-carbobenzoxy-O-L-séryl- (ou thréonyl-) O-peracétyl-N-acétyl-D-glucosaminides aux O-L-séryl (ou thréonyl) -N-acétyl-D-glucosaminides nécessite (Schémas IV et V de la fig. 21 ; p. 67) :

1 - La débenzylation et la N-décarbobenzoylation de l'acide aminé qui sont réalisées simultanément par hydrogénation catalytique ;

2 - La O-désacétylation de la fraction glucidique qui est effectuée par saponification sans provoquer de rupture de liaisons O-glycosidiques par β -élimination qui ont été stabilisées par la débenzylation du groupement carboxylique des acides aminés (voir p.104).

B - METHODES1 - Débenzylation et N-décarbobenzoylation simultanées

Nous avons appliqué le procédé de réduction catalysée par le charbon palladié décrit par JONES et al. (335). Le mode opératoire est le suivant :

250 mg d'ester benzylique du N-carbobenzoxy-O-peracétyl dérivé sont dissous dans 4 ml d'un mélange d'éthanol et d'acétate d'éthyle (4:1) (v:v). 200 mg de charbon palladié à 5 p.100 MERCK sont introduits dans la solution qui est ensuite acidifiée par l'addition de 1 ml d'acide acétique glacial. Le mélange est agité pendant 24 à 36 h sous une faible pression d'hydrogène (quelques cm de mercure) et filtré. Le filtrat, auquel on ajoute les solutions éthanoliques provenant du lavage du charbon, est concentré à siccité sous pression réduite, à la température du laboratoire. Le résidu sec est dissous dans 2 ml d'eau.

Nota. Le procédé de JONES avait été décrit par les auteurs pour effectuer la N-décarbonylation, et la O-désacétylation simultanée des composés. Nous avons observé, grâce à l'analyse chromatographique, que cette dernière était incomplète. Elle s'achevait au cours de la déméthylation du carboxyle de l'acide-amino par saponification, mais cette dernière entraînait naturellement, la rupture de nombreuses liaisons glycosidiques par β -élimination et une baisse de rendement importante.

2 - O-désacétylation

La saponification des fonctions O-acétylées peut être spécifiquement réalisée de deux manières :

- a - par la soude diluée 0,1 N à 20°C pendant 30 à 60 mn, la purification de l'hydrolysate étant ensuite effectuée par un passage sur échangeur de cations (Dowex 50 X 8 ; forme acide)
- b - par le méthylate de sodium 1 à 2 N (~~voir Appendice , p. 21~~), à 0-4°C, pendant 15 à 24 h, les ions sodium étant ensuite éliminés par un passage sur échangeurs de cations (Dowex 50 X 8 ; forme acide).

Dans les deux cas, les solutions d'élution des résines par une solution ammoniacale à 5 p.100 (v:v) sont évaporées sous vide à siccité.

C - CRITERES DE PURETE

Les quantités de substances que nous avons isolées étaient trop faibles pour préciser des propriétés physiques dont la détermination ne nous aurait pas été d'une grande utilité puisqu'aucune donnée n'existe, dans la littérature, concernant les caractéristiques des O-séryl et O-thréonyl-N-acétylglucosaminides. Aussi avons-nous préféré appliquer le procédé sensible de l'électrophorèse.

Les électrophorèses ont été effectuées, dans des cuves "en toit", sur du papier Arches 304, avec une solution aqueuse d'acide acétique et d'acide formique (80 : 15 : 5) de pH 1,5 (solution d'ATFIELD) (336), sous une tension de 10 V/cm pendant 4 h.

la révélation des électrophorogrammes a été effectuée à l'aide des réactifs suivants (voir Appendice ; p.211) :

1 - Réactif à la ninhydrine à 1 g p.100 ml d'acétone, spécifique des fonctions amine.

2 - Réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE, spécifique des oses.

3 - Réactif d'EHRlich "indirect" au p-diméthylaminobenzaldéhyde, spécifique des N-acétylosamines.

4 - Réactif de TATE et BISHOP (337) à l'hydroxylamine ferrique spécifique des liaisons esters.

D - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

1 - Les méthodes de N-décarboboxylation et de O-désacétylation successives préconisées par JONES et al., ne nous ont pas donné satisfaction car elles conduisent à des rendements très faibles pour les raisons que nous avons exposées plus haut (voir p. 90).

2 - Les rendements sont augmentés en utilisant les esters benzyliques des amino-acides car la débenzylation s'effectue en même temps que la N-décarboboxylation par hydrogénation catalytique et stabilise la liaison osidique (voir p.104).

3 - L'analyse électrophorétique des préparations obtenues montrent qu'elles sont hétérogènes (Fig. 22 ; p. 92). Elles renferment, en effet, 5 constituants dont les vitesses de migration électrophorétique, rapportées à la vitesse de migration de la sérine ou de la thréonine, sont les suivantes :

| | | | |
|--------------|---|---|-------------|
| Constituants | 1 | : | 1 |
| | 2 | : | 0,82 à 0,89 |
| | 3 | : | 0,74 à 0,78 |
| | 4 | : | 0,63 à 0,65 |
| | 5 | : | 0,28 à 0,29 |

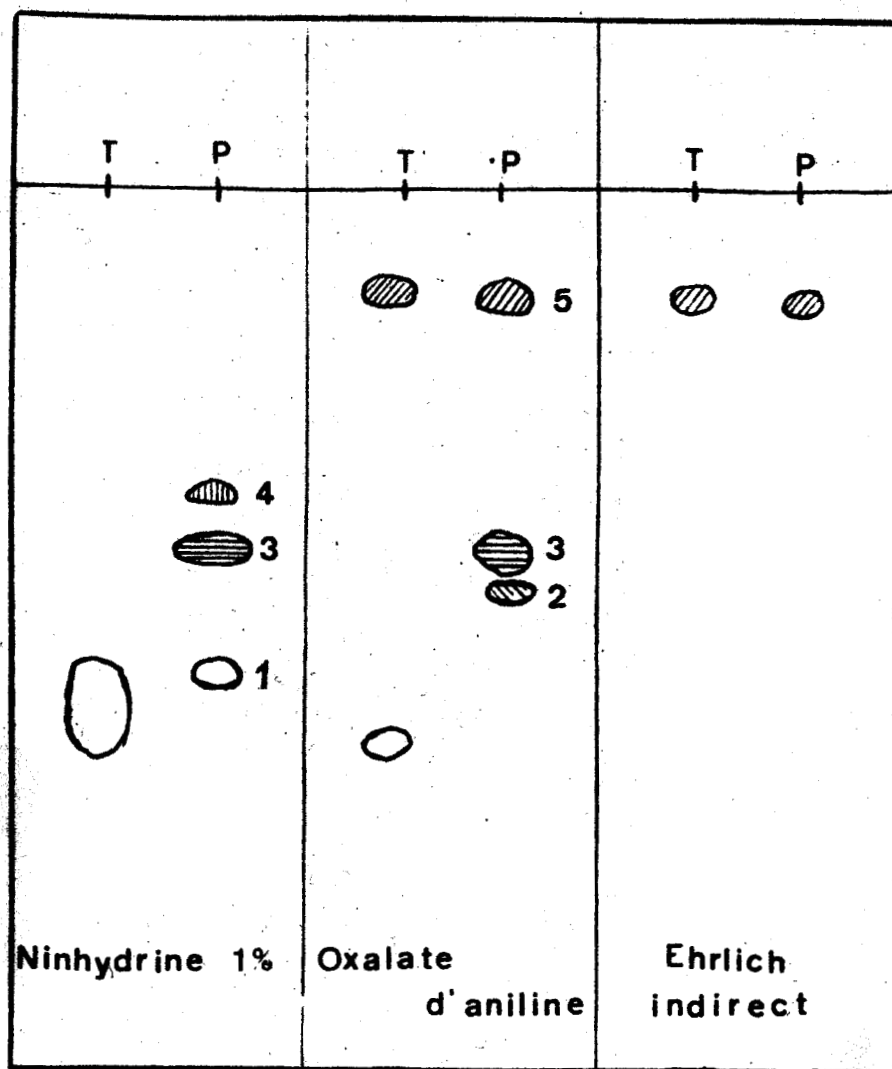


Figure 22

Electrophorèse à pH 1,5 des préparations brutes (P) de O-N-acétylglucosaminides de la sérine (ou de la thréonine). T : solution-témoin renfermant de la sérine, de la thréonine et de la glucosamine (tache n°1), de la N-acétylglucosamine (tache n°5). Les taches n°2, 3 et 4 correspondent à différents glycosides (voir texte ; p. 91). Révélation par différents réactifs.

Les 5 constituants ont été isolés par électrophorèse préparative sur papier effectuée dans les conditions décrites plus haut et soumis à diverses analyses dont les résultats ont été les suivants :

Le composé 1 est l'hydroxy-amino-acide qui a été libéré au cours de l'hydrogénation. En effet, avant et après hydrolyse chlorhydrique (HCl 5,6 N, à 105°C, pendant 24 h), il possède et conserve le comportement chromatographique, étudié à l'Autoanalyseur Technicon, de la sérine ou de la thréonine.

Le composé 2, ninhydrine et oxalate d'aniline positif, est constitué de glucosamine et de sérine (ou de thréonine) dans les proportions molaires 1 : 1. Il a été obtenu en quantité trop faible pour que nous ayons pu poursuivre l'étude de sa structure. Nous pensons qu'il s'agit du dérivé glycosidique N-désacétylé de la sérine ou de la thréonine, car il possède le même comportement électrophorétique que ce dernier que nous obtenons au cours de l'hydrolyse acide des N-acétylglucosaminides de la sérine et de la thréonine (voir p.99).

Le composé 3, ninhydrine et oxalate positif, est constitué de glucosamine et de sérine (ou de thréonine) dans les proportions molaires 1 : 1. La libération, sous l'action de β -N-acétyl-D-glucosaminidases spécifiques (+), de N-acétylglucosamine, nous permet de conclure qu'il s'agit de N-acétyl- β -D-glucosaminide de la sérine (ou de la thréonine).

Le composé 4, qui existe en très faible proportion, est en cours d'étude. Il s'agit vraisemblablement de l'anomère α car sa composition est identique à celle du composé 3.

Le composé 5 est la N-acétylglucosamine dont il possède le comportement chromatographique. Hydrolysé par l'acide chlorhydrique 4 N pendant 4 h à 100°C, il fournit de la glucosamine.

(+) Les préparations enzymatiques nous ont été aimablement fournies par les Professeurs BUDECKE et GHUYSEN à qui nous adressons nos vifs remerciements.

E - PURIFICATION DES O-SERYL et O-THREONYL- β -N-ACETYLGLUCOSAMINIDES

Les résultats précédents nous permettaient d'envisager l'isolement des glycosides, par électrophorèse préparative sur papier, puisque ceux-ci n'étaient pas accompagnés, sur les électrophorégrammes, de substances parasites.

Les électrophorèses préparatives ont été effectuées, à pH 2,4, plus favorable pour effectuer les électrophorégrammes préparatifs car il individualise mieux les N-acétyl-glucosaminides, que le tampon de pH 1,5. Après séchage à l'air ambiant des électrophorégrammes, les bandes correspondant au composé 3 ont été découpées et éluées avec de l'eau distillée. Les solutions d'éluion ont été rassemblées et évaporées à siccité par lyophilisation. Les contrôles électrophorétiques et chromatographiques de pureté que nous avons effectués montrent que les préparations obtenues donnent toujours une seule tache dans les systèmes-tampons de pH 1-5, 2-4 et 3,9 et dans les systèmes-solvants suivants :

n-butanol/acide acétique/ eau (4:1:5)

pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2).

Sur ce critère de pureté, -que nous ne considérons évidemment pas comme un critère absolu-, nous avons fondé notre expérimentation concernant les propriétés des O-séryl et O-thréonyl- β -N-acétyl-D-glucosaminides.

CONCLUSIONS

La réaction de condensation de KOENIGS et KNORR appliquée à l' α -chloro-O-peracétyl-N-acétyl-D-glucosamine et aux esters benzyliques des N-carbobenzoxyles de la sérine et de la thréonine, suivie d'une hydrogénation catalytique et d'une saponification, fournit les O-séryl et O-thréonyl- β -N-acétyl-D-glucosaminides dont la purification est réalisée par électrophorèse préparative. On obtient, de cette manière, des composés électrophorétiquement et chromatographiquement homogènes dont les caractéristiques sont les suivantes :

1 - Ils sont composés de glucosamine et de sérine (ou de thréonine) en proportions équimolaires ;

2 - Ils sont hydrolysés par des β -N-acétyl-D-glucosaminidases spécifiques en N-acétyl-D-glucosamine et en sérine (ou thréonine).

Les rendements sont malheureusement très faibles et ne dépassent pas 1 p.100. Seule, la mise au point d'un procédé de condensation à partir du dérivé bromé de la glucosamine sera susceptible de les améliorer.

II - ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DES O-SERYL et O-THREONYL- β -N-ACETYL-D-GLUCOSAMINIDES

Nous avons limité notre étude des caractéristiques des O-séryl et O-thréonyl- β -N-acétyl-D-glucosaminides aux seules propriétés dont la connaissance devrait permettre de résoudre l'énigme posée par la nature de la liaison ose-acide aminé dans l'ovomucoïde. Nous avons précisé plus haut (voir p. 57) le problème et nous rappellerons qu'il s'agissait essentiellement de démontrer s'il existait, dans l'ovomucoïde, -et plus particulièrement, dans les glycoprotide β -, des liaisons O-thréonyl-N-acétyl-glucosaminidiques. Les points essentiels concernaient :

1°) La stabilité vis-à-vis de l'acide chlorhydrique des liaisons glycosidiques et des groupements "acétamido" des glycosides, de manière à prévoir l'existence du O-thréonyl-glucosaminide dans les glycoprotide β I.

2°) Le comportement électrophorétique des glucosaminides pour savoir si le O-thréonyl-glucosaminide pouvait accompagner l'asparaginyl-glucosamine dans le glycoprotide β I.

3°) Le comportement de la liaison glycosidique des N-acétyl-glucosaminides vis-à-vis de la soude afin de préciser si l'inactivité de cette dernière sur le glycoprotide β pouvait permettre, sans erreur d'interprétation, de conclure à l'absence de liaison O-glycosidique dans l'ovomucoïde.

4°) Le comportement de la liaison glycosidique au cours des réactions de dégradation d'EDMAN.

5°) L'action de l'hydrogène sur les N-acétylglucosaminides.

1°) COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE ET ELECTROPHORETIQUE

Nous avons étudié le comportement électrophorétique et chromatographique des O-séryl- et O-thréonyl-N-acétylglucosaminides et des glucosaminides obtenus par hydrolyse chlorhydrique partielle (voir le paragraphe suivant) dans le double but d'étudier la pureté de nos préparations et de préciser les caractéristiques chromatographiques et électrophorétiques de composés susceptibles de se trouver dans les hydrolysats partiels, chimiques ou enzymatiques, de glycoprotéines.

Les électrophorogrammes ont été effectués dans des cuves "en toit", sur du papier Arches 204, à 10 V/cm pendant 4 h, dans des solutions de pH différents :

pH 1,5 : acide formique/acide acétique/eau (5:15:80) (ALTFIELD) (338)

pH 2,4 : acide acétique 1 N

pH 3,9 : pyridine/acide acétique/eau (3:10:387) (MICHL) (339)

Les chromatogrammes ont été effectués sur papier Whatman n°1 dans les systèmes-colvants suivants :

n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) (PARTRIDGE) (340)

pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2) (JERMYN et ISHERWOOD) (341)

Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés par la figure 23 (p. 97) et précisés dans le tableau VII (p. 98). Ils peuvent être résumés de la manière suivante :

1 - En électrophorèse, les N-acétylglucosaminides se comportent comme des substances "neutres" et accompagnent toujours les acides aminés "neutres". Au contraire, les glucosaminides eux-mêmes possèdent une vitesse de migration cationique inférieure à celle de la glucosamine.

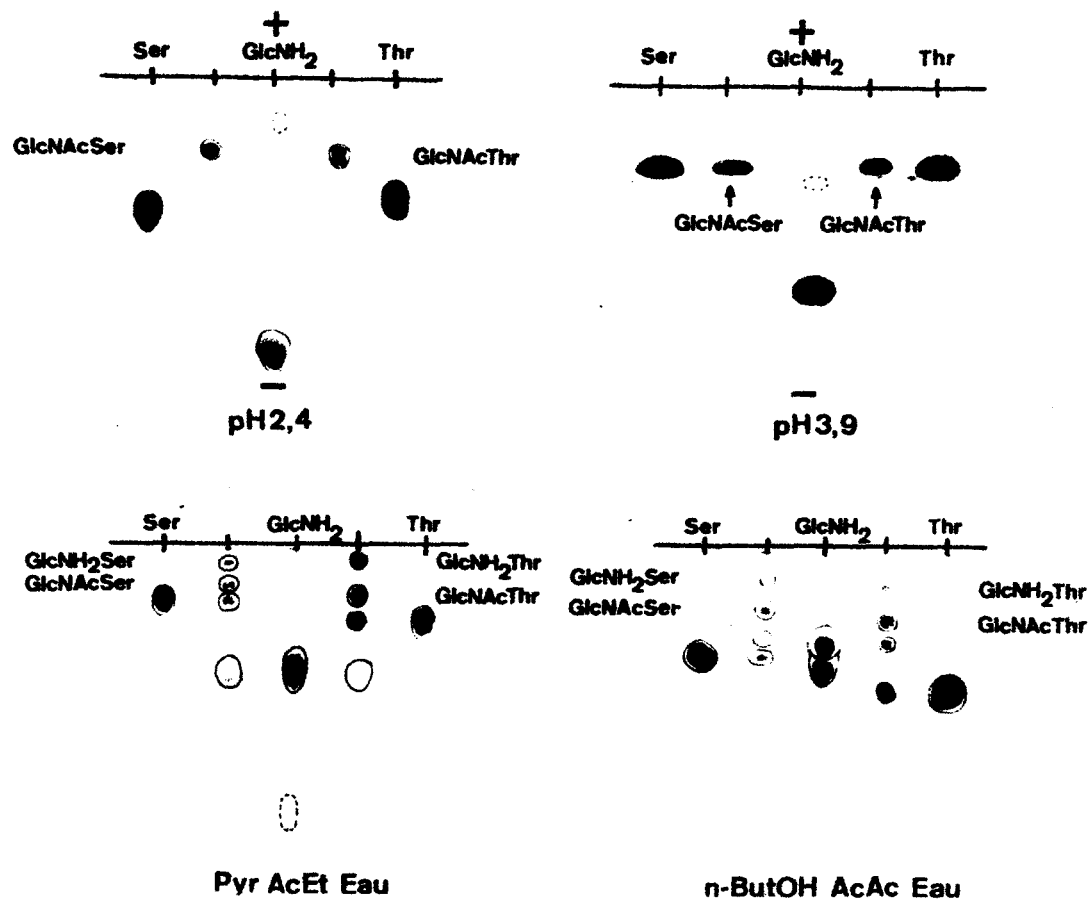


Figure 23

Electrophorèse à pH 2,4 et 3,9 (en haut) et chromatographie (en bas) dans les systèmes-solvants pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2) et n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) de la sérine (Ser); de la thréonine (Thr), de la glucosamine (GlcNH₂), des O-N-acétyl-glucosaminides de la sérine (GlcNAc-Ser) et de la thréonine (GlcNAc-Thr) et de leurs produits de N-désacétylation (GlcNH₂-Ser ; GlcNH₂-Thr). Révélation par le réactif à la ninhydrine.

Tableau VII

| Composés | Systèmes-solvants | | | |
|--|-------------------|-------------|----------|-------------|
| | A (+) | | B (++) | |
| | R Sérine | R Thréonine | R Sérine | R Thréonine |
| Sérine | 1 | 0,75 | 1 | 0,76 |
| Thréonine | 1,31 | 1 | 1,37 | 1 |
| Glucosamine chlorhydrate chlorhydrate | 0,87 | 0,66 | | |
| <i>base</i> | 1,15 | 0,85 | 2,44 | 1,72 |
| O-séryl-N-acétylglucosaminide | 0,56 | 0,43 | 0,72 | 0,53 |
| O-thréonyl-N-acétylglucosaminide | 0,68 | 0,52 | 0,92 | 0,62 |
| O-séryl-glucosaminide | 0,28 | 0,21 | 0,32 | 0,24 |
| O-thréonyl-glucosaminide | 0,34 | 0,26 | 0,25 | 0,18 |

(+) n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5)

(++) pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:1)

2 - Les études chromatographiques permettent d'énoncer les règles suivantes :

a - Le O-thréonyl-glucosaminide migre plus lentement que le O-séryl-glucosaminide. La règle est inverse dans le cas des dérivés N-acétyl-glucosaminidiques.

b - La vitesse de migration des glycosides est toujours inférieure à celle de chacun des deux constituants : l'osamine et l'hydroxy-amino-acide.

2°) ACTION DE L'ACIDE CHLORHYDRIQUE

Nous avons étudié la stabilité des O-séryl et O-thréonyl- β -N-acétylglucosaminides dans l'acide chlorhydrique 1,5 N, pendant des temps variant de 15 à 90 mn. Notre but était de vérifier si, dans les conditions d'hydrolyse (par HCl 1,5 N, à 100°C, pendant 90 mn) du glycoprotide β d'ADAM-CHOSSON isolé des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde (voir p. 52), pouvait se former un composé de comportement électrophorétique identique à celui du glycoprotide β I et qui serait le O-thréonyl-glucosaminide. Il s'agissait donc d'étudier la stabilité vis-à-vis de l'acide chlorhydrique de la liaison glycosidique et de la fonction "acétamido" des -acétyl-glucosaminides de la thréonine (et de la sérine, pour généraliser les résultats).

A - MODE OPERATOIRE

Une solution de 1 à 2 mg de O-séryl ou de O-thréonyl-N-acétyl-glucosaminide dans 0,25 à 0,50 ml d'acide chlorhydrique, 1,5 N est maintenue à 100°C. A des intervalles de temps échelonnés entre 15 et 90 mn, des prélèvements sont effectués et soumis à l'analyse électrophorétique à pH 2,4. Les composés étaient révélés par le réactif à la ninhydrine à 1 p.100.

B - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés par la figure 24 (p. 100). On voit que, légèrement en arrière de la tache de la glucosamine, subsiste après 90 mn d'hydrolyse, un composé de comportement cationique que nous avons isolé par électrophorèse préparative. L'analyse

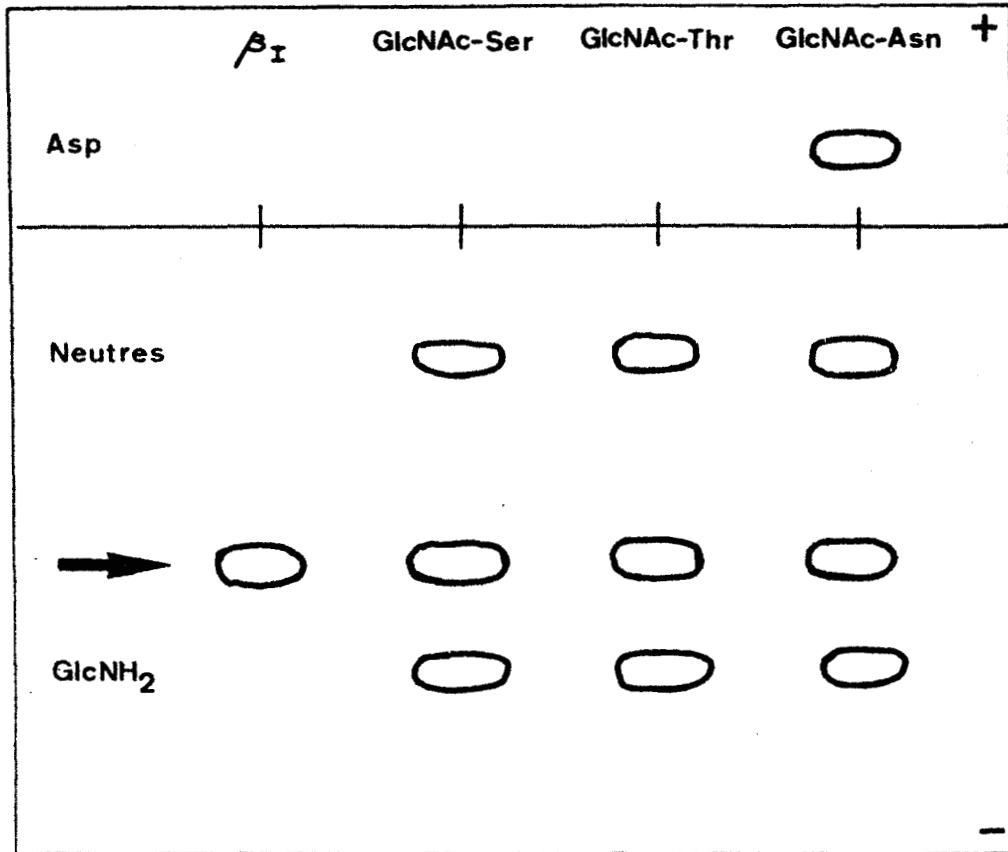


Figure 24

Electrophorèse à pH 3,9 du composé β_I d'ADAM-CHOSSON d'hydrolysats chlorhydriques (HCl 1,5 N ; 100°C ; 1,5 h) des O-séryl (GlcNAc-Ser) et O-thréonyl-N-acétylglucosaminides (GlcNAc-Thr) et du N- β -aspartyl-N-acétyl-glucosaminylamine (GlcNAc-Asn) Asp : aspartique - "Neutres" : composés "neutres" (sérine, thréonine, N-acétylglucosaminides intacts) ; GlcNH₂ : glucosamine. La flèche indique l'emplacement des O-séryl et O-thréonyl-glucosaminides et de la N- β -aspartyl-glucosaminylamine. Révélation par la ninhydrine.

chromatographique, à l'Autoanalyseur Technicon, des hydrolysats chlorhydriques de cette substance montre qu'elle est constituée de glucosamine et de thréonine (ou de sérine) dans les proportions molaires 1 : 1.

C - CONCLUSIONS

1 - Dans les conditions d'hydrolyse du glycoprotide β , de l'ovomucoïde, les O-séryl et O-thréonyl-N-acétylglucosaminides sont N-désacétylés et le proton de la fonction amine libérée, par un effet protecteur vis-à-vis de la liaison glucosaminidique, stabilise cette dernière. Cet effet s'ajoute à celui de la fonction amine de l'acide-amino comme l'a démontré SPIRO (342) au cours de ses recherches sur la stabilité d'un O-hydroxylysylglucosido-galactoside : au moment où la totalité des liaisons glucosidiques sont coupées par une hydrolyse acide, il persiste 80 p.100 de O-hydroxylysylgalactoside. Un résultat identique a été obtenu par DEREVITSKAYA et al. (343) au cours de l'étude comparative de la stabilité des O-glucosides de la sérine et de la N-carbobenzoxy-sérine. Ce double mécanisme explique qu'il subsiste du O-séryl ou du O-thréonyl-glucosaminide, dans les hydrolysats chlorhydriques des N-acétylglucosaminides.

Au contraire, dans le cas de glycosides d'oses "neutres", comme les O-séryl-galactoside et -glucoside (DEREVITSKAYA, VAFINA et KOCHETKOV (344) ; KUM et ROSEMAN (345)) et le O-séryl-xyloside, (KUM et ROSEMAN (346) et LINDAHL et RODEN (347)), la liaison glycosidique est coupée dans les conditions d'hydrolyse que nous avons décrites, car elle ne bénéficie pas de l'effet protecteur du proton porté par la fonction amine de la glucosamine.

2 - Le comportement électrophorétique du O-thréonyl-glucosaminide étant identique à celui de l'asparaginy-glucosamine, ces deux composés peuvent donc coexister dans le glycoprotide β I d'ADAM-CHOSSON.

3°) ACTION DE LA SOUDE

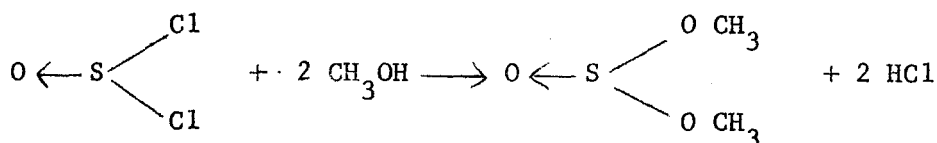
Nous avons vu (p.56) que le glycoprotide β était stable en milieu sodique, dans les conditions de dégradation des liaisons O-séryl ou O-thréonyl-glycosidique, mais que ce résultat ne permettait pas d'éliminer l'existence de ce type de liaison et les schémas de structure b de la figure 18 (p. 51). En effet, selon l'hypothèse émise par certains auteurs (HARBON (348), HARTLEY et JEVONS (349)), les O-glycosides de composés hydroxylés en β d'un carboxyle ne seraient dégradés par la soude que si ce dernier est bloqué.

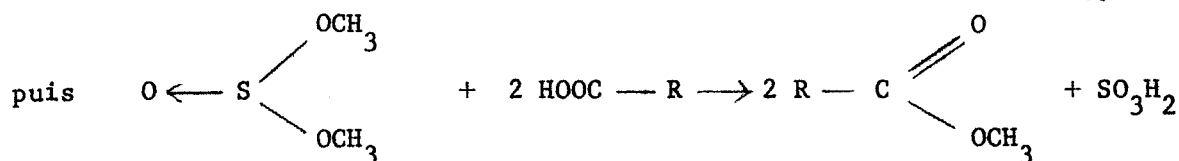
Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'action de la soude :

- 1 - sur les O-séryl- et O-thréonyl-N-acétylglucosaminides et
- 2 - sur les amides de ces derniers dont nous nous proposons donc de décrire la préparation avant d'exposer les résultats que nous avons obtenus par action de la soude sur les deux séries de composés.

A - PREPARATION DES β -N-ACÉTYL-D-GLUCOSAMINIDES DE LA SERINAMIDE ET DE LA THREONINAMIDE

1 - PRINCIPE. Dans un premier temps, les O-séryl et O-thréonyl- β -N-acétylglucosaminides sont estérifiés par le méthanol anhydre en présence de chlorure de thionyle, selon le procédé général de SOKOLOVSKY, SADEH et PATCHORNIK (350). Le mécanisme de la réaction est le suivant :





L'amidation est réalisée dans un second temps par action, sur les esters, de la butylamine que nous avons choisie, préférentiellement à l'éthylamine, trop volatile et à l'amoniac en solution méthanolique, de préparation longue et délicate car le réactif ne doit pas renfermer la moindre trace d'eau.

2 - MODE OPERATOIRE

a - Estérification. 10 à 100 mg de substance (+) sont dissous dans 5 à 50 ml de méthanol anhydre. A la solution refroidie à -5°C , on ajoute, goutte à goutte, 0,15 à 1,50 ml de chlorure de thionyle préalablement refroidi à -20°C . La réaction exothermique élève la température à $+13^\circ\text{C}$. Le mélange est maintenu à la température ambiante pendant 4 h sous agitation constante. Il est ensuite concentré sous vide à la température du laboratoire, à l'abri de toute trace d'eau.

b - Amidation. Le résidu sec est traité par 0,2 à 2 ml de n-butylamine, et la solution obtenue est évaporée à siccité, après 24 h d'action à 20°C .

3 - RESULTATS

L'analyse électrophorétique (pH 3,9 ; 400 V/cm pendant 4 h) a apporté les résultats suivants :

1 - La présence d'une tache unique, pour chacun des composés étudiés, montre que l'estérification et la réamidation sont quantitatives.

2 - Les N-acétylglucosaminides de la sérinamide et de la thréoninamide possèdent une vitesse de migration anodique nettement supérieure à

(+) Le procédé est applicable à n'importe quel glycoprotide (voir p.156).

celle de leurs homologues non amidés. Les migrations relatives, calculées par rapport à la glucosamine, sont, en effet, les suivantes :

| | |
|---|------|
| glucosamine | 1 |
| N-acétylglucosaminides de la sérinamide et de la thréoninamide | 0,70 |
| N-acétylglucosaminides de la sérine et de la thréonine | 0,40 |

B - ACTION DE LA SOUDE SUR LES N-ACÉTYL-GLUCOSAMINIDES DE LA SERINE ET DE LA THREONINE ET SUR LEURS DERIVES AMIDES

1 - MODE OPERATOIRE

1 à 2 mg de O-séryl (ou de O-thréonyl) N-acétylglucosaminide ou de son dérivé amidé sont dissous dans 1 ml d'une solution aqueuse 0,1 N en soude et 0,3 N en borohydrure de sodium. Le mélange est maintenu pendant 24 h à la température du laboratoire. Il est ensuite additionné d'acide chlorhydrique jusqu'à une concentration 5,6 N et porté au bain-marie bouillant pendant 3 h. L'hydrolysate est évaporé à siccité sous vide et analysé à l'Auto-analyseur Technicon.

2 - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

a - Les N-acétylglucosaminides de la sérine et de la thréonine sont stables en milieu alcalin.

b - Au contraire, leurs homologues amidés sont sensibles à l'action combinée de la soude et du borohydrure de sodium et la rupture de la liaison glycosidique s'accompagne de la formation de glucosaminitol et de la destruction de la sérine ou de la thréonine (Fig. 25 ; p. 105).

Nos résultats sont à rapprocher de ceux de DEREVITSKAYA et al. (351) qui ont démontré que le O-glucoside de la N-carbobenzoxy-L-sérine était stable à pH 11, pendant 24 h à 37°C, que, dans les mêmes conditions expérimentales, la méthylamide correspondante était dégradée dans la proportion de 95 p.100.

3 - DISCUSSION

MECANISME DE LA "β-ELIMINATION" (+)

Les résultats que nous avons obtenus nous permettent d'expliquer

(+) Voir la revue générale de BALLOU (352).

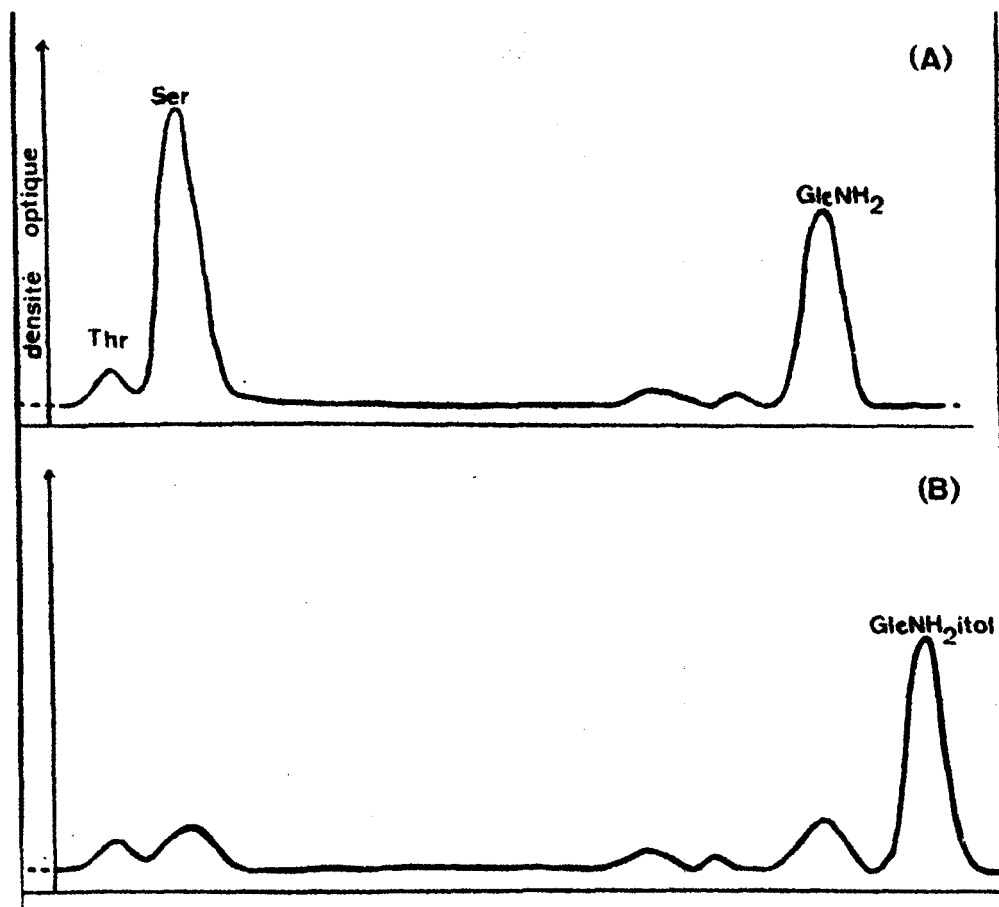
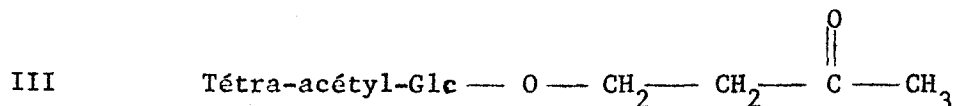
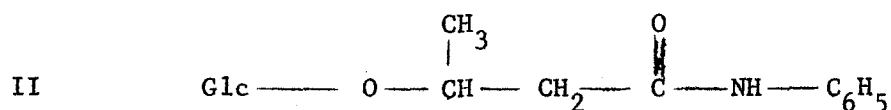
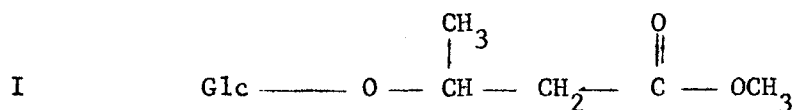


Figure 25

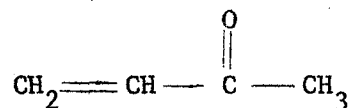
Chromatographie à l'Auto-analyseur Technicon des hydrolysats chlorhydriques (HCl 5,6 N ; 24 h à 100°C). A : schématisation des résultats obtenus avec les N-acétylglucosaminides de la sérine, avant et après l'action de la soude, et de la sérinamide avant l'action de la soude. B : du O-sérylamide-N-acétyl-D-glucosaminide après hydrolyse sodique par NaOH 0,1 N à 20°C pendant 24 h, en présence de borohydrure de potassium 0,3 N. Ser : sérine ; GlcNH₂ : glucosamine ; GlcNH₂itol : glucosaminitol.

la rupture des liaisons O-séryl et O-thréonyl-glycosidiques sous l'action de la soude et de préciser les conditions dans lesquelles cette rupture s'effectue.

La grande labilité, en milieu alcalin, des glycosides de composés β -hydroxy-carbonylés est bien connue depuis les travaux de KUHN et LOW (353) et d'ISBELL (354) et l'on sait depuis longtemps, que les composés suivants réduisent à chaud la liqueur de Fehling.



On sait aussi que l'hydrolyse de la liaison glycosidique s'accompagne d'une désaturation de l'aglycone par un processus dit de " β -élimination". Par exemple, le traitement du composé III par une solution méthanolique de méthoxyde de baryum 0,003 M à la température ordinaire fournit du glucose et la méthyl-vinylcétone :



Dans les mêmes conditions expérimentales, le 3-céto-1-butanol lui-même n'est pas modifié. La " β -élimination" implique donc la substitution de l'hydroxyle du composé β -hydroxy-carbonylé (+). En outre, suivant certains auteurs (HARBON, HERMAN-BOUSSIER et CLAUSER (355) ; HARTLEY et JEVONS (356)), -et particulièrement dans le cas de liaisons osidiques de la sérine et de la thréonine-, lorsque le groupement carbonylé fait partie d'une fonction carboxylique, celle-ci doit être bloquée. Toutefois, cette hypothèse n'avait pas reçu de confirmation au moment où nous avons entrepris nos travaux et nous nous sommes attaché à la vérifier.

La rupture, par la soude, des liaisons O-glycosidiques des β -hydroxy-amino-acides dont le groupement carboxylique est bloqué s'explique par une

(+) La substitution doit être, comme nous le verrons plus loin, effectuée, en outre, par un composé électrophile.

double induction électrophile. Elle peut être décomposée en plusieurs étapes que nous avons illustrées dans la figure 26 (p. 108).

1ère étape (Fig. 26 a). La substitution d'une fonction hydroxylée, placée en position β d'un carbonyle (" β -hydroxyle"), par un composé qui rend électrophile l'oxygène de liaison, -comme, par exemple, un reste "glycosyl"-, induit la délocalisation du doublet σ et provoque l'apparition d'une charge positive partielle sur le carbone qui la porte. Quand, en outre, le milieu est basique, les cations alcalins induisent une délocalisation du doublet π de la fonction carbonyle qui s'énolise et dont le carbone se charge électropositivement.

2è étape (Fig. 26 b). L'ionisation des carbones " β " et "carbonylé" provoque un appel d'électrons de l'hydrogène du carbone " α " (Fig. 26 a) vers celui-ci. Cette délocalisation se traduit par l'élimination du proton et par l'apparition d'un carbanion.

3è étape (Fig. 26 c). Finalement, la molécule se stabilise par une série de délocalisations d'électrons : -"désionisation" de la fonction carbonyle par attraction du doublet par le carbonium et régénération de la liaison π ; -transfert des électrons du carbanion sur le carbone β avec formation d'une liaison π , avec rupture concomitante de la liaison C-O et libération, sous la forme d'un anion, du groupement électrophile (d'un glycosyloxy-anion, dans le cas particulier que nous avons choisi).

4 - CONCLUSIONS

a - Nous avons vérifié expérimentalement l'hypothèse émise par HARBON et al. (357) et par HARTLEY et JEVONS (358) selon laquelle le groupement carboxylique de la sérine et de la thréonine O-glycosidée doit être bloqué pour que s'exerce l'action de la soude sur la liaison glucide-amino-acide. Ce résultat original présente un intérêt fondamental dans l'étude de la nature de la liaison glycanne-protide. En effet, nous avons démontré que si le groupement carboxylique de l'hydroxy-amino-acide O-conjugué au glucide est libre, une grave cause d'erreur d'interprétation d'un résultat négatif de l'action de la soude peut être commise. Pour l'éviter, les glycoprotides renfermant des β -hydroxy-amino-acides doivent être systématiquement amidés avant de faire agir la soude, de manière à bloquer le groupement carboxylique éventuellement libre d'un hydroxy-amino-acide O-conjugué à un glycanne.

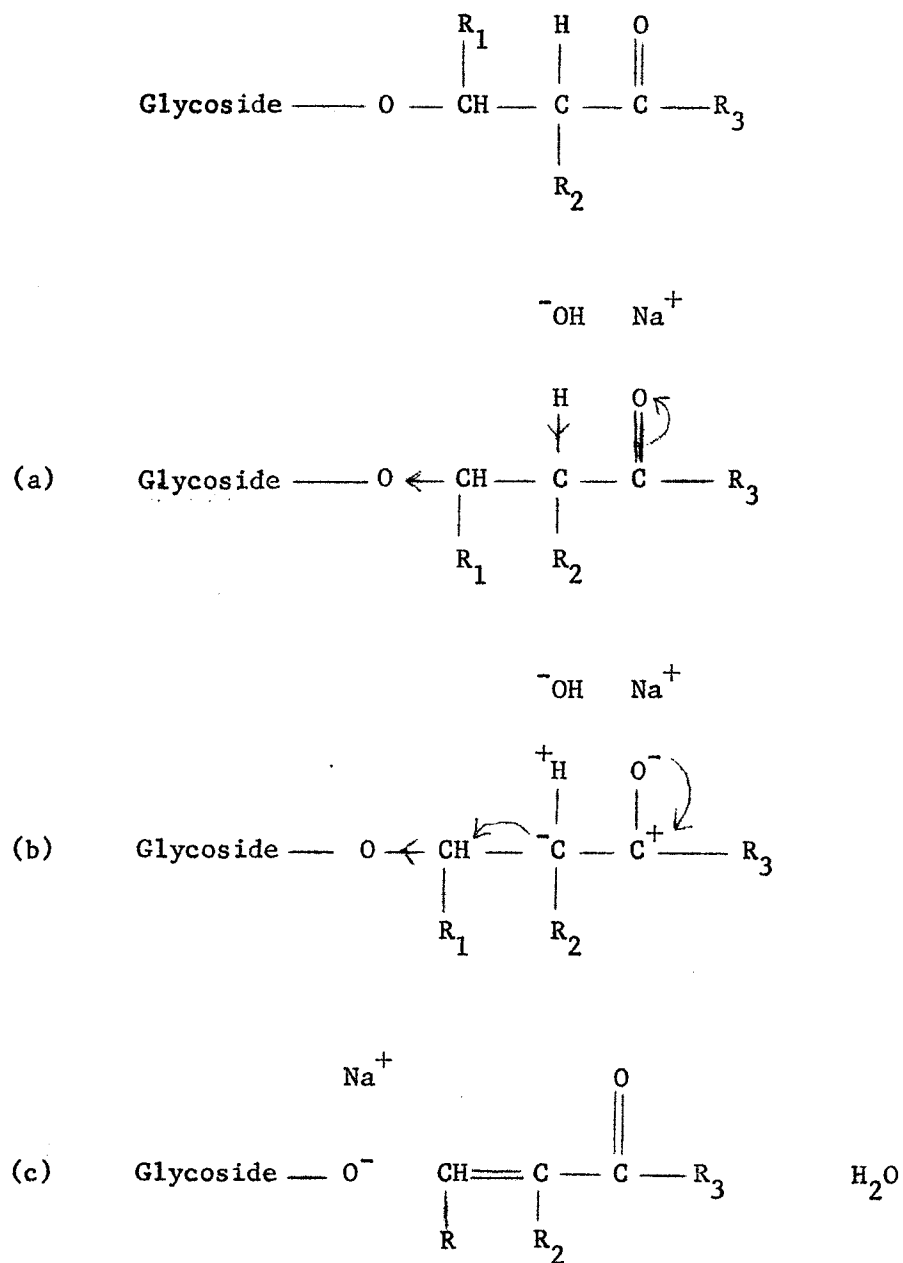


Figure 26

Mécanisme général de la "β-élimination".

Nota : La formule b correspond à une forme "limite" de la formule a.

b - Dans le cas des glycoprotides β et β_I d'ADAM-CHOSSON, on voit que l'ambiguïté subsiste puisque la stabilité vis-à-vis de la soude de ces composés, -en particulier, du composé β_I -, n'élimine pas pour autant les schémas b de la figure 18 et l'existence d'une liaison O-glycosidique de la thréonine. En effet, la résistance de cette dernière peut parfaitement s'expliquer par la non-substitution du groupement carboxylique.

4° - COMPORTEMENT DE LA LIAISON GLYCOSIDIQUE AU COURS DES REACTIONS DE DEGRADATION D'EDMAN

La réaction d'EDMAN de dégradation récurrente des chaînes peptidiques est fréquemment utilisée pour étudier les modalités de l'attache glycanne-protide. Nous verrons plus loin (p. 142) que, dans certaines conditions, l'action de l'isothiocyanate de phényle s'exerce sur l'acide aminé conjugué au glycanne et fournit un glyco-PTH-acide dont la formation apporte des résultats extrêmement précieux sur les modalités de l'attache glycanne-protide. Il était donc intéressant, d'une part, de vérifier si la liaison O-glycosidique des β -hydroxy-acides restait stable au cours des réactions de production des glyco-PTH-acides et, d'autre part, d'étudier le comportement chromatographique de ces composés.

A - MODE OPERATOIRE

Nous avons limité nos recherches au O-PTH-séryl-N-acétylglucosaminide que nous avons préparé en appliquant le mode opératoire de KONIGSBERG et HILL (359) décrit dans l'Appendice technique (p. 211). Nous avons étudié le comportement des composés obtenus, en chromatographie sur papier Whatman n°1, dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5).

B - RESULTATS

1 - Nous avons obtenu, avec un bon rendement (70 p.100 environ) la O-PTH-séryl-N-acétylglucosaminide. Celle-ci est accompagnée d'une faible quantité de N-acétylglucosamine et de PTH-sérine formées, vraisemblablement au cours de la cyclisation, par les acides acétique et chlorhydrique, du phénylthiocarbonyl-dérivé, à cause de la grande labilité des liaisons N-acétyl-

glucosaminides en milieu acide.

2 - Nous avons rassemblé, dans les tableau VIII (p.111), les résultats des analyses chromatographiques.

C - CONCLUSIONS

Les liaisons O-glycosidiques des hydroxy-amino-acides sont suffisamment stables dans les conditions de la réaction d'EDMAN pour que celle-ci puisse être appliquée à la préparation de O-PTH-séryl et de O-PTH-thréonyl-glycannes.

5° - ACTION DE L'HYDRAZINE SUR LES N-ACETYL-GLUCOSAMINIDES

L'hydrazinolyse est couramment appliquée à l'étude de la structure des glycoprotides (voir p.48). Il était donc important de préciser l'action de l'hydrazine sur les liaisons O-glycosidiques.

Nous avons observé que, dans les conditions d'hydrazinolyse décrites dans l'Appendice technique (p.211), les O-séryl et O-thréonyl-N-acétylglucosaminides étaient simplement N-désacétylés et que la liaison glycosidique restait stable. Ce résultat a été obtenu en appliquant aux produits de la réaction l'analyse électrophorétique suivant le protocole page. 99.

Cette observation, -parfaitement prévisible puisque l'action lytique de l'hydrazine sur les liaisons esters et amides est bien connue-, est du plus haut intérêt. On possède, en effet, avec l'hydrazinolyse un excellent moyen de discriminer les liaisons de type O-glycosidique des liaisons de type amide, -comme dans la N-(β -aspartyl)-glucosaminylamine. En effet, dans le cas de ce dernier composé, la liaison "asparaginyll" est coupée par l'hydrazine qui libère de l'asparthydrazide et des dérivés mal définis de la glucosamine. Sur ce principe, YOSIZAWA, SATO et SCHMID (360) sont parvenus à détacher les glycannes de l'orosomucoïde, sans que le procédé amène, toutefois, le moindre résultat sur la nature de l'ose et de l'acide aminé engagés dans la liaison.

Tableau VIII

Comportement chromatographique du O-séryl-N-acétylglucosaminide et de son dérivé phénylthiohydantoinique.

| Composés | R _{Ser} (a) | (b) | (c) |
|-----------------------------------|----------------------|-----|-----|
| Sérine | 1 | - | - |
| PTH-sérine | 5,6 | + | - |
| N-acétylglucosamine | 1,5 | - | + |
| O-séryl-N-acétylglucosaminide | 0,56 | - | (+) |
| O-PTH-séryl-N-acétylglucosaminide | 3,3 - 4,5 | + | + |

(a) Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5).

(b) Révélation par le réactif à l'azoture de sodium-iode de CHERBULIEZ et al. (361). (voir Appendice technique ; p. 211).

(c) Révélation par la réaction d'EHRLICH "indirecte" (voir Appendice technique ; p. 211).

III - CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'ensemble de nos recherches sur les O-séryl et O-thréonyl-N-acétylglucosaminides sont les suivantes :

1 - Nous avons mis au point des procédés originaux de synthèse ou de préparation de glycosides qui n'avaient pas encore été réalisés jusqu'à présent. Il s'agit des composés suivants dont nous avons, en outre, précisé les comportements chromatographiques et électrophorétiques :

le O-thréonyl- β -N-acétyl-D-glucosaminide
 le O-sérylamide- β -N-acétyl-glucosaminide
 le O-thréonylamide- β -N-acétyl-glucosaminide
 le O-séryl- β -D-glucosaminide
 et le O-thréonyl- β -D-glucosaminide.

La préparation de ces substances est décrite pour la première fois puisque les seuls glycosides d'hydroxyamino-acides dont la synthèse a été jusqu'à présent réalisée sont :

le O-séryl- β -N-acétyl-D-glucosaminide (JONES et al.) (362),
 l'ester du O-séryl- β -N-benzoyl-D-glucosaminide (MICHEEL et al.) (363),
 le O-DNP-séryl- β -N-acétyl-D-glucosaminide (VERCEL-LOTI et al.) (364).

2 - Nous avons étudié l'action de l'acide chlorhydrique sur la N-(β -aspartyl)-N-acétyl-glucosaminylamine et sur les N-acétyl-glucosaminides dans les conditions habituellement appliquées pour effectuer l'hydrolyse partielle de glycoprotides dans le but d'obtenir le glucide et l'acide aminé impliqués dans la liaison glycanne-protéine : HCl 1,5 N, à 100°C, pendant 15 à 90 mn. Nous avons, de cette manière, démontré, que la liaison O-glucosaminidyl de la sérine et de la thréonine était stable (probablement à cause de la proximité des protons des fonctions amines ionisées de la glucosamine et de l'acide aminé). Les O-séryl et O-thréonylglucosaminides peuvent donc parfaitement être présents dans des hydrolysats partiels de glycoprotides. La démonstration que leur comportement électrophorétique est identique à celui de la β -N-asparaginyl-glucosamine permettra d'éviter de graves causes d'erreur quand les liaisons de type O-glycosidique et asparaginyl-glucosamine coexisteront dans les glycoprotéines.

3 - Les liaisons O-séryl et O-thréonyl-N-acétylglucosaminides ne sont pas coupées par l'hydrazine ou par les réactifs utilisés dans la réaction de dégradation récurrente d'EDMAN.

4 - Nous avons démontré que la rupture, par la soude, d'une liaison O-glycosidique d'hydroxy-amino-acide ne pouvait s'effectuer qu'à la condition que le groupement carboxylique de ce dernier soit bloqué, soit par conjugaison peptidique "naturelle" avec un autre amino-acide, soit par amidation "artificielle". Cette information capitale que nous apportons permettra donc d'éviter des causes d'erreur dans l'interprétation des résultats de l'action de la soude sur les glycoprotides.

5- Dans le cas particulier de l'ovomucoïde, nous démontrons que, dans le glycoprotide β I d'ADAM-CHOSSON (365), -composé de glucosamine, d'acide aspartique et de thréonine, dans les proportions 2 : 1 : 1-, peuvent parfaitement coexister l'asparaginyl-glucosamine et le O-thréonyl-glucosaminide puisque ce dernier est stable dans les conditions de formation du glycoprotide par hydrolyse acide partielle du glycoprotide β . D'autre part, ce résultat n'est pas incompatible avec la stabilité de ce dernier vis-à-vis de la soude (MONTREUIL, BISERTE et CHOSSON) (366), puisque si la thréonine, portant son groupement carboxylique libre, est conjugué au glycanne par une liaison O-glycosidique celle-ci ne peut être rompue qu'après réamidation du glycoprotide. Ce mode opératoire a été appliqué aux glycoprotides provenant de l'ovomucoïde et les résultats que nous avons obtenus seront décrits dans le 2^e chapitre de la rubrique "Travaux personnels".

RECHERCHES SUR LES MODALITES
DE LA LIAISON GLYCANNE-PROTIDE
DANS L'OVOMUCOIDE

Nous avons abordé notre étude en appliquant, comme l'avait fait ADAM-CHOSSON, un procédé de dégradation du type 4 (voir p.17), fondé sur la dégradation profonde de la fraction protéinique en vue d'obtenir des glycoprotides simples. Nous envisagerons donc successivement :

1°- L'isolement des glycoprotides formés au cours de l'hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde.

2°- La détermination de la composition centésimale et molaire des glycoprotides.

3°- La structure des glycoprotides et la nature, dans ces derniers, de l'attache glycanne-protide.

1°- HYDROLYSE PRONASIQUE DE L'OVOMUCOIDE
ET
ISOLEMENT DES GLYCOPROTIDES

I - MATERIEL ET METHODES

A - L'OVOMUCOIDE

L'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule a été préparé selon le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH (367). Il contenait, suivant les préparations, de 8 à 9 p.100 d'oses "neutres" ; de 13 à 14,7 p.100 de N-acétylglucosamine et de 0,85 à 0,9 p.100 d'acide N-acétylneuraminique. Sa composition molaire était la suivante (pour un poids moléculaire de 24 000) (+) : galactose 2, mannose 9, N-acétylglucosamine 20, acide N-acétylneuraminique 1. Toutes les préparations étaient hétérogènes en immuno-électrophorèse et comportaient 4 arcs de précipitation (voir, à ce sujet, MONTREUIL, CASTIGLIONI, ADAM-CHOSSON, CANER et QUEVAL) (368).

(+) FREDERICQ et DEUTSCH (367).

B - HYDROLYSE PRONASIQUE

1° - Principe

Nous avons appliqué, dans ses grandes lignes, le procédé que YAMASHINA ET MAKINO (369) ont appliqué à l'ovalbumine en apportant, toutefois, les trois modifications suivantes

a - abandon de la solution boratée, employée par les auteurs pour tamponner les hydrolysats, et stabilisation du pH à l'aide d'un pH-stat ;

b - fixation de l'acide trichloracétique, utilisé pour purifier les hydrolysats, par un échangeur d'anions, en remplacement de l'extraction par l'éther sulfurique qui provoque des pertes sensibles de rendement en glycopeptides.

c - l'application de 4 hydrolyses pronasiques successives même lorsque la consommation de soude devient nulle à partir du 3^e hydrolysats. En effet, la libération des derniers amino-acides au voisinage de la liaison glycanne-protide n'entraîne plus de consommation de soude perceptible.

2° - Mode opératoire

A une solution de 10 g d'ovomucoïde dans 1 litre d'acétate de calcium 0,01 M, on ajoute 200 mg de Pronase (CALBIOCHEM). L'hydrolyse est effectuée à pH 8 et à 40°C, sous agitation, pendant 48 h en présence de toluène. Le pH est maintenu constant par l'addition de soude 0,1 N contrôlée par un titrateur automatique (pH-stat TTT1C Radiometer) et la consommation de soude est régulièrement déterminée. L'hydrolysats est ensuite ajusté à pH 4,5 avec de l'acide acétique glacial, puis concentré à 20 ml environ et traité par 10 volumes d'éthanol absolu. Le mélange est maintenu pendant deux heures à la température du laboratoire, puis à 2°C pendant 18 heures. Le précipité qui s'est formé est recueilli par centrifugation, dissous dans 500 ml d'acétate de calcium 0,01 M et soumis à une nouvelle hydrolyse pronasique dans les conditions décrites ci-dessus.

Ce protocole expérimental est répété encore deux fois (+), à la différence près que le précipité obtenu à partir du 4^e hydrolysate est soumis à une purification selon le mode opératoire décrit ci-dessous. Ce précipité représente le "fraction glycopeptidique I".

C - ISOLEMENT ET PURIFICATION DES GLYCOPEPTIDES

1° - Principe

Les glycopeptides sont débarrassés de l'acide trichloracétique et d'une partie des peptides par un passage sur échangeurs de cations et d'anions. Ils sont ensuite purifiés par chromatographie sur Sephadex qui élimine encore des peptides et fractionnés, enfin, sur des colonnes de résines échangeuses d'ions à l'aide d'un tampon de formiate de pyridine. En outre, certains glycopeptides ont été isolés et purifiés par électrophorèse préparative.

2° - Mode opératoire

a - Purification sur échangeurs d'ions

La "fraction glycopeptidique I" est dissoute dans 50 ml d'eau distillée et la solution obtenue est additionnée d'un volume égal d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 10 g p.100 ml.

Le précipité formé est éliminé par centrifugation, après un repos de 18 h, à 2°C. La solution surnageante est purifiée par un passage successif sur des colonnes (2 X 35 cm) 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 des colonnes (1 litre), est concentré à 20 ml, dans un évaporateur rotatif. Les glycopeptides sont isolés par l'addition de 10 volumes d'éthanol absolu. Ce précipité représente la "fraction glycopeptidique II".

(+) Fréquemment, à partir de la 3^e précipitation éthanolique, le mélange se gélifie et il est nécessaire d'ajouter un volume d'éther sulfurique pour sédimenter le précipité par centrifugation.

b - Purification par chromatographie sur gel de dextranne

La fraction glycopeptidique II est débarrassée des peptides qui n'ont pas été retenus par les échangeurs d'ions, par une chromatographie sur colonne (2 X 35 cm) de gel de Sephadex G-25. La quantité de précipité chromatographié est de l'ordre de 400 mg et le déplacement des composés est effectué avec de l'eau distillée. Le repérage des constituants présents dans l'effluent est réalisé en dosant les glucides par la méthode colorimétrique au phénol-sulfurique de DUBOIS et al. (370) (~~voir Appendice technique p. 211~~) et les protéides par le procédé à la ninhydrine de MOORE et STEIN (371 bis) (voir Appendice technique ; p. 211) ou par la technique aux dinitrophényl dérivés de GHUYSEN, TIPPER, BIRGE et STROMINGER (371 bis) (voir Appendice technique ; p. 211). On obtient de cette manière (Fig 27 ; p. 118) une fraction enrichie en glycopeptides. Il s'agit de la "fraction Sephadex"

c - Fractionnement par chromatographie sur résine échangeuse de cations

350 mg de la fraction Sephadex, en solution dans 2 ml d'eau distillée, sont soumis à la chromatographie sur colonne (2 X 40 cm) de Dowex 50 W X 2 ("mesh" 200-400 ; forme acide) et le repérage des constituants des fractions d'éluion est effectué en appliquant le procédé de dosage colorimétrique des glucides de DUBOIS et al. Le passage d'un litre d'eau distillée fournit une première fraction ("Fraction α ") (Fig. 28 ; p. 119) qui est constituée par deux pics d'éluion que nous avons rassemblés en raison de l'identité de leur comportement électrophorétique et de leur composition en glucides et en acides aminés. Le déplacement des glycopeptides fixés sur la colonne est ensuite réalisé, à pH 3,0, à l'aide d'un gradient de concentration en formiate de pyridine (système à deux réservoirs cylindriques contenant, le premier, 8 ml de pyridine, 12,5 ml d'acide formique et 479,5 ml d'eau distillée ; le second, 160 ml de pyridine, 250 ml d'acide formique et 90 ml d'eau distillée). On obtient, de cette manière, les fractions β et γ (Fig 28 ; p. 119) que l'on débarrasse du formiate de pyridine par simple évaporation sous vide à l'évaporateur rotatif, suivie d'une lyophilisation poussée.

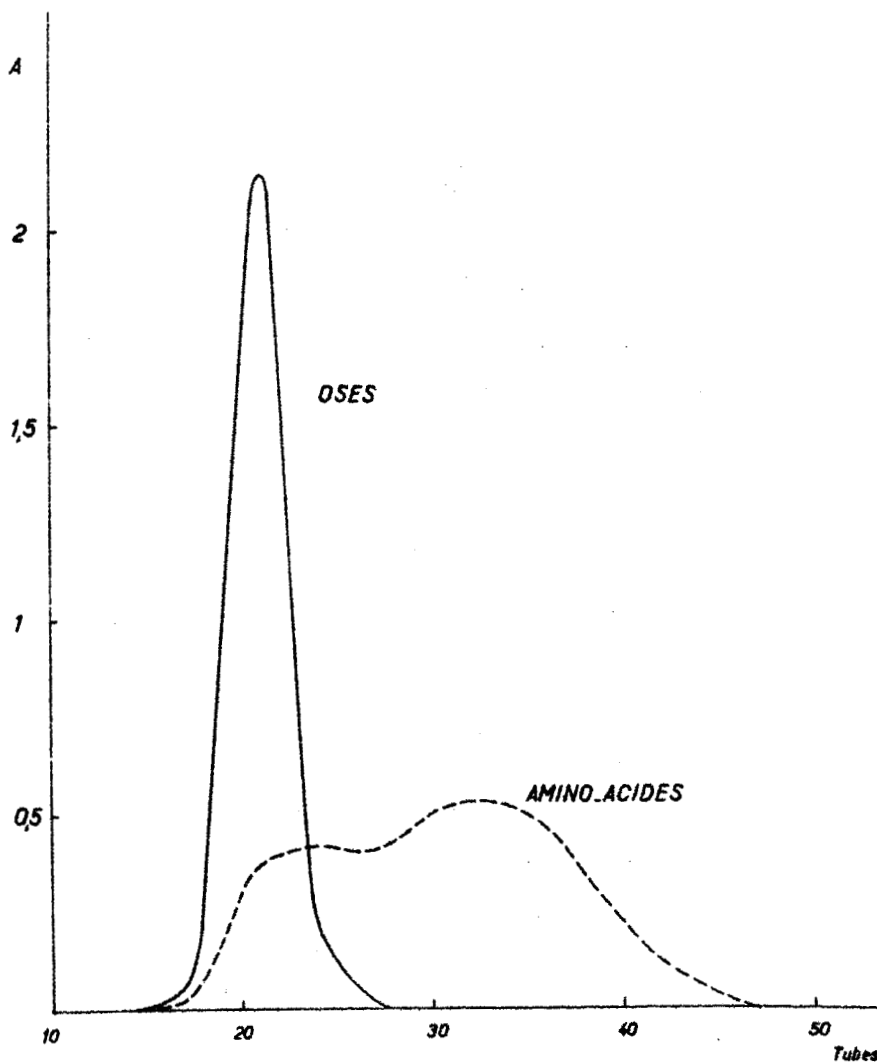


Figure 27

Diagramme d'élution sur Sephadex G 25 d'un hydrolysate pronasique d'ovomucoïde. Colonne de 2 X 35 cm pour 400 mg de préparation ; élution par l'eau ; fractions de 2 ml ; débit : 0,5 ml/mn. En traits pleins : dosage des oses "neutres" par le phénol-sulfurique ; en traits pointillés : dosage des protides par la ninhydrine.

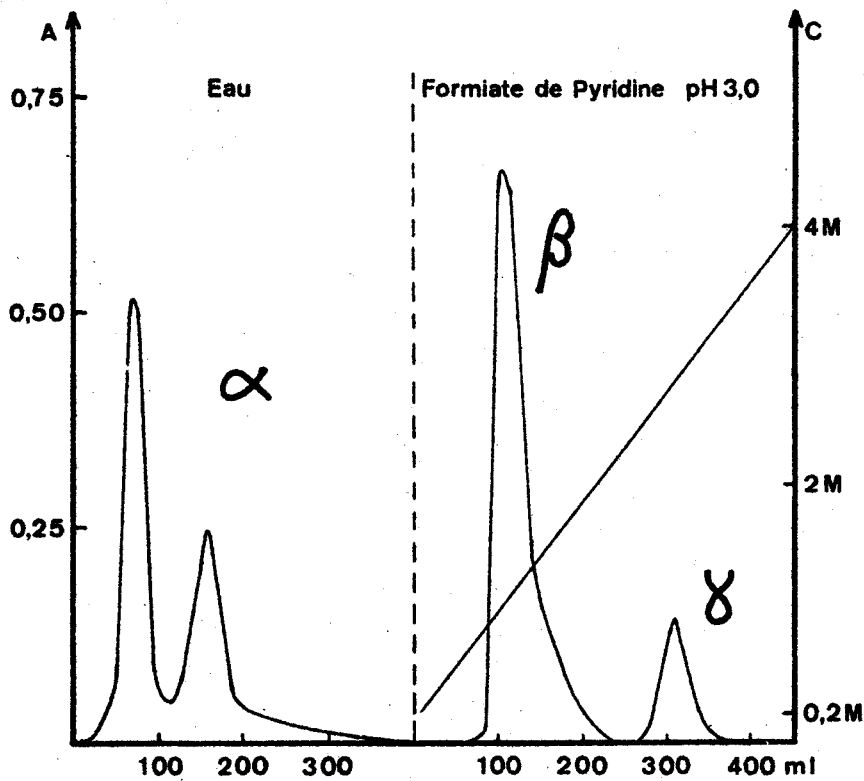


Figure 28

Diagramme de fractionnement des glycoprotides de l'ovomucoïde (350 mg) préalablement purifiés par chromatographie sur Sephadex G 25, sur colonne (2 X 40 cm) de Dowex-50 W X 2 ("mesh" 200-400 ; forme acide ; fractions de 10 ml ; débit : 0,5 ml/mm). Repérage des composés glycoprotidiques par le phénol sulfurique. En ordonnées : A : absorbance ; C : concentration en formiate de pyridine. En abscisses : volumes d'élution..

Nota. Le mode opératoire remplace celui qu'appliquait ADAM-CHOSSON et qui s'inspirait directement du protocole expérimental décrit par IZUMI, MAKINO et YAMASHINA (372) : fractionnement sur colonnes de SE-cellulose et déplacement des glycopeptides successivement par de l'eau ("Fraction α ") et par une solution de citrate de sodium 0,02 M de pH 3 ("Fractions β et γ "). Le procédé offrait le désavantage d'exiger l'élimination du citrate de sodium par un passage sur échangeurs de cations et d'anions qui provoquait des pertes sensibles de rendement.

d - Sous-fractionnement électrophorétique de la "fraction α "

La "fraction α ", très hétérogène (Fig 29 ; p. 121), est soumise à l'électrophorèse préparative sur papier Arches 304 dans les conditions expérimentales suivantes : pH 1,5 (solution de 150 ml d'acide formique concentré et de 50 ml d'acide acétique glacial dans 800 ml d'eau distillée) ; 12 V/cm pendant 4 h. Chacune des fractions obtenues est ensuite purifiée par une électrophorèse préparative effectuée dans les mêmes conditions sur papier MACHEREY-NAGEL 807 (sans amino-acides). Nous nous sommes limité à l'étude ultérieure des fractions α_3 et α_4 qui étaient les plus abondantes.

II - RESULTATS

Nous avons illustré, dans les figures 27 (p. 118), 28 (p. 119) et 29 (p. 121) et dans le tableau X (p. 130) les résultats que nous avons obtenus à propos du fractionnement des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde et que nous pouvons résumer de la manière suivante :

1° - La combinaison de la chromatographie sur résines échangeuses d'ions, sur Sephadex et sur cellulose modifiée permet d'obtenir, à partir des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde, 3 fractions glycopeptidiques très purifiées : les fractions α , β et γ dans les proportions relatives de 25 à 30 p.100, 68 à 75 p.100 et 0 à 2 p.100.

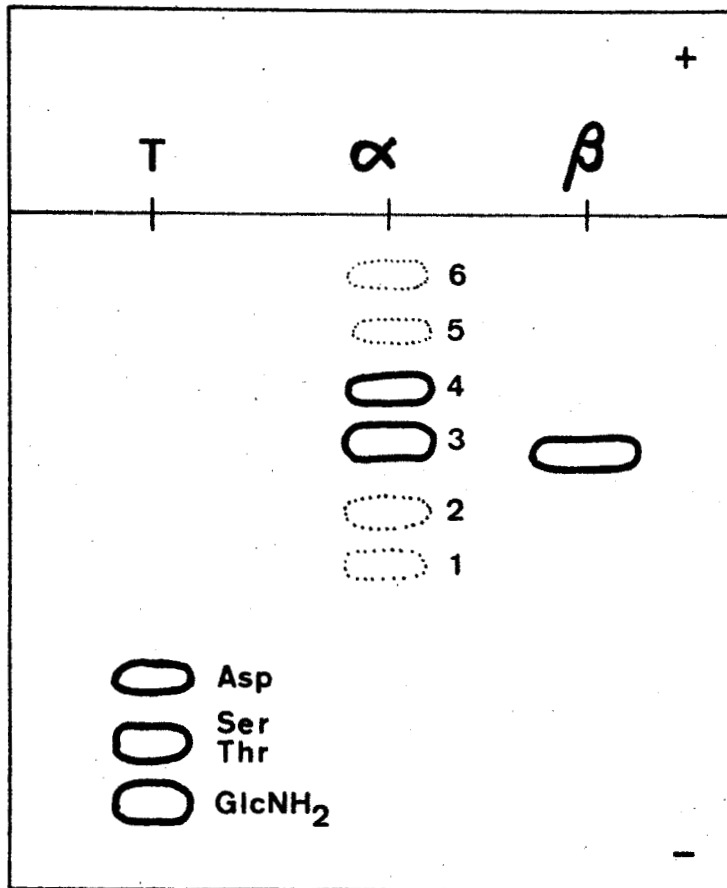


Figure 29

Electrophorèse sur papier des fractions α et β obtenues par chromatographie sur DOWEX 50 X 2. Voir, dans le texte, les conditions expérimentales. T : solution-témoin de composés purs ; Asp : acide aspartique ; Ser : sérine ; Thr : thréonine ; GlcNH₂ : glucosamine. α et β : respectivement, fractions α et β .

2° - Les fractions β et γ sont homogènes. Au contraire, la fraction α est hétérogène en électrophorèse sur papier puisqu'elle contient au moins 5 constituants. Parmi ceux-ci, on peut isoler, par électrophorèse préparative sur papier, deux fractions majeures (80 p.100 de la Fraction α) : les fractions α_3 et α_4 ; en proportions sensiblement identiques.

3° - En effectuant systématiquement et d'une manière comparative le dosage des oses dans les différentes fractions que nous avons obtenues, d'une part, à l'aide de notre procédé et, d'autre part, en appliquant le procédé original de YAMASHINA et MAKINO (373) et d'IZUMI, MAKINO et YAMASHINA (374), nous avons observé que les pertes totales étaient, dans le premier cas, de 4 à 6 p.100, tandis qu'elles atteignaient 30 à 45 p.100 dans le second cas (voir le tableau IX ; p. 123).

III - DISCUSSION

A - Les modifications que nous avons apportées au procédé original d'hydrolyse pronasique des glycoprotéines décrit par YAMASHINA et MAKINO (375) et par IZUMI, MAKINO et YAMASHINA (376) permettent d'obtenir des glycoprotides avec un meilleur rendement. Ces améliorations sont principalement dues :

1) à l'abandon du borate de sodium comme tampon au cours de l'hydrolyse ;

2) au remplacement de l'extraction par l'éther de l'acide trichloracétique, par un passage sur échangeur d'anions ;

3) à une purification par chromatographie sur Sephadex qui élimine les holoprotides de faible poids moléculaire ;

4) au remplacement, pour effectuer le fractionnement des glycopeptides par chromatographie d'échanges d'ions, de la SE- ou de la SM- cellulose par une résine faiblement réticulée (Dowex 50W X 2).

B - L'application des procédés de fractionnement que nous avons décrits permet d'isoler deux fractions principales α et β . La fraction β est homogène en électrophorèse, tandis que la fraction α se dissocie en plusieurs bandes.

Tableau IX

Détermination des pertes en glycopeptides (+) au cours de l'hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde effectuée par différents procédés.

| Stades de l'hydrolyse pronasique | Procédé de YAMASHINA <u>et al.</u> | | Procédé personnel |
|----------------------------------|---|--|---|
| | p.100 de pertes dans le surnageant alcoolique | p.100 de pertes dans le précipité (++) | p.100 de pertes dans le surnageant alcoolique |
| 1ère hydrolyse | 1 à 2 | 4 à 5 | 1 à 2 |
| 2è hydrolyse | 2 | 8 à 15 | 1 à 2 |
| 3è hydrolyse | 2 | 8 à 15 | 1 |
| 4è hydrolyse | 1 | 8 à 15 | 1 |
| Pertes totales | 34 à 52 p.100 | | 4 à 6 p.100 |

(+) Déterminées en dosant les glucides dans les fractions éliminées.

(++) Ce précipité se forme au cours de la concentration de la solution boratée d'hydrolyse.

Parmi celles-ci, nous avons retenu les bandes α_3 et α_4 qui représentaient les constituants majeurs.

C - En outre, dans certains hydrolysats, nous avons isolé, mais toujours en faible quantité, la fraction γ décrite par ADAM-CHOSSON.

IV - CONCLUSIONS

L'application d'un procédé original du fractionnement des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde nous a permis d'isoler trois fonctions glycoprotidiques majeures : les fonctions α_3 , α_4 et β . En outre, la fraction γ d'ADAM-CHOSSON est présente dans certains hydrolysats.

2° - COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE
DES FRACTIONS GLYCOPROTIDIQUES PRESENTES
DANS LES HYDROLYSATS PRONASIQUES DE
L'OVOMUCOIDE

I - MATERIEL ET METHODES

A - COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES

La composition centésimale des glycopeptides en glucides a été déterminée par l'application des procédés classiques de dosage colorimétrique des glucides : les hexoses "neutres" (galactose + mannose); par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (377), modifiée par RIMINGTON (378) ; la glucosamine, par la méthode d'ELSON et MORGAN (379), modifiée par BELCHER, NUTTEN et SAMBROOK (380), après une hydrolyse de 4 h, par HCl 4 N redistillé, en tube scellé sous vide ; l'acide N-acétyl-neuraminique, par la méthode à la diphénylamine de WERNER et ODIN (381) ; les groupements acétyl, par la méthode de PHILLIPS (382) (+).

B - COMPOSITION MOLAIRE

La détermination de la composition molaire d'un composé exige la connaissance de sa masse moléculaire. Nous ferons donc précéder l'exposé concernant les procédés d'identification et de dosage des oses et des acides aminés que nous avons appliqués aux fractions α_3 , α_4 et β , par la description des méthodes de calcul de la masse moléculaire de ces dernières.

1. - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DES GLYCOPROTIDES

La masse moléculaire des glycoprotides a été déterminée expérimentalement par 3 procédés :

a - procédé physique appliquant l'équation de SVEDBERG, qui fait intervenir les constantes de sédimentation et de diffusion libre et le

(+) Les procédés de dosage colorimétriques des oses sont tellement classiques que nous n'avons pas jugé utile de les décrire dans l'Appendice technique et nous nous sommes limité au seul exposé de la méthode de PHILLIPS (voir Appendice technique ; p. 211).

volume spécifique partiel.

b - procédé physique, fondé sur la loi de STOKES, qui associe les constantes de sédimentation et de viscosité ;

c - procédé chimique fondé sur le dosage des groupements N-terminaux des amino-acides. En outre, la masse moléculaire a été calculée d'après la composition molaire des glycoprotides.

a - Application de la formule de SVEDBERG

Ce procédé fait intervenir les constantes de sédimentation et de diffusion libre et le volume spécifique partiel.

Les constantes de sédimentation et de diffusion ont été mesurées à 20°C sur des solutions de glycopeptides dans un tampon phosphate 0,1 M de pH 6,5 (+).

Le volume spécifique partiel a été déterminé expérimentalement par picnométrie ou calculé d'après la composition des glycopeptides (voir Appendice technique ; p. 211).

La masse moléculaire M est calculée en appliquant la formule de SVEDBERG :

$$M = \frac{S_0}{D_0} \cdot \frac{RT}{1 - V_{sp} \cdot \rho}$$

où : S_0 : constante de sédimentation extrapolée à une dilution infinie ;

D_0 : constante de diffusion libre extrapolée à une dilution infinie ;

R : constante des gaz parfaits ($8,303 \cdot 10^{-7}$) ;

T : température absolue (293°) ;

V_{sp} : volume spécifique partiel ;

ρ : densité de la solution-tampon.

(+) Nous exprimons notre reconnaissance à Monsieur le Professeur J. TONNELAT qui a effectué les déterminations des constantes de sédimentation et nous remercions vivement Mademoiselle A. BARNEOUD de sa précieuse collaboration technique.

b - Application de la loi de STOKES (+)

Nous avons appliqué la loi de STOKES selon laquelle la masse molaire d'un composé peut être déterminée en utilisant la formule suivante :

$$M = 9\sqrt{2} \cdot \frac{N \pi}{v} \left[\frac{\eta s_0 v}{1 - v\rho} \right]^{3/2}$$

où : N : nombre d'AVOGADRO ;

v : volume spécifique partiel ;

η : viscosité du solvant en poises ;

ρ : densité du solvant ;

s_0 : constante de sédimentation, exprimée en secondes, à 20°C, pour une dilution infinie.

c - Procédé chimique

α - Principe. Les groupements N-terminaux des amino-acides sont dosés selon la technique du fluoro-dinitrobenzène de GHUYSEN, TIPPER, BIRGE et STROMINGER (384).

Les dosages sont effectués par rapport à des témoins constitués par les acides aminés dont la position N-terminale a été préalablement déterminée par l'application des procédés décrits plus loin (voir p. 140). On élimine de cette manière, la cause d'erreur due aux différences d'absorbance molaire des DNP-amino-acides.

β - Mode opératoire. Le procédé de dosage lui-même est décrit dans l'Appendice technique (voir p. 211). Il permet de préciser le nombre de micromoles d'amino-acides par rapport à la masse de composé utilisée. La masse

(+) Voir la revue générale d'ELIAS (383).

moléculaire est calculée en appliquant la formule :

$$M = \frac{P \cdot 1000}{\mu M}$$

où : P : poids de substance en mg ;

μM : nombre de micromoles d'acide aminé N-terminal pour le poids P.

2. - IDENTIFICATION ET DOSAGE DES OSES ET DES ACIDES AMINES CONSTITUANT LES GLYCOPROTIDES

a - Identification et dosage des oses

α - La composition molaire des glycopeptides en oses "neutres" a été déterminée par chromatographie quantitative sur papier en appliquant les modes opératoires décrits par MONTREUIL, SPIK, DUMAISNIL et MONSIGNY (385) dont nous nous limitons à exposer le principe :

-hydrolyse par HCl 1,5 N, à 100°C, pendant 1,5 h ;

-purification sur résines échangeuses de cations (Dowex 50 X 8 ; forme acide) et d'anions (Duolite A-102-D ; forme acétate) ;

-chromatographie quantitative sur papier dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) et dosage des oses par les méthodes de HUGHES et JEANLOZ (386) (élution par l'éthanol chlorhydrique des taches données par le réactif au citrate d'aniline de DATE (387)) et de MONTREUIL et SCHEPPLER (388) (élution des oses repérés par la révélation de témoins latéraux et dosage réductimétrique par le ferricyanure de potassium).

β - Le nombre de résidus d'acide N-acétylneuraminique a été déterminé d'après les résultats fournis par les dosages colorimétriques (voir p. 125).

γ - La glucosamine a été dosée, en même temps que les acides aminés, à l'Auto-analyseur Technicon, suivant le mode opératoire décrit ci-dessous.

b - Identification et dosage des acides aminés

Les acides aminés (et la glucosamine) ont été dosés par chromatographie à l'Auto-analyseur Technicon (colonne de 0,6 X 150 cm ou 0,6 X 65 cm) selon le procédé général de PIEZ et MORRIS (389) (voir Appendice technique ; p.211) en utilisant des systèmes originaux de formation du tampon dans un "Autograd" à 9 compartiments que nous décrivons dans l'Appendice technique (voir p. 211).

II - RESULTATS

Nous avons précisé dans les tableaux X (p. 130 et 131) et XI (p. 132.) les compositions centésimales et molaires en glucides et en acides aminés des différentes fractions que nous avons obtenues. On voit que :

1° - Les fractions glycopeptidiques I et II et la fraction Sephadex sont très riches en glucides et contiennent une faible proportion d'acides aminés. En outre, les rapports oses "neutres"/N-acétylglucosamine et oses "neutres"/acide N-acétylneuraminique sont, dans les 3 fractions, identiques à ceux de l'ovomucoïde natif. L'hydrolyse pronasique a donc respecté le glycanne.

2° - La chromatographie sur Dowex 50 X 2 (Fig. 28 ; p. 119) des glycoprotides préalablement purifiés sur Sephadex G-25, fournit trois fractions ("Fractions α , β et γ ") qui sont différentes par leur composition en glucides et en acides aminés.

a - L'étude de la composition en glucides des 3 fractions montre qu'il existe deux groupes bien distincts de glycoprotides dans les hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde : l'un, fraction α , contient des sia-loglycoprotides et l'autre, fractions β et γ , des asialoglycoprotides. La présence d'acide N-acétylneuraminique dans le glycoprotide α explique son

à partir d'hydrolysats pronasiques d'une préparation d'ovomucoïde.

| ANAN (c) | | Oses "neutres" | | Oses "neutres" | | Glucides totaux | Glycane p.100 (d) |
|----------|-------|----------------|-------|----------------|------|--------------------|-------------------------|
| (e) | (f) | Glc NAc | | ANAN | | | |
| (e) | (f) | (e) | (f) | (e) | (f) | | |
| 0,90 | 0,029 | 0,60 | 0,735 | 9,45 | 21,8 | 23,5 | 21,5 |
| 2,0 | 0,065 | 0,60 | 0,732 | 8,40 | 19,5 | 46,8 | 42,75 |
| 2,95 | 0,096 | 0,60 | 0,733 | 9,28 | 21,6 | 76,15 | 69,4 |
| 3,50 | 0,114 | 0,635 | 0,78 | 9,20 | 20,5 | 86,2 | 78,8 |
| 11,47 | 0,368 | 0,725 | 0,89 | 3,29 | 6,3 | 101,47 | 92,6 |
| 3,50 | 0,114 | 0,586 | 0,72 | 9,12 | 21,9 | 89,9 | 82,7 |
| 10,6 | 0,345 | 0,80 | 0,98 | 3,24 | 5,5 | 88,1 | 80,7 |
| 0 | 0 | 0,48 | 0,59 | - | - | 95,7 | 87,3 |
| 0 | 0 | 0,467 | 0,57 | - | - | 71,9 | 65,7 |

(e) Valeurs exprimées en g d'oses pour 100 g de glycoprotides, obtenues par dosage colorimétrique par rapport à des témoins "oses libres".

(f) Valeurs exprimées en millimoles par g de glycoprotides.

Tableau XI

Composition molaire en glucides et en acides aminés et masses moléculaires des fractions α_3 , α_4 , β et γ .

| | Désignation du glycoprotide | | | |
|---|-----------------------------|----------------|---------------|----------|
| | α_3 | α_4 | β | γ |
| Galactose | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Mannose | 2 | 3 | 5 | 5 |
| <u>N</u> -acétylglucosamine | 5 | 4 | 10 | 10 |
| Acide <u>N</u> -acétylneuraminique | 0,3 (+) | 1 | 0 | 0 |
| Acide aspartique | 1 | 1,14 | 1,15 | 1,4 |
| Thréonine | - | 0,66 | 0,85 | 0,6 |
| Sérine | 0,17 | 0,29 | - | - |
| Cystine | - | - | - | 1,4 |
| <u>Masse moléculaire</u> | | | | |
| par ultra-centrifugation et diffusion | - | 1885 | 3200 | - |
| calculée d'après la loi de STOKES | - | 2015 | 3200 | - |
| par dosage des NH_2 | - | 1850 \pm 150 | 3200 \pm 50 | - |
| calculée d'après la composition molaire | 1745 | 1958 | 3220 | 3543 |

(+) Ce résultat anormal pourrait s'expliquer par une hydrolyse de liaisons sialosyl au cours des expérimentations.

comportement lors de la chromatographie sur les colonnes de Dowex 50 X 2.

En outre, la répartition du galactose, du mannose et de la N-acétylglucosamine est différente dans les deux groupes : proportions 1 : 3 : 4 dans le premier ; proportions 1 : 5 : 10 dans le second.

b - L'étude de la composition en acides aminés des différentes fractions glycoprotidiques montre que les unes renferment seulement de l'acide aspartique, tandis que les autres contiennent de la thréonine. Seule, la fraction γ contient, outre de l'acide aspartique et de la thréonine, de la cystine. Celle-ci a été identifiée par chromatographie sur papier grâce à l'application de réactifs spécifiques. Dans tous les cas, la composition en acides aminés de la fraction protidique est simple et révélatrice d'une action très profonde de l'enzyme dans les conditions expérimentales que nous avons décrites.

3° - L'application, aux fractions α_4 et β , de la méthode des DNP (voir p. 127) de GHUYSEN, TIPPER, BIRGE et STROMINGER (390) a fourni, comme valeurs de masses moléculaires, respectivement, 1850 (\pm 150) et 3200 (\pm 50). Ces valeurs sont en accord avec celles qui ont été calculées, d'une part, d'après la composition molaire des glycopeptides (voir Tableau XI ; p. 132) et, d'autre part, en appliquant la formule de STOKES (voir p. 126).

Les faibles quantités de fraction γ dont nous disposions ne nous ont pas permis d'appliquer la méthode de GHUYSEN. Quant à la fraction α_3 , les résultats étaient trop dispersés pour être interprétés. Dans ce cas particulier, l'échec du procédé pourrait s'expliquer par une interférence, dont l'origine nous échappe.

4° - L'ultra-centrifugation des fractions α et β a fourni les valeurs de constantes de sédimentation suivantes :

| Concentration (en mg p. ml) | "Fraction α " | "Fraction β " |
|--------------------------------|----------------------|---------------------|
| 10 | 0,5 | 0,66 |
| 5 | 0,54 | 0,78 |
| 2,5 | 0,62 | 0,81 |
| <hr/> | <hr/> | <hr/> |
| S_{20}^0 | $0,64 \pm 0,04$ | $0,87 \pm 0,03$ |

Les valeurs des constantes de diffusion libre et du volume spécifique partiel étant, respectivement : 12,8 et 0,61 pour la fraction α ; 9,93 et 0,62 pour la fraction β , les poids moléculaires sont donc de 1885 pour la fraction α et de 3250 pour la fraction β . On voit que ces valeurs sont très voisines de celles qui ont été obtenues par l'application de la loi de STOKES, d'une part, par le procédé de dosage des groupements N-terminaux, d'autre part, par le calcul effectué d'après la composition molaire, enfin (tableau XI ; p. 131).

III - DISCUSSION

I - Les modifications que nous avons apportées au procédé original d'hydrolyse pronasique des glycoprotéines décrit par YAMASHINA et MAKINO (391) et IZUMI, MAKINO et YAMASHINA (392) permettent d'obtenir des glycoprotides simples dont la fraction peptidique renferme rarement plus de trois amino-acides. Fréquemment, un seul amino-acide est présent et le partenaire protidique de la liaison glycanne-protéine est alors, d'emblée, identifiée. L'hydrolyse pronasique de certaines glycoprotéines est parfois tellement profonde que le simple passage sur échangeurs d'ions fournit d'emblée des glycopeptides purs (voir, par exemple, le cas des globulines γ G (p. 167) et de la transferrine (p.176)).

En outre, la fraction glycanne de l'ovomucoïde est respectée par la pronase.

Nous devons, toutefois, signaler que l'action de certaines préparations de pronase s'accompagne parfois d'une perte en acide sialique et que, dans ce cas, la plus grande prudence doit donc être observée dans l'utilisation des glycopeptides en vue d'étudier la structure de la fraction glycanne.

Les dégradations profondes des glycoprotéines que nous obtenons s'expliquent par le fait que nous effectuons, contrairement aux autres auteurs, quatre hydrolyses pronasiques au lieu de deux ou trois, même lorsque, comme nous l'avons vu plus haut, la consommation de soude devient négligeable ou nulle dès la 3^e hydrolyse.

II - L'application des procédés de fractionnement que nous avons décrits permet d'isoler deux fractions principales (α et β) qui diffèrent par la composition en glucides de leur fraction glycanique. En particulier, la fraction α contient de l'acide sialique, tandis que la fraction β en est dépourvue. Les résultats que nous avons obtenus et qui sont rassemblés dans les tableaux X (p. 130 et 131) et XI (p. 132) confirment entièrement ceux qui ont été décrits par ADAM-CHOSSON (393) ainsi que les résultats de MONTGOMERY et WU parus simultanément (394).

MONTGOMERY et WU ont, en effet, décrit 4 glycopeptides (glycopeptides I, II, III et IV) qu'ils ont isolés des hydrolysats papaïno-pronastiques de l'ovomucoïde de CHATTERJEE et MONTGOMERY (395), en associant la chromatographie sur Sephadex et l'électrophorèse préparative sur colonne de cellulose et dont les caractéristiques de la fraction glucidique sont les suivantes :

- 1 - Le glycopeptide IV renferme de l'acide sialique ;
- 2 - Les rapports oses "neutres"/osamine et mannose/galactose sont respectivement 0,59 à 0,66 et 3,9 à 4,5 pour les glycopeptides I, II et III ; 0,75 et 2,2 pour le glycopeptide IV (Tableau XII ; p. 136).

III - Nous avons retrouvé, -mais toujours en très faible quantité et dans certains hydrolysats seulement-, la fraction γ contenant de la cystine, qui a été décrite par MONTREUIL et al. (voir p.49) et dont la présence n'a pas été signalée par MONTGOMERY et WU. Nous formulons toutefois les plus grandes réserves à propos de l'existence réelle de ce glycoprotide et de son origine glycoprotéinique et nous le considérons plutôt comme un artefact né d'une estérification par la cystine, au cours de l'hydrolyse enzymatique ou des opérations de fractionnement, de "glycoprotides β " dont il possède la composition en glucides. Nous abandonnons donc l'hypothèse de l'existence d'un allo-ovomucoïde qui avait été posée dans les mémoires antérieurs (ADAM-CHOSSON (396) ; MONTREUIL, CASTIGLIONI et al. (397)).

Tableau XII

Composition des fractions glycopeptidiques isolées des hydrolysats papaïniques de l'ovomucoïde (d'après MONTGOMERY et WU) (398).

| Résidus | GLYCOPEPTIDES | | | | | | | |
|----------------------------|---------------|------------------------|-----------|------------------------|-----------|------------------------|-----------|------------------------|
| | I | | II | | III | | IV | |
| | g p.100 g | Composition molaire(a) | g p.100 g | Composition molaire(a) | g p.100 g | Composition molaire(a) | g p.100 g | Composition molaire(a) |
| Aspartique | 4,41 | 1,54 | 4,72 | 1,12 | 4,83 | 1,05 | 3,65 | 1,12 |
| Thréonine | 2,56 | 1,02 | 4,36 | 1,18 | 0,10 | 0,02 | 2,56 | 0,90 |
| Sérine | 0,97 | 0,44 | 1,21 | 0,38 | 0,10 | 0,02 | 0,89 | 0,36 |
| Isoleucine | 0,54 | 0,20 | 1,26 | 0,30 | | | 0,81 | 0,26 |
| Proline | 0,61 | 0,25 | 0,83 | 0,26 | | | 1,07 | 0,39 |
| Alanine | 0,52 | 0,29 | 0,65 | 0,25 | | | 0,59 | 0,29 |
| Phénylalanine | 0,89 | 0,25 | 1,20 | 0,24 | | | 1,46 | 0,35 |
| Glycocolle | 0,36 | 0,26 | 0,12 | 0,06 | | | 0,12 | 0,08 |
| Leucine | 0,19 | 0,06 | 0,12 | 0,03 | | | 0,12 | 0,04 |
| Lysine | 1,67 | 0,54 | | | | | | |
| Arginine | 1,21 | 0,31 | | | | | | |
| Glutamique | 0,36 | 0,01 | | | | | | |
| Histidine | 0,50 | 0,15 | | | | | | |
| NH ₃ | (b) | | (b) | | 0,84 | 1,24 | (b) | |
| Acide N-acétylneuraminique | | | | | | | 7,80 | 0,93 |
| N-Acétyl-D-glucosamine | 40,3 | 8,00 | 59,6 | 8,00 | 65,0 | 8,00 | 46,4 | 8,00 |
| D-Mannose | 22,7(c) | 5,64(c) | 23,4 | 3,94 | 25,4 | 3,90 | 18,9(d) | 4,10 |
| D-Galactose | | | 5,2 | 0,88 | 6,5 | 1,05 | 8,6(d) | 1,86 |
| <u>Hexoses</u> | | 0,66 | | 0,59 | | 0,59 | | 0,75 |
| <u>D-Glucosamine</u> | | | | | | | | |
| <u>D-Mannose</u> | | | | 4,5 | | 3,9 | | 2,2 |
| <u>D-Galactose</u> | | | | | | | | |

(a) Moles de résidus pour 8 moles de N-acétyl-D-glucosamine.

(b) Dosages non effectués.

(c) Exprimé en D-mannose.

(d) Résultat d'un dosage.

IV - La connaissance de la composition en glucides des fractions α et β , associée à des résultats récemment obtenus au laboratoire, nous permet de confirmer les conclusions qui avaient été tirées de travaux antérieurs (ADAM-CHOSSON (399) ; MONTREUIL, CASTIGLIONI et al. (400)) selon lesquelles les "glycoprotides β " provenaient de l'ovomucoïde proprement dit, tandis que les "glycoprotides α " avaient pour origine l'ovoglycoprotéine décrite par KETTERER (401). Les auteurs précédents ont, en effet, démontré que l'analyse immuno-électrophorétique révélait l'hétérogénéité de toutes les préparations d'ovomucoïde, quel que soit le procédé d'isolement utilisé. Quatre constituants sont présents dans ces dernières et des recherches récentes (JPKUBCZAK et MONTREUIL) (402) ont permis de préciser qu'il s'agissait de deux holoprotéines : l'ovo-inhibiteur-trypsique de MATSUSHIMA (403) et l'apo-ovo-flavoprotéine, et de deux glycoprotéines : l'ovomucoïde "proprement dit" et l'ovoglycoprotéine de KETTERER. La fraction glycannique de ce dernier composé possède les caractéristiques suivantes (KETTERER) (404) qui sont identiques à celles des "glycoprotides α " :

| | |
|---|-----|
| Oses "neutres"/Osamines | 1 |
| Oses "neutres"/Acide-N-acétylneuraminique | 4,5 |
| Mannose/Galactose | 2 |

Nos conclusions s'éloignent de celles de MONTGOMERY et WU (405) qui considèrent que le sialo-glycopeptide IV provient de l'ovomucoïde.

V - L'application de différents procédés à la détermination des masses moléculaires des glycopeptides α et β conduit à des résultats concordants (Tableau XI ; p. 131) : 1850 à 2000 pour les glycopeptides α_4 ; 3200 à 3250 pour les glycopeptides β .

Ces résultats permettent de déterminer le nombre de chaînes glycanniques dans l'ovomucoïde et dans l'ovoglycoprotéine, en supposant que les différents glycannes possèdent des masses moléculaires identiques.

En nous fondant sur un poids moléculaire de 27 000 pour l'ovomucoïde (FREDERICQ et DEUTSCH) (406) et de 24 400 pour l'ovoglycoprotéine (KETTERER) (407), d'une part, et sur la composition centésimale en glucides

totaux de l'ovomucoïde et de l'ovoglycoprotéine, d'autre part, nous démontrons qu'il existe, dans l'ovomucoïde deux chaînes glycaniques et, dans l'ovoglycoprotéine, quatre chaînes glycaniques.

Ces résultats confirment ceux de MONTREUIL, CASTIGLIONI et al. (408) et de MONTREUIL, SPIK et al. (409) et infirment le schéma de structure qui avait été proposé par ADAM-CHOSSON (410), dans lequel figuraient 4 chaînes glycaniques. Il sont en désaccord avec ceux de NEUBERGER et PAPKOFF (411) et de MONTGOMERY et WU (412) qui concluaient à l'existence de 3 chaînes glycaniques.

IV - CONCLUSIONS

- 1 - L'hydrolyse pronasique telle que nous l'appliquons et les procédés de purification et de fractionnement des hydrolysats de l'ovomucoïde permet d'isoler deux fractions majeures dont la composition de la copule protidique est simple. Il s'agit des fractions α_3 , α_4 et β .
- 2 - L'absence dans certains hydrolysats ou la présence, dans d'autres, en très faibles quantités du glycoprotide γ nous autorisent à le considérer comme un artefact provenant de la transamino-acylation de la cystéine sur des glycoprotides β et à abandonner l'hypothèse selon laquelle le glycoprotide γ proviendrait de l'allo-ovomucoïde.
- 3 - Les glycoprotides que nous avons étudiés se classent en deux groupes différents par leur composition en glucides. Le groupe des "glycoprotides α " est constitué de galctose, de mannose, de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétyl-neuraminique dans les rapports molaires 1 : 2 à 3 : 4 à 5 : 0,3 à 1; tandis que le groupe des "glycoprotides β " ne renferme pas d'acide sialique et est composé de galactose, de mannose et de N-acétyl-glucosamine dans les rapports molaires 1 : 5 : 10. Les sialo-glycoprotides α proviennent de l'ovoglycoprotéine de KETTERER qui est un des constituants de l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH et dont ils possèdent la composition en glucides. Les asialo-glycoprotides β dérivent de l'ovomucoïde "proprement dit".

4 - L'application de plusieurs procédés de détermination des masses moléculaires des glycoprotides nous amènent à la conclusion qu'il existe deux chaînes glycaniques dans l'ovomucoïde "proprement dit" et quatre chaînes dans l'ovoglycoprotéine de KETTERER.

3° - STRUCTURE DE LA FRACTION
PEPTIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES PRESENTS DANS LES
HYDROLYSATS PRONASIQUES DE L'OVOMUCOÏDE

I - MATERIEL ET METHODES

A - IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX

Les acides aminés en position C-terminale ont été identifiés par voies enzymatique (action de la carboxypeptidase) et chimique (action de l'hydrazine).

1° - L'hydrolyse enzymatique des liaisons des amino-acides C-terminaux a été effectué par la carboxypeptidase (LIGHT) selon le procédé décrit par SPIRO (413) (voir Appendice technique ; p. 211).

2° - L'hydrazinolyse a été réalisée suivant la méthode d'AKA-BORI et coll. (414) : action à 100°C, pendant 8 h, de l'hydrazine anhydre (0,3 ml pour 10 mg de glycopeptide sec) préparée selon le protocole expérimental de KUSAMA (415) ; fixation des hydrazides sur colonne (0,9 X 2cm) d'Amberlite IRC-50 (forme acide) ; déplacement par l'eau (50 ml) des acides aminés neutres et dicarboxyliques (+) suivant le procédé préconisé par LAY et POLGLASE (416) et des acides aminés basiques (++) par une solution (15 ml) d'acétate d'ammonium 0,1 M de pH 7 (DE LA LLOSA et coll.)(417). Le dosage des amino-acides présents dans les deux éluats est effectué à l'Auto-analyseur Technicon.

(+) Eventuellement accompagnés, dans le cas où l'asparagine (ou la glutamine) se trouve en position terminale, de "l'asparthydrazide 4" (ou du "glutamhydrazide 5").

(++) Eventuellement accompagnés de "l'asparthydrazide 1" et du "glutamhydrazide 1".

B - IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX

Les acides aminés en position N-terminale ont été identifiés par les procédés suivants :

- 1° - Action de la leucine aminopeptidase ;
- 2° - Diazotation ;
- 3° - Oxydation periodique, réservée à la thréonine (ou à la sérine)
- 4° - Dinitrophénylation ;
- 5° - Dégradation d'EDMAN.

1° - Action de la leucine amino-peptidase

L'hydrolyse des glycoprotides (10 mg) par la leucine aminopeptidase (SIGMA) dans les conditions opératoires décrites par SMITH et HILL (418) et par TAKAHASHI (419) (voir Appendice technique ; p.211). Les acides aminés éventuellement libérés ont été recherchés, soit par chromatographie à l'Auto-analyseur Technicon, soit par les procédés classiques d'analyse chromatographique et électrophorétique sur papier préconisés par BISERTE, DAUTREVAUX et BOULANGER (420).

2° - Diazotation des glycoprotides

La diazotation des fonctions NH_2 libres a été réalisée en dissolvant 10 mg de glycoprotide p. ml d'une solution aqueuse saturée de nitrite de sodium que l'on additionne ensuite d'un volume égal d'acide acétique glacial. Après un repos d'une nuit à 4°C, l'excès de nitrite de sodium est détruit par l'addition d'urée, ajoutée jusqu'à cessation de dégagement gazeux (MATSUSHIMA et FUJII) (421). La solution est ensuite purifiée par passage sur une colonne (2 X 40 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50 X 8) ; "mesh" 25 X 50 ; forme acide), suivi d'un lavage soigneux à l'eau distillée. La solution effluente est évaporée à siccité sous pression réduite et sa composition en acides aminés est déterminée à l'Auto-analyseur Technicon.

3° - Oxydation periodique

a - Principe. La thréonine en position N-terminale est oxydée par l'acide periodique à la condition que son groupement hydroxylé soit libre. Le procédé est donc précieux pour la recherche de liaisons-O-glycosidiques portées par des résidus de thréonine N-terminale.

b - Mode opératoire. L'oxydation periodique a été effectuée suivant la technique de GLICK et al.(422) : une solution de 25 mg de glycoprotide dans 7 ml d'eau est additionnée de 3 ml de métaperiodate de sodium 0,086 M et de 15 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M, de pH 5,0. Le mélange est maintenu à 4°C et à l'obscurité. La consommation d'acide periodique est déterminée en suivant régulièrement l'absorbance de la solution mesurée à 310 m μ . Au bout de 48 h, l'absorbance est, en général, stabilisée. La solution est alors déminéralisée par un passage sur colonnes (2 X 40 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50 X 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide) et d'anions (Duolite A-40, forme formiate). La solution effluente, à laquelle on joint les eaux de rinçage (1000 ml), est évaporée à siccité sous pression réduite. La composition du résidu sec en amino-acides et en glucides est précisée en appliquant les procédés que nous avons décrits plus haut (voir p. 128).

4° - Procédé de dinitrophénylation

Nous avons appliqué le procédé général décrit par BISERTE et al.(423) en l'adaptant toutefois aux glycoprotides dont les DNP-dérivés possèdent des caractères de solubilité différents de ceux des DNP-holoprotides. Le mode opératoire est le suivant :

a - Isolement des DNP-glycoprotides

La condensation du fluoro-dinitrobenzène avec les glycoprotides est réalisée dans les conditions décrites par SANGER (424) (voir Appendice technique ; p.211). Les sels minéraux sont ensuite éliminés par l'addition d'éther sulfurique jusqu'à l'apparition d'un louche. Après un repos d'une heure, le précipité est redissous dans la quantité minimale d'eau distillée. La solution obtenue est additionnée d'un volume d'éthanol absolu et les sels minéraux sont de nouveau précipités par l'éther sulfurique. Les deux solutions surnageantes sont réunies et évaporées à siccité sous vide, à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris par l'eau distillée et la solution obtenue est débarrassée du fluoro-dinitrobenzène en excès, ainsi que du dinitrophénol et de la dinitraniline formés au cours de la réaction, par deux extractions éthérées effectuées, la première, en milieu neutre et, la seconde, en milieu acide (ajustement de la solution à pH 1 par addition d'acide chlorhydrique). La fraction aqueuse est enfin évaporée à siccité, sous pression réduite, à l'évaporateur rotatif.

b - Hydrolyse des DNP-glycoprotides et analyse des hydrolysats

L'hydrolyse des DNP-glycoprotides et l'identification des DNP-amino-acides sont effectués suivant le mode opératoire décrit par BISERTE, HOLLEMAN et al., (425) (voir Appendice technique ; p.211).

En outre, les amino-acides libres, présents dans la phase aqueuse des hydrolysats après l'extraction des DNP-amino-acides par l'éther, sont dosés à l'Auto-analyseur Technicon par rapport à un "témoin interne" de nor-leucine ajouté aux DNP-glycoprotides, avant l'hydrolyse chlorhydrique (voir Appendice technique ; p.211).

5° - Dégradation d'EDMAN

a - Principe. La réaction d'EDMAN est très précieuse dans l'exploration des modalités de la liaison glycanne-protide dans les glycopeptides. En effet, elle réalise la dégradation récurrente de la fraction peptidique par l'extrémité N-terminale et vient "buter" sur l'acide aminé conjugué au glycanne

en respectant la liaison "glycosyl" et en détachant l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique. Il s'ensuit la formation d'un PTH-dérivé d'un glyco-amino-acide conformément aux réactions de la figure 30 (p. 144).

b - Mode opératoire

1 - Préparation des dérivés phényl-thiohydantoïniques

Les glycoprotides (100 à 200 mg dans 20 ml de tampon de pH 8,5) (+) sont condensés avec l'isothiocyanate de phényle (1,5 ml) dans les conditions décrites par KONIGSBERG et HILL (426) : 37°C , pendant 2,5 h. La solution est évaporée à siccité sous vide à l'évaporateur rotatif.

Les phényl-thiocarbamyl-dérivés sont ensuite cyclisés en milieu acide suivant le procédé de LIGHT et GREENBERG (427) : addition de 20 ml d'un mélange d'acide acétique et d'acide chlorhydrique concentré (5:1)(v:v) qu'on laisse agir à 37°C pendant 2 h.

Les phényl-thiohydantoïnes formées (PTH-dérivés) sont extraites trois fois par 10 ml de benzène, puis 2 fois par 10 ml d'un mélange de benzène et de butanone (2:3)(v:v) selon le protocole décrit par CHERBULIEZ, BAEHLER et RABINOWITZ (428). Les deux solutions d'extraction et la solution aqueuse sont évaporées à siccité sous pression réduite et sont ensuite analysées séparément.

2 - Analyse de la phase organique

Les PTH-dérivés, présents dans la phase organique, sont analysés par électrophorèse sur papier à pH 3,9 (tampon acétate de pyridine de MICHL (429)) et par chromatographie sur couche mince de Silica-gel G dans les systèmes-solvants de BRENNER, NIEDERWIESER et PATAKI (430) et de PATAKI (431) : chloroforme / acide formique concentré (100:5) (v:v) ; chloroforme/méthanol (100:5) (v:v).

(+) Composition du tampon :

| | | |
|-------------------------------|------|----|
| N-éthylmorpholine redistillée | 60 | ml |
| Acide acétique glacial | 1,5 | ml |
| Ethanol à 95° | 500 | ml |
| Eau distillée q.s.p. | 1000 | ml |

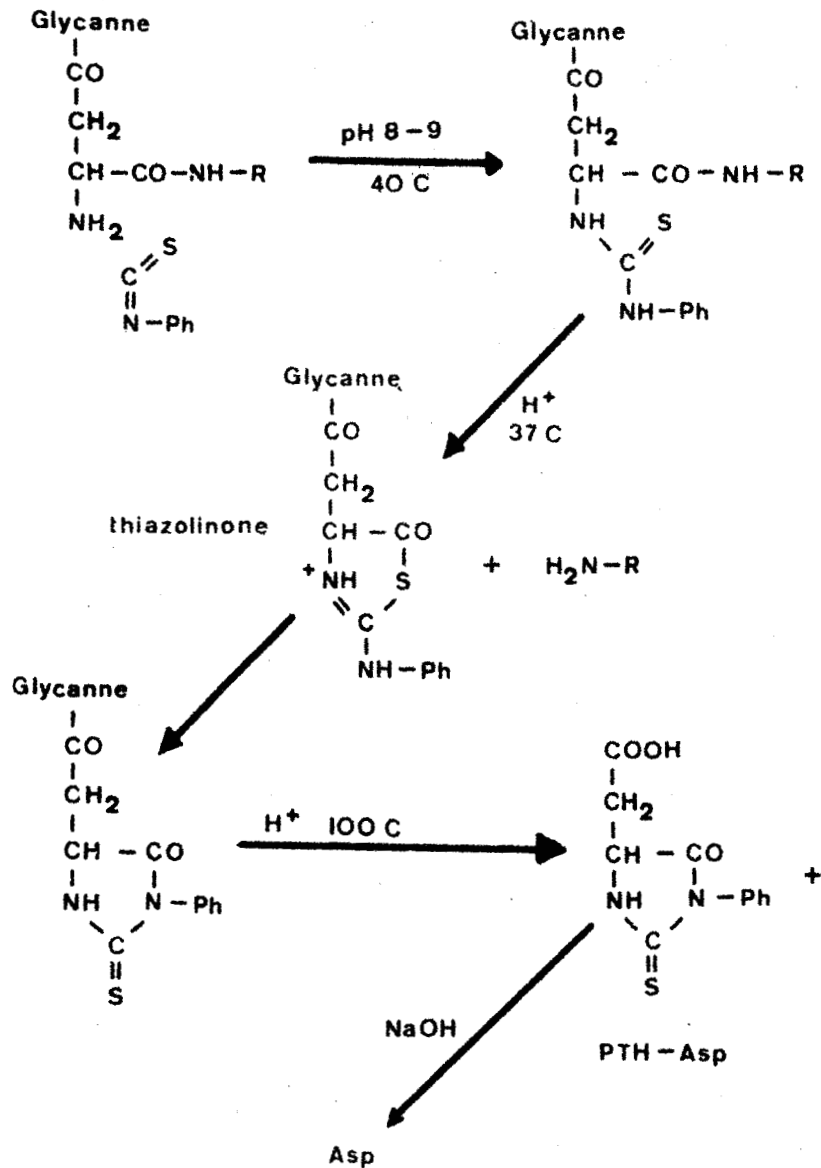


Figure 30

Dégradation récurrente d'EDMAN d'un glycopeptide et formation des glyco-PTH-amino-acides.

La révélation des PTH-dérivés est effectuée, soit en chauffant à 120°C, pendant 2 h, les chromatoplaques préalablement imprégnées par pulvérisation d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 5 p.100 (v:v) (formation de taches jaunes) ; soit en utilisant le réactif à l'iode-azoture de sodium de CHERBULIEZ, BAEHLER et RABINOWITZ (432) (formation de taches blanches sur un fond brun) (+). En outre, la fraction des PTH-dérivés totaux a été traitée par la soude 0,1 N (1 ml p.10 mg de glycoprotide), à 120°C pendant 10 h (VAN ORDEN et CARPENTER) (433) de manière à dissocier les PTH-amino-acides libérés et à régénérer les amino-acides. On identifie ensuite ces derniers à l'Auto-analyseur Technicon, après avoir ajusté la solution sodique à pH 2, par l'addition d'acide chlorhydrique 2 N.

3 - Analyse de la phase aqueuse

La phase aqueuse contient les glycoprotides et les PTH-glyco-amino-acides qui se sont formés, soit à partir de glyco-amino-acides, soit à partir de glycopeptides dans lesquels l'acide-amino-N-terminal était conjugué au glycanne dans le glycopeptide natif. Sa composition a été étudiée de la manière suivante :

α - Une partie aliquote correspondant à 10 mg de glycoprotéide de départ, est hydrolysée par HCl 5,6 N à 100°C, pendant 24 h et sa composition en acides aminés est déterminée à l'Auto-analyseur Technicon. On identifie et on dose, de cette façon, les acides aminés dont le groupement NH_2 était protégé dans le glycoprotéide natif.

β - Le reste de la solution est soumis à l'analyse par chromatographie sur papier Macherey-Nagel 807, dans le système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5). Les glycoprotides et les PTH-glyco-amino-acides restent au trait de départ, tandis que les acides aminés et les peptides, libérés au cours de la dégradation d'EDMAN, sont entraînés par le solvant.

(+) Le réactif est obtenu en mélangeant extemporanément dans les rapports volumétriques 1 : 1 : 6, les trois solutions suivantes :

- Solution 1 : iode 1,27 g, IK 8,3 g, eau q.s.p. 100 ml.
- Solution 2 : NaN_3 3,2 g, eau q.s.p. 100 ml.
- Solution 3 : Thiodène 1 g, eau q.s.p. 100 ml.

Dans un second temps, les différents constituants ainsi repérés sont isolés par chromatographie préparative et leur composition en glucides, en amino-acides et en PTH-amino-acides est précisée en appliquant les procédés que nous avons décrits plus haut.

II - RESULTATS

L'application des procédés que nous venons de décrire nous a permis d'isoler ou de caractériser, dans les fractions α_3 , α_4 et β , 10 glycoprotides dont nous avons précisé dans la figure 31 (p. 147) les schémas de structure de la fraction protidique. Ces derniers ont été précisés sur la base des résultats expérimentaux suivants :

A - FRACTION α_3

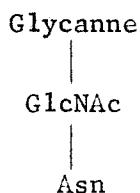
1 - L'application du procédé général de dinitrophénylation de SANGER montre que la fonction NH_2 de la totalité de l'acide aspartique est libre puisque l'hydrolysât du DNP-glycopeptide ne contient que le DNP-aspartique et aucune trace d'acide aspartique libre.

2 - L'action de l'isothiocyanate de phényle sur la fraction α_3 libère la sérine (0,17 résidu p. 5 résidus de glucosamine, provenant du glycopeptide 2 ; voir tableau XI ; p. 132) et donne un PTH-dérivé que nous avons isolé à l'état pur par chromatographie préparative sur papier. L'hydrolyse de ce dérivé par HCl 2 N, pendant 2 h, fournit uniquement, -mis à part, évidemment, les oses provenant de la dégradation du glycanne-, le PTH-acide aspartique à l'exclusion de tout autre amino-acide libre. Ce résultat implique que la fonction α -amino-acide de l'acide aspartique n'est pas liée au glycanne.

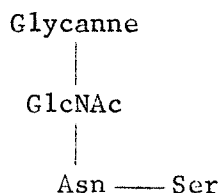
Nous pouvons donc conclure, en tenant compte de la composition de la fraction α_3 en acides aminés (Tableau XI ; p. 132), que la fraction α_3 est constituée du mélange des deux glycoprotides 1 et 2 (Fig. 31 ; p. 147) dans les proportions relatives (pour 4 résidus de glucosamine) suivantes :

glycoprotide 1 : 0,83

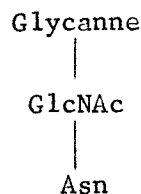
glycoprotide 2 : 0,17

F
R
A
C
T
I
O
N
 α_3 

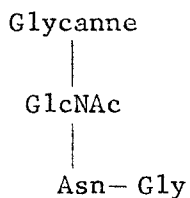
Glycoprotide 1
0,83



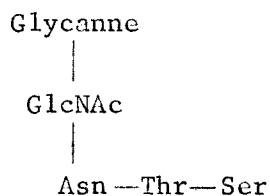
Glycoprotide 2
0,17

F
R
A
C
T
I
O
N
 α_4 

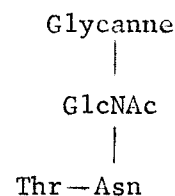
Glycoprotide 3
0,32 à 0,37



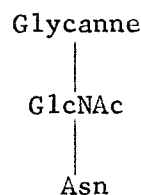
Glycoprotide 4
0,15



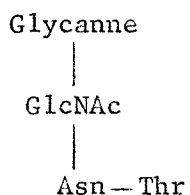
Glycoprotide 5
0,27 à 0,29



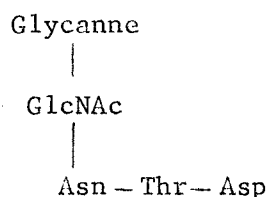
Glycoprotide 6
0,35 à 0,40

F
R
A
C
T
I
O
N
 β 

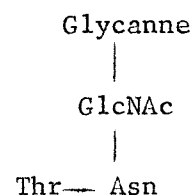
Glycoprotide 7
0,20



Glycoprotide 8
0,36



Glycoprotide 9
0,10



Glycoprotide 10
0,39

Figure 31

Schémas de structure des glycoprotides isolés ou caractérisés dans les fractions α_3 , α_4 et β . Les nombres indiquent les proportions molaires dans lesquelles les différents glycoprotides existent dans chacune des fractions.

B - FRACTION α_4

Nous avons vu que la fraction α_4 , renfermait de l'acide aspartique, de la thréonine et de la sérine, dans les proportions relatives 1,14 - 0,66 et 0,29 (Tableau XI ; p. 132).

1 - L'application du procédé général de dinitrophénylation de SANGER montre que 0,65 résidu d'acide aspartique (provenant des glycoprotides 3,4 et 5) et 0,35 résidu de thréonine (provenant du glycoprotide 6) sont en position N-terminale et que la totalité de la sérine se retrouve dans les hydrolysats chlorhydriques du DNP-glycoprotide.

2 - L'application du procédé d'EDMAN a apporté les résultats suivants (Tableau XIII ; p. 149) :

a - L'hydrolyse acide de la "phase aqueuse" (voir p. 145) montre, par le dosage des acides aminés libres, que pour 4 résidus de glucosamine, 0,77 résidu d'acide aspartique, provenant des glycoprotides 3,4 et 5, et 0,39 résidu de thréonine, provenant du glycoprotide 6, se trouvent en position N-terminale. En outre, les PTH-dérivés de l'acide aspartique et de la thréonine ont été identifiés dans les hydrolysats.

b - Le fractionnement chromatographique sur papier de la "phase aqueuse" (voir p. 145) permet d'isoler la "fraction glycoprotide + PTH-glycoprotide" qui est restée au trait de départ. L'hydrolyse de cette dernière libère de l'acide aspartique (0,4 résidu p. 4 résidus de glucosamine, provenant du glycoprotide 6), accompagné de son PTH-dérivé (provenant des glycoprotides 3,4 et 5) que nous avons identifié en appliquant le protocole expérimental décrit plus haut (voir p.143).

Ces résultats sont en faveur de la présence, dans la fraction α_4 , d'un mélange de 4 glycoprotides dans les proportions relatives (pour 4 résidus de glucosamine) suivantes :(Fig. 31 ; p. 147) :

| | | |
|----------------|---|-------------|
| glycoprotide 3 | : | 0,32 à 0,37 |
| glycoprotide 4 | : | 0,15 |
| glycoprotide 5 | : | 0,27 à 0,29 |
| glycoprotide 6 | : | 0,35 à 0,40 |

Tableau XIII

Composition (rapportée à 4 résidus de glucosamine) en amino-acides et en PTH-amino-acides de la fraction α_4 , après action de l'isothiocyanate de phényle (dégradation d'EDMAN).

| | Fraction native | Composition en acides aminés des hydrolysats chlorhydriques | |
|------------|-----------------|---|--|
| | | de la "phase aqueuse" totale (+) | de la "fraction PTH-glycoprotidique et glycoprotidique" (++) |
| Aspartique | 1,14 | 0,37 | 0,40 |
| Thréonine | 0,66 | 0,27 | - |
| Sérine | 0,29 | + | - |
| Glycocolle | 0,15 | 0,15 | - |

(+) Voir texte (p. 145).

(++) Obtenue par chromatographie préparative sur papier de la "phase aqueuse" (voir p. 145).

C - FRACTION β

La copule protidique de la fraction β est constituée d'acide aspartique et de thréonine dans les proportions relatives (déterminées pour 10 résidus de glucosamine) de 1,15 et 0,85 (Tableau XI ; p. 132).

1 - Dans les hydrolysats acides du DNP-protide, nous avons identifié, d'une part, le DNP-aspartique et la DNP-thréonine et, d'autre part, l'acide aspartique et la thréonine. Les amino-acides libres étaient dans les proportions molaires (déterminées pour 10 résidus de glucosamine) de 0,49 pour l'acide aspartique (provenant des glycoprotides 9 et 10) et de 0,46 pour la thréonine (provenant des glycoprotides 8 et 9). Ces résultats sont rassemblés dans le tableau XIV (p. 151).

2 - A la fin du premier cycle, l'application de la méthode d'EDMAN fournit une "phase aqueuse" (voir p.145) dont l'hydrolyse chlorhydrique libre (pour 10 résidus de glucosamine) 0,52 mole d'acide aspartique (provenant des glycoprotides 9 et 10) et 0,53 mole de thréonine (provenant des glycoprotides 8 et 9) (Tableau XIV ; p. 151).

L'analyse de cette même phase, par chromatographie sur papier, révèle la présence de thréonine libre (provenant du glycoprotide 8) (+). Elle permet, en outre, d'isoler, restée au trait de départ, une fraction qui fournit, par hydrolyse acide, le PTH-dérivé de l'acide aspartique (provenant des glycoprotides 7,8 et 9).

D'autre part, nous avons identifié, dans la "phase organique", le PTH-dérivé de la thréonine (provenant du glycoprotide 10).

A la fin du second cycle de la dégradation d'EDMAN, on obtient uniquement un PTH-dérivé (PTH-aspartyl-glycane) que nous avons isolé par chromatographie préparative et qui donne, par hydrolyse chlorhydrique, seulement le PTH-aspartique.

Ce composé s'est formé, dès le premier cycle, à partir des glycoprotides 7,8 et 9 et, au cours du second cycle, à partir du glycoprotide 10

(+) D'après les schémas que nous proposons ci-dessous, nous aurions logiquement dû caractériser le peptide thréonyl-aspartique provenant du glycopeptide 9, nous n'avons cependant pas pu le mettre en évidence, vraisemblablement à cause de la faible proportion de glycopeptide 9 dans le composé β .

Tableau XIV

Composition en amino-acides et dérivés (ramenée à 10 résidus de glucosamine) de la fraction β native, après dinitrophénylation et après l'action de l'i-sothiocyanate de phényle (un seul cycle de dégradation d'EDMAN).

| | Fraction native | Après dinitrophénylation | | Dégradation d'EDMAN | |
|------------------|-----------------|--------------------------|---------------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| | | DNP-amino-acides (a) | Amino-acides non dinitro-phénylés (b) | PTH-amino-acides (a) | amino-acides non substitués (c) |
| Acide aspartique | 1,15 | 0,66 | 0,49 | 0,63 | 0,52 |
| Thréonine | 0,85 | 0,39 | 0,46 | 0,32 | 0,53 |

(a) Valeurs calculées.

(b) Dosés à l'Auto-analyseur Technicon après hydrolyse acide.

(c) Dosés à l'Auto-analyseur Technicon après hydrolyse acide de la "phase aqueuse" (voir p. 145).

devenu un "aspartyl-glycane" au cours du premier cycle.

3 - L'oxydation periodique détruit 0,40 mole de thréonine (pour 10 résidus de glucosamine) qui se trouvait donc en position N-terminale (dans le glycopeptide 10).

4 - L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que la fraction β est un mélange de 4 glycoprotides, dans les proportions relatives (pour 10 résidus de glucosamine) suivantes :

| | | |
|-----------------|---|------|
| glycoprotide 7 | : | 0,20 |
| glycoprotide 8 | : | 0,36 |
| glycoprotide 9 | : | 0,10 |
| glycoprotide 10 | : | 0,39 |

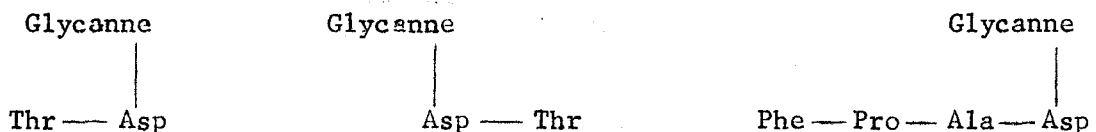
III - DISCUSSION

Les résultats que nous avons obtenus révèlent la complexité de composition des hydrolysats enzymatiques des préparations d'ovomucoïde. L'hétérogénéité s'était déjà manifestée à propos de la composition des fonctions glycanniques. Elle se complique par la diversité de composition des copules peptidiques. Au total, nous avons caractérisé 10 glycoprotides dans les hydrolysats pronasiques des préparations d'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH.

1 - Nos résultats sont à rapprocher, en premier lieu, de ceux de MONTGOMERY et WU (434) et de TANAKA (435).

a - MONTGOMERY et WU (436) ont déterminé la structure peptidique de 4 glycoprotides provenant de l'hydrolyse pronasique des "glycopeptides II et III" (voir p.135) obtenus par hydrolyse papaïnique de l'ovomucoïde de CHATTERJEE et MONTGOMERY (437) :

- Les glycoprotides provenant du "glycopeptide II sont au nombre de 3 et leur copule peptidique possède la structure suivante :

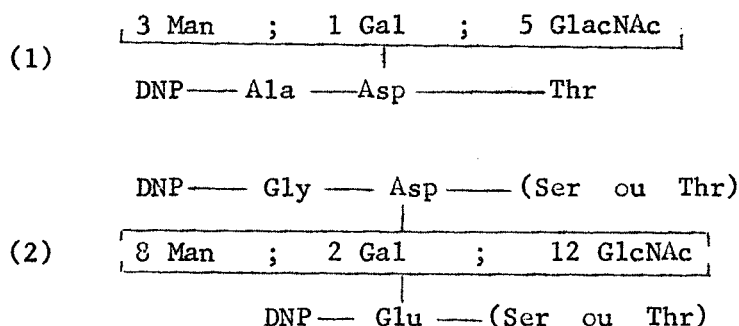


Les deux premiers correspondent à nos glycopeptides 8 et 10 ; le troisième était absent de nos hydrolysats.

- Le glycoprotide provenant du "glycopeptide III" (voir p. 135) ne renferme que de l'acide aspartique. Il est identique à notre glycoprotide 7.

- Les auteurs n'ont pas étudié le sialo-glycopeptide IV (voir p. 135).

b - TANAKA (438) a isolé des hydrolysats pancréatiques de l'ovomucoïde deux DNP-glycopeptides auxquels il a attribué les structures suivantes :



D'après la composition en glucides "neutres" et en osamines des deux glycopeptides, il semble que le premier soit du "type ovoglycoprotéine" et le second, du "type ovomucoïde".

Si les résultats que nous avons obtenus à propos des glycoprotides α ne sont pas en désaccord avec le schéma du premier glycopeptide de TANAKA, au contraire, le second schéma est infirmé par nos travaux et par ceux de MONTGOMERY et WU.

2 - Nos résultats sont à rapprocher, en second lieu, de ceux d'ADAM-CHOSSON et de MONTREUIL et al.

Nous avons, certes, retrouvé les fractions α et β de ces auteurs mais nous avons démontré la grande hétérogénéité de ces fractions en appliquant des procédés d'analyses plus précis. En particulier, l'application aux DNP-glycopeptides β de la "contre expérience" qui consiste à rechercher

et à doser, non seulement les DNP-amino-acides, mais encore les amino-acides libres, nous a permis de résoudre le problème. En effet, toute l'argumentation des auteurs précédents reposait sur la formation quantitative de DNP-aspartique et de DNP-thréonine qui les a conduits, en outre, à la notion de la présence, dans l'ovomucoïde, de 2 glycanes unis à la protéine, l'un par l'acide aspartique et l'autre par la thréonine.

IV - CONCLUSIONS

L'application des procédés de détermination des séquences peptidiques, associés aux méthodes de fractionnement des glycoprotides, nous a permis d'isoler ou de caractériser, au total, 10 glycoprotides différant (Fig. 31 ; p. 147) soit par la composition de leur fraction glycanique, soit par la structure de la copule protidique.

Les glycoprotides 1 à 6 proviennent vraisemblablement de l'ovoglycoprotéine de KETTERER dont ils possèdent la composition en glucides. Si cette hypothèse se confirmait, nous connaîtrions déjà la structure des glycoprotides provenant de l'ovoglycoprotéine. Quant aux glycoprotides 7 à 10, ils proviendraient alors de l'ovomucoïde "proprement dit". Seul, l'isolement de ces deux entités glycoprotéiniques et l'étude des produits de leur dégradation pronasique nous permettra de vérifier cette hypothèse.

| |
|--|
| <p>4° - NATURE DE LA LIAISON GLYCANNE-PROTIDE DANS LES PREPARATIONS D'OVOMUCOÏDE</p> |
|--|

I - MATERIEL ET METHODES

Les amino-acides présents dans les glycoprotides 1 à 10 nous permettent d'envisager les types de liaisons suivants :

- A - aspartyl-glycosylaminique
- B - O-thréonyl-glycosidique
- C - ester

A - IDENTIFICATION DE LA "N- β -ASPARTYL-GLUCOSAMINYLAMINE" (+)ET DE SES DERIVES

1 - A partir d'un glyco-amino-acide: ~~200 mg~~ 200 mg sont hydrolysés par HCl 1,5 N (20ml), à 100°C, pendant 1,5 h. L'acide chlorhydrique est éliminé par lyophilisation, à - 70°C, des hydrolysats étendus de 30 fois leur volume d'eau. La préparation obtenue est soumise à une électrophorèse préparative sur papier à pH 3,9 (tampon de MICHL) (439) et la composition en glucides et en acides aminés des différents constituants ainsi isolés est déterminée.

La fraction intéressante, qui correspond au point d'attache lui-même (osaminidyl- ou osidyl-osaminidyl-amino-acide ou -peptide) est purifiée par une chromatographie de 72 h, effectuée sur papier Macherey-Nagel 807, dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) de manière à éliminer totalement la glucosamine libre. Sa composition en glucides et en amino-acides est déterminée et sa structure est ensuite précisée en appliquant les modes opératoires suivants :

a - Le pouvoir réducteur est étudié par la méthode au ferricyanure de PARK et JOHNSON (440) (voir Appendice technique ; p.211).

b - L'oxydation périodique est effectuée dans les conditions décrites plus haut (voir p.141) sur le composé natif et N-réacétylé selon la technique de LEVY et Mc ALLAN (441) (voir Appendice technique ; p.211).

c - La β -N-acétyl-D-glucosaminidase a été utilisée selon les modes opératoires décrits par BHAVANANDAN et al. (442) et par GHUYSEN et STROMINGER (443) (++) sur le composé N-réacétylé ;

d - les spectres infra-rouges, destinés essentiellement à préciser la nature α ou β de la liaison glucosaminylaminique, ont été obtenus avec un spectrophotomètre infra-rouge Perkin-Elmer, modèle 21, après pastillage dans le bromure de potassium.

(+) Ce terme désigne, d'une manière simplifiée, la β -L-aspartamido-1-acétamido-2-didéoxy-1,2- β -D-glucopyranose.

(++) Nous remercions vivement les Professeurs E. BUDECKE et J.M. GHUYSEN, pour les préparations enzymatiques qu'ils nous ont fournies, et le Professeur J.M. GHUYSEN et ses collaborateurs pour les tentatives d'hydrolyse qu'ils ont effectuées.

2 - A partir d'un PTH-aspartyl-glycane

Les PTH-aspartyl-glycannes, isolés dans les conditions que nous avons décrites plus haut (voir p.145) sont soumis à une hydrolyse chlorhydrique effectuée dans les conditions précédentes. L'hydrolysate, débarrassé de l'acide chlorhydrique par lyophilisation, est analysé par une chromatographie de 36 h, sur papier Macherey-Nagel 807, dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5). Les bandes de papier renfermant les constituants qui donnent une réaction positive avec le réactif de CHERBULLIEZ et al. (voir p.145) sont éluées, selon la méthode de DENT (444), par de l'eau distillée, puis par du méthanol pur. Les PTH-dérivés, présents dans les éluats, sont caractérisés par le tracé des courbes d'absorption (λ max 269 m μ) et dosés par spectrophotométrie à 269 m μ (SJOQUIST) (445) en utilisant une solution étalon titrée à 10 mg de PTH-acide-aspartique p. ml. L'osamine (ou éventuellement l'ose "neutre") conjuguée est identifiée et dosée en appliquant les procédés que nous avons décrits plus haut (voir p.128).

B - RECHERCHE DES LIAISONS O-GLYCOSIDIQUES

1° - Action des alcalis sur les glycopeptides natifs

100 à 200 mg de glycopeptides sont traités par 10 à 20 ml des solutions aqueuses de soude 0,1 N, en présence de borohydrure de sodium (concentration finale 0,3 M), à 5°C et à 20°C, pendant des temps variant de 1 à 9 jours (procédé de TANAKA, BEROLINI et PIGMAN (446)).

La solution est acidifiée par de l'acide acétique glacial ajouté jusqu'à la fin du dégagement gazeux. Elle est ensuite évaporée à siccité sous pression réduite. Le résidu est débarrassé de l'acide borique en le reprenant par un mélange de méthanol et d'acide acétique glacial (4:1) (v:v) et en évaporant la suspension obtenue par ventilation ou par distillation sous pression réduite. Ce mode opératoire est répété 4 fois. La préparation obtenue est soumise aux analyses suivantes :

a - détermination à l'Auto-analyseur Technicon de la composition en amino-acides de l'hydrolysate chlorhydrique ;

b - fractionnement sur des colonnes (2 X 40 cm) de Dowex 50 8 ("mesh" 25-50 ; forme acide) :

Le passage de 1 000 ml d'eau distillée fournit une "fraction neutre" qui contient les glycannes réduits, libérés par la " β -élimination" et les glycoprotides respectés par la soude ;

Le passage d'une solution ammoniacale (dilution au 1/20 de la solution commerciale à 21 p.100 d'ammoniac) déplace les protides détachés au cours de la " β -élimination".

Chacune des deux fractions est évaporée à siccité et soumise aux diverses analyses que nous avons décrites plus haut.

2° - Action des alcalis sur les glycoprotides réamidés

Nous avons démontré (voir p.104) que la rupture, par " β -élimination", des liaisons O-séryl et O-thréonyl-glycosidique sous l'action des alcalis ne pouvait s'effectuer si le β -hydroxy-amino-acide conjugué au glycanne possédait son groupement carboxylique libre et qu'il était nécessaire de bloquer ce dernier pour que la réaction ait lieu. Pour éliminer cette cause d'erreur nous faisons systématiquement agir la soude sur les glycopeptides natifs et réamidés.

La réamidation est effectuée de la manière suivante (voir p. 103) : 10 à 100 mg de glycopeptide sont d'abord estérifiés, pendant 4 h, à 20°C, par 2 à 20 ml d'une solution de chlorure de thionyle dans le méthanol anhydre (solution à 3 p.100) (v:v) (SOKOLOVSKY et al.) (447). Le mélange est évaporé à siccité sous pression réduite, à l'abri de toute trace de vapeur d'eau, et le résidu sec est traité, à 20°C, pendant 24 h, par 0,2 à 2 ml de butylamine. La solution est évaporée à siccité et la préparation obtenue est soumise à l'action de la soude dans les conditions que nous avons décrites ci-dessus.

C - RECHERCHE DES LIAISONS ESTERS

La recherche des liaisons esters a été effectuée par la méthode d'HESTRIN (448) aux hydroxamates, modifiée par Mc COMB et Mc CREADY (449) et par action de la soude diluée pendant des temps très courts (NaOH 0,1 N ;

à 100°C pendant 5 à 10 mn).

II - RESULTATS

A - FRACTION α_3

1 - La fraction α_3 n'est pas réductrice. Le glycanne est donc conjugué par sa fonction réductrice à la fraction protidique.

2 - La recherche des fonctions esters a été négative. Le carboxyle α de la sérine et le carboxyle β de l'acide aspartique ne sont donc pas conjugués par une liaison ester.

3 - L'hydrolyse acide partielle (HCl 1,5 N, à 100°C pendant 1,5 h) libère un fragment glycoprotidique qui possède le comportement électrophorétique de la N- β -aspartyl-glucosaminyllamine et que nous avons isolé par électrophorèse préparative sur papier (voir p.155). Sa composition molaire est la suivante : acide aspartique 1, glucosamine 2. Le spectre infra-rouge révèle le pic d'absorption caractéristique des liaisons β -glycosidiques (891 cm^{-1}).

4 - L'application de la méthode d'EDMAN fournit un PTH-glyco-protide que nous avons isolé par chromatographie préparative sur papier de la "phase aqueuse" (voir p.145).

L'hydrolyse chlorhydrique partielle de ce composé, effectuée dans les conditions décrites ci-dessus, libère un PTH-dérivé dont le comportement chromatographique (Tableau III ; p. 63) est identique à celui du PTH-dérivé de la N- β -aspartyl-glucosaminyllamine.

En outre, l'hydrolyse acide totale (HCl 4 N, 100°C pendant 4 h) fournit, en proportions équimolaires, de la glucosamine et du PTH-acide aspartique.

Ce résultat implique que la fraction α amino-acide de l'acide aspartique des glycoprotides 1 et 2 n'est pas engagée dans la liaison avec le glycanne.

5 - L'action de la soude, dans les conditions de la rupture des liaisons O-glycosidiques par " β -élimination" est négative sur la fraction α_3

native et réamidée. La sérine n'est donc pas conjuguée par une liaison O-glycosidique au glycanne.

Ce résultat est confirmé par la libération de cet amino-acide au cours de la réaction d'EDMAN (voir p.146).

6 - Sur la base de ces résultats expérimentaux, nous pouvons donc conclure que, la fraction α_3 est un mélange de deux glycoprotides dans lesquels l'acide aspartique est conjugué par son carboxyle β à la N-acétylglucosamine, par une liaison " β -glucosaminyllamine".

B - FRACTION α_4

1 - La fraction α_4 n'est pas réductrice.

2 - La fraction α_4 , native et réamidée, résiste à l'action des alcalis. Elle ne renferme donc ni liaison ester, ni liaison O-glycosidique.

3 - Après deux cycles de réaction d'EDMAN, les PTH-dérivés ont été isolés et purifiés par chromatographie préparative (voir p. 145) et hydrolysés par HCl 1,5 N, à 100°C pendant 1,5 h. Nous avons identifié, dans les hydrolysats, le PTH-dérivé de la -N-aspartyl-glucosaminyllamine en appliquant le mode opératoire décrit à propos de la fraction α_3 .

4 - Nous pouvons donc conclure que, dans la fraction α_4 , les glycoprotides 3 à 6 sont conjugués aux glycannes par une liaison " β -aspartyl-glucosaminyllamine"

C - FRACTION β

1 - La fraction β n'est pas réductrice.

2 - Elle n'est pas modifiée par l'action de la soude avant et après réamidation. Elle ne renferme donc pas de liaisons esters ou O-glycosidiques (Tableau XV ; p. 160).

3 - L'hydrolyse acide partielle (HCl 1,5 N, 100°C pendant 1,5 h) de la fraction β fournit un mélange de glycoprotides simples qui ont été isolés par électrophorèse préparative et fractionnés par chromatographie sur papier. Nous avons obtenu, de cette manière, deux glycoprotides

Tableau XV

Composition (rapportée à 10 résidus de glucosamine) de la fraction glycopeptidique β native et amidée (+) avant et après action de la soude 0,1 N.

| | Fraction native | | Fraction native amidée | |
|-----------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| | Avant action de la soude | Après action de la soude | Avant action de la soude | Après action de la soude |
| | Acide aspartique | 1,15 | 1,15 | 1,15 |
| Thréonine | 0,85 | 0,85 | 0,85 | 0,80 |

(+) voir texte (p.157).

dont les propriétés sont les suivantes :

a - Le premier est constitué uniquement de glucosamine et d'acide aspartique en proportions équimolaires. Il possède toutes les caractéristiques de la N-(β -aspartyl)-glucosaminylamine, en particulier, son comportement électrophorétique (Fig. 32 ; p. 161 bis).

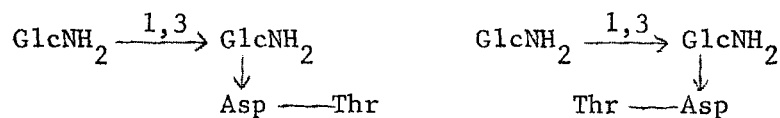
b - Le second contient de la glucosamine, de l'acide aspartique et de la thréonine dans les proportions molaires suivantes : 2 : 1 : 1. Il s'agit du "composé β I" d'ADAM-CHOSSON dont nous avons déterminé la structure sur la base des résultats suivants :

1° - L'oxydation periodique détruit l'osamine et 25 p.100 de la thréonine. Ces résultats sont différents de ceux d'ADAM-CHOSSON qui n'avait pas observé de destruction de thréonine.

2° - L'action des N-acétylglucosaminidases sur le "composé β I" N-réacétylé a été négative.

3° - L'action de la soude a été négative, avant et après réamidation. La thréonine n'est donc pas conjuguée, contrairement aux conclusions d'ADAM-CHOSSON, par une liaison O-glycosidique.

Nous pouvons donc conclure que le "composé β I" est un mélange dans les proportions relatives 3 : 1; des deux glycopeptides suivants :



Nota : La liaison 1,3 glucosaminidique est démontrée par le fait que l'acide periodique détruit seulement une osamine sur les deux résidus.

4° - L'hydrolyse acide ménagée du PTH-aspartyl-glycane fournit deux composés que nous avons isolés par chromatographie préparative sur papier dans le système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5). Tous deux sont constitués de glucosamine et de PTH-acide aspartique, en proportions équimolaires. Ils possèdent le comportement chromatographique

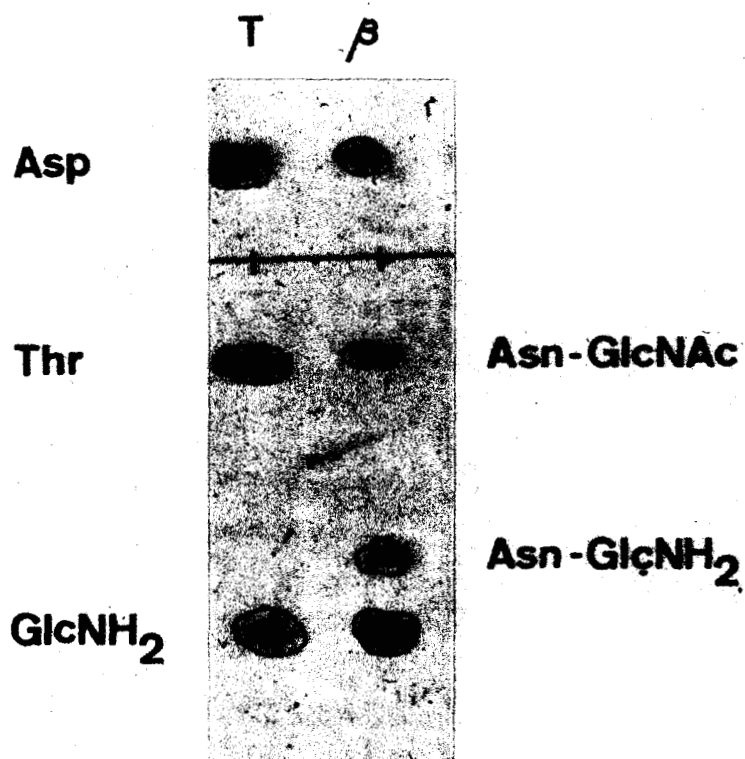


Figure 32

Electrophorèse à pH 3,9 d'un hydrolysât chlorhydrique (HCl 1,5 N ; 100°C ; 1,5 h) de la fraction glycoprotidique β . T : solution-témoin de composés purs. Asp : acide aspartique ; Thr : thréonine ; GlcNH₂ : glucosamine. β : hydrolysât chlorhydrique de la fraction β ; Asn-GlcNAc : N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine ; Asn-GlcNH₂ : N-(β -aspartyl)-glucosaminylamine.

(Tableau III ; p. 63), l'un de la N-(β -[PTH-aspartyl])-glucosaminylamine et l'autre, de la N-(β -[PTH-aspartyl])-N-acétyl-glucosaminylamine.

D - FRACTIONY

La structure de la fraction Y a été décrite dans des mémoires antérieurs (voir p. 49). Nous nous bornerons à rappeler qu'elle renferme, outre de l'acide aspartique et de la thréonine, de la cystine conjuguée par une liaison ester très alcali-labile. Des recherches plus poussées n'ont pu être entreprises car les quantités de glycoprotides Y présentes dans les hydrolysats sont toujours très faibles et le composé est même, parfois, inexistant.

III - DISCUSSION

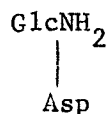
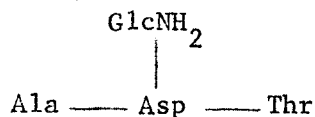
1° - Nous avons démontré sans ambiguïté que, dans l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH, glycanne et protéine sont conjugués par des liaisons de type N- β -aspartyl-N-acétylglucosaminylamine.

Nous sommes parvenu à cette conclusion en étudiant la structure de glycopeptides simples isolés à partir des hydrolysats pronasiques d'ovomucoïde. Nous l'avons confirmée en vérifiant que l'action de la soude sur l'ovomucoïde natif ne libérait pas de glucides :

500 mg d'ovomucoïde ont été traités par la soude 0,1 N, dans les conditions décrites à la p. 156. La solution a été fractionnée sur Sephadex G-50 et l'effluent a été analysé quant à sa teneur en glucides et en protéides. Un seul pic, correspondant à l'ovomucoïde, a été mis en évidence. En outre, la fraction dialysable de la solution ne renferme pas de glucides.

2° - Ainsi est démontrée l'existence de liaisons de type N- β -aspartylglucosaminylamine qui avait été suggérée par TANAKA (450) et par MONTGOMERY et WU (451,452).

Par une action de la baryte, suivie d'une hydrolyse sulfurique ménagée, sur l'ovomucoïde natif, TANAKA a obtenu deux glycopeptides auxquels il a attribué les structures suivantes :



sans préciser, toutefois les modalités de la conjugaison de la glucosamine avec l'acide aspartique.

MONTGOMERY et WU ont démontré, par la méthode d'EDMAN, que, dans les 4 glycopeptides qu'ils ont isolés, l'acide aspartique était lié au glycanne par son carbone β , sans toutefois déterminer l'ose conjugué à l'acide aminé ni les modalités de l'attache.

3° - ADAM-CHOSSON, MONTREUIL et coll. étaient parvenus aux mêmes conclusions que les nôtres, mais pensaient à l'existence, en outre, d'une ou de deux liaisons O-thréonyl-N-acétylglucosaminidiques. Nous avons infirmé ce dernier schéma.

IV - CONCLUSIONS

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude des modalités de l'attache glycanne-protide dans l'ovomucoïde sont les suivantes :

1 - Nous avons démontré sans ambiguïté que, dans tous les glycoprotides de "type α " ou de "type β " présents dans les hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH, l'acide aspartique était lié à la N-acétyl-glucosaminylamine par son carboxyle β , sur la base des résultats suivants :

a - Isolement de PTH-aspartyl-glycannes dont la formation n'est possible que si la fonction α -amino-acide n'est pas conjuguée avec le glycanne.

b - Identification du PTH-dérivé de la N-(β -aspartyl)-N-acétylglucosaminylamine (ou de son produit N-acétylé) parmi les produits d'hydrolyse acide ménagée des PTH-dérivés des aspartyl-glycannes.

c - Identification de la N-(β -aspartyl)-glucosaminylamine parmi les produits d'hydrolyse acide partielle d'aspartyl-glycannes natifs.

2 - L'action de la soude sur les glycopeptides des "types α et β " a été négative, même après la réamidation de ces derniers. Nous pouvons donc conclure qu'il n'existe pas de liaisons glycosidiques de β -hydroxy-amino-acides dans l'ovomucoïde. Nous infirmons donc les conclusions de mémoires antérieurs (ADAM-CHOSSON (453) ; MONTREUIL, SPIK, CHOSSON, SEGARD et SCHEPPLER (454) ; MONTREUIL, CASTIGLIONI et al. (455)) selon lesquels existaient, dans l'ovomucoïde, des liaisons O-thréonyl-N-acétylglucosaminides, ainsi que les hypothèses de HARTLEY et JEVONS (456) et de BEELEY et JEVONS (457).

En outre, les résultats que nous avons obtenus démontrent qu'il n'existe pas de liaisons "éther" entre la thréonine et la fonction glycanique de l'ovomucoïde contrairement à l'interprétation qui avait été donnée à des résultats antérieurs.

| |
|-----------------------|
| CONCLUSIONS GENERALES |
|-----------------------|

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude sont les suivantes :

1 - Nous avons décrit un procédé général d'hydrolyse pronasique des glycoprotéines et de fractionnement des hydrolysats qui permet d'obtenir, avec un bon rendement, des glycoprotides dont la composition, de la fraction protidique est simple puisque celle-ci renferme de 1 à 3 amino-acides seulement. On obtient, de cette manière, un excellent matériel en vue de l'étude de la structure du point d'attache glycanne-protide dans les glycoprotéines.

2 - Nous avons mis au point une série de méthodes qui permettent de déterminer les séquences d' amino-acides au voisinage de la liaison glycanne-protide et de préciser les modalités de cette dernière. En particulier, nous décrivons un procédé d'hydrolyse ménagée, -soit du glyco-amino-acide natif, soit de son PTH-dérivé-, qui permet de démontrer sans ambiguïté l'existence de liaisons "N- β -aspartyl-glucosaminylamines". En outre, l'étude de l'action de la soude sur les glycopeptides réamidés, -quand ils renferment toutefois des β -hydroxy-amino-acides-, permet de rechercher les liaisons O-glycosidiques de ces derniers sans courir le risque d'une erreur due à la position C-terminale des β -hydroxy-amino-acides conjugués. Nous avons, en effet, démontré que la " β -élimination" ne s'effectuait pas dans ce cas.

3 - L'application de ces procédés à l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH nous a permis d'isoler ou de caractériser 10 glycoprotides et de déterminer les séquences d' amino-acides au voisinage de la liaison "N- β -aspartylglucosaminylamine", à l'exclusion de toute liaison "éther", "ester" ou "O-glycosidique".

4 - Nous avons retrouvé et confirmé les résultats d'ADAM-CHOSSON et de MONTREUIL et coll. concernant la distinction en deux groupes et l'origine des glycoprotides présents dans les hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH.

Le groupe des "glycoprotides α " est constitué de galactose, de mannose, de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétyl-neuraminique dans les rapports molaires 1 : 2 à 3 : 4 à 5 : 0,3 à 1, tandis que le groupe des "glycoprotides β " ne renferme pas d'acide sialique et est composé de galactose, de mannose et de N-acétyl-glucosamine dans les rapports molaires 1 : 5 : 10.

Les sialo-glycoprotides proviennent de l'ovoglycoprotéine de KETTERER qui est un des constituants de l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH et les asialo-glycoprotides dérivent de l'ovomucoïde "proprement dit".

Nous pensons toutefois pouvoir infirmer l'existence d'un "allo-ovomucoïde".

5 - L'application de plusieurs procédés de détermination des masses moléculaires des glycoprotides nous amènent à la conclusion qu'il existe, conjugués par des liaisons "N- β -aspartyl-N-acétylglucosaminyllamine", deux chaînes glycaniques dans l'ovomucoïde "proprement dit" et quatre chaînes dans l'ovoglycoprotéine de KETTERER.

6 - Les procédés que nous avons décrits sont susceptibles d'application très générale. Ils ont permis, au laboratoire, de préciser les modalités de l'attache glycanne-protide de plusieurs glycoprotéines.

La responsabilité des méthodes d'exploration de la structure des chaînes peptidiques et des modalités de l'attache glucide-protéine que nous assumons au Laboratoire, dans le cadre d'un travail d'équipe sur les glycoprotéines, nous a permis de participer (voir p. 4) à l'étude et à la détermination de la nature de la liaison glucide-protéine dans les glycoprotéines suivantes : globulines γ G du sérum humain, du sérum et du colostrum de la Vache ; transferrine et lactotransferrine humaines ; globulines γ A du lait de Femme.

Dans le troisième chapitre de notre mémoire nous exposerons très succinctement, les résultats qui ont été obtenus, en nous limitant à la description des procédés que nous avons été amené à mettre au point.

RECHERCHES,
DANS LE CADRE D'UN TRAVAIL D'EQUIPE,
SUR LES MODALITES DE LA LIAISON
GLYCANNE-PROTIDE
DANS DIVERSES GLYCOPROTEINES.

1. - GLOBULINES γ G

I - GLOBULINES γ G DU SERUM (+) ET DU COLOSTRUM (++) DE LA VACHE

A - MODE OPERATOIRE

Les globulines γ G du sérum de Boeuf ont été préparées par un procédé original (DUQUESNE) adapté de la méthode au rivanol de HOREJSI et SMETANA (458). Leur composition centésimale en glucides est la suivante : 1,9 p.100 d'oses "neutres" ; 1,15 p.100 d'osamines et 0,47 p.100 d'acides sialiques. La fraction glycanne est constituée de galactose, de mannose, de fucose, de N-acétylglucosamine et d'acides neuraminiques (N-glycolyl et N-acétyl), dans les rapports molaires suivants : 5 : 7 : 3 : 9 : 2 moles par mole de globuline γ G.

Les globulines γ G colostrales ont été préparées selon le procédé d'ANTONY (459). Leur composition centésimale est la suivante : oses "neutres" 1,8 p.100 ; osamines 1,1 p.100 ; acides sialiques 0,82 p.100. La fraction glycanne est constituée de galactose, mannose, fucose, N-acétylglucosamine, acides neuraminiques (N-acétyl et N-glycolyl) : 6 : 6 : 2 : 8 : 4 moles par mole de globuline γ G.

L'hydrolyse pronasique, la défécation trichloracétique et la purification des hydrolysats sur échangeurs d'ions ont été réalisées dans les conditions qui ont été décrites dans le chapitre précédent (p.115).

(+) Collaboration avec Mlle Nicole DUQUESNE.

(++) Collaboration avec Mr André CHERON.

On obtient de cette manière un glycopeptide I qui est homogène en chromatographie et en électrophorèse sur papier et dont la composition molaire est précisée dans le tableau XVI (p. 169).

La structure glycopeptidique a été déterminée en appliquant les procédés généraux dans le chapitre précédent.

B - STRUCTURE DES GLYCOPEPTIDES I

La structure du glycopeptide I a été déterminée de la manière suivante :

1° - L'application de la méthode de dinitrophénylation de SANGER (460) démontre que les deux résidus d'acide aspartique se trouvent en position N-terminale. Il existe donc deux unités glycaniques par molécule de globuline γ G.

2° - La méthode de dégradation récurrente d'EDMAN scinde le glycopeptide en deux composés qui ont été isolés par chromatographie préparative sur papier dans le système-solvant n-butanol/acide formique/eau (75:15:10).

L'un est le peptide séryl-thréonine puisqu'il est constitué de sérine et de thréonine dans les proportions 1 : 1 et que, par dégradation récurrente d'EDMAN, on en libère la thréonine.

L'autre composé, qui reste au trait de départ des chromatogrammes, est le dérivé phénylthiohydantoïnique (dérivé PTH) d'un glyco-amino-acide, non réducteur, dont l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 5,6 N fournit le dérivé PTH de l'acide aspartique.

3° - La leucine-aminopeptidase est sans action. Au contraire, la carboxypeptidase libère - mais difficilement - la majeure partie de la thréonine (1,55 résidu sur les 2 résidus).

4° - Le glycopeptide résiste à l'action de la soude 0,5 N pendant 24 h à 20°C avant et après réamidation : il ne possède donc ni liaison O-séryl ou O-thréonyl-glycosidique.

Tableau XVI

Composition molaire des glycopeptides I obtenus par hydrolyse pronasique des globulines γ G sériques et colostrales de Vache (d'après DUQUESNE, MONSIGNY et MONTREUIL (461) et CHERON, MONSIGNY, ANTONY et MONTREUIL (462)).

| | <u>γ G sériques</u> | <u>γ G colostrales</u> |
|------------------|---------------------------------------|--|
| Galactose | 5 | 6 |
| Mannose | 7 | 6 |
| Fucose | 3 | 2 |
| Acides sialiques | 1 | 4 |
| Glucosamine | 9 | 8 |
| Acide aspartique | 2 | 1,98 |
| Sérine | 2 | 1,74 |
| Thréonine | 2 | 1,21 |
| Glycocolle | 0,18 | 0,07 |
| Acide glutamique | 0,09 | 0,08 |

C - NATURE DE LA LIAISON

1° - La nature de l'ose engagé dans la liaison glycanne-protéine a été précisée en appliquant aux glycopeptides I le procédé d'hydrolyse ménagée par l'acide chlorhydrique (hydrolyse à 100°C pendant 1,5 h avec l'acide chlorhydrique 1,5 N).

L'électrophorèse à pH 3,9 montre la présence de glycoprotides (glycopeptides II) qui possèdent une vitesse de migration cathodique un peu plus faible que celle de la glucosamine. Ils ont été isolés par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,9 et purifiés par chromatographie sur papier dans le système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5). Ils ne sont pas réducteurs. Leur composition est la suivante :

| | <u>Y G sériques</u> | <u>Y G colostrales</u> |
|-------------|---------------------|------------------------|
| Glucosamine | 1,4 | 1 |
| Aspartique | 1 | 1 |
| Sérine | 1 | 0,4 |
| Thréonine | 0,3 | - |

L'expérimentation précédente ayant démontré que l'acide aspartique était lié au glycanne dans les glycopeptides I, d'une part, la glucosamine étant le seul ose présent dans les glycopeptides II, d'autre part, nous pouvons conclure que l'acide aspartique et la glucosamine sont impliqués dans la liaison glycanne-protéine dans les globulines YG.

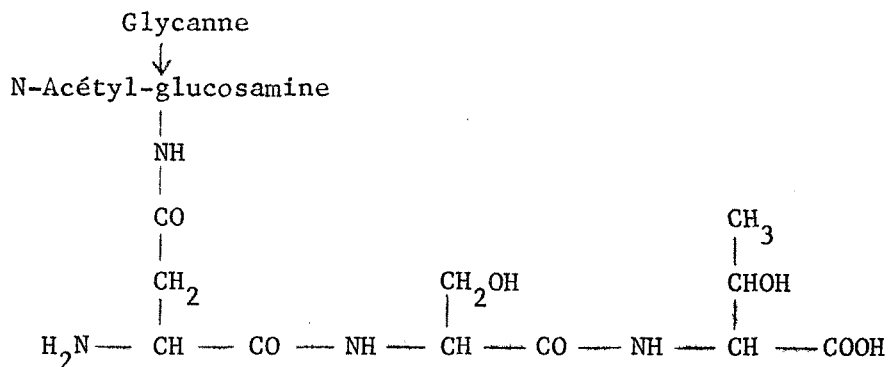
En outre, la formation du dérivé PTH de l'acide aspartique et la libération du peptide séryl-thréonine par action du phényl-isothiocyanate sur les glycopeptides I prouve que le carboxyle α de l'acide aspartique est engagé dans une liaison peptidique avec la sérine et que l'acide aspartique est attaché par son carboxyle β .

L'attache se fait sur le carbone 1 de la glucosamine puisque les glycopeptides ne sont pas réducteurs. La stabilité de ces derniers vis-à-vis de la soude montre que la liaison n'est pas de type ester. Elle était donc vraisemblablement de type N- β -aspartyl-glucosaminyldiamine.

2° - Cette hypothèse a été vérifiée par l'identification du PTH-dérivé de la N-β-aspartyl-glucosaminyllamine parmi les produits de l'hydrolyse chlorhydrique partielle du PTH-aspartyl-glycane obtenu au cours de la réaction d'EDMAN sur les glycopeptides I (voir plus haut, B, 2°).

D - CONCLUSIONS

Ces résultats démontrent qu'il existe, dans les globulines γ G du sérum et du colostrum de Vache, deux unités glycaniques unies à la fraction protéique par la glucosamine et par l'acide aspartique et que les glycopeptides I possèdent la structure suivante :



II - GLOBULINES γ G SÉRIQUES HUMAINES (+)

A - MODE OPERATOIRE

Les globulines γ G du sérum humain étaient des préparations commerciales pures (MERIEUX). Nous avons précisé dans le tableau XVII (p. 172) leur composition centésimale en glucides ainsi que la composition molaire de la fraction glycanique calculée pour un poids moléculaire de 145 000.

Le fractionnement des hydrolysats pronasiques, effectué dans les conditions qui ont été décrites à propos des globulines γ G bovines, a permis d'isoler une "fraction glycoprotidique I" dont la composition centésimale en glucides et la composition molaire sont précisées dans le tableau XVII (p. 172).

(+) Collaboration avec Mlle Nicole DUQUESNE.

Tableau XVII

Composition centésimale et molaire des globulines
 Y G humaines natives, de la "fraction glycoprotidi-
 que I" et du "glycoprotide II" (d'après DUQUESNE,
 MONSIGNY et MONTREUIL) (463).

| | Globulines Y G natives | "Fraction glycoproti- dique I" | "Glycopro- tide II" | Valeurs de Clamp et Putnam |
|----------------------------|------------------------------|--------------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| Composition centésimale | | | | |
| Oses neutres | 1,36 p.100 | 42,1 | 45,4 | 43,6 ± 3,1 |
| N-acétylglucosamine | 1,48 p.100 | 37,5 | 41,7 | 32 ± 0,5 |
| Acide N-acétylneuraminique | 0,26 p.100 | 7,36 | 2,09 | - |
| Composition molaire | | | | |
| Galactose | 3 | 3 | 3 | 8 |
| Mannose | 6 | 6 | 6 | |
| Fucose | 2 | 2 | 2 | 2 |
| N-acétylglucosamine | 10 | 10 | 10 | 8 |
| Acide N-acétylneuraminique | 1 | 1 | 0,3 | - |
| Acide aspartique | - | 3,33 | 2,68 | 2 |
| Sérine | - | 1,92 | 1,97 | 1,5 |
| Thréonine | - | 1,81 | 1,96 | 1,4 |
| Acide glutamique | - | 0,92 | 0,20 | 0,2 |
| Alanine | - | 0,35 | 0,09 | 0,2 |
| Glycocolle | - | 0,34 | 0,08 | 0,2 |
| Proline : | - | Traces | 0 | 0,4 |
| Méthionine | - | - | 0,06 | - |

B - STRUCTURE DU "GLYCOPEPTIDE II"

1° - La méthode de dégradation récurrente d'EDMAN scinde le "glycoprotide II" en deux composants majeurs. L'un est le peptide séryl-thréonine ; l'autre est le PTH-dérivé d'un glycoprotide dont l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 1,5 N fournit seulement le PTH-dérivé de l'acide aspartique.

La formation du PTH-aspartyl-glycane et la libération du peptide séryl-thréonine nous permettent de conclure que le peptide aspartyl-séryl-thréonine est conjugué au glycane par le groupement carboxylique β de l'acide aspartique.

2° - Mise en évidence d'une liaison "N- β -aspartyl-glucosaminylamine"

a - Le "glycoprotide II" résiste à l'action de la soude 0,5 N pendant 24 h à 20°C avant et après réamidation : il ne possède donc ni liaison ester, ni ni liaison O-séryl ou O-thréonyl-glycosidique.

b - Les produits totaux de la réaction d'EDMAN appliquée au "glycoprotide II" ont été hydrolysés par l'acide chlorhydrique 1,5 N à 100°C pendant 1,5 h. L'électrophorèse sur papier à pH 3,9 de ces hydrolysats révèle l'existence de sept fractions dont les vitesses relatives de migration, calculées par rapport à la glucosamine (bande n°1), sont les suivantes :

Fractions

| | | |
|---|----|------|
| 2 | : | 0,80 |
| 3 | : | 0,70 |
| 4 | :: | 0,57 |
| 5 | : | 0,45 |
| 6 | : | 0,34 |
| 7 | : | 0 |

Les fractions 3, 4 et 5, qui donnent une réaction positive à la ninhydrine et une réaction négative avec le réactif à l'azoture de sodium de CHERBULIEZ et coll. (464) spécifique des thiohydantoïnes, existent seulement à l'état de traces et n'ont pas encore été identifiées.

La bande 7 est constituée par le PTH-dérivé de l'acide aspartique (PTH-dérivé I).

Le composé 2 a été identifié au PTH-dérivé de la β 1-N-(β -aspartyl)-1,2-didéoxy-2-aminoglucoylamine (PTH-dérivé II).

La fraction "neutre" 6 est très hétérogène en chromatographie sur papier dans le système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5), et, par chromatographie préparative sur papier ont été isolés et identifiés, - outre la sérine, la thréonine, la séryl-thréonine et les oses neutres -, le PTH-dérivé de la 1-N-(β -aspartyl)-1,2-didéoxy-2-acétamido-glucosylamine (PTH-dérivé III).

Ce dernier composé a été caractérisé de la manière suivante :

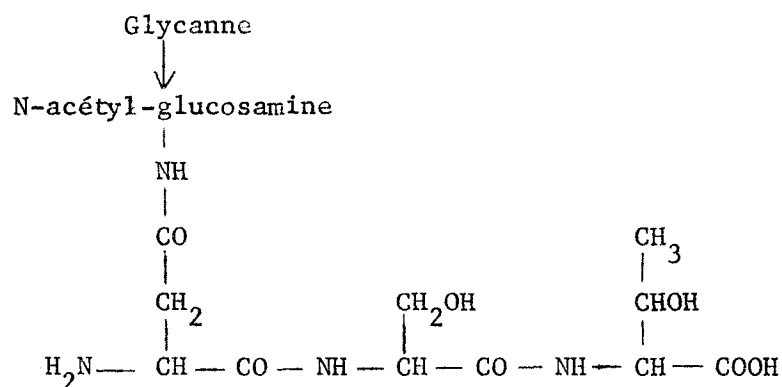
α - ses comportements électrophorétique et chromatographique (Tableau III ; p. 63) sont identiques à ceux du PTH-dérivé que nous avons préparé à partir d'un échantillon de 1-N-(β -aspartyl)-1,2-didéoxy-2-acétamido-glucosylamine pur (voir p. 60) ;

β - Il n'est pas réducteur ;

γ - Il est uniquement composé, en proportions équimoléculaires, de glucosamine et du PTH-dérivé de l'acide aspartique.

C - CONCLUSIONS

1 - Les hydrolysats pronasiques de globulines γ G du sérum humain contiennent une fraction glycoprotidique qui est constituée par un mélange de deux glycoprotides. L'un (80 p.100 environ de la fraction) possède la structure suivante :



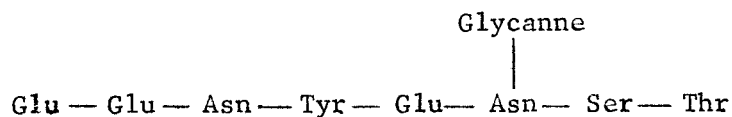
L'autre (20 p.100 environ de la fraction) ne contient que l'acide aspartique. Ces résultats confirment les conclusions de ROSEVEAR et SMITH (465), de ROTHFUS (466) et de ROTHFUS et SMITH (467) selon lesquelles l'acide aspartique est lié à la fraction glycannique.

2 - Les résultats obtenus au Laboratoire démontrent sans ambiguïté l'existence, dans les globulines γ G du sérum humain, de liaisons glycanne-protéine du type 1-N-(β -aspartyl)-1,2-didéoxy-2-acétamido-glucosylamine dont la présence avait été posée en hypothèse par ROTHFUS (468) et par ROTHFUS et SMITH (469).

3 - En nous fondant, d'une part, sur la composition du "glycoprotide II" et, d'autre part, sur le fait que la totalité de l'acide aspartique passe à l'état de PTH-dérivé au cours de la dégradation d'EDMAN, nous pouvons conclure qu'il existe, dans les globulines γ G du sérum humain, deux unités glycaniques d'un poids moléculaire moyen de 2 000 environ. Nous parvenons donc aux mêmes conclusions que FRANKLIN et DISCHE (470) et CLAMP et PUTNAM (471). Nous nous éloignons, au contraire, de celles de ROSEVEAR et SMITH (472) selon lesquelles il n'existerait qu'un seul groupement glycanique.

4 - Il est intéressant de rapprocher les résultats obtenus à propos des globulines γ G du sérum humain, d'une part, du sérum et du colostrum de Vache, d'autre part. Dans les deux cas, les résultats sont identiques : les deux chaînes glycaniques sont unies à l'acide aspartique de la même manière et les séquences C-terminales sont identiques.

5 - En associant ces résultats à ceux de ROSEVEAR et SMITH (473) qui ont déterminé la séquence N-terminale d'un glycopeptide isolé des hydrolysats enzymatiques des globulines γ G du sérum humain (Glu-Glu-Asn-Tyr-Glu-Asn-Glycanne), nous pouvons conclure que les groupements glycaniques sont attachés en position "interne" sur les chaînes protéiques et que la structure de la fraction peptidique voisine du point d'attache est la suivante :



| |
|-------------------------------|
| 2. - TRANSFERRINE HUMAINE (+) |
|-------------------------------|

A - MODE OPERATOIRE

L'hydrolyse pronasique d'échantillons commerciaux (BEHRING-WERKE) de transferrine humaine, d'une part, l'isolement des glycopeptides, d'autre part, ont été effectués dans les conditions générales que nous avons décrites, à propos de l'ovomucoïde et des globulines γ G, à la différence près que la transferrine avait été préalablement débarrassée de l'acide N-acétylneuraminique par une hydrolyse sulfurique douce (H_2SO_4 , 0,1 N, à 80°C, pendant 1 h).

Les hydrolysats ont été purifiés sur résines échangeuses d'ions (voir p. 116), puis fractionnés par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,9.

On a obtenu, de cette manière, 2 glycopeptides dont la composition et la structure ont été déterminées en appliquant les procédés décrits dans le chapitre précédent.

B - RESULTATS

1 - La composition des glycopeptides I et II est précisée dans le tableau XVIII (p. 177). On voit que la séparation électrophorétique de ces composés a été rendue possible par la présence de résidus de lysine dans le glycoprotide II.

Les glycopeptides I et II possèdent une composition voisine de celle des glycopeptides DEAE-GP II et DEAE-GP III de JAMIESON (474).

2 - L'application de la méthode de dinitrophénylation de SANGER montre que la totalité de l'acide aspartique dans le glycopeptide II, et la totalité de la sérine, dans le glycopeptide I se trouvent en position N-terminale. Ces résultats impliquent l'existence de deux chaînes glycaniques dans la transferrine humaine.

(+) Collaboration avec Mlle Geneviève SPIK.

Tableau XVIII

Composition molaire des glycopeptides I
et II isolés des hydrolysats pronasiques
de la transferrine humaine (d'après SPIK,
MONSIGNY et MONTREUIL)

| | Glycoprotide I | Glycoprotide II |
|------------------|----------------|-----------------|
| Glucosamine | 10 | 10 |
| Acide aspartique | 1,64 | 2,04 |
| Sérine | 1,50 | - |
| Lysine | - | 1,88 |

3 - La leucine-aminopeptidase libère la sérine du glycopeptide I et conduit à un glyco-amino-acide qui renferme uniquement de l'acide aspartique.

4 - La méthode de dégradation récurrente d'EDMAN, appliquée au glycopeptide I fournit le dérivé PTH de la sérine et libère un glyco-amino-acide qui ne renferme plus que de l'acide aspartique.

Appliquée au glycopeptide II, elle libère l' ϵ -phénylthiocarbamyl-lysine et donne le dérivé PTH d'un glyco-amino-acide dont l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 5,6 N fournit uniquement le dérivé PTH de l'acide aspartique.

5 - L'hydrolyse acide partielle (HCl 1,5 N ; 1,5 h à 100°C) des aspartyl-glycannes (obtenus à partir du glycopeptide I par dégradation récurrente d'EDMAN et par hydrolyse par la leucine-amino-peptidase) conduit à un glyco-amino-acide qui a été isolé par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,9.

Il est constitué uniquement de glucosamine et d'acide aspartique dans les proportions 1 : 1 et possède les propriétés et le comportement électrophorétique de la N- β -aspartyl-glucosaminylamine.

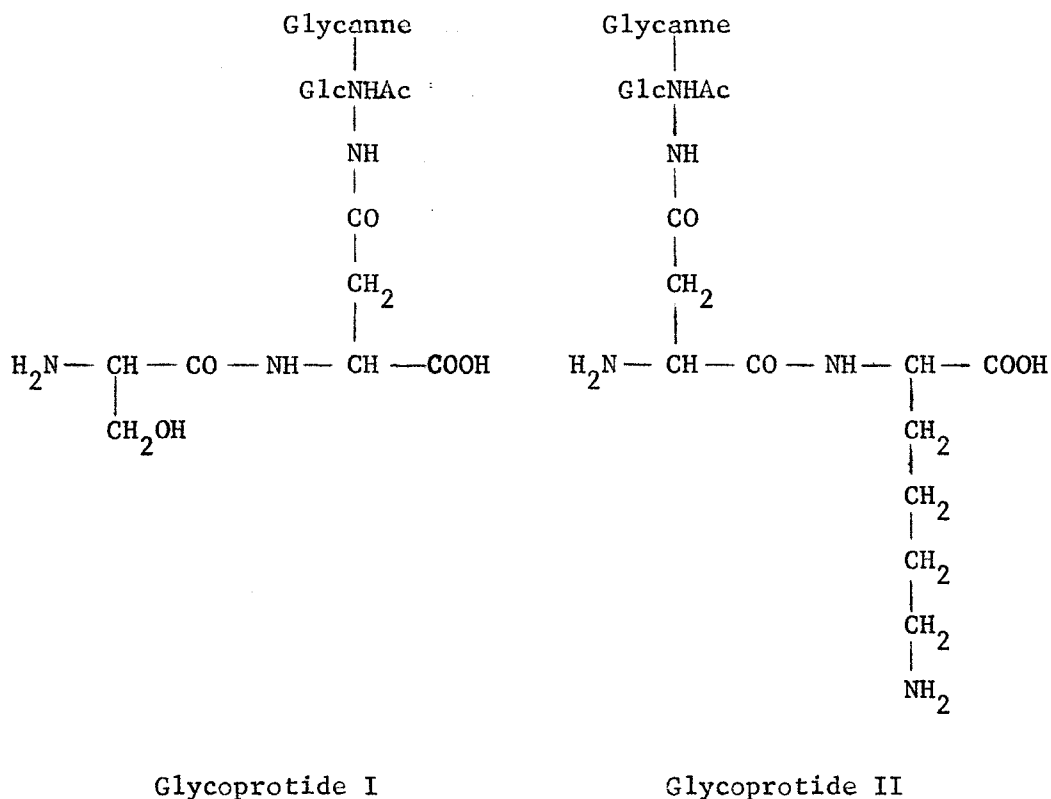
6 - L'hydrolyse acide, effectuée dans les mêmes conditions, du PTH-aspartyl-glycanne obtenu par dégradation d'EDMAN du glycopeptide II, fournit la N- β -(PTH-aspartyl)-glucosaminylamine.

7 - L'action de la soude est négative sur les glycopeptides I et II, avant et après réamidation. Ils ne renferment donc aucune liaison ester ou O-glycosidique.

C - CONCLUSIONS

1 - Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude sont les suivantes :

Les schémas de structure des glycoprotides I et II sont les suivants :



2 - La transferrine humaine possède deux groupements glycaniques unis, l'un et l'autre, au groupement protidique par une liaison N- β -aspartyl-glucosaminylaminique.

3 - LACTOTRANSFERRINE HUMAINE (+)

A - MODE OPERATOIRE

La lactotransferrine a été isolée selon le procédé de MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (475) et purifiée sur DEAE-cellulose. La composition centésimale en glucides de la préparation était la suivante : oses "neutres"

(+) Collaboration avec Mlle Geneviève SPIK.

(galactose, glucose, mannose, fucose : 6 : 1 : 6 : 4) 3,1 p.100 ; N-acétylglucosamine 2,93 p.100 (13 résidus par mole) ; acide N-acétylneuraminique 1,3 p.100 (4 résidus par mole).

Les hydrolysats pronasiques de l'apo-asialo-lactotransferrine, préparés dans les conditions que nous avons décrites, ont été purifiés par un passage sur des colonnes d'échangeurs de cations et d'anions. Le liquide effluent, lyophilisé, fournit une fraction glycoprotidique dont la composition et la structure ont été déterminées par l'application des procédés généraux que nous avons décrits.

B - RESULTATS

1° - La composition de la fraction glycopeptidique en acides aminés est précisée dans le tableau XIX (p. 181). Sa composition en glucides était la suivante :

| | |
|---------------------|------------|
| Oses "neutres" | 38,4 p.100 |
| N-acétylglucosamine | 37,2 p.100 |

Il est intéressant de comparer ces résultats avec les valeurs de GOT (476) concernant un glycopeptide obtenu par chromatographie sur Sephadex G-25, suivie d'une électrophorèse sur papier à pH 2,4, d'un hydrolysat pronasique de lactotransferrine : hexoses 33 p.100, fucose 7 p.100, hexosamines 20 p.100, acide sialique 9,6 p.100 ; 1 résidu d'acide aspartique, 2 d'acide glutamique, 1 de proline, 1 de leucine et un peu de thréonine.

2° - MISE EN EVIDENCE D'UNE LIAISON O-THREONYL-GLYCOSIDIQUE

L'action de la soude 0,5 N à 20°C, pendant 1 à 7 jours, en présence de borohydrure de sodium 0,3 N suivie de la réduction du "déhydro-amino-acide" formé, par une méthode originale au sodium-ammoniac (voir p.39 et Appendice technique, p. 211) a apporté les résultats suivants :

a - Un résidu de thréonine disparaît, tandis qu'apparaît de l'acide α -aminobutyrique formé par la réduction de l'acide 2-amino-2-buténoïque produit par la réaction de " β -élimination".

Tableau XIX

Composition en amino-acides de la fraction glycoprotidique, obtenue par hydrolyse pronasique de la lactotransferrine, avant et après action de la soude (d'après SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL)

| | avant action de la soude | après action de la soude |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Glucosamine | 13 | 13 |
| Acide aspartique | 2,53 | 2,6 |
| Thréonine | 3,10 | 1,9 |
| Sérine | 0,66 | 0,5 |
| Acide glutamique | 2,16 | 1,83 |
| Proline | 1,90 | 0,80 |
| Glycocolle | 1,45 | 0,70 |
| Alanine | 0,23 | + |

b - Le passage du mélange sur des colonnes d'échangeurs de cations fournit deux solutions : l'une est constituée par la solution effluente (solution 1) à laquelle on joint les eaux de lavage des colonnes. L'autre (solution 2) est obtenue par le passage sur ces dernières d'une solution d'ammoniaque 0,5 N.

α - La solution 2 ne renferme pas de glucides. Analysée à l'Auto-analyseur Technicon après hydrolyse, elle se révèle constituée de peptides qui renferment la totalité de l'acide α -amino-butérique. Il s'agit des peptides détachés par l'action de la soude.

β - La solution 1 donne par électrophorèse préparative sur papier à pH 2,4 (acide acétique 1 N), deux constituants majeurs dont les propriétés sont les suivantes :

1 - Le constituant I possède un caractère "neutre". Il est ninhydrine-négatif et donne une réaction positive avec les réactifs à l'acide periodique-benzidine, spécifiques des fonctions α -glycols.

Il s'agit d'un glycanne détaché par la rupture de la liaison O-thréonyl-glycosidique. En effet, il ne renferme pas d'acides aminés et il est constitué seulement de glucides. Sa composition en oses "neutres" est la suivante : galactose, mannose, fucose : 4 : 4 : 2. Il contient, en outre, un polyol qui a été mis en évidence par chromatographie en couche mince, mais qui n'a pas encore été identifié. On sait toutefois que ce polyol est le galactitol ou le mannitol.

2 - Le constituant II possède en électrophorèse, un comportement cationique. Il donne une réaction positive avec les réactifs à la ninhydrine et à l'acide periodique-benzidine. Il s'agit de glyco-amino-acides constitués d'acide aspartique associés à des glycannes dont la composition en oses "neutres" est différente de celle du constituant I : galactose, mannose, fucose : 4 : 6 : 3.

Il s'agit des glycoprotides qui ont résisté à l'action de la soude et dans lesquels des liaisons N- β -aspartyl-glucosaminyamine ont été caractérisées.

3° - MISE EN EVIDENCE D'UNE LIAISON DE L'ACIDE ASPARTIQUE ET DE LA GLUCOSAMINE

Les hydrolysats acides partiels (HCl 1,5 N, à 100°C, pendant 1,5 h) du constituant II précédent ont été soumis à l'électrophorèse préparative sur papier à 3,9. La zone d'éluion située immédiatement en arrière de la glucosamine a été fractionnée dans un second temps par chromatographie préparative sur papier dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5). On a isolé, de cette manière, - outre un oside ne renfermant que de la glucosamine -, un glyco-amino-acide non réducteur dont l'hydrolyse totale a fourni uniquement de l'acide aspartique et de la glucosamine dans les proportions 1 : 2, et qui possède les propriétés et le comportement électrophorétique de la N- β -aspartyl-glucosaminyllamine.

C - CONCLUSIONS

1° - Il existe, dans la transferrine humaine, deux types de liaisons glycanne-protéine.

Dans l'une, sont unis l'acide aspartique et la glucosamine sous la forme de N- β -aspartyl-N-acétylglucosaminyllamine.

Dans l'autre, la thréonine et un hexose sont conjugués par une liaison O-thréonyl-glycosidique, la nature de l'ose (galactose ou mannose) restant toutefois à préciser.

2° - La lactotransferrine renferme au moins deux unités glycaniques (trois selon GOT et al.) (477,478) dont les compositions en oses sont différentes. Une seule est unie à la fraction protéique par une liaison O-thréonyl-glycosidique.

4 - GLOBULINES γ A DU LAIT DE FEMME (+)

A - MODE OPERATOIRE

1° - ISOLEMENT ET ETUDE DE LA COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES

a - Les globulines γ A ont été isolées par le procédé de relargage au sulfate d'ammonium de MONTREUIL, CHOSSON, HAVEZ et MULLET (479), purifiées

par chromatographie sur colonne de Sephadex G-100, puis de CM-Sephadex C-50.

La préparation et la purification des hydrolysats pronasiques ont été effectuées selon un mode opératoire que nous avons décrit.

b - La composition centésimale et molaire en glucides de la glycoprotéine native et des glycopeptides a été déterminée à l'aide de méthodes qui ont dû être adaptées aux caractères particuliers des globulines γA : présence de galactosamine et de glucosamine ; existence de nombreuses liaisons de type O-glycosidique.

Les acides aminés ont été dosés à l'Auto-analyseur Technicon avec un tampon original (voir Appendice technique ; p. 211) qui évite l'interférence, avec la valine et l'acide α -amino-butyrique, des pics de la glycosamine et de la galactosamine. La précision du dosage de ces dernières est donc augmentée et les résultats que nous obtenons sont, en outre, vérifiés, par la méthode colorimétrique de LUDOWIEG et BENMAMAN (480). Les résultats sont exprimés en μM p. mg de glycopeptides.

2° - ACTION DE LA SOUDE SUR LES GLYCOPEPTIDES

a - Protocole expérimental

Nous avons appliqué, dans ses grandes lignes, le mode opératoire décrit par TANAKA et al. (481) 250 mg de glycopeptides sont maintenus, pendant 3 jours à 20°C dans 50 ml d'une solution 0,1 M en soude et 0,3 M en borohydrure de sodium.

La composition centésimale en glucides totaux, - d'une part -, la composition molaire (exprimée en μM p. mg de glycopeptides) en acides aminés et en osamines, - d'autre part -, ont été déterminées en appliquant les procédés de dosage que nous avons décrits plus haut.

La présence des osaminitols dans les hydrolysats chlorhydriques des glycopeptides traités par la soude en milieu réducteur, introduit une cause d'erreur dans le dosage des osamines à l'Auto-analyseur Technicon car les composés possèdent le comportement chromatographique de la galactosamine. Nous éliminons cette interférence de deux manières :

1) en dosant la glucosamine et la galactosamine par la méthode colorimétrique de LUDOWIEG et BENMAMAN (482) ;

2) en détruisant par la soude (soude 0,1 N; à 100°C, pendant 5 mn) les osamines préalablement N-réacétylées par la méthode de LEVY et Mc ALLAN (483). Cette action suivie d'une nouvelle hydrolyse acide (HCl 2 N, à 100°C, pendant 2 h) destinée à N-désacétyler les osaminitols qui sont ensuite dosés à l'Auto-analyseur Technicon.

Ces procédés que nous avons personnellement mis au point sont décrits en détail dans l'Appendice technique (voir p. 211).

Les déhydro-amino-acides formés au cours de la " β -élimination" ont été réduits par le procédé de réduction par le sodium dans l'ammoniac liquide (voir Appendice technique ; p. 211).

Les mêmes protocoles expérimentaux ont été appliqués aux glycopeptides réamidés.

b - Fractionnement et étude des composés libérés par l'action de la soude

Les produits de l'action de la soude sont fractionnés sur résines échangeuses d'ions. On obtient, de cette manière, comme dans le cas de la lactotransferrine :

- une fraction effluente "neutre" qui contient les glycannes détachés par l'action de la soude et les glycoprotides alcali-stables. On sépare les premiers des seconds par une électrophorèse préparative sur papier à pH 1,5.

- et une fraction "basique" que l'on déplace de l'échangeur de cations et qui renferme les peptides libérés par la soude.

B - RESULTATS

1° - Nous avons rassemblé dans le tableau XX (p. 186) les résultats qui concernent la composition globale des glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique des globulines γ A.

Tableau XX

Composition molaire en oses et en acides aminés des différentes fractions obtenues à partir des hydrolysats pronasiques des globulines γ A du lait de Femme (d'après DESCAMPS, MONSIGNY et MONTREUIL).

| Glyco-protides natifs ou réamidés | | Glycoprotides natifs ou réamidés par la soude | | | | | |
|-----------------------------------|------|---|-------|--|---|---|-------|
| | | Totaux | | Fractions | | | |
| | | Avant réduction par le sodium-ammoniac | Après | Glycannique (fraction I) 28,4 p.100 | Glycoprotidique (fraction II) 62,6 p.100 | Peptidique (fraction III) 9 p.100 non réduite réduite par le sodium ammoniac | |
| Asp | 9,85 | 8,9 | 8,6 | 0,53 | 7,2 | 1,9 | 1,8 |
| Thr | 9,85 | 6 | 6,35 | 0,43 | 3,8 | 2,54 | 2,6 |
| Ser | 8 | 5,1 | 5,7 | 0,22 | 2,22 | 2,85 | 3 |
| Glu | 2,85 | 2,54 | 2,54 | 0,27 | 1,43 | 1,43 | 1,4 |
| Pro | 10,2 | 10,8 | 9,5 | 0,15 | 3,2 | 5,1 | 4,9 |
| Gly | 5 | 6 | 5,7 | 0,28 | 2,54 | 1,9 | 1,8 |
| Ala | 6,75 | 7 | 10,2 | 0,17 | 3,2 | 3,2 | 6,67 |
| Val | 2,85 | 3,2 | 2,22 | 0,29 | 1,27 | 1,15 | 1,15 |
| α -NH ₂ but | 0 | 0,63 | 2,85 | - | - | 0,3 | 2,7 |
| GlcNH ₂ | 40 | 42 | 41 | 10,5 | 31,8 | 1,9 | 1,9 |
| GalNH ₂ | 10 | 3,5 | } 3,8 | + | 2,7 | } 0,8 | } 0,8 |
| GalNH ₂ itol | 0 | 3,2 | | 3,2 | - | | |
| Oses | 79,5 | | | 30,8 | 50,2 | 1,05 | - |
| Acides sialiques | 9,05 | | | 4,12 | 5,4 | - | - |

2° - L'action de la soude fait disparaître 3 résidus de sérine et 4 résidus de thréonine, ainsi que 7 résidus de galactosamine.

Il apparaît simultanément du galactosaminitol, 3 résidus d'amanine (provenant de la réduction de la déhydro-alanine) et 3 résidus d'acide α -amino-butyrique (provenant de la réduction incomplète des résidus d'acide α -amino-buténoïque).

Nota a - La présence des "déhydro-amino-acides" a été confirmée par la formation et l'identification des quinoxalinols correspondant (voir p. 36 et Appendice technique ; p.211) à partir des produits d'action de la soude en milieu non réducteur.

b - Les "déhydro-amino-acides" ont été caractérisés uniquement dans les peptides détachés par la soude et présents dans la fraction "basique" des milieux de réactions (voir ci-dessus).

3° - L'électrophorèse préparative à pH 1,5 de la fraction "neutre" de ces derniers permet d'obtenir, d'une part, les glycanes détachés et réduits et, d'autre part, les glycoprotides alcalis-résistants.

Parmi les produits de l'hydrolyse acide partielle de ces derniers, on a isolé et identifié la N- β -aspartyl-glucosaminylamine.

C - CONCLUSIONS

Dans les globulines γ A du lait de Femme, existent deux types de liaisons glycanne-protides :

1 - 7 chaînes glycaniques sont unies à la protéine par des liaisons O-N-acétyl-galactosaminidiques : 3 avec la sérine et 4 avec la thréonine.

2 - Les autres chaînes sont conjuguées par des liaisons N- β -aspartyl-glucosaminylamine.

Nos résultats sont à rapprocher de ceux qu'ont récemment obtenus DAWSON et CLAMP (484) à propos de globulines γ A de myélome. Ces auteurs ont démontré la présence de ces deux types de liaisons dans ces protéides "pathologiques". On ignore encore si la conjugaison s'effectue de la même manière dans les globulines γ A sériques normales.

| |
|-----------------|
| 5 - CONCLUSIONS |
|-----------------|

I. - De l'ensemble des résultats que nous avons décrits dans ce dernier chapitre, nous pouvons conclure que les méthodes d'analyse des glycoprotides que nous avons mises au point sont susceptibles d'être appliquées d'une manière générale.

Elles ont permis de démontrer, sans ambiguïté et d'une manière originale, les modalités de la conjugaison des glycanes avec les chaînes peptidiques dans plusieurs glycoprotéines.

2. - Pour la première fois, a été démontré la co-existence de deux types différents de mode d'attache dans les mêmes molécules de glycoprotéine : à propos de la lactotransferrine et des globulines γ A.

3. - Dans le cas des liaisons de type N- β -aspartyl-glucosaminylamine, on remarquera que l'acide aspartique est toujours conjugué à un β -hydroxy-amino-acide. Cette observation est à la base d'une hypothèse que nous formulerons dans nos conclusions générales et qui concerne la "codage protéique" de la conjugaison glycanne-protide dans les glycoprotéines.

CONCLUSIONS GENERALES

Les recherches que nous avons effectuées nous ont conduit à mettre au point une série de méthodes qui permettent, d'une part, de déterminer la nature N- β -aspartyl-glucosaminylaminique ou O-glycosidique des liaisons glycanne-protide dans les glycoprotéines et, d'autre part, de préciser les séquences peptidiques au voisinage des points d'attache dans les glycopeptides. Elles ont été suivies d'applications aux glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde, d'une part, de ~~de~~ diverses glycoprotéines, d'autre part, : globulines immunes γ G et γ A, transferrine et lactotransferrine. Les travaux concernant ces derniers composés ont été effectués en équipe.

I - Les principaux résultats que nous avons obtenus à propos des méthodes d'analyses sont les suivants :

A - Déterminations des modalités de l'attache glycanne-protide

1° - Cas de liaisons O-glycosidiques

a - Nous avons réalisé la synthèse des composés nouveaux (à l'exception du O-séryl- β -N-acétylglucosaminide) suivants, dont nous avons, ensuite, étudié la stabilité vis-à-vis des acides et des alcalis :

O-L-séryl- et O-L-thréonyl- β -N-acétyl-D-glucosaminides

O-L-sérylamide et O-L-thréonylamide- β -N-acétyl-D-glucosaminides

O-L-séryl et O-L-thréonyl- β -D-glucosaminides.

b - Les O-séryl et O-thréonyl-glucosaminides résistent à l'action de l'acide chlorhydrique 1,5 N, à 100°C, pendant 1,5 h, - dans les conditions classiques de formation des osyl-amino-acides à partir des glycoprotides.

c - Les O-séryl et O-thréonyl-glucosaminides et N-acétyl-glucosaminides résistent à l'action de la soude. Au contraire, les liaisons glycosides de la sérinamide et de la thréoninamide sont coupées par " β -élimination". Nous avons par cette observation :

1 - démontré le mécanisme de la rupture des liaisons O-glycosidiques des β -hydroxy-amino-acides par β -élimination et montré que celle-ci ne pouvait s'effectuer que si le groupement carboxylique de l'hydroxy-amino-acide était bloqué.

2 - éliminé une cause d'erreur dans l'interprétation des résultats de l'action de la soude sur les glycoprotides : une action négative ne peut, en effet, permettre de conclure, à priori, à l'absence de liaison O-glycosidique si le glycopeptide n'a pas été préalablement réamidé par un procédé original que nous décrivons.

d - Enfin, nous avons mis au point des méthodes qui permettent d'identifier et de doser les osamines et les acides aminés modifiés par la réaction de " β -élimination" effectuée en phase réductive : glucosaminitol et galactosaminitol, d'une part ; alanine et acide α -amino-butyrrique, d'autre part, obtenus par réduction des acides α -amino-acrylique et α -amino-buténoïque réalisée à l'aide d'un procédé original au sodium-ammoniac.

2° - Cas de liaisons de type N- β -aspartyl-glucosaminylamine

a - Nous avons étudié la stabilité de la N- β -aspartyl-glucosaminylamine et montré qu'elle était stable vis-à-vis de la soude 0,1 N à 20°C, pendant plusieurs jours et de l'acide chlorhydrique 1,5 N à 100°C pendant 1,5 h. Ce composé peut donc accompagner les O-séryl et O-thréonyl-glucosaminides parmi les produits de l'hydrolyse partielle des glycoprotéines. Il possède, en outre, le même comportement électrophorétique que ces derniers. Toutefois, la discrimination est rendue possible par l'étude de l'action de la soude sur les produits de réamidation : les O-glucosaminides sont détruits, tandis que la N- β -aspartyl-glucosaminylamine résiste à l'alcali.

b - Nous avons mis au point un procédé de dégradation récurrente d'EDMAN qui, appliqué aux glycopeptides conjugués par une liaison N-(β -aspartyl)-glucosaminylaminique, permet d'obtenir un PTH-aspartylglycane dont la formation implique que la fonction α -amino-acide n'est pas ~~en~~ ^{occupée} dans l'attache glucide-protide. En outre, l'hydrolyse acide partielle (HCl 1,5 N, à 100°C pendant 1,5 h) conduit à la PTH-aspartyl-glucosaminylamine dont nous avons décrit les propriétés qui permettent de l'identifier.

B - Détermination des séquences peptidiques au voisinage des points d'attache

Nous avons été amené à adapter au cas particulier des glycoprotides les procédés généraux de détermination des séquences peptidiques, car la présence de la fraction glycanique modifie profondément les propriétés physico-chimiques, comme les caractères de solubilité des dérivés que l'on obtient par l'application des procédés de SANGER et d'EDMAN.

a - L'application de la méthode de SANGER conduit, dans le cas des glycoprotides, à des dérivés dinitrophénylés qui sont hydrosolubles et qui ne peuvent être isolés par les méthodes classiques. Nous avons donc été amené à mettre au point un procédé de précipitation sélective par l'éthanol et l'éther. En outre, nous avons montré la nécessité de doser les acides aminés non dinitrophénylés, libérés par l'hydrolyse acide des DNP-glycopeptides de manière à déterminer par différence la quantité d'acides aminés qui se trouvaient initialement en position N-terminale et à éviter de graves causes d'erreur d'interprétation des résultats.

b- Nous avons mis au point un procédé de dégradation récurrente selon EDMAN, fondé sur la caractérisation des PTH-amino-acides libérés et le dosage des acides aminés non substitués. Cette méthode permet, à la fois

- 1 - de déterminer la séquence peptidique au voisinage du point d'attache ;
- 2 - de caractériser l'acide aminé conjugué au glycanne en hydrolysant le PTH-amino-acyl-glycanne et en caractérisant le PTH-amino-acyl-ose ;
- 3 - de démontrer, dans le cas d'une liaison aspartyl-glucosylaminique, que l'acide aspartique est conjugué par sa fonction carboxylique β .

c - Nous avons adapté la méthode de GHUYSEN de dosage des fonctions NH_2 à la détermination de la masse moléculaire des glycoprotides et à la détermination du nombre de chaînes glycaniques présentes dans une glycoprotéine.

II - Nous avons amélioré les procédés de YAMASHINA et d'ADAM-CHOSSON d'hydrolyse des glycoprotéines par la pronase et les méthodes de fractionnement des hydrolysats. Les modifications que nous avons apportées nous permettent d'obtenir, avec un bon rendement, des glycoprotides dont la fraction protidique ne renferme que 1 à 3 amino-acides et qui représentent donc un excellent matériel pour explorer les modalités de la liaison glycanne-protéine.

III - L'ensemble de ces techniques ont été mises au point en utilisant l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH que nous avons étudié dans une première série de recherches.

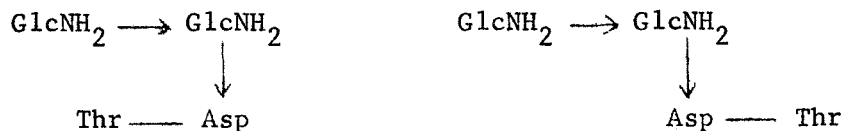
1° - Reprenant les premiers travaux de MONTREUIL et coll. et d'ADAM-CHOSSON, nous avons retrouvé certains des résultats obtenus par ces auteurs : présence des glycopeptides α , β (et parfois γ) dans les hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde ; caractérisation du composé β_I (2 glucosamines, 1 aspartique, 1 thréonine) dans les hydrolysats acides partiels du glycopeptide β ; existence de liaisons de type N- β -aspartyl-glucosaminylamine dans l'ovomucoïde.

Toutefois, nos résultats s'éloignent de ceux des auteurs précédents sur trois points principaux :

a - Les hydrolysats pronasiques d'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH contiennent, non pas 3 (glycopeptides α_4 , β et γ), mais 10 glycoprotides dont nous avons déterminé les structures.

b - Dans les 10 glycoprotides, les glycannes, sont unis à la fraction protidique uniquement par des liaisons de type N-(β -aspartyl)-glucosaminylaminique à l'exclusion de toute liaison ester, éther et O-glycosidique.

En particulier, le composé β_I d'ADAM-CHOSSON, sur la structure duquel reposait essentiellement l'argumentation de cet auteur et de MONTREUIL et coll. pour conclure à l'existence de liaisons O-glycosidiques dans l'ovomucoïde, n'est pas un mélange de N- β -aspartyl-glucosaminylamine et de O-thréonyl-glucosaminide, mais un mélange des deux glycopeptides :



c - Nous confirmons la présence, dans les préparations d'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH de deux glycoprotéines : l'ovomucoïde "proprement dit" et l'ovoglycoprotéine de KETTERER, mais nous infirmons l'existence de l'allo-ovomucoïde.

2° - Nous confirmons les résultats antérieurs d'ADAM-CHOSSON et de MONTREUIL et coll. et, comme ces auteurs, nous classons les glycopeptides provenant de l'hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde de FREDERICQ et DEUTSCH en deux groupes différents par leur composition en glucides.

Le groupe des "glycoprotides α " est constitué de galactose, de mannose, de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétyl-neuraminique dans les rapports molaires 1 : 2 à 3 : 4 à 5 : 0,3 à 1, tandis que le groupe des "glycoprotides β " ne renferme pas d'acide sialique et est composé de galactose, de mannose et de N-acétyl-glucosamine dans les rapports molaires 1 : 5 : 10.

Les sialo-glycoprotides proviennent de l'ovoglycoprotéine de KETTERER et les asialo-glycoprotides dérivent de l'ovomucoïde "proprement dit".

3° - L'application de plusieurs procédés de détermination des masses moléculaires des glycoprotides nous ont permis de démontrer qu'il existait, conjugués par des liaisons N- β -aspartyl-N-acétylglucosaminylamine", deux chaînes glycaniques dans l'ovomucoïde "proprement dit" et quatre chaînes dans l'ovoglycoprotéine de KETTERER.

IV - Les procédés que nous avons mis au point sont susceptibles d'applications générales. Dans le cadre d'un travail d'équipe, effectué au Laboratoire, nous avons contribué à la détermination de la nature des modalités de l'attache glycanne-protide dans plusieurs glycoprotéines. Les résultats originaux qui ont été obtenus se résument de la manière suivante :

1° - Dans les globulines γ G du sérum humain, du sérum bovin et du colostrum de Vache, deux chaînes glycaniques sont unies à la fraction protéique par des liaisons de type N-(β -aspartyl)N-acétylglucosaminyamine.

En outre, dans les trois cas, la séquence C-terminale au voisinage du point d'attache des glycopeptides était la suivante : Asn-Ser-Thr, révélant une certaine unité structurale du groupe des globulines γ G.

2° - Les globulines γ A sont nettement différentes des précédentes. En effet, dans les globulines γ A du lait de Femme, outre plusieurs ~~polychaînes~~ ^{glycopeptides} de type N-(β -aspartyl)N-acétylglucosaminyamine, existent 7 glycannes unis par des liaisons O-glycosidiques : 3 avec la sérine ; 4 avec la thréonine.

3° - Des différences analogues de structure se manifestent entre la transferrine et la lactotransferrine humaines.

Dans la transferrine, deux chaînes glycaniques sont attachées à la protéine par des liaisons N-(β -aspartyl)N-acétylglucosaminyamine.

Dans la lactotransferrine, existent trois résidus osidiques dont deux sont conjugués par une liaison du type précédent et ^{un} par une liaison O-thréonylglycosidique.

V - La comparaison des structures peptidiques au voisinage des points d'attache glycanne-protide dans les glycoprotéines que nous avons étudiées, révèle l'existence de séquences communes et, en particulier, la présence constante de sérine ou de thréonine (de lysine dans le seul cas de la transferrine) conjuguée au reste aspartyl-glycanne (Tableau XXI ; p. 195).

Cette observation nous incite à considérer que ce motif structural n'est pas un effet du hasard, mais pourrait bien représenter le "code protéique" qui incite les transosidases à greffer sur le carboxyle β de l'asparagine, la N-acétyl-glucosamine initiatrice de la synthèse ultérieure des glycannes.

Tableau XXI

Séquences peptidiques au voisinage du point d'attache de glycopeptides isolés des hydrolysats pronasiques de diverses glycoprotéines.

| | |
|-------------|--|
| Asn—Thr | Ovomucoïde ; orosomucoïde (+) |
| Thr—Asn | Ovomucoïde ; orosomucoïde |
| Asn—Ser—Thr | Globulines γ G du sérum humain, du sérum bovin et du colostrum de Vache |
| Ser—Asn | Transferrine ; Taka-amylase A |
| Asn—Lys | Transferrine ; fibrinogène |

(+) FOURNET, Communication personnelle.

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

- ADAM-CHOSSON A., Thèse Doct. Sci., Lille, 1964, (1, 260,262,266,268,365,393, 396,399,410,453).
- ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 1881, (114,263).
- ADAMS J.B., Biochem. J., 1965, 94, 368, (20,168,205).
- ADAMS J.B., Biochem. J., 1965, 97, 345, (21,168,206,207,210).
- AKABORI S., OHNO K. et NARITA K., Bull. Chem. Soc., Japan, 1952, 25, 214, (414).
- ANAI M., IKENAKA T. et MATSUSHIMA Y., J. Biochem., 1966, 59, 57, (126)
- ANDERSON B., HOFFMAN P. et MEYER K., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 74, 309 et J. Biol. Chem., 1965, 240, 156, (33,34, 179,180).
- ANDERSON B., SENO N., SAMPSON P., RILEY J.G., HOFFMAN P. et MEYER K., J. Biol. Chem., 1964, 239, PC 2716, (14,41,181,185,209,211).
- ANGYAL S.J. et SHELTON B., J. Chem. Soc., 1966, 433, (322).
- ANTONY N., Thèse Doct. Sci., Lille, 1965 (459).
- ATFIELD G.N. et MORRIS C.J.O.R., Biochem. J., 1961, 81, 606, (336,338).
- BALLOU C.E., Adv. Carb. Chem., 1954, 9, 91, (352).
- BARKER S.A., PARDOE G.I., STACEY F.R.S. et HOPTON J.W., Nature, 1963, 197, 231, (234).
- BEELEY J.G. et JEVONS F.R., Biochem. J., 1963, 88, 15, (457).
- BELCHER R., NUTTEN A. J. et SAMBROOK C.M., Analyst, 1954, 79, 201, (380).
- BEN-ISHAI D. et BERGER A., J. Org. Chem., 1952, 17, 1564, (330).
- BERGMAN F., Anal. Chem., 1952, 24, 1367, (174).
- BERGMAN M. et GRAFE K., Z. Physiol. Chem., 1930, 187, 187, (191).
- BERTOLINI M. et PIGMAN W., J. Biol., Chem., 1967, 242, 3776, (23).

- BERTOLINI M., TETTAMANTI G. et PIGMAN W., Abs. Pap. 152 Meeting, A.C.S., N.Y., 1966, D-052, (22).
- BEST J.S., BHAVANANDAN V.P. et GOTTSCHALK A., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 101, 141, (18,141,184).
- BHARGAVA A.S. et GOTTSCHALK A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1966, 24, 280, (25).
- BHAVANANDAN V.P., BUDDECKE E., CARUBELLI R. et GOTTSCHALK A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1964, 16, 353, (15,140,182,199,442).
- BISERTE G., DAUTREVAUX M. et BOULANGER P., Bull. Soc. Chim., 1963, 2954, (420).
- BISERTE G., HOLLEMAN J.W., HOLLEMAN-DEHOVE J. et SAUTIERE P., J. Chromatog., 1959, 2, 225, (423).
- BLIX G., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, 106, 164, (169).
- BOGDANOV V., KAVERZNEVA E. et ANDREJEVA A., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 65, 168, (233,243).
- BOGDANOV V.P., KAVERZNEVA E.D. et ANDREJEVA A.P., Biochim. Biophys. Acta, 1964, 83, 69, (102,233,243,281,285,294,299).
- BOLTON C.H., HOUGH L. et KHAN M. Y., Biochem. J., 1966, 101, 184, (278).
- BOLTON C.H. et JEANLOZ R.W., J. Org. Chem., 1963, 28, 3228, (277).
- BRAGG P.D. et HOUGH L., Biochem. J., 1961, 78, 11, (223).
- BRAY B.A., LIEBERMAN R. et MEYER K., J. Biol. Chem., 1967, 242, 3373, (46).
- BRENNER M., NIEDERWIESER A. et PATAKI G., in E. STAHL, Thin-Layer chromatography, Springer-Verlag, Berlin, 1965, 391, (430).
- BRICAS E., GHUYSEN J.M. et DEZELEE P., Biochemistry, 1967, 6, 2598, (71).
- BRUMFITT W., WARDLAW A.C. et PARK J.T., Nature, 1958, 181, 1783, (76).
- BUTLER W.T. et CUNNINGHAM L.W., J. Biol. Chem., 1965, 240, PC 3449 et J. Biol. Chem., 1966, 241, 3882, (58).
- CARUBELLI R., BHAVANANDAN V.P. et GOTTSCHALK A., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 101, 67, (17,183,197).
- CASTELLANI A.A., ZONTA L., BALDUINI C. et LATERZA L., Experientia, 1966, 22, 225, (24).

- CASTELLANI A., ZONTA L. et DE LUCA L., *Giorni Biochim.*, 1965, 14, 135, et *Giorni Biochim.*, 1965, 14, 135, (35).
- CHAPUT M., MICHEL G. et LEDERER E., *Experientia*, 1961, 17, 107, (7,8).
- CHATTERJEE A.K. et MONTGOMERY R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, 99, 426, (224,250,395,437).
- CHEFTEL C., BOUCHILLOUX S. et LISSITZKY S., *C. R. Acad. Sci.*, 1964, 259, 1458, (130).
- CHEFTEL R.I., CLOAREC L., MORETTI J. et JAYLE M.F., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, 47, 385, (125).
- CHERBULIEZ E., BAEHLER B. et RABINOWITZ J., *Helv. Chim. Acta*, 1964, 47, 1350, (361,428,432,464).
- CHERON A., MONSIGNY M., ANTONY N. et MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, à paraître, (122,462).
- CHIBNALL A.C., MANGAN J.L. et REES M.W., *Biochem. J.*, 1958, 68, 114, (137, 138).
- CHIBNALL A.C. et REES M.W., in G.E.W. WOLSTENHOLME et M.P. CAMERON, *The Chemical structure of proteins*, Churchill éd., London, 1953, 70, (137,138).
- CHIBNALL A.C. et REES M.W., *Biochem. J.*, 1958, 68, 105, (137,138).
- CLAMP J.R., DAWSON G., HOUGH L. et KHAN M.Y., *Carbohydr. Res.*, 1966, 3, 254, (146).
- CLAMP J.R. et PUTNAM F.W., *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 3233, (471).
- CLARKE H.T. et INOUE J.M., *J. Biol. Chem.*, 1930, 89, 399, (192).
- CUNNINGHAM L.W., FORD J.D. et SEGREST J.P., *J. Biol. Chem.* 1967, 242, 2570, (59,256).
- CUNNINGHAM W.L. et SIMKIN J.L., *Biochem. J.*, 1966, 99, 434, (109).
- CZERKAWSKI J.W., PERKINS H.R. et ROGERS H.J., *Biochem. J.*, 1963, 86, 468, (81).
- DATE J.W., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1958, 10, 149, (387).
- DAWSON G. et CLAMP J.R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, 26, 349 et *Biochem. J.*, 1967, 103, 5P, (61,127,484).
- DE LA LLOSA P., TERTRIN C. et JUTISZ M., *Experientia*, 1964, 20, 204, (417).

- DENT C.E., Biochem. J., 1947, 41, 240 et 1948, 43, 169, (444).
- DEREVITSKAYA V.A., VAFINA M.G. et KOCHETKOV N.K., Carbohydr. Res., 1967, 3, 377, (333,343,344,351).
- DESCAMPS J., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., D, sous presse, (63,128).
- DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F., Anal. Chem., 1956,28, 350, (370).
- DUQUESNE N., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1965, 261, 1430, (121,461).
- DUQUESNE N., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., D, 1966, 262, 2536, (120,463).
- EHRHARDT E. et CRAMER F., J. Chromatog, 1962, 7, 405, (331).
- ELIAS H.G., Méthodes de l'ultracentrifugation analytique, Beckman, Instruments International S.A., éd. 1964, (383).
- ELSON L.A. et MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1933,27, 1824, (379).
- EYLAR E.H. et JEANLOZ R.W., J. Biol. Chem., 1962, 237, 1021, (218).
- FINDLAY J., LEVY G.A. et MARSH C.A., Biochem. J., 1958, 69, 467, (304,306, 310,312).
- FLETCHER A.P., MARSHALL R.D. et NEUBERGER A., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 71, 505, et 74, 311, (98, 241,302).
- FLOWERS H.M. et JEANLOZ R.W., J. Org. Chem., 1963,28, 1564 et 2983, (334).
- FOURNET B., Communication personnelle, (108).
- FRANKLIN A.C. et DISCHE Z., Feder. Proc., 1962, 21, 33, (470).
- FREDERICQ E. et DEUTSCH H.F., J. Biol. Chem., 1949, 181, 499, (367,406).
- GALLOP P.M., SEIFTER S. et MEILMAN E., Nature, 1959, 183, 1659, (175).
- GHUYSEN J.M., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 40, 473, (75).
- GHUYSEN J.M., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 47, 561, (139).
- GHUYSEN J.M., BRICAS E., LEYH-BOUILLE M., LACHE M. et SHOCKMAN G.D., Biochemistry, 1967, 6, 2607, (90).
- GHUYSEN J.M. et SALTON M.R.J., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 40, 462, (235).

BUS
VILLE

- GHUYSEN J.M. et STROMINGER J.L., *Biochemistry*, 1963, 2, 1110 et 1119, (85,443).
- GHUYSEN J.M., TIPPER D.J., BIRGE C.H. et STROMINGER J.L., *Biochemistry*, 1965, 4, 2245, (84,371 bis, 384,390).
- GIBBONS R.A. et ROBERTS G.P., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1963, 106, 218 (159).
- GLICK M.C., CHEN I.W. et ZILLIKEN F., *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 981, (422).
- GOLDSTEIN I.J., HAY G.W., LEWIS B.A. et SMITH F., *Abstr. Div. Carb. Chem. Ann. Chem. Soc.*, 135th Meeting, BOSTON, 1959, 3 D, (247).
- GOT R., in H. PEETERS, *Protides of the Biological Fluids*, Elsevier, Amsterdam, 1964, 385, (476,477).
- GOT R., GOUSSAULT Y. et FONT J., *Carbohydrate Res.*, 1966, 3, 157, (49,478).
- GOTTSCHALK A., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1963, 106, 168, (6,148).
- GOTTSCHALK A., *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1965, 43, 391, (19,142).
- GOTTSCHALK A. et MURPHY W.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 46, 81, (2,149, 151, 153,155,165).
- GOTTSCHALK A., MURPHY W.H. et GRAHAM E.R.B., *Nature*, 1962, 194, 1051, (3, 156, 167,188).
- GRAHAM E.R.B., MURPHY W.H. et GOTTSCHALK A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 74, 222, (4,157,160,177,254).
- GREGORY J.D., LAURENT T.C. et RODEN L., *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 3312, (38).
- HARBON S., *Thèse Doct. Sci.*, Paris, 1963, (161, 162, 173, 203, 348).
- HARBON S., HERMAN G. et CLAUSER H., à paraître, (204).
- HARBON S., HERMAN-BOUSSIER G. et CLAUSER H., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1963, 47, 1279, (12,163,176,178,355,357).
- HARBON S., HERMAN G., ROSSIGNOL B., JOLLES P. et CLAUSER H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 17, 57, (13,186,200,214).
- HARTLEY F.K. et JEVONS F.R., *Biochem. J.*, 1962, 84, 134, (349,356,358,456).
- HASCHEMEYER R.H., CYNKIN M.A., HAN L.C. et TRINDLE M., *Biochemistry*, 1966, 5, 3443, (124).

- HERMAN G., HARBON S., ROSSIGNOL B. et CLAUSER H., Abstr. 6th Intern. Cong. Biochem., New-York, 1964, (11).
- HERMAN-BOUSSIER G., HARBON S. et CLAUSER H., Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 1267, (164).
- HESTRIN S., J. Biol. Chem., 1949, 180, 249, (171,448).
- HEYMANN H., MANNIELLO J.M. et BARKULIS S.S., J. Biol. Chem., 1964, 239, 2981, (88).
- HEYMANN H.L., ZELEZNICK D. et MANNIELLO J.A., J. Am. Chem. Soc., 1961,83, 4859, (92).
- HOCHSTRASSER K., Z. Physiol. Chem., 1963, 333, 99, (133).
- HOREJSI J. et SMETANA R., Acta Med. Scand., 1956,155, 65, (458).
- HUGHES R.C. et JEANLOZ R.W., Biochemistry, 1964, 3, 1535, (386).
- HUGHES R.C. et JEANLOZ R.W., Biochemistry, 1966, 5, 253, (107).
- INOUYE Y., KITAOKA S. et OCHIAI H., Bull. Agr. Chem. Soc., Japan, 1956, 20, 157, (315,318,320).
- INOUYE Y., ONDERA K., KITAOKA S. et OCHIAI H., J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 4218, (315,318,320).
- ISBELL H.S., Ann. Rev. Biochem., 1943, 12, 215, (354).
- IZUMI K., MAKINO M. et YAMASHINA I., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 50, 196 et J. Biochem., 1962, 51, 365, (372,374,376,392).
- JAKUBCZAC E. et MONTREUIL J., Communication personnelle, (402).
- JAMIESON G.A., J. Biol. Chem., 1965, 240, 2019 (129).
- JAMIESON G.A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1964, 17, 775 et J. Biol. Chem., 1965, 240, 2019, (474).
- JAYLE M.F., Les Haptoglobines, Masson éd., Paris, 1965, (230).
- JEANLOZ R.W., Bul. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 303, (219).
- JEANLOZ R.W. et EYLAR E.H., Intern. Symp. Macromol., Section V, A 8, Wiesbaden, 1959, (220).
- JERMYN M.A. et ISHERWOOD F.A., Biochem. J., 1949, 44, 402, (341).
- JOLLES P., NGUYEN-TRUNG-LUONG-CROS H. et LEDERER E., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 43, 559, (7 bis).

- JONES J.K.N., PERRY M.B., SHELTON B. et WALTON D.J., *Can. J. Chem.*, 1961, 39, 1005, (303,305,309,311,325,326,328,335,362).
- JUSIC D., résultat non publié, cité par W.WEIDEL et H. PELZER, in F.F. NORD, *Adv. Enzm.*, 1964, 26, 193.
- KABAT E.A., BASSETT E.W., PRYZWANSKY K., LLOYD K.O., KAPLAN M.E. et LAYUG E.J., *Biochemistry*, 1965, 4, 1632, (50,56).
- KAMIYAMA S. et SCHMID K., *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 49, 250, (231).
- KAPLAN D., *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 136, 394, (32).
- KATSURA N. et DAVIDSON E.A., *Feder. Proc.*, 1965, 24, 607, et *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 121, 120, (44).
- KAVERZNEVA E.D. et LAPUK V.H., *Biokimiya*, 1964, 29, 138, (170).
- KAVERZNEVA E.D., *Khim. Prirodn. Soedin. Akad. Nauk.Uz S.S.R.*, 1966, 2, 130, (135).
- KETTERER B., *Life Science*, 1962, 5, 163, et *Biochem. J.*, 1965, 96, 372, (269,401,404,407).
- KO A., CLAMP J.R., DAWSON G. et CEBRA J., *Biochem. J.*, 1967, 105, 35 P, (62).
- KOCHETKOV N. K., DEREVITSKAYA V.A. et KARAMURZA S.G., *Dokl. Akad. Nauk. S.S.R.*, 1965, 163, 650, (53).
- KOCHETKOV N.K., DEREVITSKAYA V.A. et KARAMURZA S.G., *Carbohydr. Res.*, 1967, 3, 403, (54).
- KOCHETKOV N.K., MOLODTSOV N.V. et DEREVITSKAYA V.A., *Izv. Akad. Nauk.S.S.R., Serkhim.*, 1966, 1400, (279).
- KOENIGS W. et KNORR E., *Ber.*, 1901, 34, 957, (313).
- KONIGSBERG W. et HILL R.J., *J. Biol. Chem.* 1962, 237, 2547, (359,426).
- KUHN R. et LÖW I., *Ber.*, 1941, 74, 219, (353).
- KUM K. et ROSEMAN S., *Biochemistry*, 1966, 5, 3061, (345,346).
- KUSAMA K., *J. Biochem.*, 1957, 44, 375, (415).
- LAMPORT D.T.A., *Nature*, 1967, 216, 1323, (65,257).
- LAY W.P. et POLGLASE W.J., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1957, 35, 39, (416).
- LEABACK D.H. et WALKER P.G., *J. Chem. Soc.*, 1957, 78, 4754, (316,323).
- LEE Y.C. et MONTGOMERY R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 95, 263, (227,244).

- LEE Y.C., WU Y.C. et MONTGOMERY R., *Biochem. J.*, 1964, 91, 9 C, (237).
- LEUTGEB W. et WEIDEL W., *Naturforsch.*, 1963, 18 b, 1065, (80).
- LEVY G.A. et Mc ALLAN A., *Biochem. J.*, 1959, 73, 127, (441,483).
- LIGHT A. et GREENBERG J., *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 258, (427).
- LINDAHL U., *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 130, 361 et 368, (30).
- LINDAHL U., CIFONELLI J.A., LINDAHL B. et RODEN L., *J. Biol. Chem.* 1965, 240, 2817; (29).
- LINDAHL U. et RODEN L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 17, 254, (28).
- LINDAHL U. et RODEN L., *J. Biol. Chem.* 1965, 240, 2821, (31) et 1966, 241, 2113, (42,347).
- LIS H., SHARON N. et KATCHALSKI E., *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 684, (134).
- LIU T.Y. et GOTSCHLICH E.C., *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 471, (72).
- LLOYD K.O. et KABAT E.A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1964, 16, 385, (52).
- LLOYD K.O. et KABAT E.A., *Carbohydr. Res.*, 1967, 4, 165, (52,57).
- LUDOWIEG J. et BENMAMAN J.D., *Anal. Biochem.*, 1967, 19, 80, (480,482).
- MAHAVEDAN S. et TAPPEL A.L., *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 4568, (147).
- MAKINO M., KOJIMA T. et YAMASHINA I., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 1966, 24, 961, (145).
- MAKINO M. et YAMASHINA I., *J. Biochem.*, 1966, 60, 262, (252,283).
- MARKS G.S., MARSHALL R.D. et NEUBERGER A., *Biochem. J.*, 1962, 85, 15 P, (97,271).
- MARKS G.S., MARSHALL R.D. et NEUBERGER A., *Biochem. J.*, 1963, 87, 274, (97,291).
- MARLER E. et DAVIDSON E.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1965, 54, 648, (45).
- MARSCHALL R.D. et NEUBERGER A., *Biochemistry*, 1964, 3, 1596, (100,242,274, 280,293,298,300).
- MASAMUNE H., *Compt. Rend. 3è Cong. Int. Bioch., Bruxelles*, 1955, 72, (232).
- MATSUSHIMA K., *Science*, 1958, 127, 1178, (403).

- MATSUSHIMA Y. et FUJII N., Bull. Chem. Soc., Japan, 1957, 30, 48, (421).
- Mc COMB E.A. et Mc CREADY R.M., Anal. Chem., 1957, 29, 819, (449).
- MECHAM D.K. et OLCOTT H.S., J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 3670, (196).
- MESTER L., MOCZAR E. et LAKI K., C.R. Acad. Sci., 1963, 256, 307, (229).
- MESTER L., MOCZAR E., VASS G. et SZABADOS L., Path. Biol., 1965, 13, 540, (123).
- MEYER K., SENO N., ANDERSON., LIPPMAN V. et HOFFMAN P., Feder. Proc., 1964, 23, 484, (40).
- MICHEEL F. et KÖCHLING H., Ber., 1958, 91, 673, (363).
- MICHEEL F., VAN DE KAMP F.P. et WULFF H., Ber., 1955, 88, 2011, (317).
- MICHL H., Monatsch. Chem., 1951, 82, 489, (301,339,429,439).
- MIRELMAN D. et SHARON N., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1966, 24, 237, (82).
- MOGGRIDGE R.C.G. et NEUBERGER A., J. Chem. Soc., 1938, 745, (314,319,322).
- MONTGOMERY R., LEE Y.C. et WU Y.C., Biochemistry, 1965, 4, 566, (103, 245).
- MONTGOMERY R. et WU Y.C., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1963, 11, 249, (394,398,405,412,434,436,451).
- MONTGOMERY R. et WU Y.C., J. Biol. Chem., 1963, 238, 3547, (394,398,405,412, 434,436,452).
- MONTGOMERY R., WU Y.C. et LEE Y.C., Biochemistry, 1965, 4, 578, (104,251).
- MONTREUIL J., ADAM-CHOSSON A. et SPIK G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 1867, (216, 217, 226).
- MONTREUIL J., BISERTE G. et CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 1963, 256, 3372, (111,158,258,259,261,265,366).
- MONTREUIL J., CASTIGLIONI B., ADAM-CHOSSON A., CANER F. et QUEVAL J., J. Biochem., 1965, 57, 514, (113,264,267,368,397,400,408,455).
- MONTREUIL J., CASTIGLIONI B., ADAM-CHOSSON A., CANER F. et QUEVAL J., in Biochemistry of sulfur and glycoproteins. T. ANDO, F. EGAMI et N. TAMIYA, éd., Tokyo, 1965, 81, (113,264,267,368,397,400,408,455).
- MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R. et MULLET S., C.R. Soc. Biol., 1960, 154, 732, (479).

- MONTREUIL J., CHOSSON A. et SCHEPPLER N., C.R.Acad. Sci., 1962, 255, 3261, (225).
- MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., Bul. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 13, (388).
- MONTREUIL J., SPIK G., CHOSSON A., SEGARD E. et SCHEPPLER N., International Symposium II, Chromatographie, Soc. Belge Sci. Pharmac., éd., 1963, 47, et J. Pharm. Belg., 1963, 18, 529, (112, 409, 454).
- MONTREUIL J., SPIK G., DUMAISNIL J. et MONSIGNY M., Bull. Soc. Chim., 1965, 239, (385).
- MONTREUIL J., TONNELAT J. et MULLET S., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 413, (475).
- MOORE S. et STEIN W. H., J. Biol. Chem., 1954, 211, 893, (371).
- MUIR H., Biochem. J., 1958, 69, 195, (26).
- MUNOZ E., GHUYSEN J.M. et HEYMANN H., Biochemistry, 1967, 6, 3659, (94).
- MUNOZ E., GHUYSEN J.M., LEYH-BOUILLE M., PETIT J.G., HEYMANN H. BRICAS E. et LEFRANCIER P., Biochemistry, 1966, 5, 3748, (93).
- MURAKAMI M. et EYLAR E.H., J. Biol. Chem., 1965, 240, PC 556, (143).
- MURPHY W.H., Thèse Doct. Sci., Austr. Nat. Univ., 1962, (253).
- MURPHY W.H. et GOTTSCHALK A., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 52, 349, (5).
- MURTHY P.V.N., RAGHUPATH E. et CHAIKOFF I.L., Biochemistry, 1965, 4, 611, (132).
- NEUBERGER A. et PAPKOFF H., Biochem. J., 1963, 87, 581, (411).
- NYSTROM R.F., CHAIKEN S.W. et BROWN W.G., J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 3245, (136).
- PARK J.T. et JOHNSON M.J., J. Biol. Chem., 1949, 181, 149, (440).
- PARK J.T. et STROMINGER J.L., Science, 1957, 125, 99, (86).
- PARTRIDGE S.M., Biochem. J., 1948, 42, 238, (340).
- PATAKI G., Chimia, 1964, 18, 23, (431).
- PATCHORNIK A. et SOKOLOVSKY M., J. Am. Chem. Soc., 1963, 86, 1206, (194,201).
- PATCHORNIK A. et SOKOLOVSKY M., J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 1860, (195,202).

- PELZER H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 63, 229, (74).
- PERKINS H.R. et ROGERS H.J., *Biochem. J.*, 1959, 72, 647, (77).
- PETIT J.F., MUNOZ E. et GHUYSEN J.M., *Biochemistry*, 1966, 5, 2764, (89).
- PHILLIPS D.M.P., *Biochem. J.*, 1963, 86, 397, (382).
- PIEZ K.A. et MORRIS L., *Anal. Biochem.*, 1960, 1, 187, (389).
- PIGMAN W., *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1963, 24, 67, (10).
- PRIMOSIGH J., PELZER H., MAAS D. et WEIDEL W., *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 46, 68, (73).
- RILEY G., TURNBULL J.H. et WILSON W., *J. Chem. Soc.*, 1957, 1373, (193).
- RIMINGTON C., *Biochem. J.*, 1931, 25, 1062 et 1940, 34, 931, (378).
- RODEN L., *Feder. Proc.*, 1964, 23, 484, (36).
- RODEN L., *Feder. Proc.*, 1966, 25, 409, (27).
- RODEN L. et ARMAND G., *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 65, (43).
- RODEN L., GREGORY J. et LAURENT T., *Biochem. J.*, 1964, 91, 2 P, (37).
- ROSEVEAR J.W. et SMITH E.L., *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 250, et *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 425, (465,472,473).
- ROSTON C.P.J.L., CAYGILL J.C. et JEVONS F.R., *Biochem. J.*, 1965, 97, 43 P, (144).
- ROTHFUS J.A., *Feder. Proc.*, 1961, 20, 383, (248,466,468).
- ROTHFUS J.A. et SMITH E.L., *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 1402, (119,249,467, 469).
- SALTON M.R.J., *The cell wall*, Elsevier, Amsterdam, 1964, 133, (67).
- SALTON M.R.J. et GHUYSEN J.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 36, 552, et 1960, 45, 355, (79,236).
- SANGER F., *Biochem. J.*, 1945, 39, 507, (424,460).
- SCHOCHER A.J., BAYLEY S.T. et WATSON R.W., *Can. J. Microbiol.*, 1962, 8, 89, (70).
- SCHOCHER A.J., JUSIC D. et WATSON R.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1961, 6, 16, (69).

- SCHROEDER L.R. et GREEN J.W., J. Chem. Soc., 1966, 530, (329).
- SCHWETT R.S., Biochim. Biophys. Acta, 1955, 18, 566, (172).
- SENO N., MEYER K., ANDERSON B. et HOFFMAN P., J. Biol. Chem., 1965, 240, 1005, (39).
- SJOQUIST J., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 41, 20, (445).
- SMITH E.L. et HILL R.L., in P.D. BOYER, H. LARDY et K. MYRBACK, The Enzymes, Academic Press éd., New York, 1960, 4, 37, (418).
- SMYTH D.S. et UTSUMI S., Nature, 1967, 216, 332, (64).
- SOKOLOVSKY M., SADEH T. et PATCHORNIK A., J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 1212, (350,447).
- SONNET J., Thèse Doct., Bruxelles, 1956, (221).
- SPIK G. et MONTREUIL J., International Symposium IV, Chromatographie, Electrophorèse, Bruxelles 1966, (48,116,118).
- SPIK G. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., à paraître, (116).
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1965, 260, 4282, (115).
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1965, 261, 1137, (115).
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1966, 263 D, 893, (47,117,189).
- SPIRO R.G., J. Biol. Chem., 1962, 237, 382, (413).
- SPIRO R.G., J. Biol. Chem., 1962, 237, 646, (228).
- SPIRO R.G., J. Biol. Chem., 1964, 239, 567, (228).
- SPIRO R.G., J. Biol. Chem., 1965, 240, 1603, (131).
- SPIRO R.G., Feder. Proc. 1966, 25, 409, et 1967, 26, 607, et J. Biol. Chem. 1967, 242, 1923, et 1967, 242, 4813, (60,255,342).
- SPRINGER G.F., NAGAI Y. et TEGTMEYER H., Biochemistry, 1966, 5, 3254, (51).
- TAKAHASHI K., J. Biochem., 1962, 52, 74, (419).
- TANAKA M., J. Pharm. Soc., Japan, 1961, 81, 1460, 1464, 1467, 1470, (110,246, 435,438,450).

- TANAKA K., BERTOLINI M. et PIGMAN W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 16, 404, (187,190,198,446,481)
- TANAKA K. et PIGMAN W., *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, PC 1487, (16,208,212,213).
- TATE M.E. et BISHOP C.T., *Can. J. Chem.*, 1962, 40, 1043, (307,308,324,337).
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., *Biochem. Z.*, 1929, 215, 36, (377).
- TIPPER D.J., STROMINGER J.L. et ENSIGN J.C., *Biochemistry*, 1967, 6, 906, (87).
- TSUKAMOTO H., YAMAMOTO A. et MIYASHITA C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 15, 151, (101,240,272,286,288,295).
- VAN ORDEN H.O. et CARPENTER F.H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 14, 399, (433).
- VERCELLOTTI J.R., FERNANDEZ R. et CHANG C.J., *Carbohydr. Res.*, 1967, 5, 97, (327,364).
- VERCELLOTTI J.R. et LUETZOV A.E., *J. Org. Chem.*, 1966, 31, 825, (327,364).
- VILKAS E., ROJAS A., DAS B.C., WOLSTENHOLME W.A. et LEDERER E., *Tetrahedron*, 1966, 22, 2809, (9).
- WEIDEL W., FRANK H. et LEUTGEB W., *J. Gen. Microbiol.*, 1963, 30, 127, (83).
- WEIDEL W. et PELZER H., in F.F. NORD, *Adv. Enzym.*, 1964, 26, 193, (66,91).
- WERNER I. et ODIN L., *Acta. Soc. Med. Upsaliensis*, 1952, 57, 230, (381).
- WHITE T., *J. Chem. Soc.* 1940, 428, (321).
- WINZLER R.J., in *Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*, Little Brown, éd., Boston, 1958, 245, (222).
- WINZLER R.J., HARRIS E.D., PEKAS D.J., JOHNSON C.A. et WEBER P., *Biochemistry*, 1967, 6, 2195, (55).
- YAMAMOTO A., MIYASHITA C. et TSUKAMOTO H., *Chem. Pharm. Bull., Japan*, 1965, 13, 1041, (273,287,289,292,296).
- YAMAMOTO A. et TSUKAMOTO H., *Chem. Pharm. Bull.*, 1965, 13, 1046, (282,289, 292,296).
- YAMASHINA I., BAN-I K. et MAKINO M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 78, 382, (99,239,270 bis,284).
- YAMASHINA I. et IZUMI K., in *Biochemistry and Medecine of Mucopolysaccharides*, F. EGAMI et Y. OSHIMA, Mazuren éd., Tokyo, 1962, 39, (96).

- YAMASHINA I. et MAKINO M., J. Biochem. 1962, 51, 359, (95,270,369,373,375, 391).
- YAMASHINA I., MAKINO M., BAN-I K. et KOJIMA T., J. Biochem., 1965, 58, 168, (105,106,238,276,290,297).
- YOSHIMURA J. et HASHIMOTO H., Carbohyd. Res., 1967, 4, 435, (275).
- YOSIZAWA Z., SATO T. et SCHMID K., Biochim. Biophys. Acta, 1966, 121, 417, (360).
- ZIOUDROU C., WILCHEK M. et PATCHORNIK A., Biochemistry, 1965, 4, 1811, (215).

A P P E N D I C E T E C H N I Q U E

La bibliographie (p. 253), la table des matières (p. 211) et la numérotation des tableaux et des figures de l'Appendice technique sont indépendantes de la première partie du mémoire.

TABLE DES MATIERES
DE
L'APPENDICE TECHNIQUE

211

| | |
|---|-----|
| I - <u>PREPARATION OU PURIFICATION DES SOLVANTS ET DES MATIERES PREMIERES</u> | 213 |
| Hydrazine anhydre | 213 |
| Toluène pur | 213 |
| Chloroforme pur | 213 |
| Ether sans peroxyde | 214 |
| Méthanol anhydre | 214 |
| Carbonate d'argent | 214 |
| Benzène anhydre | 215 |
| II - <u>TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES</u> | 215 |
| A - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE</u> | 215 |
| B - <u>CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE SUR PAPIER</u> | 217 |
| III - <u>TECHNIQUES DE DOSAGE DIVERSES</u> | 220 |
| A - <u>DETERMINATION DU POUVOIR REDUCTEUR</u> | 220 |
| B - <u>DOSAGE DES FONCTIONS O-ACETYL</u> | 221 |
| C - <u>DOSAGE DES FONCTIONS N-ACETYL</u> | 225 |
| D - <u>DOSAGE DES ACIDES AMINES ET DES PEPTIDES</u> | 227 |
| 1° - <u>METHODE A LA NINHYDRINE</u> | 227 |
| 2° - <u>METHODE AU FLUORODINITROBENZENE</u> | 227 |
| IV - <u>SEPARATION ET DOSAGE DES ACIDES AMINES, DES OSAMINES ET DES OSAMINITOLS</u> | 228 |
| A - <u>HYDROLYSE DES GLYCOPROTIDES</u> | 228 |
| B - <u>SEPARATIONS CHROMATOGRAPHIQUES</u> | 229 |
| 1° - <u>Amélioration de la séparation de la sérine et de la thréonine</u> | 229 |
| 2° - <u>Régénération du pouvoir séparateur de la résine</u> | 231 |

| | |
|---|-----|
| 3° - <u>Séparation simultanée de la glucosamine et des acides aminés</u> | 231 |
| 4° - <u>Séparation simultanée de la glucosamine de la galactosamine et des acides aminés</u> | 231 |
| 5° - <u>Séparation de l'acide α-aminobutyrique et des acides aminés</u> | 231 |
| C - <u>DOSAGE DES COMPOSES PROVENANT DE LA β-ELIMINATION</u> | 231 |
| α - <u>DOSAGE DES OSAMINITOLS</u> | 236 |
| β - <u>DOSAGE DES ACIDES AMINES-ETHYLENIQUES</u> | 236 |
| V - <u>DETERMINATION DU VOLUME SPECIFIQUESPARTIEL</u> | 238 |
| A - <u>DETERMINATION DU V_{sp} PAR PYCNOMETRIE</u> | 239 |
| B - <u>DETERMINATION DU V_{sp} PAR LE CALCUL</u> | 244 |
| VI - <u>PROCEDES D'EXPLORATION DES SEQUENCES PEPTIDIQUES DANS LES GLYCOPEPTIDES</u> | 244 |
| A - <u>HYDROLYSE PAR LA CARBOXYPEPTIDASE</u> | 247 |
| B - <u>HYDROLYSE PAR L'AMINOPEPTIDASE</u> | 247 |
| C - <u>DINITROPHENYLATION</u> | 248 |
| 1° - <u>Dinitrophénylation des glycoprotides</u> | 248 |
| 2° - <u>Purification des DNP-glycoprotides</u> | 249 |
| 3° - <u>Hydrolyse des DNP-glycoprotides</u> | 249 |
| 4° - <u>Extraction et chromatographie des DNP-amino-acides</u> | 249 |
| 5° - <u>Chromatographie des DNP-amino-acides</u> | 250 |
| a - DNP-éthérosolubles | 250 |
| b - DNP-hydrosolubles | 250 |
| 6° - <u>Analyse des acides aminés non dinitrophénylés dans les hydrolysats chlorhydriques</u> | 251 |
| D - <u>DEGRADATION RECURRENTE D'EDMAN</u> | 251 |

I - PREPARATION OU PURIFICATION DES SOLVANTS ET DES MATIERES PREMIERES

Hydrazine anhydre

L'hydrate d'hydrazine commercial est, à température ordinaire, un liquide que l'on peut conserver sans précautions particulières. On le déshydrate par un traitement à la chaux vive (KUSAMA) (1) effectué de la manière suivante :

50 g d'hydrate d'hydrazine, sont ajoutés à une suspension de 500 g d'oxyde de calcium dans 500 ml de toluène pur. Le mélange est agité, puis abandonné pendant 18 h à 20°C. Après une ébullition à reflux pendant 3 h, l'azéotrope toluène-hydrazine est distillé. La fraction passant entre 90 et 95°C est recueillie. Après refroidissement, le distillat se sépare en deux couches de liquide : la couche inférieure, constituée par l'hydrazine anhydre, est recueillie par décantation. L'hydrazine anhydre est conservé à température du laboratoire, à l'abri de la lumière, dans des flacons en verre Pyrex.

Toluène pur

Le toluène commercial est purifié de la façon suivante :

Un mélange de toluène (1 000 ml) et d'acide sulfurique pur R.P. (100 ml) est agité, à 20°C, pendant 24 h. Après décantation, la phase organique est distillée sur chlorure d'aluminium (50 g). Le distillat est lavé une fois avec 500ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 20 g p.100 ml, puis cinq fois avec 500 ml d'eau distillée. Enfin, le toluène est débarrassé de l'eau par filtration sur papier Whatman n° 3 et est conservé sur chlorure de calcium sec. Il est redistillé avant emploi.

Chloroforme pur

La condensation des dérivés acéto-halogénés exige l'utilisation du chloroforme sans éthanol. La purification du chloroforme commercial a été effectuée de la manière suivante :

500 ml de chloroforme pur R.P. sont lavés 3 fois avec 100 ml d'une solution 1 M de chromate de potassium dans l'acide sulfurique 1 N :

| | |
|--------------------------------|--------|
| Chromate de potassium pur R.P. | 97 g |
| Eau distillée | 525 ml |
| Acide sulfurique pur R.P. | 15 ml |

Le mélange est chaque fois agité pendant 15 mn. Le chloroforme est ensuite lavé par décantation, successivement avec 100 ml d'eau distillée, 100 ml de solution de soude 1 N, 100 ml d'eau distillée (4 fois). Il est enfin séché sur sulfate de magnésium anhydre, puis utilisé immédiatement.

Ether sans peroxyde

1 litre d'éther est maintenu à l'ébullition à reflux en présence de 100 g de chlorure stanneux, pendant 60 mn. Il est ensuite distillé, recueilli et conservé dans des flacons de verre brun, sur du sulfate ferreux.

Méthanol anhydre

Le méthanol employé dans les réactions d'estérification (p.103) est déshydraté de la manière suivante :

1 litre de méthanol est chauffé à reflux, pendant 4 h, en présence de 50 g de tournure de magnésium, puis distillé en atmosphère anhydre et conservé dans des flacons bien bouchés.

Carbonate d'argent

Le carbonate d'argent utilisé dans les réactions de condensation de KOENIGS et KNORR (p.82) est préparé extemporanément, à l'obscurité, suivant le procédé de WOLFROM et LINEBACK (2) :

Une solution de 16 g de carbonate de sodium anhydre pur R.P. dans 75 ml d'eau distillée est ajoutée goutte à goutte, sous agitation constante à une solution de 80 g de nitrate d'argent pur R.P. dans 200 ml d'eau distillée. On verse ensuite, en trois fractions, dans le mélange, une solution de 10 g de bicarbonate de sodium pur R.P. dans 125 ml d'eau distillée. Le précipité jaune de carbonate d'argent est recueilli par filtration sur verre

fritté, n° 4 et lavé 12 à 15 fois à l'eau distillée, en prenant soin de le remettre chaque fois en suspension homogène. Il est enfin lavé deux fois à l'éther et séché, sous vide, en présence de chlorure de calcium anhydre à l'abri de la lumière. Rendement : 60 à 65 g.

Benzène anhydre

Le benzène commercial est purifié selon la technique de PICHAT et CLEMENT (3). Il est d'abord agité, pendant quelques minutes, avec le cinquième de son volume d'une solution obtenue en dissolvant 50 g d'oxyde mercurique jaune dans 1 litre d'une solution diluée d'acide sulfurique (200 ml d'acide sulfurique p.1000 ml d'eau). La phase benzénique est ensuite distillée.

II - TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES (+)

A - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

1° - Préparation des plaques

A 30 g de Silicagel G(MERCK), on ajoute 55 ml d'eau et 10 ml d'éthanol absolu. La suspension obtenue est agitée énergiquement pendant 3 minutes, puis est coulée, à l'aide d'un étaleur (DESAGA), sur des plaques de verre préalablement lavées à l'eau distillée et essuyées avec du papier filtre. Les plaques ainsi préparées sont utilisables après élimination de l'excès de solvant (eau et alcool) soit par un séchage à 20°C pendant 24 h, soit par un séchage à 100°C pendant 30 mn.

2° - Systèmes-solvants

La chromatographie est effectuée dans des cuves en verre à base rectangulaire (8 x 22 cm) contenant 100 ml de l'un des systèmes-solvants spécifiques de chacune des applications suivantes :

a - Analyse de la penacétylglucosamine :

- Benzène/méthanol/chloroforme (92:8:2)

(+) Dans tous les cas, nous avons utilisé des solvants purs pour analyse ou purifiés selon les modes opératoires décrits ci-dessus

- b - Analyse de l'acéto-chloro-glucosamine :
- Benzène /méthanol/chloroforme (85:8:7)
- c - Analyse des N-carbobenzoxy-sérine et -thréonine et de leurs esters benzyliques :
- n-butanol/acide acétique/pyridine/eau (15:3:10:2) (EHRHARDT et CRAMER) (4).
- d - Analyse des O-acétyl-glucosaminides des esters benzyliques des N-carbobenzoxy-sérine et thréonine :
- Benzène/méthanol/chloroforme (85:8:7)
 - n-butanol/acide acétique/pyridine/eau (15:3:10:2) (EHRHARDT et CRAMER) (5).
 - Benzène/éthanol/eau/acide acétique (200:47:15:1) (HAY, LEWIS et SMITH) (6).
- e - Analyse des dérivés phénylthiohydantoiniques des acides aminés (BRENNER, NIEDERWIESER et PATAKI (7) ; PATAKI (8)) :
- Chloroforme pur
 - Chloroforme/méthanol (100:5)
 - Chloroforme/acide formique (100:5)
- f - Analyse des quinoxalinols :
- Chloroforme/éthanol (95:5) (HARBON, HERMAN et CLAUSER) (9).
- g - Analyse des 2,4 dinitrophénylhydrazones :
- Ether de pétrole (60-80°)/formiate d'éthyle (13:7) contenant 0,104 M d'acide propionique par litre (RONKAINEN) (10).
- h - Analyse des 2,4-dinitrophénylhydrazines des acides organiques :
- Chloroforme/méthanol/diéthylamine (98:2:0,5) (THOMPSON et HEDIN) (11).

3° - Révélations

a - Réactif général. Tous les composés organiques d'un chromatogramme sur couche mince de silice, peuvent être révélés par pulvérisation d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 5 p.100 (v:v), suivie d'un chauffage à 120°C,

pendant 0,5 h ou à 100°C pendant 2 ou 3 h.

b - Révélation des dérivés N-carbobenzoxylés. Les composés renfermant des noyaux benzéniques peuvent être révélés sélectivement en appliquant le mode opératoire décrit par EHRHARDT et CRAMER (12) : imprégnation des chromatogrammes en couche mince par pulvérisation d'une solution de 5 g de bichromate de potassium dans 100 ml d'une solution aqueuse à 40 p.100 (v:v) d'acide sulfurique concentré. Ces composés donnent des colorations vertes de tonalités différentes.

c - Révélation des esters par l'hydroxylamine. Nous avons appliqué, pour révéler les fonctions esters le procédé de TATE et BISHOP (13) :

Les chromatogrammes en couche mince sont d'abord imprégnés d'un réactif obtenu en mélangeant, à parties égales, une solution aqueuse de chlorhydrate d'hydroxylamine à 10 g/100 ml et une solution de soude 5 N. Après un séjour de 10 mn à 100-110°C, les hydroxamates formés sont mis en évidence, sous la forme de taches noir-violacé, par pulvérisation d'une solution obtenue en mélangeant 6 ml d'acide chlorhydrique concentré et 45 ml d'une solution ferrique (nitrate ferrique à 9 H₂O : 40 g, eau distillée : 600 ml, acide acétique glacial : 400 ml).

B - CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE SUR PAPIER

Les composés hydrophiles ont été analysés par chromatographie descendante sur papier WHATMAN n° 1 ou n° 3 ou par électrophorèse en cuve en toit sur papier ARCHES 304. Dans certains cas, ces composés ont été purifiés par chromatographie ou électrophorèse sur papier, sans acides aminés, MACHEREY-NAGEL 807 ou 261.

1° - Systèmes-solvants

Nous avons généralement utilisé la phase supérieure du système-solvant biphasique de PARTRIDGE (14) : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5).

Dans des cas particuliers, nous avons utilisé les systèmes-solvants suivants :

a - Glucosaminidyl-amino-acides :

- Pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2) (JERMYN et ISHERWOOD) (15).

b - 2,4-dinitrophényl-amino-acides :

- Toluène/pyridine/2-chloro-éthanol/ammoniaque 0,8 N (10:3:6:6), (BISERTE et OSTEUX (16) modifié par LEVY (17)).
- Phosphate de sodium 1,5 M de pH 6,0 (BISERTE, HOLLEMAN et al.) (18).

2° - Solutions-tampons

Nous avons utilisé les 3 systèmes tampons suivants :

- pH 3,9 : pyridine/acide acétique/eau (3:10:387) (MICHL) (19).
- pH 2,4 : acide acétique/eau (6:94).
- pH 1,5 : acide formique/acide acétique/eau (5:15:80).

3° - Révélationa - Révélation des amines par la ninhydrine :

Le réactif (solution à 1 g de ninhydrine dans 94 ml d'acétone et 6 ml d'acide acétique) est finement pulvérisé sur le support chromatographique (papier ou couche mince) ou électrophorétique qui est ensuite maintenu à 100°C pendant 5 à 15 mn. L'emplacement des composés aminés est marqué par l'apparition de taches rouge-violacé.

Cette coloration est instable et pour conserver les chromatogrammes ou les électrophorégrammes, on pulvérise le réactif de KAWEREAU (20) obtenu en mélangeant 1 ml de solution aqueuse saturée de nitrate cuivrique, 0,2 ml d'acide nitrique à 10 p.100 dans l'eau, et 500 ml d'éthanol absolu ; les taches rouge-violacé virent au rouge brique, par formation d'oxyde cuivreux, inaltérable.

b - Révélation des oses par l'oxalate d'aniline :

Les chromatogrammes ou électrophorégrammes sont imprégnés du réactif obtenu en mélangeant

2 vol. d'une solution éthanolique d'aniline à 2 p.100 (v:v)

3 vol. d'une solution aqueuse d'acide oxalique à 25 p.1000(p:v)

et chauffés à l'étuve à 105°C pendant 2 à 20 mn. Les oses donnent des colorations spécifiques, brunes dans le cas des aldohexoses et des N-acétylosamines, roses dans le cas des pentoses (PARTRIDGE) (21).

c - Révélation des osamines par la réaction d'ELSON et MORGAN :

Nous avons utilisé le réactif de PARTRIDGE (22) : pulvérisation d'une solution alcaline d'acétylacétone (obtenue en mélangeant 1,5 ml d'acétylacétone (2,4 propanedione) et 50 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium cristallisé (17 g p.100 ml)), séchage à 105°C, pendant 5 mn, puis pulvérisation d'un réactif d'EHRlich modifié (obtenu en dissolvant 1 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde dans 240 ml d'un mélange de n-butanol, d'éthanol et d'acide chlorhydrique concentré dans les proportions 6 : 1: 1) et enfin séchage à 90°C pendant 5 à 10 mn. Les osamines apparaissent sous forme de taches violacé-mauve.

d - Révélation des N-acétylosamines libres et conjugués par le réactif au p-diméthylamino-benzaldéhyde :

La révélation des N-acétylosamines a été effectuée selon le procédé de SALTON (23). La réaction est effectuée en deux temps. On pulvérise d'abord sur les supports chromatographiques ou électrophorétiques une solution alcaline obtenue en mélangeant à volumes égaux une solution de tétraborate de sodium 0,05 M et d'éthanol à 95° et on chauffe à 100°C pendant 10 mn. On traite ensuite par le réactif au p-diméthyl-amino-benzaldéhyde :

| | | |
|-------------------------------|-----|----|
| p-diméthylamino-benzaldéhyde | 0,3 | g |
| Acide chlorhydrique concentré | 9 | ml |
| Ethanol absolu | 9 | ml |
| n-butanol | 54 | ml |

Après pulvérisation du réactif, les chromatogrammes ou électrophorogrammes sont maintenus à 100°C pendant 10 mn. L'emplacement des N-acétylosamines est marqué par l'apparition d'une coloration violette.

e - Révélation des glycanes par le réactif à l'acide periodique-benzidine

Les fractions glycaniques, après chromatographie ou électrophorèse, sont révélées selon le procédé de MONTGOMERY et WU (24). Le papier est trempé, rapidement, dans une solution acétonique d'acide periodique fraîchement préparée (acide periodique 0,1 M (1 vol) + acétone (19 vol)). Après cinq minutes exactement de séchage à la température de la pièce, le papier est trempé dans une solution préparée extemporanément de benzidine dans

l'acétone (0,15 g p.100 ml). L'emplacement des glycanes est révélé par une tache blanche sur un fond uniformément bleu.

f - Révélation des dérivés phénylthiohydantoïniques acides aminés :

Nous avons utilisé le réactif de CHERBULIEZ et al.(24 bis) qui est de préparation aisée et qui reste stable pendant plusieurs mois à basse température, contrairement aux autres réactifs décrits dans la littérature, comme celui de GROVES (25), par exemple.

On pulvérise sur le chromatogramme le mélange extemporané des trois solutions suivantes, dans les proportions 1 : 1 : 6.

- Iode : 1,25 g ; Iodure de potassium : 8,3 g ; Eau q.s.p. 100 ml.
- Azoture de sodium 3,2 g ; Eau q.s.p. 100 ml.
- Thiodène : 1 g ; Eau q.s.p. 100 ml.

Les phénylthiohydantoïnes apparaissent immédiatement sous la forme de taches blanches sur un fond jaune brun.

III - TECHNIQUES DE DOSAGE DIVERSES

A - DETERMINATION DU POUVOIR REDUCTEUR

La recherche des oses réducteurs libres ou conjugués est effectuée soit par réduction par le borohydrure de potassium ou de sodium suivie de la caractérisation des polyols formés ou libérés après l'hydrolyse acide du composé, soit par dosage des groupements réducteurs par la méthode au ferricyanure de PARK et JOHNSON (26) dont le mode opératoire est le suivant :

1 - Principe

Le groupement réducteur des oses terminaux réduit le ferricyanure de potassium en ferrocyanure qui donne une coloration bleue en présence d'ions ferriques, dont l'absorbance est déterminée à 690 m μ .

2 - Réactifs

| | | | |
|-----|----------------------|-------|----|
| a - | Carbonate de sodium | 5,3 | g |
| | Cyanure de potassium | 0,66 | g |
| | Eau distillée q.s.p. | 1 000 | ml |

| | | | |
|-----|--|-------|----|
| b - | Ferricyanure de potassium | 0,5 | g |
| | Eau distillée q.s.p. | 1 000 | ml |
| c - | Sulfate ferri-ammonique, 12 H ₂ O | 2,7 | g |
| | Monolauryl sulfate de sodium | 1 | g |
| | Acide sulfurique concentré R.P. | 1,39 | ml |
| | Eau distillée q.s.p. | 1 000 | ml |

3 - Mode opératoire

A 1 ml de la solution aqueuse du composé à étudier, on ajoute 0,5 ml de réactif a, puis 0,5 ml de réactif b. Après agitation, le mélange est placé dans un bain-marie bouillant pendant 15 mn. Après refroidissement, la coloration est développée par addition de 2,5 ml du réactif c. La densité optique est ensuite déterminée au spectrophotomètre à 690 m μ , et comparée à celle d'une solution titrée de glucose à 9 mg (0,05 μ M) par ml.

B - DOSAGE DES FONCTIONS O-ACETYL

Le dosage des fonctions O-acétyl peut être effectué de deux manières différentes :

- 1° - Saponification par une solution titrée de soude et dosage acidimétrique de l'excès d'alcali.
- 2° - Hydroxylaminolyse et dosage colorimétrique de l'acide acétyl-hydroxamique formé, sous la forme d'hydroxamate ferrique.

1° - HYDROLYSE SODIQUE (Procédé personnel)

a - Mode opératoire

Nous avons étudié la cinétique d'hydrolyse de l'acétate d'éthyle, puis de la O-peracétyl-N-acétylglucosamine en appliquant le mode opératoire suivant :

A 200 ml de soude 0,1 N, on ajoute 50 ml d'une solution acétonique du composé acétylé (solution 0,011 M d'acétate d'éthyle (0,52 ml p.100 ml) ou de peracétylglucosamine (534 mg p.100 ml)). La solution est abandonnée à la température du laboratoire et des prélèvements de 20 ml sont effectués à des temps variant de 5 à 120 mn. L'excès de soude est dosé à l'aide d'une

solution d'acide chlorhydrique 0,1 N.

b - Résultats

Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés par les courbes des figures 1 (p.223) et 2 (p.224). On voit que la saponification est très rapide dans le cas de l'acétate d'éthyle et que l'hydrolyse totale est obtenue en moins d'une heure. Elle est, au contraire, beaucoup plus lente dans le cas de peracétylglucosamine qui est totalement O-désacétylée au bout de 3 h.

c - Conclusions

La soude 0,1 N hydrolyse totalement les fonctions O-acétyl de la peracétylglucosamine. Le procédé est donc parfaitement applicable au dosage des groupements O-acétyles des oses et à la O-désacétylation des glucides O-acétylés.

2° - HYDROXYLAMINOLYSE

Nous avons appliqué le procédé de Mc COMB et Mc CREADY (27).

a - 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.

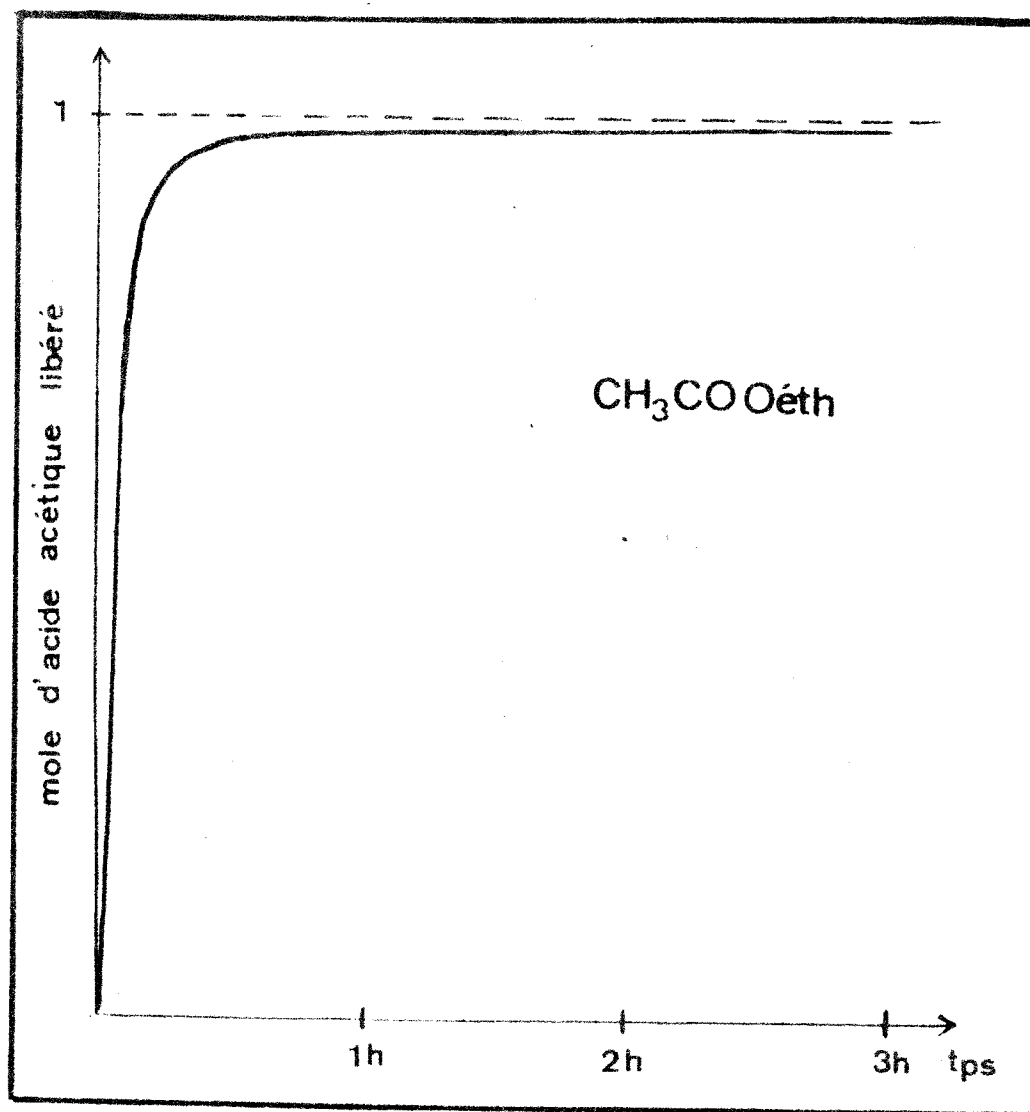


Figure 1

Courbes de libération, à 20°C, de l'acide acétique par hydrolyse sodique de l'acétate d'éthyle.

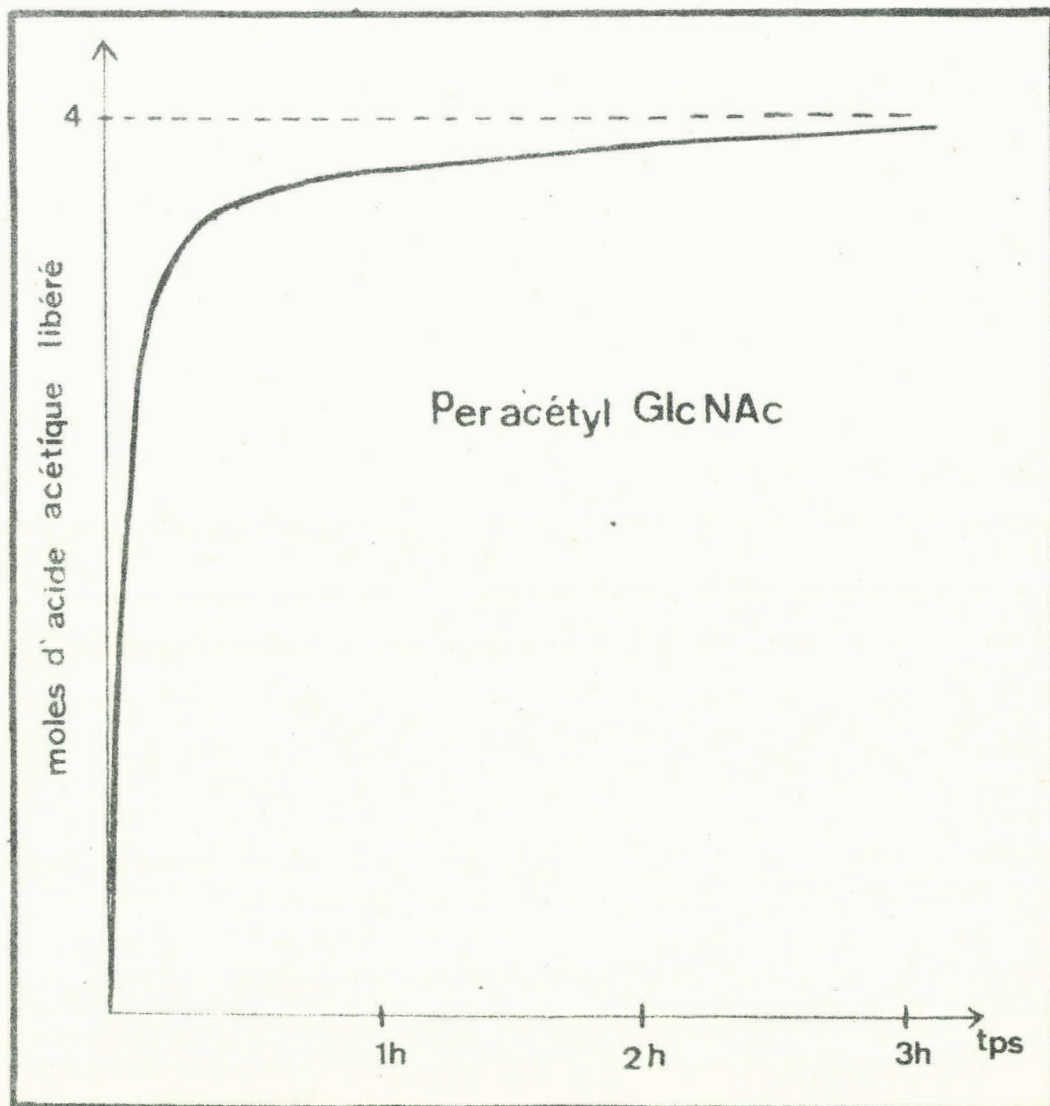


Figure 2

Courbe de libération, à 20°C, de l'acide acétique par hydrolyse sodique de la O-peracétyl-N-acétylglucosamine.

b - 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 et, très lentement et en agitant constamment, 8 ml du réactif d. L'absorbance de la solution colorée obtenue est mesurée à 520 m μ .

C - DOSAGE DES FONCTIONS N-ACETYL. Procédé de PHILLIPS (28)1 - Principe

Les fonctions acétamido sont coupées par l'hydrazine avec formation concomittente d'acéthydrazide. Celui-ci est transformé en dérivé dinitrophénylé par action du fluoro-dinitrobenzène à pH 3. Le DNP-acéthydrazide obtenu est caractérisé par chromatographie sur couche mince puis dosé, après élution, par spectrophotométrie.

2 - Réactifs

a - Hydrazine anhydre (Voir Appendice technique ; p. 213)

b - Tampon citrate 0,2 M de pH 3 :

| | |
|---|----------|
| citrate trisodique 5,5 H ₂ O | 71,4 g |
| Eau distillée q.s.p. | 1 000 ml |

La solution est ajustée à pH 3 avec de l'acide chlorhydrique normal.

c - Fluorodinitrobenzène 0,5 M :

| | |
|---------------------------|---------|
| Fluoro-2,4-dinitrobenzène | 0,66 ml |
| Ethanol absolu q.s.p. | 10 ml |

3 - Mode opératoire

Une quantité correspondant à 1 à 5 μM de groupements acétamido est déshydratée à 50°C sous pression réduite pendant 24 h, puis soumise à l'hydrazinolyse (1 ml d'hydrazine anhydre), en tube scellé, à 100°C, pendant 17 h. Le tube est refroidi sous eau courante, ouvert et l'excès d'hydrazine est éliminé sous pression réduite (à la trompe à eau) pendant 15 mn.

Le résidu est dissous dans 5 ml de tampon citrate 0,2 M. Le pH de la solution obtenue est ajusté à 3,0 par addition d'acide chlorhydrique 1 N. On ajoute ensuite 2 ml de fluorodinitrobenzène 0,5 M et on maintient à l'obscurité, pendant 4 h, sous agitation, dans un bain-marie à 40°C.

L'éthanol est éliminé sous pression réduite dans un évaporateur rotatif. La solution, concentrée à environ 4 ml, est diluée à 10 ml avec de l'eau distillée. Le DNP acéthydrazide est ensuite extrait 4 fois par 10 ml d'éther sulfurique. Les extraits éthérés sont rassemblés et évaporés à siccité sous pression réduite à l'évaporateur rotatif à 35°-40°C. Le résidu sec est débarrassé du dinitrophénol par sublimation (voir p.249) et repris dans 0,5 ml de butanone.

La solution obtenue est analysée par chromatographie sur couche mince de silice, selon le procédé de THOMPSON et HEDIN (29), avec le système-solvant suivant, préparé extemporanément :

chloroforme/méthanol/diéthylamine (98:2:0,5)

Le silicagel correspondant à la zone de l'acéthydrazide est transféré dans un tube à centrifuger. L'acéthydrazide est extrait par 5 ml du mélange isopropanol/eau (1:4) à 40°C, pendant 1 h, sous agitation intermittente. La solution, clarifiée par centrifugation, est recueillie et additionnée de 0,5 ml de soude 0,5 N, pour augmenter l'absorbance molaire. La densité optique est déterminée au spectrophotomètre à 420 m μ ;

D - DOSAGE DES ACIDES AMINES ET DES PEPTIDES

Nous avons utilisé les deux méthodes suivantes :

- a - Méthode à la ninhydrine dérivée du procédé de MOORE et STEIN (30)
- b - Méthode au fluorodinitrobenzène de GHUYSEN et coll.(30 bis)

1°- METHODE A LA NINHYDRINE

a - Principe

Les acides aminés, peptides ou protides réagissent par leur groupement aminé libre avec la ninhydrine en donnant une coloration pourpre de RUHEMAN.

b - Réactifs

- | | | |
|---------------------------------|-----|----|
| 1 - Méthylcellosolve/eau (1:1). | | |
| 2 - Ninhydrine | 20 | g |
| Méthylcellosolve | 650 | ml |
| Acétate de sodium 4 M de pH 5,5 | 350 | ml |
| 3 - Hydrindantine | 2,5 | g |
| Méthylcellosolve | 250 | ml |

Ces trois réactifs sont conservés sous atmosphère d'azote. Le réactif de coloration est obtenu en mélangeant 700 ml de la solution 1, 200 ml de la solution 2, 50 ml de la solution 3 et 50 ml d'eau distillée.

c - Mode opératoire

A 1 ml de solution, contenant 0,05 à 0,2 μ M de composés aminés on ajoute 2 ml du réactif à la ninhydrine. Après agitation, le mélange est maintenu pendant 15 mn dans un bain-marie à 95°C, puis refroidi sous eau courante. L'absorbance de la solution est déterminée à 575 μ .

2° - METHODE AU FLUORODINITROBENZENE

a - Principe

Les composés aminés réagissent avec le fluorodinitrobenzène en donnant des dérivés dinitrophénylés de couleur jaune. L'interférence du

dinitrophénol, provenant de l'hydrolyse du réactif est éliminée par acidification puisque ce composé est incolore en milieu acide.

b - Réactifs

| | | |
|---------------------------|------|----|
| 1 - Tétraborate de sodium | 1 g | g |
| Eau distillée, | 100 | ml |
| 2 - Fluorodinitrobenzène | 0,65 | ml |
| Ethanol absolu | 50 | ml |

c - Mode opératoire

A 200 μ l de solution contenant 0,01 à 0,05 μ M de composés aminés on ajoute 400 μ l de tétraborate de sodium, puis, après agitation, 50 μ l de la solution de fluorodinitrobenzène. La réaction est complétée par un séjour de 30 mn du mélange au bain-marie à 60°C. La solution refroidie sous eau courante est acidifiée par 2 ml d'acide chlorhydrique 2 N. L'absorbance est mesurée à 420 m μ .

IV - SEPARATION ET DOSAGE DES ACIDES AMINES, DES OSAMINES ET DES OSAMINITOLS

Les constituants aminés des protides (glycopeptides ou glycoprotéines) sont dosés dans les hydrolysats acides par chromatographie automatique à l'Auto-analyseur Technicon.

Nous exposerons donc, successivement, les techniques d'hydrolyse et de chromatographie que nous avons utilisées.

A - HYDROLYSE DES GLYCOPROTIDES

Afin de déterminer avec précision le pourcentage des constituants de glycoprotides, ces derniers sont déshydratés par un séjour à l'étuve à 50°C sous vide, en présence d'anhydride phosphorique jusqu'à poids constant (généralement après 4 à 6 jours).

L'échantillon (2 à 10 mg) est introduit dans un tube en pyrex (diamètre intérieur 9 mm, longueur 35 cm), avec 1 à 5 ml d'acide chlorhydrique 5,6 N (azéotrope redistillé 3 fois), contenant de la nor-leucine (0,5 mM) utilisée comme témoins interne. Le tube est chauffé à l'aide d'un chalumeau afin de provoquer un étranglement à quelques centimètres au dessus du niveau

du liquide. La solution est congelée dans un mélange de neige carbonique et d'acétone. Enfin les gaz sont éliminés, sous pression réduite, et le tube est scellé.

L'hydrolyse est effectuée à 105°C, en double, pendant 24 h, pour les analyses de routine, et en triple pendant 24 h, 48 et 72 h pour les analyses fondamentales.

Après refroidissement, les tubes sont ouverts, et l'hydrolysate est transféré dans un ballon à distiller de 50 ml. L'acide est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le résidu est repris par 0,5 l d'eau distillée ; à cette solution on ajoute 0,1 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N et 0,4 ml de glycérol, pour ioniser les groupements aminés, et pour augmenter la densité de la solution. Ce mode opératoire facilite le dépôt de l'hydrolysate à la surface de la résine, au sein même de la solution tampon.

B - SEPARATIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Nous utilisons un Auto-analyseur Technicon conçu pour la séparation des acides aminés, constituants classiques des protides. Cependant, nous avons été amené à modifier certaines conditions opératoires, afin de pouvoir doser certains composés aminés particuliers, comme l'acide α -aminobutyrique, la glucosamine, la galactosamine, les osaminitols.

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 I (p.230).

1° - Amélioration de la séparation de la sérine et de la thréonine

(Modification personnelle) (MONSIGNY) (31)

La sérine et la thréonine qui sont des constituants communs de la plupart des glycopeptides doivent être dosés avec précision. La séparation n'est satisfaisante que si on utilise des résines neuves. Nous sommes toutefois parvenu à éliminer cet inconvénient en ajoutant 5 ml d'un mélange de méthanol et de butanol (v:v) dans le premier compartiment de l'Autograd.

Tableau I

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 3,1 :

- Citrate trisodique 0,2 M ajusté à pH 3,10 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.

2° - Régénération du pouvoir séparateur de la résine (Modification personnelle)

Afin d'éviter le "vieillissement" de la résine, cette dernière est régénérée une fois par semaine, par le passage d'une solution à pH 3 d'acide éthylène di-aminotétra-acétique à 1 p.100.

3° - Séparation simultanée de la glucosamine et des acides aminés

(Modification personnelle)

Les compositions 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 II (p.232) pour la colonne de 0,6 x 130 cm remplie de "chromobeads A" et dans le Tableau III (p.233) pour la colonne de 0,6 x 65 cm, remplie de "chromobeads B".

4° - Séparation simultanée de la glucosamine de la galactosamine et des acides aminés (Modification personnelle)

La composition du gradient P-AA-9 utilisé pour séparer simultanément la glucosamine, la galactosamine et les acides aminés est précisée dans le Tableau IV (p.234) 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° - Séparation de l'acide α -amino-butyrique et des acides aminés

(Modification personnelle)

L'acide α -amino-butyrique possède, avec les gradients précédents, une vitesse de migration intermédiaire entre celle de la glucosamine et de la galactosamine. Afin de doser cet amino-acide, avec précision nous utilisons le gradient P-AA-12 décrit dans le Tableau V (p.235). Dans ces conditions, les acides aminés suivants sont parfaitement séparés : acide aspartique, thréonine, sérine, acide glutamique, proline, glycolle, alanine, acide α -amino-butyrique et valine. En outre, l'interférence des osamines ou de leurs dérivés est évitée.

C - DOSAGE DES COMPOSES PROVENANT DE LA " β -ELIMINATION"

Nous avons vu que la soude, en présence de borohydrure, sépare les protides unis par une liaison O-séryl ou O-thréonyl-glycosidique et le glycanne. Ce dernier voit se réduire, en osaminitol, l'osamine qui était conjuguée, tandis que se forment à partir des β -hydroxy-amino-acides des

Tableau II

Composition du gradient G-AA-6 permettant la séparation simultanée de la glucosamine et des acides aminés (Colonne de 0,6 x 130 cm).

| Compartiment | pH 2,875 | pH 3,8 | pH 5,0 | <u>Méthanol</u> <u>n-Butanol</u> 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 III

Composition du gradient P-AA-6 permettant la séparation de la glucosamine 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 | - | 40 | - | - | - | - |
| 4 | - | 25 | 12 | - | 3 | - |
| 5 | - | 10 | 27 | - | 3 | - |
| 6 | - | - | - | 40 | - | - |
| 7 | - | - | - | 40 | - | - |
| 8 | - | - | - | 40 | - | - |
| 9 | - | - | - | 40 | - | - |

Tableau IV

Composition du gradient P-AA-9 permettant la séparation simultanée de la glucosamine, de la galactosamine et des acides aminés (Colonne de 0,6 x 65 cm).

| Compartiment | pH 2,75 | pH 2,875 | pH 3,8 | 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 | - | - |

Tableau V

Composition du gradient P-AA-12 permettant un dosage précis des acides aminés et de l'acide α -aminobutyrique (Colonne de 0,60 x 65 cm).

| Compartment | pH 2,75 | pH 2,875 | pH 3,1 | pH 3,8 | Méthanol |
|-------------|---------|----------|--------|--------|----------|
| 1 | 38 | - | - | - | 2 |
| 2 | 12 | 28 | - | - | - |
| 3 | - | - | 20 | 20 | - |
| 4 | - | - | - | 40 | - |
| 5 | - | - | - | 40 | - |
| 6 | - | - | - | 40 | - |
| 7 | - | - | - | 40 | - |

"déhydro-amino-acides". Nous décrivons ci-dessous les procédés de dosage de ces deux types de composés modifiés.

α - DOSAGE DES OSAMINITOLS

Les osaminitols (glucosaminitol ou galactosaminitol) ont un volume d'élution identique à celui de la galactosamine lorsqu'on utilise les résines et les gradients mentionnés plus haut. C'est pourquoi nous avons été amené à détruire les osamines afin d'éliminer l'interférence avec l'osaminitol. Nous utilisons le mode opératoire suivant :

1° - Principe

Les osamines présentes dans les hydrolysats des glycoprotides sont N-acétylés en appliquant la technique de LEVY et Mc ALLAN (32). Les N-acétyl osamines formées sont très instables en milieu alcalin et sont détruites par la soude. Les autres constituants aminés également 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 LEVY et MC ALLAN : Au produit de l'hydrolyse acide de 5 à 10 mg de glycopeptides, dissous dans 1 ml de soude 1 N, on ajoute 75 μ l d'anhydride acétique. Le mélange est agité pendant 20 mn à 20°C.

b - Destruction des osamines : La solution ajustée à pH 7,0, puis additionnée d'un volume égal de soude 0,2 N est 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'hydrolysate est évaporé à siccité et le résidu est repris dans les conditions décrites plus haut (voir p.229). L'analyse chromatographique est effectuée avec le gradient que nous avons décrit dans le Tableau IV (p.234) et qui permet de séparer l'osaminitol des acides aminés.

β - DOSAGE DES ACIDES-AMINES-ETHYLIQUES

1° - Principe

Nous avons mis au point un procédé de dosage des déhydro-amino-acides formés par l'action de la soude sur les O-glycosides de la sérine ou de la thréonine.

Nous les réduisons, dans un premier temps, avec le sodium-ammoniac (voir p.38) selon le procédé utilisé par RESSLER et KASHELIKAR (33) pour réduire les nitriles en amines. Dans un second temps, l'alanine et l'acide α -aminobutyrique formés sont ensuite dosés à l'Auto-analyseur Technicon avec le gradient P-AA-12, décrit dans le Tableau V (p. 235).

2° - Mode opératoire

a - Action de la soude

50 mg de glycopeptide amidé (voir p.157) est traité par 10 ml de soude 0,1 N contenant 4 à 5 mg de borohydrure de sodium, pendant 1 à 9 jours. La solution est neutralisée à pH 7,0 par addition d'acide acétique puis évaporée à siccité dans un tube à rodage normalisé 19 / 38, utilisé pour la réduction, adapté à un dispositif rotatif d'évaporation.

b - Dissolution dans l'ammoniac anhydre

Le résidu sec est mis en suspension dans 0,2 ml de méthanol anhydre. Dans le tube, maintenu dans un mélange de neige carbonique et de méthylcellosolve, on fait passer un courant d'ammoniac anhydre. Celui-ci est préparé par addition lente de lessive de soude à une solution saturée de sulfate d'ammonium très pur, maintenue à 50°C. L'ammoniac qui se dégage est déshydraté par passage sur une colonne de chaux sodée et sur une colonne de sulfate de calcium. Il se condense sur les parois froides du tube à réaction. Quand 3 ml environ d'ammoniac sont condensés, le tube est agité et réchauffé à - 33°C.

c - Réduction par le sodium

Le sodium est introduit à l'aide d'un tube de 4 mm de diamètre que l'on plonge plusieurs fois dans l'ammoniac. La réduction est terminée quand, après l'introduction du tube de sodium dans l'ammoniac, la coloration bleue, donnée par le sodium dissous, persiste pendant 30 secondes.

d - Analyse des composés obtenus

L'ammoniac est éliminé en gardant le tube pendant quelques minutes à la température du laboratoire. L'amidure de sodium formé est détruit par addition de méthanol et l'excès d'ammoniac est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le résidu sec est dissous dans 10 ml d'acide chlorhydrique 5,6 N. Il est ensuite hydrolysé dans les conditions décrites plus haut (voir p.228). Enfin les acides aminés libérés sont dosés à l'Auto-analyseur en utilisant le gradient décrit dans le Tableau V (p.235).

V - DETERMINATION DU VOLUME SPECIFIQUE PARTIEL (V_{sp})

La connaissance du volume spécifique partiel d'un composé est indispensable pour calculer sa masse moléculaire. Parmi les nombreuses techniques qui existent, nous avons choisi les deux suivantes :

A - La pycnométrie

B - Le calcul

A - DETERMINATION DU V_{sp} PAR PYCNOMETRIE

1° - Principe

Les mesures de la densité du tampon et de la solution de protide, à une concentration connue, permettent de calculer, le volume effectivement occupé par une masse unité de protide. On utilise pour cela un pycnomètre (Fig. 3 ; p.239).

2° - Mode opératoire

Un pycnomètre d'une capacité approximative de 10 ml est exactement pesé (M_V), puis il est rempli d'eau distillée dégazée, à 20°C. La masse totale (M_W) ainsi déterminée, permet de déduire la masse d'eau qu'il contient et donc sa capacité :

$$V = \frac{M_W - M_V}{0,99823} \quad . \text{ (Nous avons indiqué dans le$$

Tableau VI (p.240) la densité de l'eau à différentes températures). Le pycnomètre est ensuite soigneusement rincé, rempli avec le tampon, puis pesé (M_T) : on en déduit la densité du tampon à 20°C.

$$d_T = \frac{M_T - M_V}{V} \quad \text{Le pycnomètre est ensuite rempli}$$

par une solution (à 1 p.100 ou à 0,5 p.100) de glycopeptide dans le tampon et pesé (M_S). On en déduit le densité de cette solution :

$$d_S = \frac{M_S - M_V}{V}$$

3° - Calcul

Le volume occupé par le produit P (en gramme) est $V_{sp.P}$. Le pycnomètre dont la capacité est V , contient $(V - V_{sp.P})$ de tampon et la masse de ce tampon est $(V - V_{sp.P}) d_T$ et la densité de la solution

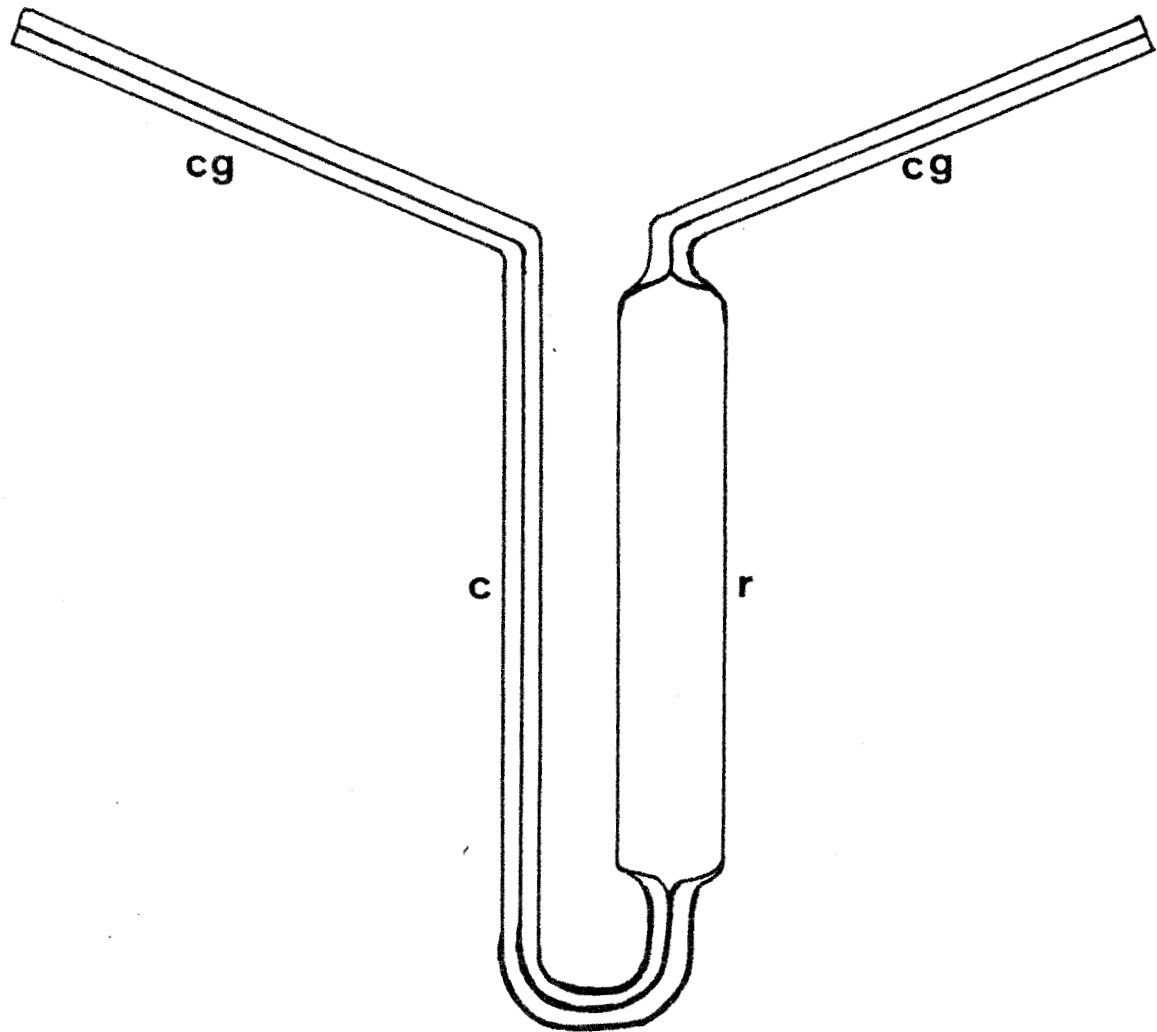


Figure 3

Schéma à l'échelle d'un pycnomètre ;

c : tube capillaire ;

cg : tube capillaire gradué ;

r : Réservoir.

Tableau VI

Densité de l'eau à diverses températures (en °C)

| | |
|-----|---------|
| 0° | 0,99987 |
| 4° | 1,00000 |
| 10° | 0,99973 |
| 15° | 0,99913 |
| 16° | 0,99897 |
| 17° | 0,99880 |
| 18° | 0,99862 |
| 19° | 0,99843 |
| 20° | 0,99823 |
| 21° | 0,99802 |
| 22° | 0,99780 |
| 23° | 0,99756 |
| 24° | 0,99732 |
| 25° | 0,99707 |

$$\text{est } d_s = \frac{M_s - M_v}{V} = \frac{(V - V_{sp} \cdot P) d_T}{V} + \frac{P}{V}$$

$\frac{P}{V}$ = représente la concentration du produit : c, en g/ml . On a donc

$$d_s = (1 - V_{sp} \cdot c) d_T + c$$

$$\text{d'où } d_s = d_T - V_{sp} \cdot c \cdot d_T + c$$

$$\text{Equation 1 : } d_s = d_T + (1 - V_{sp} d_T) \cdot c$$

$$\text{Equation 2 : } V_{sp} = - \frac{d_s}{c \cdot d_T} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d_T}$$

On peut utiliser l'équation 1 et tracer la courbe des densités de la solution en fonction des concentrations. La pente de cette courbe donne le "coefficient de flottaison" directement utilisable pour le calcul des masses moléculaires (voir p. 126) : **Figure IV** (p. 242). On peut aussi utiliser l'équation 2 qui détermine le V_{sp} pour une concentration donnée.

Il est très important de déterminer le V_{sp} de façon précise, puisque l'erreur relative est multipliée par 3 ou 4 dans le terme de "flottaison" : $(1 - V_{sp} \cdot d_T)$.

4° - Calcul d'erreur

a - Erreur relative du V_{sp}

$$\frac{\Delta V_{sp}}{V_{sp}} = \frac{\Delta d_s}{d_s} + 2 \frac{\Delta c}{c} + 2 \frac{\Delta d_T}{d_T}$$

- La concentration c comporte deux causes d'erreur : erreur sur la pesée $\frac{\Delta M}{M}$ et erreur sur la dilution $\frac{\Delta V}{V}$

- La densité du tampon dépend de l'erreur sur le volume du pycnomètre $\frac{\Delta V_p}{V_p}$, sur la pesée $\frac{\Delta M_T}{M_T}$

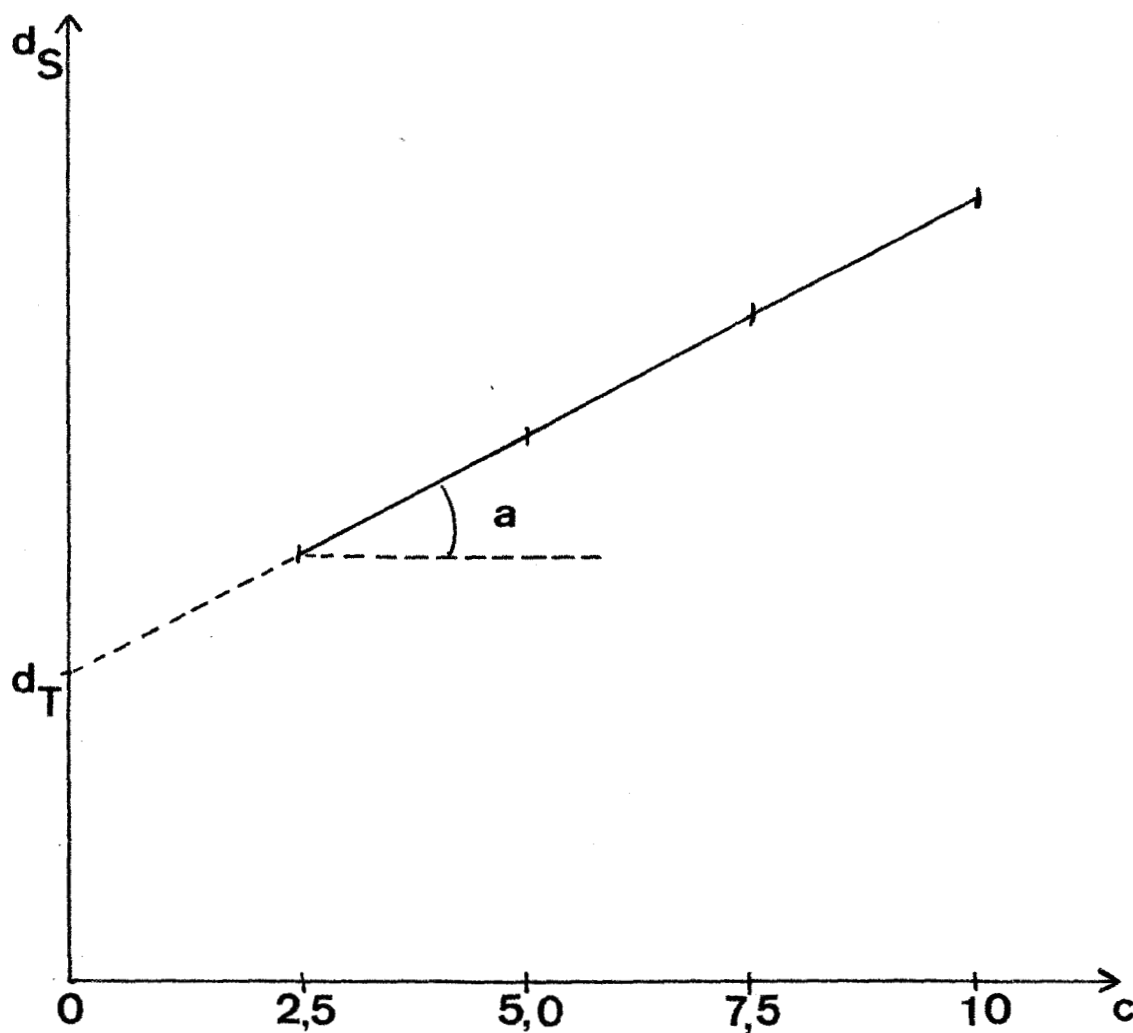


Figure 4

Détermination graphique du "coefficient de flottaison" ;
 a : coefficient de flottaison : $(1 - V_{sp} \cdot d_T)$; d_S : densité de la solution ; d_T : densité du tampon ; c : concentration du protide dans la solution, exprimée en mg/ml.

- La densité de la solution comporte les 2 mêmes causes d'erreur

$$\frac{\Delta V_p}{V_p} \text{ et } \frac{\Delta M_s}{M_s} \text{ d'où, au total,}$$

$$\frac{\Delta V_{sp}}{V_{sp}} = 3 \frac{\Delta V_p}{V_p} + \frac{\Delta M_p}{M_p} + \frac{\Delta M_s}{M_s} + 2 \frac{\Delta M_T}{M_T} + 2 \frac{\Delta V}{V} + 2 \frac{\Delta M}{M}$$

Il est donc nécessaire, pour éliminer au maximum les causes d'erreur sur le volume, de travailler à une température rigoureusement contrôlée, d'utiliser de l'eau dégazée. Les pesées doivent être effectuées de façon précise.

b - Evaluation des erreurs

La pesée du produit doit être précise : cependant pour des concentrations de 1 p.100, en effectuant une dilution à 100 ml, il suffit d'effectuer une pesée de 1 g à $\pm 0,1$ mg près : $\Delta M/M = 1/10\ 000$. Le problème le plus ardu reste sans doute la préparation de l'échantillon rigoureusement anhydre. (On utilise pour cela une étuve à 50°C sous vide poussé, en présence de déshydratants : soude en écailles et anhydride phosphorique. La dessiccation est prolongée jusqu'à poids constant.). L'erreur de volume sur la dilution, réalisée en fiole jaugée, est de l'ordre de 0,1 ml : soit $\Delta V/V = 1/1\ 000$. Les erreurs sur le volume du pycnomètre sont de l'ordre du microlitre pour un volume de quelque 8 ml : soit $\Delta V_p/V_p = 1/8\ 000$. Enfin, les erreurs sur les pesées du pycnomètre vide et des différents pycnomètres remplis dépendent du soin du manipulateur, (les traces de doigts en particulier, sont à éviter) : Elles sont de l'ordre de 2 mg pour une masse d'environ 50 g. : soit $\Delta M/M = 1/50\ 000$. L'erreur relative totale est donc :

$$\frac{\Delta V_{sp}}{V_{sp}} = 3 \frac{1}{8\ 000} + 8 \frac{1}{50\ 000} + 2 \frac{1}{10\ 000} + 2 \frac{1}{1\ 000}$$

$$\frac{\Delta V_{sp}}{V_{sp}} \approx \frac{3}{1\ 000}$$

B - DETERMINATION DU V_{sp} PAR LE CALCUL

1 - Principe

Le volume spécifique partiel d'une molécule est égal à la moyenne des V_{sp} de ses différents constituants.

Les valeurs des V_{sp} des acides aminés ont été précisées par COHN et EDSALL (34) et celle des oses par SQUIRE et al. (35) et BEZKOROVAINY et al. (36) (voir Tableau VII; p.245).

2 - Mode opératoire

Le calcul est effectué en appliquant la formule suivante :

$$V_{sp} = \frac{\sum n_i \cdot M_i \cdot V_i}{\sum n_i \cdot M_i}$$

dans laquelle :

n_i : représente le nombre de chacun des constituants pour une masse donnée du composé.

M_i : leur masse moléculaire résiduelle (sans eau).

V_i : leur volume spécifique partiel.

Le rapport des sommes $\sum n_i \cdot M_i \cdot V_i$ et $\sum n_i \cdot M_i$ représente le V_{sp} de la molécule.

3 - Applications

A titre d'exemple, nous avons précisé dans le Tableau VIII (p.246) les résultats que nous avons obtenus à propos du glycoprotide β de l'ovomucoïde (voir p.116).

VI - PROCEDES D'EXPLORATION DES SEQUENCES PEPTIDIQUES DANS LES GLYCOPEPTIDES

Les procédés généraux de détermination des séquences peptidiques dans les "holoprotides" sont applicables aux glycoprotides. Toutefois, la présence du groupement glycanique hydrophile pose des problèmes particuliers qui ont nécessité, de notre part, la modification ou la mise au point de méthodes d'analyse.

Tableau VII

Volumes spécifiques partiels des constituants des glycoprotides (100, ml/g)

| | |
|----------------------------|----|
| Alanine | 74 |
| Arginine | 70 |
| Asparagine | 60 |
| Acide Aspartique | 59 |
| 1/2 Cystine | 63 |
| Glutamine | 67 |
| Acide glutamique | 66 |
| Glycocolle | 64 |
| Histidine | 67 |
| Leucine | 90 |
| Iso-Leucine | 90 |
| Lysine | 82 |
| Méthionine | 75 |
| Phénylalanine | 77 |
| Proline | 76 |
| Sérine | 63 |
| Thréonine | 70 |
| Tryptophane | 74 |
| Tyrosine | 71 |
| Valine | 86 |
| Acide N-acétylneuraminique | 59 |
| Osamine | 62 |
| Ose | 62 |

Tableau VIII

Calcul du volume spécifique partiel du glycoprotide β .

| Constituants | n_i | M_i | V_i | $n_i M_i$ | $n_i M_i V_i$ |
|------------------|-------|-------|-------|-----------|---------------|
| Glucosamine | 10 | 203 | 0,62 | 2 030 | 1 258 |
| Oses | 5 | 162 | 0,62 | 810 | 502 |
| Acide aspartique | 1 | 115 | 0,59 | 115 | 68 |
| Thréonine | 1 | 101 | 0,70 | 101 | 70 |
| Total | | | | 3 056 | 1 898 |

$$V_{sp} = \frac{\sum n_i \cdot M_i \cdot V_i}{\sum n_i \cdot M_i} = \frac{1\ 898}{3\ 056} = 0,62$$

A - HYDROLYSE PAR LA CARBOXYPEPTIDASE (+)

Nous avons utilisé la technique décrite par SPIRO (39) :

A une solution de 20 mg de glycoprotide dans 1 ml de tampon véronal 0,03 M de pH 8,0 contenant 1 p.100 de chlorure de lithium, utilisé comme activateur, on ajoute 1 mg de carboxypeptidase (LIGHT). L'hydrolyse est effectuée pendant 24 h, à 37°C. La solution est ensuite acidifiée à pH 2,0 par l'addition d'acide chlorhydrique 1 N. Une partie aliquote de l'hydrolysate, correspondant à 1 ou 2 mg de glycoprotide, est ensuite analysée directement l'Auto-analyseur Technicon. Le reste de la solution est purifié par chromatographie sur gel de Sephadex G 25 (Colonne de 2 x 35 cm). La fraction glycopeptidique est exclue du gel. Sa composition en amino-acide est déterminée après hydrolyse chlorhydrique.

B - HYDROLYSE PAR L'AMINOPEPTIDASE

Nous avons utilisé les techniques de TAKAHASHI (40) et SMITH et HILL (41).

1° - Méthode de TAKAHASHI

A une solution de 20 mg de glycoprotide dans 1 ml de tampon Tris (2-hydroxyméthyl-2-amino-1,3-propanediol) 0,05 M, de pH 8,5, 0,005 M en chlorure de magnésium utilisé comme activateur, on ajoute, dissoute dans 0,5 ml du même tampon, 1 mg d'amino-peptidase (SIGMA) préactivée par un chauffage de 40 mn à 37°C. L'action de l'enzyme est prolongée pendant 24 ou 48 h, à 37°C. La solution est ensuite analysée dans les conditions que nous avons décrites à propos de l'action de la carboxypeptidase.

2° - Technique de SMITH et HILL

Le mode opératoire est identique au précédent, à la différence près que le pH du tampon Tris 0,05 M est plus faible (pH 7,5) et que les activateurs sont les chlorures de manganèse et de magnésium, aux concentrations respectivement de 0,002 M et de 0,004 M.

(+) Quand la fraction peptidique du glycoprotide est un dipeptide, le glycoprotide est préalablement N-acétylé par la méthode de LEVY et Mc ALLAN (37) (voir p. 236) ou dinitrophénylé par la méthode de SANGER (38) (voir p. 141).

C - DINITROPHENYLATION

La recherche et le dosage des acides aminés N-terminaux par le procédé au fluoro-2,4-dinitrobenzène de SANGER (42) réclament les précautions suivantes :

a - Toutes les réactions doivent être effectuées à l'abri de la lumière, pour éviter les réactions de dégradation photochimique des DNP-amino-acides ;

b - Le fluoro-dinitrobenzène doit être pur, et en particulier, ne doit pas contenir de dérivés trinitrés qui rendent difficile l'interprétation des chromatogrammes ;

c - Toutes les manipulations depuis la condensation du fluoro-dinitrobenzène et du protide, jusqu'à l'analyse des DNP-amino-acides, doivent être réalisées dans le minimum de temps ;

d - Le dosage en retour des acides aminés non dinitrophénylés, après hydrolyse chlorhydrique, doit être systématiquement effectué.

Les différentes étapes sont les suivantes :

- 1° - Condensation du fluoro-dinitrobenzène et du glycoprotide.
- 2° - Purification du DNP-glycoprotide.
- 3° - Hydrolyse acide du DNP-glycoprotide.
- 4° - Extraction et chromatographie des DNP-amino-acides.
- 5° - **Chromatographie des DNP-amino-acides.**
- 6° - **Analyse des acides aminés non dinitrophénylés dans les hydrolysats chlorhydriques.**

1° - Dinitrophénylation des glycoprotides

Nous avons utilisé la technique décrite par SANGER (43). Le glycoprotide (20 mg) est dissous dans 5 ml d'eau contenant 500 mg de bicarbonate de sodium. A cette solution, on ajoute 10 ml d'une solution éthanolique à 5 p.100 (v:v) de fluoro-2,4-dinitrobenzène, et le mélange est agité pendant 4 h, à l'obscurité et à la température du laboratoire. On ajoute alors, à nouveau, 500 mg de bicarbonate de sodium et 10 ml de solution éthanolique de fluorodinitrobenzène et la réaction est prolongée pendant 24 h.

2° - Purification du DNP-glycoprotide

La purification du DNP-glycoprotide formé est décrite à la page 142 .

3° - Hydrolyse des DNP-glycoprotides

Nous avons utilisé les techniques décrites par BISERTE, HOLLEMAN et al. (44). L'hydrolyse est effectuée en tube scellé sous pression réduite, pendant 16 h à 105°C, par l'acide chlorhydrique redistillé (voir l'hydrolyse des protides ; p. 228). Quand le glyco-colle ou la proline se trouvent en position N-terminale, il est nécessaire d'effectuer les hydrolyses dans les conditions suivantes, afin d'éviter au maximum les dégradations de ces composés :

- pour le DNP-glyco-colle, hydrolyse par l'acide chlorhydrique 5,6 N pendant 4 h à 105°C.

- pour la DNP-proline, hydrolyse par l'acide chlorhydrique 11,2 N, pendant 4 h à 105°C.

4° - Extraction et chromatographie des DNP-amino-acides

Les hydrolysats chlorhydriques sont dilués avec de l'eau pour obtenir une concentration sensiblement normale en acide chlorhydrique. L'hydrolysat ainsi dilué est extrait 7 à 8 fois par 5 ml d'éther privé de peroxydes (voir Appendice technique ; p. 214). Les extraits étherés sont rassemblés, lavés une fois par 10 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N. Ils contiennent les DNP-amino-acides éthero-solubles. Les phases aqueuses sont rassemblées. Elles renferment les DNP-amino-acides hydrosolubles : DNP-arginine, acide DNP-cystéique, ϵ -DNP-lysine, Im-DNP-histidine.

Les solutions étherées ou aqueuses sont évaporées à siccité, séparément, dans l'appareil spécial décrit par BISERTE et al. (45) et qui permet d'éliminer le dinitrophénol par sublimation sous pression réduite.

La sublimation s'effectue à 70° - 80°C pendant trente minutes, le doigt intérieur étant rempli d'un mélange de neige carbonique et d'acétone.

5° - Chromatographie des DNP-amino-acidesa - DNP-éthéro-solubles

Le résidu, privé de dinitrophénol, est dissous dans un faible volume d'acétone, et l'analyse des DNP amino-acides est réalisé par chromatographie bidimensionnelle sur papier WHATMAN n° 1.

Le dépôt est effectué sur une feuille de 40 x 55 cm à 10 cm du bord du petit côté et à 5 cm du bord du grand côté. Le premier système-solvant utilisé est préparé de la façon suivante :

Le mélange : toluène/pyridine/2chloro-éthanol/ammoniacque 0,8 N (10:3:6:6), qui est biphasique, est homogénéisé par agitation, puis laissé au repos pendant 4 h. La phase aqueuse, inférieure est éliminée ; la phase organique supérieure, qui reste trouble, est filtrée sur du papier WHATMAN n° 1, qui retient les micelles d'eau, et le filtrat clair ainsi obtenu est utilisé comme solvant de développement de la première dimension.

Le chromatogramme, enroulé est maintenu par 2 agrafes, en cylindre. Il est placé dans une cuve de chromatographie ascendante, contenant deux cristallisoirs concentriques ; le cristallisoir central est rempli d'ammoniacque 0,8 M. L'autre cristallisoir reçoit le système-solvant 24 h après l'introduction du chromatogramme dans la cuve.

Lorsque le front du solvant atteint la partie supérieure de la feuille, celle-ci est sortie de la cuve, et le solvant est éliminé sous courant d'air, à l'abri de la lumière, pendant 10 à 12 h.

Une deuxième chromatographie, descendante, est alors effectuée perpendiculairement à la première, dans un tampon phosphate de sodium 1,5 M de pH 6, ou dans un tampon phosphate de sodium 2,5 M de pH 6 lorsque les acides DNP-aspartique et DNP-glutamique sont tous deux présents.

Les DNP-amino-acides apparaissent sous la forme de taches jaunes. Ils sont identifiés grâce à des diagrammes témoins. La tache du dinitrophénol (jaune) peut faiblement être reconnue, car elle disparaît lorsque l'on soumet le chromatogramme aux vapeurs d'acide ; la tache de la dinitraniline se présente sous forme d'une traînée qui possède une fluorescence verdâtre particulière lorsqu'elle est soumise aux rayons ultra-violetts.

b - DNP-hydrosolubles

Les DNP-amino-acides solubles dans la phase aqueuse peuvent être extraits par le butanol secondaire et analysés par chromatographie sur papier dans le système-solvant toluène/pyridine/ 2 chloro-éthanol/ammoniaque 0,8 N (10:3:6:6) ou dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5).

6° - Analyse des acides aminés non dinitrophénylés dans les hydrolysats chlorhydriques

Les hydrolysats chlorhydriques (16 h à 105°C), débarrassés des DNP-amino-acides éthero-solubles, sont concentrés à siccité à l'évaporateur rotatif sous pression réduite, à 35 - 40°C. Le résidu est repris par de l'eau distillée, et une partie aliquote correspondant à 1 ou 2 mg de glycoprotide de départ, est soumise à l'analyse des acides amino-acides.

D - DEGRADATION RECURRENTE D'EDMAN

La technique de dégradation d'EDMAN est décrite à la page 142. Lorsque la fraction protidique est constituée par un peptide, il faut réaliser plusieurs cycles successifs. Le mode opératoire est alors le suivant :

- 1er Cycle : a - Condensation du phénylisothiocyanate et du glycoprotide et cyclisation en milieu acide : hydrolyse d'une partie aliquote et analyse des acides aminés non modifiés : (Composition totale I)

b - Purification par chromatographie préparative sur papier MACHEREY-NAGEL 807 ou 261, dans le système-solvant de PARTRIDGE (46) : analyse du glycoprotide, resté au trait de départ (composition "trait de départ" I), et des acides aminés et peptides éventuellement libérés.

- 2è Cycle : a - Condensation du phénylisothiocyanate et du glycoprotide "trait de départ" I. Cyclisation en milieu acide. Hydrolyse d'une partie aliquote et analyse des acides aminés non modifiés : (composition totale II).

b - Purification et analyses identiques à celles du premier cycle : (Composition "trait de départ" II).

Ce protocole est répété jusqu'à l'obtention d'un glycoprotide "trait de départ" ne renfermant plus d'acide aminé non modifié.

Dans le cas où des peptides sont libérés (peptides initialement en position C-terminale par rapport à l'acide aminé lié au glycanne), ils sont isolés, analysés et soumis à une dégradation d'EDMAN, dans les mêmes conditions que les glycoprotides eux-mêmes.

- BEZKOROVAINY A. et DOHERTY D.G., Arch. Biochem. Biophys., 1962, 96, 491 (36)
- BISERTE G., HOLLEMAN J.W., HOLLEMAN-DEHOVE J. et SAUTIERE P., J. Chromatog., 1959, 2, 225 (18,44,45).
- BISERTE G. et OSTEUX R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 50, (16).
- BRENNER M., NIEDERWIESER A. et PATAKI G., in E. STAHL, Thin-layer chromatography, Springer-Verlag, Berlin, 1965, 391, (7).
- CHERBULIEZ E., BAEHLER B. et RABINOWITZ J., Helv. Chim. Acta, 1964, 47, 1350, (24 bis).
- COHN E.J. et EDSALL J.T., Proteins, Aminoacids and peptides as ions and dipolar ions, Reinhold, New York, 1943, (34).
- EHRHARDT E. et CRAMER F., J. Chromatog., 1962, 7, 405, (4,5,12).
- GHUYSEN J.M., TIPPER D.J., BIRGE C.H. et STROMINGER J.L., Biochemistry, 1965, 4, 2245, (30 bis).
- GROTHER J.W., J. Biol. Chem., 1931, 93, 25, (25).
- HARBON S., HERMAN G. et CLAUSER H., à paraître. (9).
- HAY G.W., LEWIS B.A. et SMITH F., J. Chromatog., 1963, 11, 479, (6).
- JERMYN M.A. et ISHERWOOD F.A., Biochem. J., 1949, 44, 402, (15).
- KAWERAU E. et WIELAND T., Nature, 1951, 168, 77, (20).
-
- KUSAMA K., J. Biochem., 1957, 44, 375, (1).
- LEVY G.A. et Mc ALLAN A., Biochem. J., 1959, 73, 127, (32,37).
- LEVY A.L., Nature, 1954, 174, 126, (17).
- Mc COMB E.A. et Mc CREADY R.M., Anal. Chem., 1957, 29, 819, (27).
- MICHL H., Monatsch. Chem., 1951, 82, 489, (19).
- MONSIGNY M., Symposium 1965, Compagnie Technicon, Paris. (31).
- MONTGOMERY R. et WU Y.C., J. Biol. Chem., 1963, 238, 3547, (24).
- MOORE S. et STEIN W., J. Biol. Chem., 1954, 211, 893, (30).
- PARK J.T. et JOHNSON M.J., J. Biol. Chem., 1949, 181, 149, (26).

- PARTRIDGE S.M., Biochem. J., 1948, 42, 238, (14,22,46).
- PARTRIDGE S.M., Biochemical Society Symposia 3, 52 Cambridge University Press éd., London, 1949, (21).
- PATAKI G., Chimia, 1964, 18, 23, (8).
- PHILLIPS D.M.P., Biochem. J., 1963, 86, 397, (28).
- PICHAT L. et CLEMENT ., Bull. Soc. Chim., 1961, 524, (3).
- RESSLER C. et KASHELIKAR D.V., J. Amer. Chem. Soc., 1966, 88, 2025, (33).
- RONKAINEN P., J. Chromatog., 1963, 11, 228, (10).
- SALTON M.R.J., Biochim. Biophys. Acta, 1959, 34, 308, (23).
- SANGER F., Biochem. J., 1945, 39, 507, (38,42,43).
- SMITH E.L. et HILL R.L., in BOYER P.D., LARDY H. et MYRBACK K., The Enzymes, Academic Press éd., New-York, 1960, 4, 37, (41).
- SPIRO R.G., J. Biol. Chem., 1962, 237, 382, (39).
- SQUIRE P.G., DELIN S. et PURATH J., Biochim. Biophys. Acta, 1964, 89, 400 (35).
- TAKAHASHI K., J. Biochem., 1962, 52, 74, (40).
- TATE M.E. et BISHOP C.T., Can. J. Chem., 1962, 40, 1043, (13).
- THOMPSON A.C. et HEDIN P.A., J; Chromatog., 1966, 21, 13, (11,29).
- WOLFROM M.L., et LINEBACK D.R., Meth. Carb. Chem., 1962, 2, 342, (2).

