

50376
1970

N° d'ordre : 223

132

50.376

1970

132

UNIVERSITE DE LILLE
FACULTE DES SCIENCES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ

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

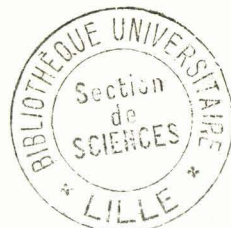
par

Gérard STRECKER

LES GLUCIDES DE L'URINE HUMAINE

1° - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES MONO-
ET DES OLIGOSACCHARIDES

2° - APPLICATION A QUELQUES URINES PATHOLOGIQUES.
DESCRIPTION DU PREMIER CAS MONDIAL DE SIALURIE



PRÉSENTÉ LE 31 OCTOBRE 1970 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. J. MONTREUIL, Président et Rapporteur

J. DRIESENS

Z. GLACET

R. GOT

M^{lle} G. SPIK

Ce travail a été effectué à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Directeur : Professeur J. DRIESSENS) et dans le laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille, sous la direction de Monsieur le Professeur J. MONTREUIL.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

Professeur de Chimie Biologique à la
Faculté des Sciences de Lille,

Chef du Service de Biochimie Cellulaire de
l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille

Je vous remercie vivement d'avoir bien voulu m'accorder votre confiance en me donnant le soin d'achever une série de travaux que vous aviez vous-même déjà bien engagés sur la voie de la réussite.

Je vous témoigne toute ma gratitude de m'avoir formé au métier de chercheur avec cet esprit qui vous est cher, de constituer une équipe unie et enthousiaste, à laquelle je suis fier d'appartenir.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements :

à Monsieur le Professeur J. DRIESSENS, Professeur de Cancérologie à la Faculté de Médecine de Lille, Directeur de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, qui nous a fait l'honneur de nous recevoir dans son établissement et nous a permis de réaliser ce travail,

à Monsieur le Professeur Z. GLACET, Professeur de Chimie organique à la Faculté des Sciences de Lille et à Monsieur le Professeur R. GOT, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui nous ont fait l'honneur de juger notre thèse ;

à Mademoiselle G. SPIK, Chargée de Recherches au C.N.R.S. pour ses précieux conseils et sa collaboration scientifique dans la découverte de la sialurie ;

à Messieurs les Professeurs G. BISERTE et G. FONTAINE et au Docteur J.P. FARRIAUX, qui nous ont fait l'honneur de nous confier le soin de réaliser l'étude biochimique qui nous a conduit à la découverte de la sialurie ;

à Mesdames B. MALLEVAIS-GOUBET et A. LOIEZ-HENNETTE et à Monsieur B. BAYARD, pour leur aide précieuse et efficace ;

à Mesdemoiselles A. POITAU et M.T. PICQUE et à Madame BENNAISSA, pour leur précieuse collaboration technique.

UNIVERSITE DE LILLE

FACULTE DES SCIENCES

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES

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

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie et Calcul Numérique
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	I.U.T. Lille
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques
M. DEDECKER Paul	Mathématiques
M. le Doyen DEFRETIN René	Directeur du Laboratoire de Biologie Maritime de Wimereux
M. DEHORS	Automatique
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Animale
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique des Fluides
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LIEBAERT	I.U.T. Lille
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. MORIAMEZ Michel	I.U.T. Valenciennes
M. MARTINOT LAGARDE	Mécanique des Fluides
M. PEREZ Jean-Pierre	Physique
M. PHAM MAU QUAN	Mathématiques
M. POUZET Pierre	I.U.T. Lille
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Mathématiques
M. TILLIEU Jacques	Physique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Minérale Appliquée E.N.S.C.I.
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale

M. WATERLOT Gérard	Géologie et Minéralogie
M. WERTHEIMER Raymond	Physique

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BENABOU Jean	Mathématiques
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. LEBRUN André	C.U.E.E.P.
M. PARREAU Michel	Mathématiques
M. SAVARD Jean	Chimie Générale
M. SCHALLER François	Biologie Animale
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BODART Marcel	Biologie Végétale
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique et Minérale 1er Cycle
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie et Minéralogie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique
M. LINDER Robert	Biologie Végétale
Mlle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Minérale Appliquée
M. PROUVOST Jean	Géologie et Minéralogie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCE (et chargés des fonctions)

M. ABBAR	I.U.T. Amiens
M. AUBIN Thierry	Mathématiques Pures
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BILLARD Jean	Physique
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Calcul Numérique
M. CHOQUET Marcel	I.U.T. Lille
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COULON Jean-Paul	Electrotechnique
Mme DRAN Raymonde	Chimie Organique
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques

M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD de la MARRE Pierre	Calcul Numérique
M. JOLY	Biologie Animale
Mlle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie Générale
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANDAIS Jean	Chimie Organique
M. LAURENT François	Automatique
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	I.U.T. Lille
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Sciences Appliquées
M. MONSIGNY Michel	Chimie Biologique
M. MONTEL Marc	Physique
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
Mme MORIAMEZ BOULLET Claude	I.U.T. Valenciennes
M. NICOLE Jacques	E.N.S.C.L.
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mécanique des Fluides
M. PONSOLLE	C.S.U. Valenciennes
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY	Radioélectrique
M. ROOS Philippe	I.U.T. Lille
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SAADA Georges	Physique
M. SAIMER Georges	Electronique
M. SMET Pierre	Physique
M. SEGUIER Guy	I.U.T. Béthune
M. THOMAS Daniel	C.S.U. Valenciennes
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
Mme ZINN Justin Nicole	Mathématiques

T A B L E d e s M A T I E R E S

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>GENERALITES</u>	3
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">1^o LES GLUCIDES LIBRES DE L'URINE</div>	4
I - <u>MECANISME DE L'ELIMINATION RENALE</u>	4
II - <u>LES GLUCIDES DES URINES PATHOLOGIQUES</u>	6
A - <u>LES GLUCOSURIES</u>	7
1 - <u>LE DIABETE PANCREATIQUE</u>	7
2 - <u>AUTRES GLUCOSURIES</u>	7
3 - <u>LA GLUCOSURIE ALIMENTAIRE</u>	8
4 - <u>LE DIABETE RENAL</u>	8
B - <u>LES GALACTOSURIES</u>	8
1 - <u>LA GALACTOSURIE PAR INSUFFISANCE HEPATIQUE</u>	9
2 - <u>LA GALACTOSEMIE CONGENITALE DU NOURRISSON</u>	9
C - <u>LES FRUCTOSURIES</u>	10
1 - <u>LA FRUCTOSURIE PHYSIOLOGIQUE DU NOUVEAU-NE</u>	10
2 - <u>LA FRUCTOSURIE PHYSIOLOGIQUE ALIMENTAIRE</u>	10
3 - <u>LA FRUCTOSURIE HEPATIQUE</u>	10
4 - <u>LA FRUCTOSURIE BENIGNE HEREDITAIRE</u>	10
5 - <u>L'INTOLERANCE HEREDITAIRE AU FRUCTOSE</u>	10
D - <u>LES LACTOSURIES</u>	10
1 - <u>LA LACTOSURIE DE LA FEMME ENCEINTE</u>	11
2 - <u>LES LACTOSURIES PAR MALADIES INTESTINALES AIGUES</u>	11
3 - <u>LA LACTOSURIE PRIMITIVE OU CONGENITALE</u>	11
E - <u>LES SACCHAROSURIES</u>	11
F - <u>LA MALTOSURIE</u>	11

	Pages
G - <u>LES PENTOSURIES</u>	12
1 - <u>LES PENTOSURIES ALIMENTAIRES</u>	12
2 - <u>LES PENTOSURIES ACCOMPAGNANT LES MYOPATHIES</u>	12
3 - <u>LA PENTOSURIE ESSENTIELLE</u>	12
H - <u>LES HEPTULOSURIES</u>	12
III - <u>LES GLUCIDES DES URINES NORMALES</u>	14
A - <u>LES MONOSACCHARIDES URINAIRES</u>	14
B - <u>LES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES</u>	19
2° LES GLUCIDES CONJUGUES DE L'URINE	24
I - <u>LES GLYCOPROTEINES URINAIRES</u>	25
A - <u>PROTEINES SERIQUES</u>	25
B - <u>HORMONES GONADOTROPES</u>	26
C - <u>SUBSTANCES DE GROUPES SANGUINS</u>	26
D - <u>GLYCOSAMINO-GLUCURONO-GLYCANNES</u>	27
E - <u>LA GLYCOPROTEINE DE TAMM et HORSFALL OU UROMUCOIDE</u>	29
F - <u>L'INHIBITEUR TRYPSIQUE D'ASTRUP</u>	31
G - <u>GLYCOPROTEINES DE FAIBLE POIDS MOLECULAIRE</u>	31
1 - <u>LA "GLYCOPROTEINE RICHE EN ACIDE SIALIQUE"</u>	31
2 - <u>LA β-MICROGLOBULINE</u>	31
II - <u>LES GLYCOPEPTIDES URINAIRES</u>	31
III - <u>DOSAGE DES GLYCOPROTIDES TOTAUX DES URINES</u>	34
IV - <u>LES GLYCOPROTEINES DES URINES PATHOLOGIQUES</u>	38
<u>GLYCOPROTEINES ET CANCER</u>	38
1 - <u>VARIATIONS QUANTITATIVES</u>	38
2 - <u>VARIATIONS QUALITATIVES</u>	

	Pages
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	45
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> MISE AU POINT D'UN PROCEDE DE FRACTIONNEMENT DES URINES </div>	46
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 1° MATERIEL ET METHODES D'ANALYSE </div>	46
<u>I - METHODES DE DOSAGES COLORIMETRIQUES DES GLUCIDES</u>	46
A - <u>DOSAGE DES OSES NEUTRES</u>	46
B - <u>DOSAGE DES ACIDES URONIQUES</u>	46
C - <u>DOSAGE DES OSAMINES</u>	46
D - <u>DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES</u>	47
<u>II - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES D'ANALYSE DES GLUCIDES</u>	47
A - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	47
1 - <u>SYSTEMES-SOLVANTS</u>	47
2 - <u>REVELATEURS SPECIFIQUES</u>	47
B - <u>FILTRATION SUR GEL</u>	47
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 2° RESULTATS </div>	48
<u>I - MODE OPERATOIRE</u>	48
A - <u>FRACTIONNEMENT DES URINES</u>	48
1 - <u>COLLECTION DES URINES</u>	48
2 - <u>PRECIPITATION ETHANOLIQUE</u>	48
3 - <u>DIALYSE DU PRECIPITE ETHANOLIQUE</u>	48
4 - <u>PURIFICATION DES SOLUTIONS GLUCIDIQUES</u>	48
B - <u>ANALYSE DES FRACTIONS OBTENUES</u>	49
1 - <u>FRACTION PRECIPITABLE PAR L'ETHANOL</u>	49
a - <u>Fraction adialysable du précipité éthanolique</u>	49
α - Analyse qualitative	49
β - Analyse quantitative	49

	Pages
b - <u>Fraction dialysable du précipité éthanolique</u>	53
α - Analyse qualitative	53
β - Analyse quantitative	53
2 - <u>LA FRACTION NON PRECIPITABLE PAR L'ETHANOL</u>	53
a - Analyse qualitative	53
b - Analyse quantitative	56
3 - <u>CONCLUSIONS</u>	56
<u>ISOLEMENT DES GLUCIDES URINAIRES</u>	58
<u>1° ISOLEMENT DES MONOSACCHARIDES NEUTRES URINAIRES</u>	58
<u>I - MODE OPERATOIRE</u>	58
A - <u>PURIFICATION SUR COLONNE DE CHARBON-CELITE</u>	58
B - <u>PURIFICATION ET ISOLEMENT DES ALDOSES</u>	58
1 - <u>DESTRUCTION DES CETOSES PAR L'ACIDE CHLORHYDRIQUE</u>	58
2 - <u>CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE DES ALDOSES</u>	58
C - <u>PURIFICATION ET ISOLEMENT DES CETOSES</u>	58
1 - <u>OXYDATION DES ALDOSES PAR L'EAU DE BROME</u>	58
2 - <u>CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE DES CETOSES</u>	59
D - <u>PURIFICATION ET ISOLEMENT DES N-ACETYLOSAMINES</u>	59
<u>II - RESULTATS</u>	59
A - <u>ISOLEMENT DES ALDOSES</u>	59
B - <u>ISOLEMENT DES CETOSES</u>	61
C - <u>ISOLEMENT DES N-ACETYLOSAMINES</u>	61
<u>III - CONCLUSION</u>	61

	Pages
<u>2° ISOLEMENT DES MONOSACCHARIDES ACIDES</u>	63
I - <u>MODE OPERATOIRE</u>	63
II - <u>RESULTATS</u>	63
III - <u>CONCLUSIONS</u>	63
<u>3° ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES</u>	65
I - <u>MODE OPERATOIRE</u>	65
A - <u>FRACTIONNEMENT DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES SUR COLONNE DE CHARBON-CELITE</u>	65
B - <u>ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES PAR CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE SUR PAPIER</u>	65
II - <u>RESULTATS</u>	66
III - <u>CONCLUSION</u>	66
<u>ETUDE DES MONOSACCHARIDES URINAIRES</u>	68
1° MATERIEL ET METHODES	68
I - <u>PREPARATION DES OSES DE REFERENCE</u>	68
A - <u>ISOLEMENT DE GLUCIDES A PARTIR DE MILIEUX NATURELS</u>	68
1 - <u>ISOLEMENT DU SEDOHEPTULOSE DE SEDUMS</u>	68
a - Mode opératoire	68
b - Résultats	68
2 - <u>ISOLEMENT DES ACIDES SIALIQUES DE LA MUCINE SOUS-MAXILLAIRE DU BOEUF</u>	68
a - Mode opératoire	68
b - Résultats	69
B - <u>PREPARATION DES CETOSES PAR EPIMERISATION</u>	69
1 - <u>PRINCIPE DE LA REACTION</u>	69
2 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	70
3 - <u>RESULTATS</u>	70

II - <u>ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES</u> <u>MONOSACCHARIDES URINAIRES</u>	70	
A - <u>METHODES CHROMATOGRAPHIQUES</u>	72	
1 - <u>SYSTEMES-SOLVANTS</u>	72	
2 - <u>REVELATEURS SPECIFIQUES</u>	72	
B - <u>METHODES ELECTROPHORETIQUES</u>	72	
1 - <u>ELECTROPHORESE DES N-ACETYLOSAMINES</u>	72	
2 - <u>ELECTROPHORESE DES ACIDES URONIQUES</u>	72	
C - <u>METHODES COLORIMETRIQUES</u>	72	
D - <u>PREPARATION DES PHENYLOSAZONES</u>	73	
1 - <u>REACTIF</u>	73	
2 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	73	
3 - <u>MICROMETHODE</u>	73	
<table border="1" data-bbox="647 1122 910 1181"><tr><td>2° RESULTATS</td></tr></table>	2° RESULTATS	74
2° RESULTATS		
I - <u>ETUDE DES ALDOSES URINAIRES</u>	74	
A - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	74	
B - <u>PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES ALDOSES URINAIRES</u>	74	
1 - <u>POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE</u>	74	
2 - <u>SYNTHESE DES OSAZONES ET ETUDE DE LEURS PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES</u>	74	
C - <u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	75	
II - <u>ETUDE DES CETOSES URINAIRES</u>	77	
A - <u>LE CETOSE 1</u>	77	
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	77	
2 - <u>ACTION DES ACIDES</u>	77	
3 - <u>REACTIONS COLORIMETRIQUES</u>	77	
4 - <u>SYNTHESE CHIMIQUE DU CETOSE 1</u>	77	

	Pages
a - Principe	77
b - Mode opératoire	77
c - Résultats	79
5 - <u>OXYDATION PERIODIQUE DU CETOSE 1</u>	79
a - Mode opératoire	79
b - Résultats	82
6 - <u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	82
B - <u>LES CETOSES 2 a et 2 b</u>	85
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	85
2 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES OSAZONES</u>	85
3 - <u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	85
C - <u>LE CETOSE 3</u>	85
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	85
2 - <u>POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE</u>	85
3 - <u>REACTION COLORIMETRIQUE DE DISCHE-BORENFREUND</u>	85
4 - <u>SYNTHESE DES OSAZONES</u>	87
5 - <u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	87
D - <u>LE CETOSE 4</u>	87
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	87
2 - <u>SYNTHESE DU CETOSE 4</u>	87
a - Mode opératoire	88
b - Résultats	88
3 - <u>PROPRIETES CHIMIQUES DU 3-CETO-FRUCTOSE</u>	88
4 - <u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	88
E - <u>LE CETOSE 5 a</u>	88
1 - <u>IDENTIFICATION DE L'ALLO-HEPTULOSE</u>	88
2 - <u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	91
F - <u>LE CETOSE 5 b</u>	91
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	91
2 - <u>POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE</u>	91
3 - <u>REACTION COLORIMETRIQUE DE DISCHE-BORENFREUND</u>	91

	Pages
4 - <u>SYNTHESE DES OSAZONES</u>	91
5 - <u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	95
G - <u>LE CETOSE 6</u>	95
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	95
2 - <u>REACTION COLORIMETRIQUE DE DISCHE-BORENFREUND</u>	95
3 - <u>SYNTHESE DES OSAZONES</u>	95
4 - <u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	95
H - <u>LE CETOSE 7</u>	95
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	95
2 - <u>POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE</u>	99
3 - <u>REACTION COLORIMETRIQUE DE DISCHE-BORENFREUND</u>	99
4 - <u>SYNTHESE DES OSAZONES</u>	99
5 - <u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	99
III - <u>ETUDE DES N-ACETYLOSAMINES</u>	99
A - <u>IDENTIFICATION ELECTROPHORETIQUE DES N-ACETYLOSAMINES URINAIRES</u>	99
B - <u>CONCLUSIONS ET DISCUSSION</u>	99
IV - <u>ETUDE DES ACIDES URONIQUES URINAIRES</u>	102
A - <u>IDENTIFICATION ELECTROPHORETIQUE DES ACIDES URONIQUES</u>	102
B - <u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	102
V - <u>ETUDE DES ACIDES SIALIQUES URINAIRES</u>	102
A - <u>IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES SIALIQUES URINAIRES</u>	102
B - <u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	102
3° CONCLUSIONS ET DISCUSSION	105
<u>L'ORIGINE DES MONOSACCHARIDES URINAIRES</u>	

	Pages
<u>ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES</u>	111
<u>1° MATERIEL ET METHODES</u>	111
I - <u>NUMEROTATION DES OLIGOSACCHARIDES</u>	111
II - <u>METHODES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE DES OSIDES</u>	111
A - <u>COMPOSITION CENTESIMALE</u>	111
B - <u>IDENTIFICATION DES OSES NEUTRES ET DETERMINATION DE LEURS RAPPORTS MOLAIRES</u>	111
1 - <u>HYDROLYSE CHLORHYDRIQUE</u>	111
2 - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE DES OSES NEUTRES</u>	112
C - <u>IDENTIFICATION DES OSAMINES ET DETERMINATION DE LEUR COMPOSITION MOLAIRE</u>	112
1 - <u>IDENTIFICATION DES OSAMINES</u>	112
a - Procédé de désamination oxydative des osamines de GARDELL et coll.	112
b - Identification des N-acétylosamines	113
2 - <u>COMPOSITION MOLAIRE EN OSAMINES</u>	113
D - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES SIALIQUES ET DETERMINATION DE LEUR COMPOSITION MOLAIRE</u>	114
E - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES URONIQUES ET COMPOSITION MOLAIRE</u>	114
F - <u>IDENTIFICATION DE L'OSE REDUCTEUR TERMINAL</u>	115
<u>2° RESULTATS</u>	115
I - <u>LA FRACTION EAU</u>	115
A - <u>L'OSIDE EAU 1</u>	115
B - <u>L'OSIDE EAU 2</u>	115
C - <u>L'OSIDE EAU 3</u>	115
D - <u>L'OSIDE EAU 4</u>	115
E - <u>L'OSIDE EAU 5</u>	115

	Pages
F - <u>CONCLUSION</u>	121
II - <u>LA FRACTION à 1,5 p. 100 EN ETHANOL :</u>	121
<u>LA FRACTION A</u>	
A - <u>L'OSIDE A 1</u>	121
B - <u>L'OSIDE A 2</u>	121
C - <u>L'OSIDE A 3</u>	121
D - <u>L'OSIDE A 4</u>	122
E - <u>LES OSIDES A 5 et A 6</u>	122
F - <u>L'OSIDE A 7</u>	122
G - <u>CONCLUSION</u>	122
III - <u>LA FRACTION à 3,5 p. 100 en ETHANOL :</u>	126
<u>LA FRACTION B</u>	
A - <u>L'OSIDE B 1</u>	126
B - <u>L'OSIDE B 2</u>	126
C - <u>L'OSIDE B 3</u>	126
D - <u>L'OSIDE B 4</u>	126
E - <u>CONCLUSION</u>	130
IV - <u>LA FRACTION à 5 p. 100 en ETHANOL :</u>	130
<u>LA FRACTION C</u>	
A - <u>L'OSIDE C 1</u>	130
B - <u>L'OSIDE C 2</u>	130
C - <u>L'OSIDE C 3</u>	130
D - <u>L'OSIDE C 4</u>	131
E - <u>L'OSIDE C 6</u>	131
F - <u>L'OSIDE C 7</u>	131
G - <u>L'OSIDE C 8</u>	131

	Pages
H - <u>L'OSIDE C 9</u>	132
I - <u>L'OSIDE C 10</u>	132
J - <u>L'OSIDE C 11</u>	132
K - <u>L'OSIDE C 12</u>	132
L - <u>CONCLUSION</u>	138
V - <u>LA FRACTION à 7,5 p. 100 EN ETHANOL :</u>	
<u>LA FRACTION D</u>	
A - <u>L'OSIDE D 1</u>	138
B - <u>L'OSIDE D 2</u>	138
C - <u>L'OSIDE D 3</u>	143
D - <u>L'OSIDE D 4</u>	143
E - <u>L'OSIDE D 5</u>	143
F - <u>L'OSIDE D 7</u>	143
G - <u>L'OSIDE D 8</u>	145
H - <u>CONCLUSION</u>	145
VI - <u>LA FRACTION à 10 p. 100 EN ETHANOL :</u>	
<u>LA FRACTION E</u>	
A - <u>L'OSIDE E 1</u>	146
B - <u>L'OSIDE E 2</u>	146
C - <u>L'OSIDE E 3</u>	146
D - <u>L'OSIDE E 4</u>	146
E - <u>L'OSIDE E 5</u>	152
F - <u>L'OSIDE E 8</u>	152
G - <u>L'OSIDE E 10</u>	152
H - <u>CONCLUSION</u>	153

	Pages
VII - <u>LA FRACTION à 15 p. 100 EN ETHANOL :</u> <u>LA FRACTION F</u>	153
A - <u>L'OSIDE F 1</u>	153
B - <u>L'OSIDE F 2</u>	156
C - <u>L'OSIDE F 3</u>	156
D - <u>L'OSIDE F 4</u>	156
E - <u>L'OSIDE F 5</u>	159
F - <u>L'OSIDE F 6</u>	159
G - <u>L'OSIDE F 7</u>	159
H - <u>L'OSIDE F 8</u>	159
I - <u>L'OSIDE F 9</u>	161
J - <u>CONCLUSION</u>	161
VIII - <u>LA FRACTION à 25 p. 100 EN ETHANOL :</u> <u>LA FRACTION G</u>	161
A - <u>L'OSIDE G 1</u>	165
B - <u>L'OSIDE G 2</u>	165
C - <u>L'OSIDE G 3</u>	165
D - <u>L'OSIDE G 4</u>	165
E - <u>L'OSIDE G 5</u>	168
F - <u>CONCLUSION</u>	168
IX - <u>LA FRACTION à 50 p. 100 EN ETHANOL :</u> <u>LA FRACTION H</u>	168
A - <u>L'OSIDE H 1</u>	168
B - <u>L'OSIDE H 2</u>	171
C - <u>CONCLUSION</u>	171

	Pages
X - <u>LA FRACTION à 90 p. 100 EN METHANOL :</u> <u>LA FRACTION I</u>	171
A - <u>L'OSIDE I 2</u>	171
B - <u>L'OSIDE I 4</u>	171
C - <u>L'OSIDE I 7</u>	171
D - <u>L'OSIDE I 10</u>	174
E - <u>CONCLUSION</u>	174
3° CONCLUSION ET DISCUSSION	175
<u>ORIGINE DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES</u>	175
1 - <u>ORIGINE ALIMENTAIRE</u>	177
2 - <u>ORIGINE GLYCOPROTIDIQUE</u>	177
3 - <u>ORIGINE GLYCOLIPIDIQUE</u>	177
4 - <u>AUTRES ORIGINES</u>	179
APPLICATIONS A L'ETUDE COMPAREE DES URINES NORMALES ET PATHOLOGIQUES	180
1° DESCRIPTION D'UN NOUVEAU TYPE DE MELITURIE : LA SIALURIE	180
I - <u>OBSERVATION</u>	180
1 - <u>OBSERVATION CLINIQUE</u>	181
2 - <u>OBSERVATION BIOCHIMIQUE</u>	181
3 - <u>OBSERVATION ANATOMIQUE</u>	181
II - <u>MISE EN EVIDENCE D'UNE SIALURIE</u>	182
A - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	182

	Pages
B - <u>RESULTATS</u>	183
C - <u>CONCLUSIONS</u>	183
III - <u>ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE L'ACIDE</u> <u>N-ACETYNEURAMINIQUE</u>	183
A - <u>ISOLEMENT ET CRISTALLISATION DE L'ACIDE SIALIQUE URINAIRE</u>	183
B - <u>ETUDE DES PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE L'ACIDE SIALIQUE</u> <u>URINAIRE</u>	187
1 - <u>POUVOIR ROTATOIRE</u>	187
2 - <u>POINT DE FUSION</u>	187
3 - <u>COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE</u>	187
4 - <u>SPECTRE INFRA-ROUGE</u>	187
5 - <u>ANALYSE ELEMENTAIRE</u>	187
6 - <u>REACTIONS COLOREES</u>	189
C - <u>ETUDE DE LA STRUCTURE DE L'ACIDE SIALIQUE URINAIRE</u>	189
1 - <u>OXYDATION PERIODIQUE</u>	189
2 - <u>ACTION DE LA N-ACETYLNEURAMINATE LYASE</u>	189
3 - <u>RECHERCHE DE L'ACIDE GLYCOLIQUE CONJUGUE</u>	191
4 - <u>CONCLUSIONS</u>	193
IV - <u>DETERMINATION DU COEFFICIENT D'EPURATION</u> <u>PLASMATIQUE, OU "CLEARANCE"</u>	193
A - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	193
1 - <u>INJECTION DE L'ACIDE SIALIQUE</u>	193
2 - <u>DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE URINAIRE ET PLASMATIQUE</u>	193
B - <u>RESULTATS</u>	194
1 - <u>MESURE DE LA "CLEARANCE" DE L'ACIDE SIALIQUE CHEZ LE JEUNE</u> <u>ERIC LES. (SIALURIE)</u>	194
2 - <u>MESURE DE LA "CLEARANCE" DE L'ACIDE SIALIQUE CHEZ UN JEUNE ENFANT</u> <u>DE TROIS ANS</u>	194
C - <u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	197

	Pages
V - <u>MISE EN EVIDENCE D'UNE N-ACETYL-GLUCOSAMINURIE</u> <u>ET D'UNE N-ACETYLMANNOSAMINURIE</u>	197
A - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	199
1 - <u>METHODES COLORIMETRIQUES DE DOSAGE</u>	199
2 - <u>METHODES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES</u>	199
B - <u>RESULTATS</u>	199
C - <u>CONCLUSION</u>	199
VI - <u>CONCLUSIONS ET DISCUSSION</u>	201
2° DESCRIPTION D'UNE OLIGOSACCHARIDOSURIE ACCOMPAGNANT UN NOUVEAU TYPE DE GANGLIO- SIDOSE A GM 2	201
I - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	203
II - <u>RESULTATS</u>	203
A - <u>DOSAGE DES GLUCIDES</u>	203
1 - <u>GLUCIDES CONJUGUES</u>	203
2 - <u>GLUCIDES LIBRES</u>	203
B - <u>IDENTIFICATION DES OLIGOSACCHARIDES</u>	205
1 - <u>URINES DE MALADIE DE TAY-SACHS</u>	205
2 - <u>URINES DU JEUNE FRANCK B.</u>	205
III - <u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	207
3° DESCRIPTION D'UN PROCEDE DE ROUTINE PERMETTANT L'EXPLORATION RAPIDE DE LA COMPOSITION EN OSIDES DES URINES - PREMIERES APPLICATIONS	207
I - <u>DESCRIPTION D'UN PROCEDE DE ROUTINE D'ETUDE</u> <u>DES GLUCIDES LIBRES URINAIRES</u>	207

	Pages
II - <u>PREMIERES APPLICATIONS</u>	208
III - <u>CONCLUSIONS ET DISCUSSION</u>	210
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONCLUSIONS GENERALES</div>	211
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	215

INTRODUCTION

L'existence d'une glucidurie discrète dans toutes les urines normales était connue depuis plus de cinquante ans, lorsque MONTREUIL et BOULANGER (1) entreprirent de caractériser et d'identifier les constituants glucidiques responsables du léger pouvoir cupri-réducteur des urines physiologiques. Parallèlement, leurs travaux portèrent sur les glucides conjugués de l'urine, et ils précisèrent bientôt la composition de ces oses liés, avant d'entreprendre des tentatives de fractionnement de ces glycoprotides. Ils s'efforcèrent en particulier de doser ces constituants glycoprotidiques urinaires par un procédé précis et reproductible, problème qui était loin d'être résolu si l'on considère l'extrême dispersion des résultats fournis jusqu'à présent par différents auteurs. Le but essentiel de ces travaux était de comparer les urines normales humaines avec des urines pathologiques, et plus particulièrement avec des urines de cancéreux, de manière à mettre en évidence des différences quantitatives et qualitatives dans la composition des urines.

SPIK et MONTREUIL (2) montrèrent ultérieurement que de nombreuses causes d'erreur intervenaient dans le dosage des hexoses et des acides uroniques par les réactifs classiques à l'orcinol sulfurique et au carbazol sulfurique et proposèrent bientôt des solutions à ce problème.

C'est donc sur des bases nouvelles et à partir de résultats acquis durant plus de dix années qu'une équipe de chercheurs (LOIEZ-HENNETTE, MALLEVAIS-GOUBET, MONTREUIL, SPIK, STRECKER et VAILLANT-DELCROIX) (3) s'efforce aujourd'hui de résoudre le problème posé par l'extrême complexité des urines.

Notre travail personnel a plus particulièrement porté sur l'étude des glucides libres, -mono et oligosaccharides-, des urines normales. Le but que nous avons poursuivi fut de dresser la liste, la plus complète possible des constituants glucidiques des urines.

Dans une première série de recherches, nous avons isolé et identifié un grand nombre de glucides présents dans les urines normales, dont la plupart n'avaient pas encore été décrits.

Dans une seconde série de travaux, nous avons mis au point des méthodes précises et des procédés de routine qui permettent d'explorer rapidement et d'une manière très précise, la composition en glucides des urines.

Dans une dernière série de recherches, nous avons commencé à appliquer nos techniques à l'analyse d'urines pathologiques, d'urines cancéreuses, en particulier. Les résultats que nous avons obtenus à propos de ces dernières sont encore trop fragmentaires pour être interprétables. Toutefois, l'efficacité de ces procédés a été démontrée par la découverte et la description du premier cas de sialurie.

Nous ferons précéder l'exposé de nos travaux par une courte revue générale consacrée aux problèmes que posent les glucides des urines.

Les résultats que nous avons obtenus ont fait l'objet des mémoires suivants :

- 1 - G. STRECKER, B. GOUBET et J. MONTREUIL : Les cétooses de l'urine humaine. Identification du D(+)allulose. C.R. Acad. Sciences, 1965, 260, 999
- 2 - J. MONTREUIL, G. BISERTE, G. STRECKER, G. SPIK, G. FONTAINE et JP. FARRIAUX : Description d'un nouveau type de méliturie : la sialurie. C.R. Acad. Sciences, 1967, 265 D, 97
- 3 - J. MONTREUIL, G. BISERTE, G. STRECKER, G. SPIK, G. FONTAINE et JP. FARRIAUX : Description d'un nouveau type de méliturie : la sialurie. Clin. Chim. Acta, 1968, 21, 61
- 4 - G. STRECKER et J. MONTREUIL : Procédés d'isolement et d'identification des cétooses. Applications à l'urine humaine. Chromatographie Symposium II, Bruxelles, Société Belge des Sciences pharmaceutiques, éd., 1968, 340
- 5 - G. STRECKER et J. MONTREUIL : Les glucides libres des urines humaines. Z. Physiol. Chem., 1969, 350, 14

GENERALITES

Les glucides de l'urine

Les glucides existent, dans les urines, sous des formes libres ou conjuguées. Nous ferons donc successivement le point sur chacune de ces deux questions, en nous limitant aux urines humaines.

1° LES GLUCIDES LIBRES DE L'URINE

Lés travaux anciens concernant les glucides de l'urine ont porté principalement sur les urines pathologiques, parce que les techniques de l'époque ne permettaient pas d'isoler ces composés, dans les urines, à de très faibles concentrations. Ce n'est qu'en 1953 que MONTREUIL et BOULANGER (4) devaient, pour la première fois, effectuer de telles recherches, dans le but de mieux définir ce milieu biologique extrêmement complexe.

I - MECANISME DE L'ELIMINATION RENALE

La présence de glucides dans l'urine est sous la dépendance des mécanismes rénaux de filtration glomérulaire, de réabsorption et de sécrétion tubulaire. Les substances plasmatiques utiles à l'organisme (eau, glucose, sels minéraux) sont réabsorbées dans le sang en parcourant le tube urinaire, tandis que les substances de déchet ou étrangères à l'organisme se concentrent dans l'urine. La réabsorption tubulaire du glucose est due à l'action de deux enzymes, une phosphophérase et une phosphatase alcaline. Si d'autres sucres échappent à la barrière hépatique, ils ne seront pas réabsorbés par les tubules auxquels font défaut les enzymes correspondant. Ces phénomènes de réabsorption tubulaire expliquent l'existence de substances à seuil, comme le glucose qui ne passe dans l'urine que lorsque le taux plasmatique dépasse 1,7 g p. 1000 ml (Fig. 1 ; p. 5).

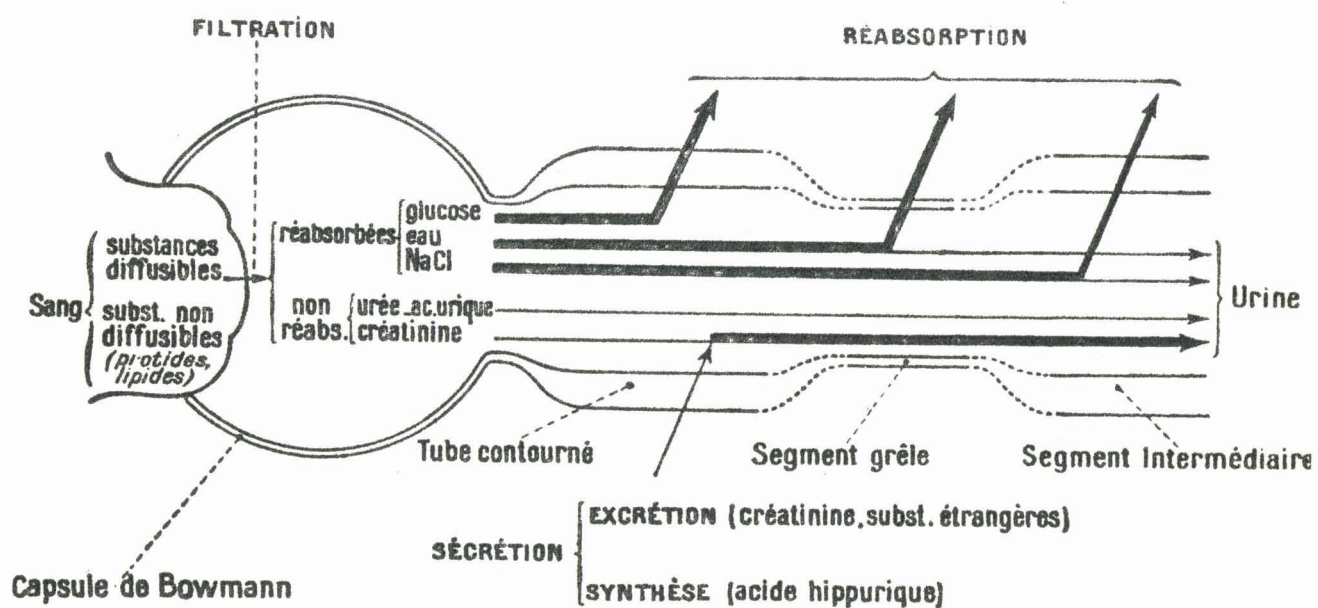


Figure 1

Mécanisme de la formation de l'urine (filtration glomérulaire, réabsorption et sécrétion tubulaires).



LA "CLEARANCE"

La "Clearance" ou coefficient d'épuration plasmatique d'un constituant urinaire mesure, en millilitres, le volume de plasma sanguin que les reins sont capables, en une minute, de débarrasser de ce constituant.

Si :

C = clearance (débit plasmatique en ml par mn)

U = concentration de la substance dans l'urine (en mg par ml)

V = débit urinaire (en ml par mn)

P = concentration de la substance dans le plasma (en mg par ml)

on a $C = \frac{UV}{P}$ formule qui doit être corrigée chez l'enfant par la détermination de la surface corporelle : S

$$C = \frac{UV}{P} \frac{1,73}{S}$$

Si une substance qui passe dans le tube urinaire par le glomérule n'est ni réabsorbée ni sécrétée par les parois du tube, son coefficient d'épuration doit être égal au débit glomérulaire. C'est le cas de l'inuline, qui est utilisé comme composé de référence, dont la "clearance" est de 120 chez l'homme sain. Lorsque la "clearance" d'un composé sera inférieure à 120, on pourra conclure que ce composé est réabsorbé en partie et une clearance supérieure à 120 indiquera que la substance est sécrétée par les tubes urinaires (*).

II - LES GLUCIDES DES URINES PATHOLOGIQUES

Un grand nombre d'affections pathologiques et génotypiques, ou de simples phénomènes d'intolérance alimentaire sont responsables de nombreuses gluciduries, dont la caractérisation reste aisée même en utilisant

(*) Pour les détails techniques de détermination d'une "Clearance", voir p. 193

d'anciens procédés classiques comme le pouvoir cupri-réducteur, la rotation optique, la formation d'osazones, la fermentation par la levure ou les réactions colorimétriques spécifiques de chaque classe de glucides.

Les méthodes chromatographiques et électrophorétiques mises en oeuvre depuis plus de vingt ans apportent souvent des solutions définitives dans les cas de gluciduries qui restaient difficiles à caractériser avec les méthodes conventionnelles. Des méthodes plus récentes de chromatographie sur couche mince proposées par PETEK et EBERHARD (5) et LATO et al. (6) ou de chromatographie en phase gazeuse, décrite par BHATTI et CLAMP (7) ont en outre le mérite d'être rapides et sont appelées à rendre de grands services dans les laboratoires d'analyses cliniques.

A - LES GLUCOSURIES (*)

Les glucosuries sont le plus souvent la conséquence d'une hyperglycémie, c'est-à-dire d'une élévation du taux du glucose sanguin. Elles peuvent être également le signe d'une anomalie de la réabsorption tubulaire du glucose.

1 - LE DIABETE PANCREATIQUE

Lorsque la sécrétion d'insuline est insuffisante pour assurer une pénétration cellulaire normale du glucose, l'organisme développe et maintient une hyperglycémie qui assure la pénétration du glucose dans les cellules par effet de masse. Quand cette hyperglycémie dépasse le "seuil", le tubule rénal n'est plus capable de réabsorber tout le glucose filtré, et la glucosurie apparaît.

2 - AUTRES GLUCOSURIES

Elles résultent de l'hypersécrétion d'un facteur hyperglycémiant. On les observe dans les cas d'hyperfonctionnement cortico-surrénal (syndrome de CUSHING, ou syndrome d'hypercorticisme métabolique), thyroïdien (maladie de BASEDOW) et hypophysaire (acromégalie).

(*) Revues générales : POLONOVSKI (8), BENARD et RAMBERT (9).

3 - LA GLUCOSURIE ALIMENTAIRE

La glucosurie alimentaire peut traduire dans certains cas un état pré-diabétique, qui sera alors mis en évidence par l'épreuve d'hyperglycémie provoquée.

4 - LE DIABETE RENAL

Le diabète rénal est caractérisé par une glucosurie sans hyperglycémie. Sa découverte ne peut être que fortuite, car la fuite urinaire du glucose est en général trop discrète pour que l'hypoglycémie se manifeste cliniquement.

Le diabète rénal correspond à une affection génotypique, et son origine est due à un abaissement du seuil rénal du glucose. On distingue néanmoins deux diabètes rénaux : diabète du type A où le seuil d'apparition de la glucosurie et la réabsorption tubulaire maximum du glucose sont tout deux abaissés, et diabète du type B, où seul le seuil d'apparition de la glucosurie est abaissé. Le diabète rénal du type A est dû à une anomalie enzymatique du système assurant la phosphorylation du glucose, tandis que l'on attribue celui du type B à une dispersion anormale de l'activité glomérulo-tubulaire, qui dépasse alors les limites physiologiques permises.

B - LES GALACTOSURIES (*)

La galactosurie est une maladie assez peu fréquente, liée à l'absence plus ou moins complète d'une enzyme habituellement présente dans le foie et les hématies, et se caractérise par l'accumulation de galactose-1-phosphate dans les cellules de l'organisme et par l'élimination urinaire de galactose. On distingue classiquement deux formes de galactosurie :

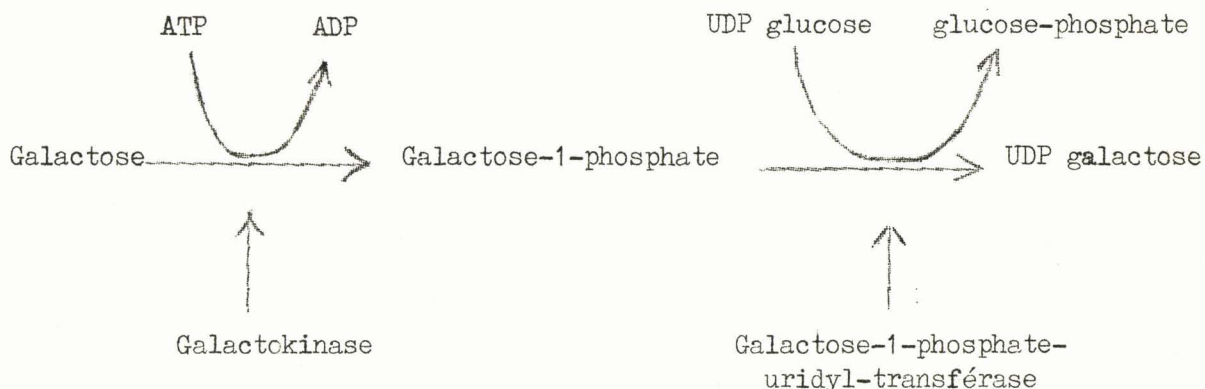
(*) Revues générales : ALAGILLE D. (10), HSIA (11), WOOLF (12).

1 - LA GALACTOSURIE PAR INSUFFISANCE HEPATIQUE.

Dans ce cas, une altération cellulaire hépatique globale (hépatite aïgue ou chronique) s'accompagne d'une difficulté de métabolisme du galactose. La rétention du galactose-1-phosphate ne s'observe alors que dans les cellules hépatiques, exclusivement.

2 - LA GALACTOSEMIE CONGENITALE DU NOURRISSON.

Cette maladie est liée à un déficit en galactose-1-phosphate-uridyl-transférase et se transmet comme un gène autosomique récessif. Toutes les cellules de l'organisme accumulent du galactose-1-phosphate, et plus particulièrement, les hématies. Le schéma ci-dessous explique le mécanisme de cette accumulation :



Le galactose se comporte alors comme une substance toxique et entraîne une maladie grave, identifiable grâce à la mise en évidence d'une galactosurie et d'une galactosémie élevée, et au dosage dans le sang de l'activité de la galactose-1-phosphate-uridyl-transférase (test de KALCKAR) (13).

C - LES FRUCTOSURIES (*)

Les fructosuries ont pu être individualisées sous les cinq formes suivantes :

1 - LA FRUCTOSURIE PHYSIOLOGIQUE DU NOUVEAU-NÉ, qui n'est observée que durant les premiers jours de la vie, avec une forme plus marquée chez les prématurés. Le fructose provient alors du placenta, qui semble avoir vis à vis du fructose un comportement particulier.

2 - LA FRUCTOSURIE PHYSIOLOGIQUE ALIMENTAIRE, qui s'observe après ingestion importante de fruits chez des sujets atteints d'insuffisance hépatique. Cette fructosurie, bénigne elle aussi, existerait chez 10 p. 100 des sujets normaux, après ingestion de 100 g de fructose.

3 - LA FRUCTOSURIE HEPATIQUE, qui se rencontre spontanément dans les insuffisances hépatiques sévères, ictères graves, cirrhoses décompensées, etc....

4 - LA FRUCTOSURIE BENIGNE HEREDITAIRE, ou fructosurie essentielle, qui est une anomalie génotypique sans manifestation clinique. Cette maladie métabolique extrêmement rare serait transmise par un gène totalement récessif, puisque les sujets hétérozygotes ne présentent aucune anomalie du métabolisme du fructose. On suppose que le trouble provient d'un dysfonctionnement de la fructokinase.

5 - L'INTOLERANCE HEREDITAIRE AU FRUCTOSE, qui se traduit par contre par des troubles cliniques assez marqués consécutifs à l'ingestion de fruits ou de fructose, accompagnés d'une fructosémie et d'une hypoglycémie, et qui serait due à l'absence d'une enzyme hépatique nécessaire à la dégradation du fructose-1-phosphate ou trioses.

D - LES LACTOSURIES (**)

Les lactosuries s'observent également dans des circonstances très variées. La plupart sont physiologiques.

(*) Revues générales : SIDBURY (14), HSIA (15)

(**) Revue générale : HSIA (16)

1 - LA LACTOSURIE DE LA FEMME ENCEINTE

Elle s'observe chez 99 p. 100 des parturientes quatre jours après l'accouchement. On ignore par quel mécanisme le lactose passe des glandes mammaires dans la circulation.

2 - LES LACTOSURIES PAR MALADIES INTESTINALES AIGUES

Elles se rencontrent essentiellement dans les gastroentérites aiguës et s'expliquent par une diminution de la sécrétion de la lactase intestinale du fait de l'inflammation de la muqueuse. Le lactose, inutilisable par l'organisme est alors éliminé par les reins.

3 - LA LACTOSURIE PRIMITIVE OU CONGENITALE

Il s'agit ici d'une affection génotypique rare, affectant le Nourrisson. Elle se caractérise par l'absence de sécrétion de la lactase par la muqueuse intestinale et une accumulation du lactose non hydrolysé dans l'intestin. La lactosurie est alors importante et ne cède qu'à la suppression du lactose de l'alimentation.

E - LES SACCHAROSURIES (*)

Les saccharosuries s'observent chez des sujets normaux, après l'absorption de quantités massives de sucre, et chez des malades qui présentent un trouble de l'absorption intestinale. Le saccharose non hydrolysé franchit alors la muqueuse. La saccharosurie congénitale peut provenir également de formation endogène de saccharose par trouble enzymatique, au niveau du rein, fort probablement. La saccharosurie peut parfois s'accompagner d'encéphalopathie qui demeure longtemps réversible si le saccharose est supprimé de l'alimentation.

F - LA MALTOSURIE

La maltosurie est observée parfois chez les grands buveurs de bière.

(*) Revues générales : ROSENFELD et al. (17), KAPLAN et al. (18)

G - LES PENTOSURIES (*)

1 - LES PENTOSURIES ALIMENTAIRES

Les pentosuries alimentaires peuvent s'observer à la suite d'ingestion excessive de certains fruits (cerises, pommes, prunes). Le sucre urinaire est alors le D-L-arabinose (mélange racémique).

2 - LES PENTOSURIES ACCOMPAGNANT LES MYOPATHIES

L'excrétion de D-ribose accompagne certaines myopathies et serait la conséquence d'un catabolisme plus rapide des nucléotides dans les muscles en voie de dégénérescence.

3 - LA PENTOSURIE ESSENTIELLE

L'excrétion anormale de L-xylulose dans les urines qui a fait l'objet d'observations répétées chez des sujets sains, presque toujours d'origine israélite ou sémite, est transmise génétiquement selon le mode récessif.

La nature de L-xylulose fut reconnue en 1914, après de nombreuses confusions avec l'arabinose ou le xylose. Cette pentosurie est provoquée par une déviation du catabolisme de l'acide glycuronique (Fig. 2 ; p. 13) et ne s'accompagne d'aucun trouble clinique.

H - LES HEPTULOSURIES

Le manno-heptulose se rencontre parfois dans l'urine normale en petites quantités et disparaît si l'on supprime les végétaux de l'alimentation. Il est très abondant dans les urines des consommateurs de fruits d'Avocatier, au point de donner une réaction positive avec la liqueur de Fehling (RELYVELD) (19).

(*) Revue générale : TOUSTER (20).

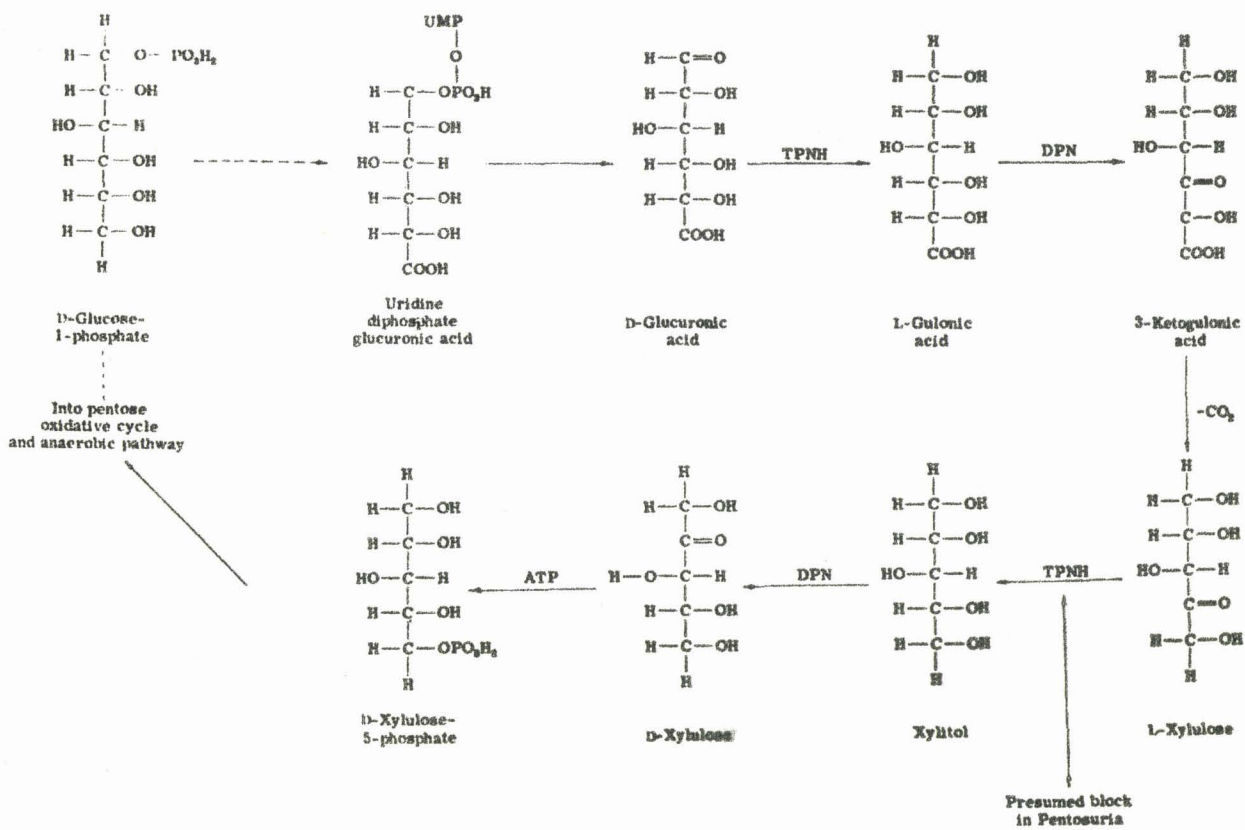


Figure 2

Métabolisme de l'acide glucuronique.

III - LES GLUCIDES DES URINES NORMALES

L'étude des glucides des urines normales posait un grand nombre de problèmes pratiquement insurmontables jusqu'à l'avènement de la chromatographie sur papier. Toutefois, au moment où nous avons entrepris nos recherches, le nombre de travaux qui avaient été réalisés était encore très restreint et les mémoires relatifs aux glucides libres de l'urine se limitaient à ceux de MONTREUIL et BOULANGER en 1953 (21), de MONTREUIL en 1955 (22) et de WHITE et HESS en 1956 (23).

A - LES MONOSACCHARIDES URINAIRES

La glucidurie discrète observée chez tous les sujets sains se situe autour de 0,2 et 0,5 g par litre, déterminée par réductimétrie et exprimée en glucose. MONTREUIL et BOULANGER (24) appliquèrent les premiers à l'urine la méthode générale de fractionnement et de purification par les échangeurs d'ions, qui permet de déminéraliser l'urine, et de procéder simultanément à un fractionnement en dérivés "acides", "basiques" et "neutres". Les auteurs mettaient ainsi en évidence de façon constante dans les dialysats d'urine les glucides suivants : glucose, fructose, arabinose, xylose (30 à 50 mg par litre) ; fucose, mannose, saccharose (3 à 15 mg par litre) ; rhamnose, galactose, à l'état de traces. Ils relevaient également la présence d'un dérivé cétosique inconnu, possédant le comportement chromatographique des pentoses (Fig. 3 ; p. 15).

La fraction acide retenue par l'échangeur d'anions, éluee par l'acide formique, renfermait des conjugués uroniques et des esters phosphoriques des oses. La fraction basique éluee de l'échangeur de cations était dépourvue de sucres aminés libres.

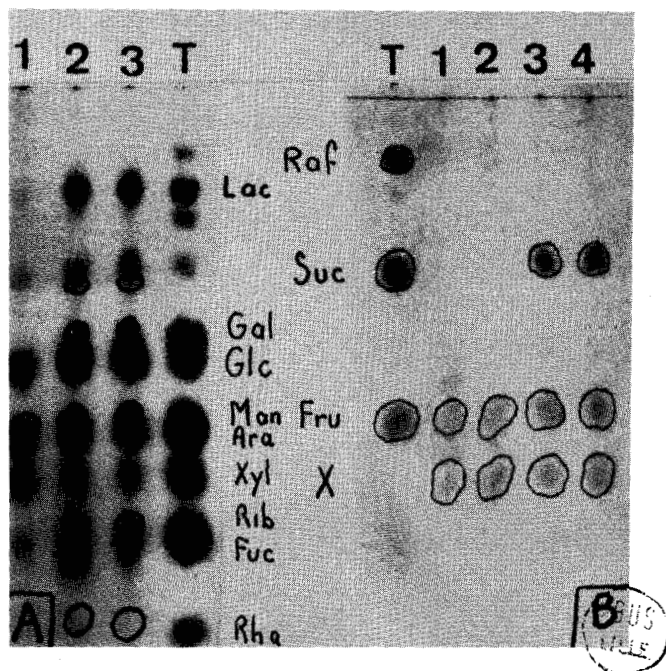


Figure 3

Glucides urinaires mis en évidence par MONTREUIL (25). A : révélation à l'oxalate d'aniline ; B : révélation à l'urée-chlorhydrique.

En utilisant une méthode analogue, WHITE et HESS (26) devaient un peu plus tard mettre en évidence les mêmes oses, et en outre montrer qu'il existait également dans l'urine de faibles quantités de manno-heptulose, de sédoheptulose, de xylulose et de ribulose.

Le réactif au citrate d'aniline révélait d'autre part, dans la zone des tétroses, une substance fournissant une coloration jaune-orangé caractéristique et qui, selon les auteurs, correspondait à l'érythrose. Le réactif à l'orcinol trichloracétique réagissait en outre avec deux substances inconnues, l'une fournissant la coloration jaune des cétohexoses, la seconde, la coloration rose des cétopentoses, mais le composé migrait dans la zone des hexoses (Fig. 4 ; p. 17).

La présence des deux cétopentoses signalée par WHITE et HESS fut confirmée ultérieurement par FUTTERMAN et ROE (27), qui s'intéressaient plus particulièrement au problème des pentuloses et qui isolèrent de l'urine normale le L-xylulose et le ribulose, en associant la chromatographie sur colonne de cellulose et la chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Les auteurs estiment que les urines renferment environ 1 mg de ribulose et 2 à 4 mg de xylulose par litre.

FLEURY, MALANGEAU et EBERHARD (28) ont étudié les urines de prématurés par chromatographie circulaire sur papier, et décelé, de manière constante, le lactose (92 p. 100 des cas), le glucose (très fréquent), le galactose (assez fréquent), le saccharose et le fructose. En outre, les auteurs signalaient la présence de trois sucres inconnus dont l'un serait le xylulose.

FLEURY et EBERHARD (29) ont étudié le pouvoir réducteur limite de l'urine désionisée et ont trouvé une valeur de 0,8 g/l, exprimée en glucose. La chromatographie sur papier effectuée sur 58 urines a mis en évidence avec des fréquences variables, divers glucides dont la liste est précisée dans le Tableau I (p. 18).

DATE (30) a dosé quelques glucides de différentes urines normales, à l'aide d'une méthode de dosage chromatographique (DATE) (31) et a obtenu les valeurs suivantes : lactose : 15 à 40 mg/24 h ; galactose : 3 à 25 mg par 24 h ; glucose : 57 à 130 mg/24 h ; arabinose : 12 à 56 mg/24 h ; xylose : 14 à 78 mg/24 h.

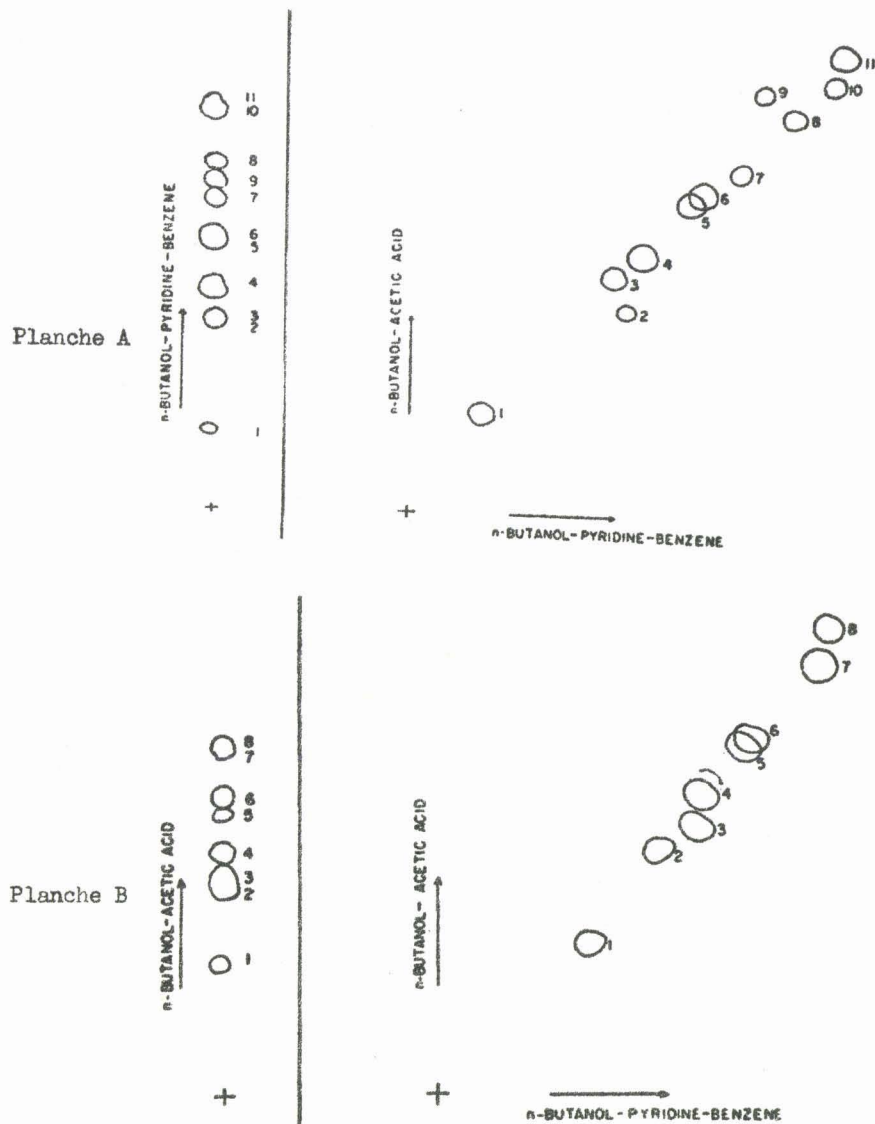


Figure 4

Glucides urinaires identifiés par WHITE et HESS (32). Révélations :
planche A : citrate d'aniline ; 1 : lactose ; 2 : mannose ; 3 : galactose ; 4 : glucose ; 5 : fructose ; 6 : arabinose ; 7 : xylose ; 8 : fucose ; 9 : ribose ; 10 : glucuronolactone ; 11 : inconnu ;
planche B : orcinol trichloracétique ; 1 : saccharose ; 2 : mannoheptulose ; 3 : sédcheptulose ; 4 : fructose ; 5 : inconnu ; 6 : inconnu ; 7 : xylulose ; 8 : ribulose.

BIB
GILE

T a b l e a u I

Glucides identifiés dans l'urine de 58 sujets (FLEURY et EBERHARD) (33).

Nature du sucre	Nombre de fois	Pourcentage
Glucose	55	95
Lactose	25	43
Saccharose	46	79
Fucose	43	74
Fructose	15	26
Xylose	12	21
Maltose	10	17
Arabinose	2	3,4
Galactose	1	1,7



Les hexamines libres de l'urine ont rarement été mises en évidence et PECHAN (34) indique que le taux de N-acétyl-glucosamine libre urinaire varie autour de 1 à 2 mg par litre.

B - LES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

L'étude des oligosaccharides urinaires posait des problèmes plus complexes encore. Depuis longtemps, les auteurs ont insisté sur l'extrême complexité de la composition en polysaccharides de faible poids moléculaire des dialysats urinaires, et ce n'est que durant ces cinq dernières années que quelques entités bien définies du point de vue physico-chimique ont pu être isolées et étudiées.

HAMERMAN et HATCH (35), en 1955, avaient montré que 65 p. 100 des osamines conjuguées totales étaient dialysables. BOAS (36) confirme cette observation et isole trois fractions hétérogènes sur une colonne de cellulose, sans cependant isoler d'entité bien définie. MIETTINEN (37) confirme cette hétérogénéité et fractionne le matériel urinaire sur gel de Séphadex en trois fractions distinctes (A, B et C), chacune d'entre elles renfermant des hexoses, des osamines et de l'acide sialique. Seules les fractions B et C sont dialysables. Par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions ou sur charbon activé, MIETTINEN et HUTTUNEN (38) et HUTTUNEN (39) obtiennent plusieurs sous-fractions de la fraction B et plusieurs d'entre elles renferment de l'acide sialique.

PECHAN (40) s'est efforcé d'isoler les oligosaccharides renfermant des osamines, par chromatographie préparative sur charbon-Célite, mais encore une fois, il n'a pas pu poursuivre l'isolement de ces composés obtenus en mélanges trop hétérogènes. L'auteur pense cependant que certains osides urinaires possèdent une composition identique à ceux du lait de Femme. En 1958, MONTREUIL (*), en utilisant exclusivement la chromatographie sur papier, avait isolé une dizaine d'osides de dialysats urinaires, et avait précisé leur composition. (Tableau II ; p. 20) : galactose, mannose, fucose et osamine, dans des proportions variables. Ces premiers résultats lui avaient permis de soupçonner une double origine de ces osides : l'une alimentaire, l'autre liée au métabolisme des

(*) Communication personnelle.

T a b l e a u I I

Composition de quelques osides isolés des urines de sujets sains
(MONTREUIL) (*)

- 1 galactose, fucose (1 : 1)
- 2 galactose, mannose (1 : 1)
- 3 galactose, fucose (2 : 1)
- 4 galactose, fucose, acétylosamine (2 : 1 : 1)
- 5 galactose, mannose, fucose, acétylosamine (1 : 1 : 1 : 1)
- 6 galactose, fucose (2 : 2)
- 7 galactose, mannose, fucose (2 : 1 : 1)
- 8 galactose, mannose, fucose, acétylosamine (2 : 1 : 1 : 1)
- 9 galactose, mannose, fucose, acétylosamine (1 : 1 : 2 : 1)
- 10 galactose, mannose, fucose, acétylosamine (2 : 1 : 3 : 1)

(*) Communication personnelle

glycoprotéines, et de montrer l'intérêt que présentait l'étude de la structure de tels osides dont l'origine pouvait se rechercher dans le sang et dans différents tissus.

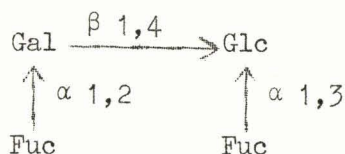
LUNDBLAD (41) a étudié les oligosaccharides urinaires en fonction de la nature du groupe sanguin des individus, et a isolé d'urines de sujets de groupes sanguins A₁ et B de type "sécréteurs", deux pentasaccharides dont il a précisé la composition :

1 : fucose, glucose, galactose (2 : 1 : 2)

2 : fucose, glucose, galactose, N-acétylgalactosamine (2 : 1 : 1 : 1)

Dans les deux cas, le glucose était en position terminale.

Plus récemment, LUNDBLAD (42) a mis en évidence dans les urines de sujets de groupe O(H) sécréteur un lactodifucotétraose qui possède toutes les propriétés du lactodifucotétraose isolé du lait de Femme par KUHN (43) et par MONTREUIL (44) :



HUTTUNEN (45) a montré la présence dans l'urine normale de 6, à 8 oligosaccharides renfermant de l'acide N-acétylneuraminique, et a isolé quatre d'entre eux, dont il a précisé la structure (Fig. 5 ; p. 22).

En étudiant plus particulièrement l'urine de Femmes enceintes, DATE (46) a mis en évidence six oligosaccharides (Figure 6 ; p. 22) dont il confirme l'identité parfaite avec les osides du lait isolés par KUHN (47) et par MONTREUIL (48).

BOURRILLON et GOUSSAULT (49), enfin, ont décrit récemment l'isolement et la composition chimique d'un fucohétéropolysaccharide, d'une masse moléculaire d'environ 4 000, et possédant une activité de groupe sanguin O(H) (Tableau III ; p. 23).

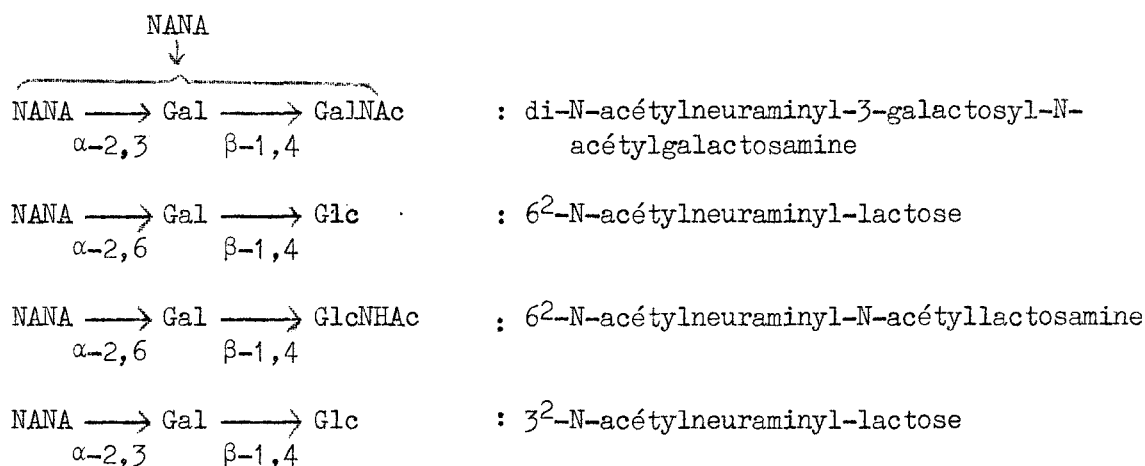


Figure 5

Structure des oligosaccharides urinaires identifiés par HUTTUNEN (48)

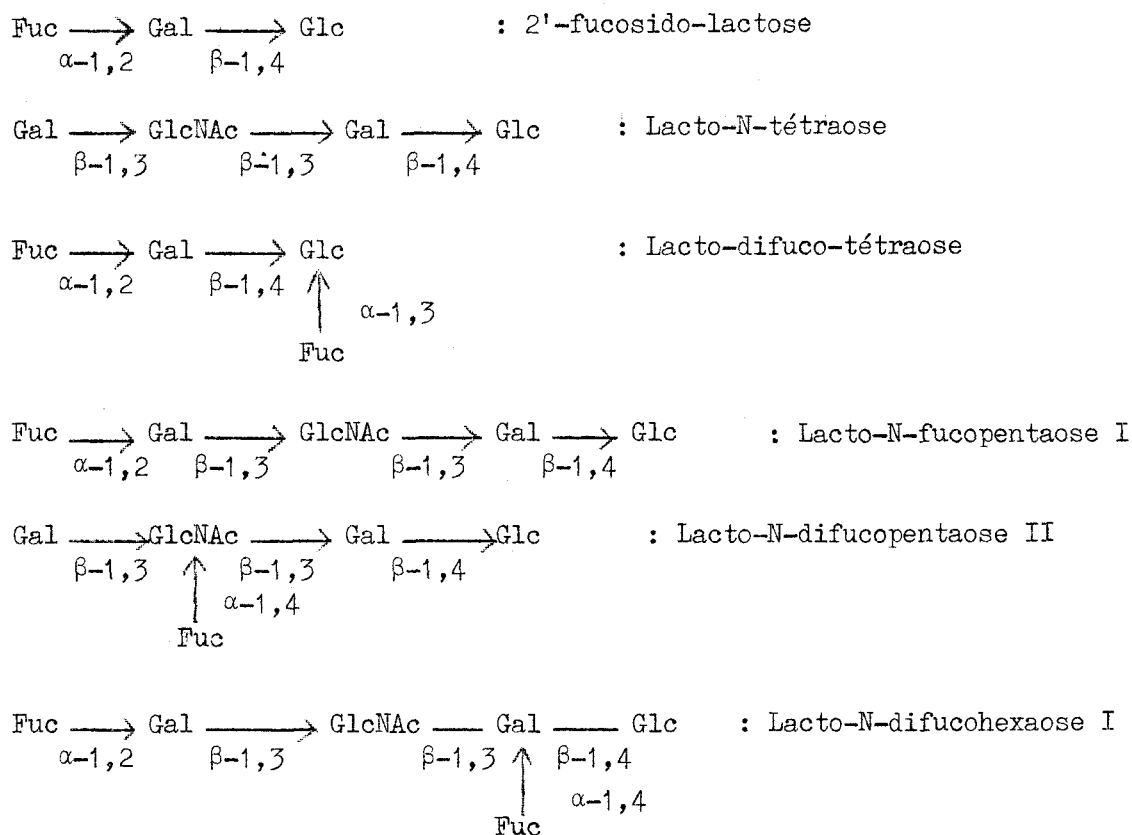


Figure 6

Structure des oligosaccharides du lait de Femme mis en évidence dans l'urine par DATE (49)

T a b l e a u I I I

Composition en glucides du fucohétéropolysaccharide isolé de l'urine humaine normale par BOURRILLON et GOUSSAULT (52).

Galactose.....	9
Mannose.....	2
Glucose.....	1
Fucose.....	5
N-acétylglucosamine.....	1
N-acétylgalactosamine.....	1
Acide sialique.....	< 0,05
Protéines.....	< 0,02
Masse moléculaire.....	environ 4 000

2° LES GLUCIDES CONJUGUES DE L'URINE

La présence dans l'urine de glucides conjugués à des protides est connue depuis les travaux de MÖRNER (53), en 1895, mais ce n'est que cinquante ans plus tard que la nature des oses liés fut précisée pour la première fois par MONTREUIL et BOULANGER (54) : le galactose, le mannose, le fucose, des osamines de l'acide glucuronique et des traces de glucose et de xylose. L'importance des glucides liés aux protéines dans l'urine fut reconnue également à la même époque par WALDRON (55) et HAMERMAN et al. (56) qui montrèrent que la fraction non dialysable de l'urine contenait 15 p. 100 d'hexoses, tandis que la fraction correspondante du sérum en possédait 2 p. 100. KING (57) établit que le poids moléculaire de ces substances est compris entre 1 000 et 100 000 (uromucoïde) et remarqua que la majeure partie de la fraction non dialysable était principalement constituée de composés très riches en sucres, notamment en fucose, par rapport aux constituants glycoprotidiques sériques. Des travaux d'ordre chimique, électrophorétique et immunologique ont permis par la suite à BERGGARD (58), BOURRILLON et al. (59), BOYCE et al. (60), BISERTE et al. (61), et HEREMANS et al. (62) de confirmer la nature glycoprotidique de la fraction non dialysable de l'urine et de caractériser un grand nombre de ces composés, sans permettre cependant de les isoler à l'état pur, à de rares exceptions près.

Le terme de glycopeptide est très général et ne présume pas de l'importance de la masse moléculaire de ces composés. Par ce même vocable sont ainsi définis les glyco-aminoacides, les glycopeptides et les glycoprotéines, de même que les mucopolysaccharides acides. Il est très difficile de fournir une classification homogène des glyco-aminoacides et des glycopeptides urinaires, car, d'une part, seules des études fragmentaires ont été effectuées à leur sujet, et d'autre part, la grande diversité de leur origine (urinaire, plasmatique ou tissulaire) demanderait en premier lieu une connaissance approfondie des glycoprotéides dont ils sont les produits de dégradation.

Deux revues générales récentes, de MALLEVAIS-GOUBET (63) et de VAILLANT-DELACROIX (64), font le point sur l'aspect qualitatif et quantitatif de cette question.

Actuellement, un très petit nombre de glycoprotéines et de glycopeptides ont été isolés à l'état pur. Ce sont surtout des travaux de nature électrophorétique et immunologique qui ont permis de mettre en évidence les protéines des urines normales.

I - LES GLYCOPROTEINES URINAIRES

A - LES PROTEINES SERIQUES

L'étude immunoélectrophorétique décrite en 1953 par GRABAR et WILLIAMS (65) s'est révélée une méthode de choix pour étudier les protéines urinaires et déterminer leur origine. Elles sont au nombre de 18 :

- 1 - la préalbumine de SCHULTZE (66), riche en tryptophanne (PATTE et al. (67) ; BERGGARD (68)).
- 2 - la sérumalbumine (GRANT) (69).
- 3 - l' α_1 -séromucoïde (PATTE et al.) (70).
- 4 - l' α_1 -lipoprotéide (BERGGARD) (71).
- 5 - l' α_1 -globuline (ou α_1 antitrypsine) (PATTE et al. (72))
- 6 - la céruléoplasmine : (BERGGARD (73) ; ROWE et al. (74)).
- 7 - l'haptoglobine (BERGGARD (75) ; PATTE et al. (76)).
- 8 - l' α_2 -macroglobuline (BERGGARD) (77).
- 9 - la α_2 -Ba-glycoprotéine (BERGGARD) (78).
- 10 - la α_2 -Zn-glycoprotéine (BERGGARD) (79).
- 11 - un composant de groupe spécifique (BERGGARD) (80).
- 12 - la transferrine (PATTE et al.) (81).
- 13 - la β_{1A} -globuline (BERGGARD) (82).
- 14 - (ou hémopexine la cytochromophile) (BERGGARD) (83).

- 15 - la β_{1E} -globuline (BERGGARD) (84).
- 16 - des γ_A -globulines (PATTE et al.) (85).
- 17 - le fibrinogène (BERGGARD) (86).
- 18 - des γ_G -globulines (GRANT) (87).

Il reste cependant à préciser si ces constituants caractérisés et dosés par des méthodes immunoélectrophorétiques sont réellement identiques aux glycoprotéines sériques correspondantes. BERGGARD (88), à ce sujet a, en effet, montré que les fractions de protéines urinaires, séparées par électrophorèse préparative, contenaient des quantités plus importantes de glucides que les fractions correspondantes du sérum. Mais ces variations de la composition en glucides sont en réalité le fait d'interférences dues à des glycopeptides très riches en sucres et qui se superposent, en électrophorèse de zone, aux glycoprotéines sériques (BOURRILLON et coll.) (89).

B - HORMONES GONADOTROPES

Ces hormones de nature glycoprotidique existent en faibles quantités dans l'urine humaine. GOT et BOURRILLON (90) ont en particulier étudié la gonadotrophine post-ménauposale et ont conclu qu'elle était riche en acide sialique. Le taux de gonadotrophine chorionique atteint des valeurs élevées dans l'urine de la Femme enceinte (GURIN, BACHMAN et WILSON) (91).

C - SUBSTANCES DE GROUPES SANGUINS

Des substances spécifiques de groupes sanguins ont été isolées des urines (FREUDENBERG et EICHEL) (92) et leur activité, -en particulier celles des substances se rapportant aux groupes A et B-, a été mise en évidence par KING, FIELDEN et BOYCE (93) et par KING, FIELDEN, GOODMAN et BOYCE (94). Ce sont des glycoprotéides qui renferment jusque 80 p. 100 de glucides totaux et qui sont essentiellement constitués de galactose, de fucose, de N-acétyl-glucosamine et de N-acétyl-galactosamine.

D - GLYCOSAMINO-GLUCURONO-GLYCANNES

L'urine renferme des mucopolysaccharides acides (ou glycosamino-glucurono-glycannes, selon la terminologie de BALAZS et JEANLOZ) (95), apparemment identiques à ceux qui ont été isolés, depuis une trentaine d'années, du tissu conjonctif. Il s'agit de polysaccharides constitués par une longue chaîne résultant de la "polymérisation" d'une unité disaccharidique composée d'une molécule d'osamine et d'une molécule d'acide uronique (remplacé par le galactose dans le cas de l'acide kérato-sulfurique) (Fig. 7 ; p. 28). A l'état natif, ces mucopolysaccharides acides sont conjugués à des protéines par des liaisons O-glycosidiques de la sérine avec le xylose (RODEN) (96) et peut-être également de la thréonine, dans le cas de l'acide hyaluronique (RODEN) (97). Les mucopolysaccharides acides suivants (10 mg \pm 2 par 24 h) ont été, jusqu'à présent, isolés ou identifiés dans l'urine humaine normale par VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (98), par KAO et al. (99) et par BERENSON et DALFERES (100) :

Composés majeurs :

Acide chondroïtine sulfurique A	31 p. 100
Acide chondroïtine sulfurique C	34 p. 100
Acide chondroïtine	25 p. 100

Composés mineurs :

Acide chondroïtine B	8 p. 100
Acide hyaluronique	1 p. 100
Kératane sulfate	1 p. 100
Héparine sulfate et "urohéparine"	traces

Ancienne dénomination	Nouvelle dénomination	Composition
Acide hyaluronique	Acide hyaluronique	$\text{GlcUr} \xrightarrow{\beta, 1-3} \text{GlcNAc}$
Héparitine-monosulfate	Héparine monosulfate	$\text{GlcUr} \xrightarrow{\alpha, 1-4} \text{GlcNSO}_3\text{H}$
Héparine	Héparine	$\text{GlcUr}-2-\text{SO}_3\text{H} \xrightarrow{\alpha, 1-4} \text{GlcNSO}_3\text{H}, -6 \text{SO}_3\text{H}$
Kérato-sulfate	Kératane Sulfate	$\text{Gal} \xrightarrow{\beta, 1-4} \text{GlcNAc}-6-\text{SO}_3\text{H}$
Chondroïtine Sulfate A	Chondroïtine 4-Sulfate	$\text{GlcUr} \xrightarrow{\beta, 1-3} \text{GlcNAc}-4-\text{SO}_3\text{H}$
Chondroïtine Sulfate C	Chondroïtine 6-Sulfate	$\text{GlcUr} \xrightarrow{\beta, 1-3} \text{GlcNAc}-6-\text{SO}_3\text{H}$
Chondroïtine Sulfate B ou β -Héparine	Dermatane Sulfate	$\text{IdoUr} \xrightarrow{\beta, 1-3} \text{GlcNAc}-4-\text{SO}_3\text{H}$

BUS
LILLE

Figure 7

Composition des glycoaminoglycannes

E - LA GLYCOPROTEINE DE TAMM et HORSFALL OU UROMUCOÏDE

La plupart des tentatives d'isolement de glycoprotéides spécifiquement urinaires se sont jusqu'à présent soldées par des échecs partiels et la substance de DONAGGIO (101) ou encore le mucoïde d'ANDERSON et Mac LAGAN (102) sont des mélanges hétérogènes dans lesquels figurent en particulier un grand nombre de glycoprotéines plasmatiques. Seule, la mucoprotéine de TAMM et HORSFALL (103) semble posséder tous les caractères d'une substance spécifiquement urinaire et être bien définie du point de vue physico-chimique, bien que de nombreuses entités antigéniques aient été caractérisées par immunoelectrophorèse. Il s'agit d'une glycoprotéine insoluble, qui renferme 20,7 p. 100 de glucides totaux, pour une masse moléculaire de 28 000, calculée à partir de la composition en acides aminés et en glucides (Tableau IV ; p. 30). La masse moléculaire, mesurée par des méthodes physiques, varie considérablement en fonction de sa structure physique : la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL se présente sous deux formes prédominantes, l'une étant un tétramère de l'autre. L'action d'agents divers (urée, alcalis, acides) dissocie la glycoprotéine en fragments de plus en plus courts, comme en témoigne les variations des propriétés physiques comme la viscosité ou la constante de sédimentation. Au terme de dissociations poussées, des particules sphériques de masse moléculaire de 27 000 ont pu être observées par ultracentrifugation, sans que l'on puisse cependant les isoler et les caractériser.

L'origine de la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL est à rechercher au niveau du tractus urinaire, sans qu'on ait pu jusqu'à présent la préciser avec certitude. L'homme en excrète environ 25 mg par litre d'urine. Elle est responsable en outre de la formation de calculs urinaires dont elle représente la matrice protéidique.

T a b l e a u I V

Composition en sucres et en aminoacides de la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL
d'après MAXFIELD et STEFANYE (104)

Composants	Résidus en %	Nombre de résidus par masse moléculaire minimum (28 100)
Alanine	3,05	12,1
Groupes amidés	0,60	10,5
Arginine	4,72	8,5
Acide aspartique	8,72	21,3
Cystine	1,42	3,9
Acide glutamique	7,06	15,4
Glycine	3,25	16,0
Histidine	2,46	5,0
Isoleucine	1,95	4,8
Leucine	5,98	14,9
Lysine	2,27	5,0
Méthionine	1,86	4,0
Phénylalanine	3,26	6,2
Proline	3,49	10,1
Sérine	4,78	15,4
Thréonine	5,31	14,8
Tryptophanne	3,52	5,3
Tyrosine	2,89	5,0
Valine	4,37	12,4
Galactosamine	1,06	1,7
Glucosamine	6,12	9,6
Galactose	5,4	8,4
Mannose	2,7	4,2
Fucose	1,1	1,9
Acide N-acétylneurami- nique	9,1	8,3

F - L'INHIBITEUR TRYPSIQUE D'ASTRUP

ASTRUP (105) a isolé des urines un inhibiteur de la trypsine et de hyaluronidase testiculaire : le "mingin" et la "minginine" (asialo-mingine). Il s'agit d'un glycoprotéide qui renferme 4 à 5 p. 100 de glucides et dont l'élimination augmente sous l'influence de l'ACTH, des hormones surrénaliennes et de "stress" divers.

G - GLYCOPROTEINES DE FAIBLE POIDS MOLECULAIRE

L'urine renferme un grand nombre de glycoprotéines de faible masse moléculaire (10 000 à 30 000) dont la constante de sédimentation oscille entre 2 et 2,5 S. Jusqu'à présent, deux seulement de ces composés ont été isolés dans un état de pureté satisfaisant :

1 - LA "GLYCOPROTEINE RICHE EN ACIDE SIALIQUE"

Cette glycoprotéine, isolée par BERGGARD (106) (1963) renferme 25 à 30 p. 100 d'acide sialique, et représente 1 mg/l d'urine. Elle fut également rencontrée par BOURRILLON et al. (107) et par EYLAR (108).

2 - LA β -MICROGLOBULINE

Cette glycoprotéine, d'une masse moléculaire de 9 500 a également été découverte par BERGGARD (109).

II - LES GLYCOPEPTIDES URINAIRES

Il existe dans l'urine un grand nombre de substances de masse moléculaire inférieure à 15 000, renfermant jusqu'à 80 p. 100 d'oses, et dont l'identification et la caractérisation sont rendues difficiles par l'absence de réactivité antigénique. Il est malaisé de définir exactement ces constituants urinaires lorsque différents auteurs les fractionnent en utilisant des méthodes différentes d'extraction. Les comparaisons ne sont possibles que lorsque des substances pures peuvent être isolées et que leur composition en oses et en acides aminés est déterminée. Il est possible néanmoins de distinguer à l'heure actuelle trois groupes de glycopeptides :

- 1 - des glycopeptides riches en fucose et possédant assez souvent des activités de groupe sanguin ;
- 2 - des glycopeptides riches en acides sialiques, d'origine inconnue, mais pouvant dériver des glycoprotéines plasmatiques, de l'uromucoïde ou des glycoprotéines tissulaires, encore mal caractérisées.
- 3 - des glycopeptides riches en acides uroniques et en hydroxyproline, dérivant des glycoamino-glycannes du collagène.

KING, FIELDEN et BOYCE (110) ont isolé de l'urine normale une fraction ultrafiltrable riche en fucose, qui est très hétérogène et présente une activité de groupe sanguin A et B.

BERGGARD (111) décrit également une fraction ultrafiltrable, mais non dialysable, riche en fucose, mais différentes des fractions obtenues par d'autres auteurs par des méthodes différentes.

LUNDBLAD (112) traite le matériel urinaire non-ultrafiltrable par électrophorèse de zone et isole plusieurs fractions glycopeptidiques, de masse moléculaire de 5 à 10 000, et très riches en fucose. Leur composition en oses est proche de celle des substances de groupes sanguins, mais aucune activité sérologique n'est détectée.

BOURRILLON, CORNILLOT et GOT (113) fractionnent l'urine par précipitation éthanolique et étudient la composition en glucides de vingt fractions différentes obtenues après chromatographie sur DEAE-cellulose et électrophorèse de zone sur amidon. Leurs éléments constitutifs sont le galactose, le glucose, le mannose, le fucose, la glucosamine, la galactosamine et l'acide sialique, c'est-à-dire les mêmes constituants glucidiques que ceux des glycoprotéines sériques. La teneur en glucides est très élevée et peut dépasser 90 p. 100.

CARRION, BOURRILLON et CABEZAS (114) ont isolé et caractérisé récemment deux sialoglycopeptides particulièrement riches en acide sialique (30 p. 100) dont les compositions sont décrites dans le Tableau V (p. 33).

T a b l e a u V

Composition en substances glucidiques et en aminoacides (*)
des deux sialoglycopeptides urinaires
isolés par CARRION, BOURRILLON et CABEZAS (115)

:	I	:	II
Hexoses	1,02		0,90
Hexosamines	0,95		0,45
Fucose	0,37		0,31
Acides sialiques	0,94		0,57
Aspartique	0,06		0,23
Sérine	0,05		0,21
Glycocolle	0,05		0,16
Glutamique	0,04		0,27
Alanine	0,035		0,16
Proline	0,035		0,21
Thréonine	0,02		0,29

(*) Exprimée en $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de substance



Le sialoglycopeptide II, en particulier, libre, après hydrolyse acide ménagée, de l'acide N, 10-diacétylneuraminique, identifié pour la première fois dans l'urine humaine.

HAKOMORI, KAWANCHI et ISHIMODA (116) ont étudié les glycopeptides dialysables de l'urine normale et isolé trois composés renfermant, outre des acides aminés, du glucose, du galactose et du fucose, composition proche de glycopeptides isolés par RADHAKRISHNAMURTHY et al. (117) du tissu conjonctif de l'aorte. Les auteurs suggèrent d'autre part que la liaison peptide-glucide peut être du type N-peptidyl-1-cétosamine.

Des glycopeptides renfermant des acides uroniques et dont l'origine est liée au métabolisme des glycosamino-glycannes ont été caractérisés et isolés. La présence de tels glycopeptides de faible poids moléculaire a tout d'abord été décrite par LUNDBLAD et BERGGARD (118), en 1962, qui n'ont pu les caractériser.

CHERIAN et RADHAKRISHNAN (119) et BOURRILLON et VERNAY (120) ont pu isoler et caractériser des glycopeptides renfermant de l'hydroxyproline, acide aminé du collagène (Tableau VI ; p. 35).

BASU (121) a isolé et cristallisé un glycopeptide que sa composition (Tableau VI ; p. 35) rattache également au métabolisme des glycosamino-glycannes.

III - DOSAGE DES GLYCOPROTIDES TOTAUX DES URINES

Une somme importante de résultats ont été rassemblés en ce qui concerne le dosage des glycosamino-glycannes urinaires. Ces derniers ont, en effet, attiré particulièrement l'attention des chercheurs, à cause de leur grande importance clinique. Le Tableau VII (p.36) montre la dispersion des résultats obtenus avec l'utilisation de méthodes différentes. Au contraire, peu de travaux ont porté sur le dosage des glycoprotides totaux urinaires. Quatre séries de résultats apportés respectivement par HAMERMAN et al. (123), KING et al. (124), BERGGARD (125) et GOUBET (126) font ressortir une grande dispersion des valeurs mesurées (Tableau VIII ; p.37). Depuis, une étude systématique des procédés de dosages colorimétriques, effectuée par SPIK et MONTREUIL (127) a montré :

T a b l e a u VI

Composition chimique de quelques glycopeptides isolés de l'urine.

	CHERIAN et RADHAKRISHNAN (128) en umoles	BOURRILLON et VERNAY (129) PM = 1 200-1 500	BASU (130) Rapports molaires
<u>Amino-acides</u>			
Hydroxyproline	107,9	7,0 p. 100	0
Proline	5,8	8,3 p. 100	0
Sérine	7		+
Glycocolle			+
Acide aspartique			+
Acide glutamique			+
Alanine			+
<u>Glucides</u>			
Oses neutres	26,2	20 p. 100 1,4 p. 100 de fucose	10 (galactose + xylose)
Acides uroniques	30,0	—	1
Hexosamines	4,8	20 p. 100	1 (glucosamine + galactosamine)
Acides sialiques	8,8	3,6 p. 100	

Tableau VII

Excrétion journalière des mucopolyosides acides de
l'urine humaine (exprimée en mg d'acide glycuronique).

Auteurs	Procédé de précipitation	Résultats
KERBY (131)	Benzidine	H (a) $4,9 \pm 1,3$ F (b) $3 \pm 0,6$
DI FERRANTE et RICH (132)	Cétavlon	2,5 (par litre)
DI FERRANTE et RICH (133)	Cétavlon	H (a) $6 \pm 0,303$ F (b) $3,77 \pm 0,24$
MEYER et al. (134)	Cétavlon	6 à 10
TELLER (135)	Cétavlon puis éthanol	H (a) 2,7 à 17,2 F (b) 2,5 à 12,9
KING et al. (136)	Ultrafiltration et sulfate d'ammonium	8
BERENSON et DALFERES (137)	Cétavlon et électrophorèse de zone	4,4 à 5,5

(a) H : Homme

(b) F : Femme

BUS
LILLE

Tableau VIII

Tableau comparatif de la composition glucidique en mg par 24 h de différentes préparations d'adialysables urinaires.

	Hexoses	Fucose	Acides sialiques	Hexosamines	Acides Uroniques
HAMERMAN et al. (138)	41,47	7,6	-	28,38	3,69
KING et al. (139)	orcinol 72,6 ± 19,1	-	40,7 ± 7,5	26,55 ± 6,1	-
BERGGARD (140)	39,6	7,1	26,4	25,66	8,76
GOUBET (141)	66 (50 à 95)		30 (20 à 40)	20	20 (6 à 35)

BHS
ELLE

1° - qu'à quantités égales, les différents oses fournissent des colorations dont les absorbances variaient dans de larges proportions,

2° - que les acides uroniques donnaient une coloration avec les réactifs à l'orcinol sulfurique et à l'anthrone sulfurique,

3° - que certains oses donnaient une coloration avec le réactif au carbazol sulfurique.

Les auteurs ont préconisé d'introduire dans les séries de dosages des solutions titrées d'oses et d'acides uroniques de manière à pouvoir doser chacun des constituants avec l'utilisation d'une formule de correction. La composition en oses des solutions-témoins doit, en outre, être identique à celle de la composition des glycoprotides urinaires.

C'est en tenant compte de ces données et après avoir mis au point un procédé quantitatif d'isolement des glycoprotéides totaux que MALLEVAIS-GOUBET (142) et MALLEVAIS-GOUBET, SPIK, LOIEZ-HENNETTE, STRECKER, VAILLANT-DELACROIX et MONTREUIL (143) ont pu réaliser une étude statistique des taux de glucides conjugués de l'urine. Les résultats obtenus (Tableau IX ; p.39) montrent que l'élimination journalière des glycoprotéides est assez constante.

IV - LES GLYCOPROTEINES DES URINES PATHOLOGIQUES

Les glycoprotéines des urines pathologiques ont été principalement étudiées dans les cas où d'importantes variations qualitatives ou quantitatives étaient mises en évidence. On a ainsi caractérisé des taux élevés d'orosomucoïde chez les sujets néphrotiques, d'haptoglobine II dans les cas de néphrose lipoïdique, d'érythropoïétine chez les sujets anémiés, de protéine de BENCE-JONES dans les cas de plasmocytose, de fragment F_c de γ -globuline dans le cas de la maladie dite "de la chaîne lourde". L'importance de l'étude des glycoprotides urinaires, au cours de l'évolution d'un cancer, tant d'un point de vue théorique que diagnostique, n'a pas échappé aux auteurs et les résultats obtenus, bien que peu nombreux, démontrent cependant de manière indiscutable l'existence de modifications de la nature, de la structure et de l'activité physiologique des glycoprotéines urinaires. Nos préoccupations actuelles et futures nous ont amené à consulter plus particulièrement les travaux concernant ce problème.

GLYCOPROTEINES ET CANCER

1 - VARIATIONS QUANTITATIVES

Il est difficile de comparer les résultats obtenus par des auteurs

Tableau IX

Elimination journalière des glycoprotéides
urinaires totaux (exprimés en mg/24 h de
glucides conjugués) (MALLEVAIS-GOUBET et al.)
(144).

	Oses "neutres"	Ac.sialique	Osamines	Oses "neutres"	Oses "neutres"
				osamines	Ac.sialique
Homme	69,23 \pm 10,6	51,9 \pm 7,3	37,6 \pm 5,0	1,87 \pm 0,18	1,33 \pm 0,10
Femme	59,40 \pm 10,2	43,0 \pm 7,8	31,4 \pm 5,0	1,92 \pm 0,17	1,37 \pm 0,12

BUS
LILLE

qui utilisent le plus souvent des techniques très différentes de fractionnement des glycoprotéines. BISERTE et al. (145) ont comparé les taux des glucides combinés des urines de sujets normaux et cancéreux, à partir de préparations de glycoprotéines isolées par adsorption benzoylée, selon le procédé d'ANDERSON et Mc LAGAN (146) et ont obtenu des valeurs identiques dans les deux cas. PECHAN (147) confirme des résultats, tandis que LEYTON et al. (148) signalent chez les sujets cancéreux un taux de glucides neutres conjugués inférieur de 30 à 50 p.100 par rapport à la normale.

MONTREUIL et coll. (Communication personnelle) dosent spécifiquement les glycoprotéides totaux de l'urine et l'application de leur méthode à des urines de cancéreux n'a pas révélé de variations significatives.

Le dosage des glycoprotéines urinaires ne semble donc pas apporter d'élément satisfaisant dans l'élaboration d'un diagnostic du cancer.

2 - VARIATIONS QUALITATIVES

Les auteurs se sont orientés vers une étude plus fine de la structure des glycoprotéines et ont, en particulier, cherché à mettre en évidence dans l'urine des substances spécifiques du métabolisme de la cellule cancéreuse. BISERTE et al. (149) signalaient déjà, en 1957, que la composition en glucides de la fraction glycoprotidique d'urines de cancéreux isolée selon la méthode d'ANDERSON et Mc LAGAN se caractérisait par une teneur plus élevée en fucose (Tableau X ; p.41). HAKOMORI et al. (150) isolent de la préparation d'ANDERSON et Mc LAGAN une γ -glycoprotéine anormale dont les caractéristiques, par rapport à la même fraction isolée de l'urine normale, sont les suivantes :

- 1 - Masse moléculaire 3 à 4 fois plus élevée,
- 2 - Degré de branchement (oses terminaux non réducteurs) 2 à 2,5 fois plus élevé,
- 3 - Taux plus faible d'hexoses et diminution sensible du rapport hexoses/hexosamines.

HAKOMORI et al. (151) étudient alors, dans l'urine de Rat, les variations du rapport hexoses/hexosamines et du degré de branchement en oses terminaux, en fonction de l'évolution d'un cancer provoqué et confirment expérimentalement l'observation précédente (Fig.8 ; p.42).

MASAMUNE et al. (152) ont mis en évidence dans les tissus et l'urine de sujets sains ou cancéreux un ensemble de substances, nommées par les auteurs les toxohormones, caractérisées par leur propriété d'inhiber l'action de la catalase hépatique. Une certaine proportion de ces substances serait de nature glycoprotéinique. Les toxohormones fractionnées à partir de tissus ou d'urines de cancéreux présentent un pouvoir inhibiteur de la catalase plus élevé que celles qui sont isolées de tissus sains.

Tableau X

Proportions moléculaires des glycoprotéides de sujets normaux (isolés suivant la méthode de ANDERSON et MAC LAGAN)(153) et de sujets cancéreux (isolés suivant la méthode de TAYAU). Résultats de MONTREUIL cités dans BISERTE et coll. (154).

	Proportions moléculaires (*)						Acide Uronique	Rapport <u>Oses</u> osamines
	Gal	Glu	Man	Fuc	Xyl	Osamine		
Glycoprotéides urinaires normaux	10	0	4	1	1	4	+	4
Glycoprotéides d'urines de cancéreux	10	2	7	7	0	11	+	2,36

(*) Les proportions moléculaires sont rapportées à 10 molécules de galactose.

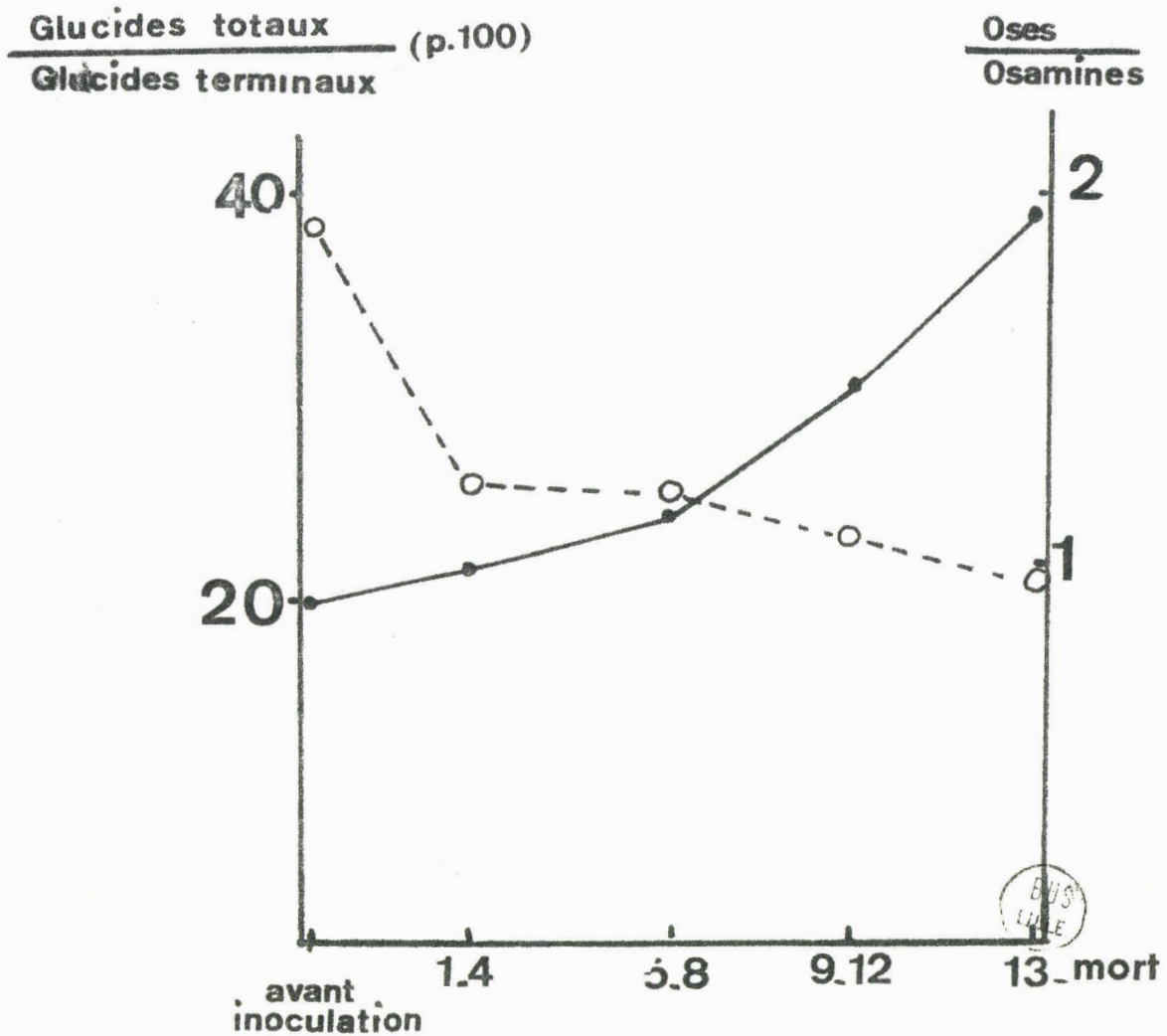


Figure 8

Variation du rapport $\frac{\text{hexoses}}{\text{hexosamine}}$ et du degré de branchement des oses dans les glycoprotéines urinaires du rat en fonction de l'évolution du cancer (HAKOMORI et coll.) (155)

MASAMUNE et al. (156) ont isolé et caractérisé de l'urine de sujets atteints de cancers divers, et principalement de cancer gastriques, un "mucopolypeptide" spécifique, le K-mucopolypeptide", absent dans l'urine normale. MASAMUNE et al. (157) ont sous-fractionné ultérieurement ce composé en fractions K_1 et K_2 , mais l'étude de ces substances n'a malheureusement pas été poursuivie depuis. Elles ont été reprises récemment au Laboratoire.

WEICKER et al. (158) ont caractérisé, dans les urines de plasmocytose, une glycoprotéine spécifique, dont les principales propriétés physico-chimiques sont décrites dans le Tableau XI (p.44). Cette glycoprotéine a la propriété de se combiner avec la protéine de BENCE-JONES, dans un rapport de 1 : 50, pour former un complexe thermo-stable, sur lequel n'agit plus la N-acétyl-neuraminidase.

TUNIS et WEINFELD (159) ont comparé les fractions obtenues par précipitation benzoïque d'urines de sujets sains et leucémiques. Ils ont caractérisé deux fractions glycoprotéiniques, F_I et F_{II} , et montré que la fraction F_{II} ne se rencontrait que très rarement dans les urines normales. Les propriétés physico-chimiques de ces différentes fractions sont à peu près identiques, sauf en ce qui concerne la thermo-stabilité de la fraction II qui est plus élevée.

KALLE, SCHWICK et al. (160) ont décrit une préparation de glycoprotéines, obtenue par fractionnement au sulfate d'ammonium d'urines de sujets atteints de leucémie myéloïde chronique, qui possède une capacité de liaison avec la vitamine B_{12} supérieure à celle des glycoprotéines présentes dans l'urine normale.

Tous ces travaux ont comme point commun d'avoir montré que la nature des glycoprotéines urinaires était modifiée par l'apparition d'un phénomène de cancérisation. Ces modifications ne s'accompagnent pas d'une élévation sensible du taux des glycoprotéines urinaires, mais portent essentiellement sur l'existence de substances spécifiques dont l'étude demandera la mise en oeuvre de méthodes d'analyse très fines, parmi lesquelles l'immuno-chimie trouvera nécessairement sa place.

Tableau XI

Propriétés physico-chimiques de la glycoprotéine
perchloro-soluble isolée d'urine de plasmocytose
(WEICKER et al.) (161).

Cristallisation dans l'éthanol et l'eau

Thermo-stable à 100°C

Soluble dans HClO_4 0,6 M

Immunoélectrophorèse et électrophorèse de zone : zone α

Point isoélectrique : pH 2-3

Masse moléculaire : 19 000

S_{20w}° : $1,43 \cdot 10^{-13}$

Analyse : C : 47,00 p.100 ; H : 6,75 p.100 ; N : 10,8 p.100 ;
S : 1,0 p.100

Peptides : 41 p.100

Glucides : 39 p.100, dont 7 p.100 d'acide sialique

Proportions moléculaires :

Acides aminés		Glucides	
Lysine	7	Galactose	10
Histidine	2	Mannose	5
Arginine	2	Glucose	5
Acide aspartique	7	Fucose	4
Thréonine	10	Rhamnose	2
Sérine	9	Ribose	-
Acide glutamique	14	N-acétylglucosamine	8
Proline	8	N-acétylgalactosamine	2
Glycocolle	4	Acide sialique	5
Alanine	12		
Cystine	6		
Valine	9		
Méthionine	-		
Isoleucine	3		
Leucine	6		
Tyrosine	6		
Phénylalanine	3		

TRAVAUX PERSONNELS

MISE AU POINT D'UN PROCÉDE DE FRACTIONNEMENT DES URINES
--

Ce chapitre s'inscrit dans le cadre d'un travail d'équipe qui a pour but d'étudier, d'un point de vue qualitatif et quantitatif, les glucides libres et combinés des urines normales et pathologiques. Dans un premier temps, en collaboration avec LOIEZ-HENNETTE, MALLEVAIS-GOUBET, MONTREUIL, SPIK et VAILLANT-DELACROIX (162), nous avons mis au point un procédé de fractionnement des urines qui permet d'obtenir de façon reproductible, 3 fractions glucidiques, glycoprotidique, oligosaccharidique et monosaccharidique. Puis, nous avons entrepris, personnellement, d'isoler et d'identifier les glucides libres, monosaccharides et oligosaccharides, de l'urine humaine normale.

1° - MATERIEL ET METHODES D'ANALYSE

I - METHODES DE DOSAGE COLORIMETRIQUES DES GLUCIDES

A - DOSAGE DES OSES NEUTRES

Les hexoses ont été dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (163) modifiée par RIMINGTON (164), en introduisant dans chaque série de dosage des "témoins internes" représentés par une solution des oses présents dans les solutions, dans les proportions molaires où ils existent dans ces dernières et une solution d'acide glucuronique, afin d'apporter la correction rendue nécessaire par leur interférence dans le dosage des hexoses totaux (MONTREUIL et SPIK (165), SPIK et MONTREUIL (166)).

B - DOSAGE DES ACIDES URONIQUES

Les acides uroniques ont été dosés par la méthode au carbazol sulfurique de DISCHE (167), en introduisant dans chaque série de dosage des "témoins internes" d'oses "neutres" (SPIK et MONTREUIL) (168).

C - DOSAGE DES OSAMINES

Les osamines ont été dosées par le procédé de BELCHER, NUTTENT et SAMBROOK (169) après une hydrolyse chlorhydrique (HCl 4 N) à 100°C, pendant 4 h, effectuée sous vide en tubes scellés. Les hydrolysats étaient débarrassés de l'acide chlorhydrique par évaporation à siccité sous vide. Les N-acétylosamines libres ont été dosées par la méthode de GOOD et BESSMAN (170).

D - DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES

Les acides sialiques libres ou conjugués ont été dosés par le réactif de DISCHE (171) à la diphénylamine, selon le procédé de WERNER et ODIN (172). Les acides sialiques libres ont été dosés par la méthode à l'acide periodique-acide thiobarbiturique d'AMINOFF (173).

II - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES D'ANALYSE DES GLUCIDES

A - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

1 - SYSTEMES-SOLVANTS

Les analyses chromatographiques ont été réalisées à l'aide des 4 systèmes-solvants suivants :

- n°1 : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) (PARTRIDGE) (174).
- n°2 : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2:1:2) (JERMYN et ISHERWOOD) (175).
- n°3 : acétate d'éthyle/pyridine/eau (8:2:1) (Mc COMB et RENDING) (176).
- n°4 : phénol saturé d'eau en atmosphère ammoniacale (1 ml d'ammoniaque pour 100 ml de la phase aqueuse) (PARTRIDGE) (177).

2 - REVELATEURS SPECIFIQUES

Les chromatogrammes ont été révélés à l'aide des 5 réactifs spécifiques suivants :

- Réactif à l'oxalate d'aniline, de PARTRIDGE (178), qui réagit avec la plupart des glucides en fournissant des colorations variées ;
- Réactif à l'urée-chlorhydrique, de DEDONDER (179), spécifique des céto-hexoses ;
- Réactif à l'orcinoïl trichloracétique, de KLEVSTRAND et NORDAL (180), spécifique des céto-ses ;
- Réactif à la vanilline, de GODIN (181), spécifique des polyols, des désoxy-hexoses et des céto-hexoses ;
- Réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde, de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (182), spécifique des désoxy-oses.

B - FILTRATION SUR GEL

Les glycoprotides urinaires ont été fractionnés par chromatographie de "gel filtration", sur gel de Sephadex G-50. Les glucides des fractions obtenues, recueillies au collecteur de fractions, ont été dosés à l'aide des méthodes colorimétriques décrites plus haut (voir p. 46).

2° - RESULTATS

I - MODE OPERATOIREA - FRACTIONNEMENT DES URINES1 - COLLECTION DES URINES

Les urines, recueillies sur un mélange de chloroforme et de toluène (1:1), sont immédiatement entreposées à la température de +4°C afin de provoquer la sédimentation d'un certain nombre de substances minérales peu solubles. Elles sont ensuite filtrées et dégazées sous vide, puis lyophilisées. La poudre obtenue est dissoute dans l'eau distillée, le pH ajusté à 8 et le résidu insoluble formé au cours de la lyophilisation, isolé par centrifugation, est lavé deux fois à l'eau afin d'extraire les substances glucidiques. Les surnageants sont rassemblés et ajustés à un volume tel que l'urine soit concentrée 10 fois.

2 - PRECIPITATION ALCOOLIQUE

L'urine est ajustée à pH 4 par de l'acide acétique et le matériel macromoléculaire précipité par l'addition de 9 volumes d'éthanol absolu à la température de - 70°C. Durant la précipitation, la température est maintenue toujours au dessous de - 15°C, afin de limiter au possible l'action dénaturante de l'éthanol sur les glycoprotéines. Le précipité, isolé par centrifugation à 1800 t/mn, est repris par la quantité d'eau correspondant au volume initial d'urine concentrée, le pH ajusté à 4, et 9 volumes d'éthanol sont ajoutés deux fois encore, afin d'extraire la totalité du matériel micromoléculaire.

3 - DIALYSE DU PRECIPITE ETHANOLIQUE

Le précipité final est repris par une petite quantité d'eau distillée et la solution obtenue est dialysée en boudins de cellophane (type Nojax 16) trois fois 24 heures contre 10 fois son volume d'eau distillée, en présence du mélange de chloroforme et de toluène (1:1) à + 4°C.

Trois fractions ont ainsi été isolées de l'urine :

- 1° - le surnageant alcoolique
- 2° - Le précipité alcoolique dialysé
- 3° - Le dialysat du précipité alcoolique.

4 - PURIFICATION DES SOLUTIONS GLUCIDIQUES

Le résidu sec des solutions éthanoliques ou des dialysats de précipités sont repris séparément par de l'eau distillée et les solutions obtenues sont déminéralisées par passages successifs sur des résines échangeuses de cations

(Dowex-50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme H⁺) et d'anions (Duolite A-40 ; "mesh" 25-50 ; forme formiate).

B - ANALYSE DES FRACTIONS OBTENUES

1 - FRACTION PRECIPITABLE PAR L'ETHANOL

a - Fraction adialysable du précipité éthanolique

- Analyse qualitative

La concentration en éthanol optimale pour obtenir la précipitation totale des glycoprotides est de 90 p.100. Dans ces conditions en effet, le surnageant alcoolique, soumis à une étude immuno-électrophorétique ne présente aucun arc. D'autre part, l'analyse chromatographique des glucides libres de la fraction adialysable du précipité fournit des résultats négatifs. La fraction adialysable du précipité alcoolique correspond donc aux glycoprotides totaux de l'urine. La composition de cette fraction a pu être précisée par un fractionnement sur Sephadex G-50 (Fig.9 ; p.50) : le dosage, dans chacune des fractions, des oses neutres, des osamines et de l'acide sialique, a permis de repérer 2 pics (pic I et pic II), tandis que l'analyse des acides uroniques fournit les pics A et B, le pic A correspondant au pic I, le pic B se dissociant du pic II.

Le pic I renferme une quantité relativement faible de glucides totaux (30 p.100). Cette première fraction éluée de la colonne de Sephadex est donc probablement de nature glycoprotéinique. L'analyse électrophorétique sur acétate de cellulose montre d'autre part la présence de mucopolysaccharides acides, révélés par le réactif au bleu alcian.

Le pic II renferme une proportion plus élevée en glucides totaux (50 p.100) et correspond à une fraction glycopeptidique.

Le pic B ne renferme que des oses neutres et des acides uroniques. Il s'agit probablement d'acide glucuronique libre ou de glucurono-conjugués de faible masse moléculaire.

La composition molaire en oses des fractions 1 à 4, correspondant aux pics I et II, montre qu'il s'agit de composés de nature glycoprotidique, puisqu'ils sont essentiellement constitués de galactose, de mannose et de fucose (Fig. 10 ; p.51). La fraction 3, glycopeptidique, renferme du glucose. Le pic B renferme un glycoside du glucose de nature encore inconnue.

- Analyse quantitative

La fraction adialysable du précipité alcoolique constitue le substrat de dosage des glycoprotides totaux de l'urine. Leur taux est remarquablement constant (Tableau XII ; p.52). Leur profil de fractionnement sur Sephadex G-50 montre qu'ils sont essentiellement constitués de glycopeptides (60 à 70 p.100).

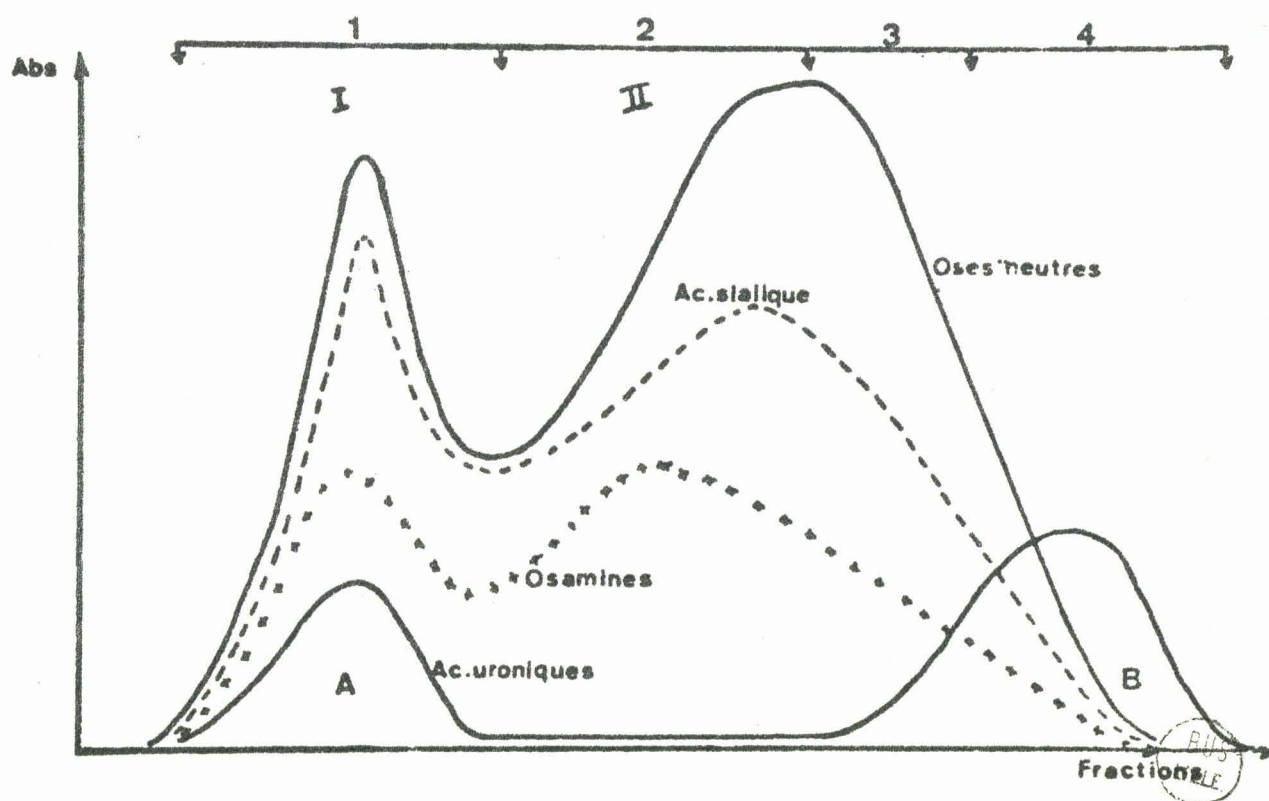


Figure 9

Courbe d'élution des glycoprotides urinaires soumis à une "gel filtration" sur Sephadex G-50. En abscisses : fractions obtenues ; en ordonnées : absorbance des colorations données par les glucides. Les chiffres arabes correspondent aux fractions dont la composition centésimale et molaire en oses a été déterminée.

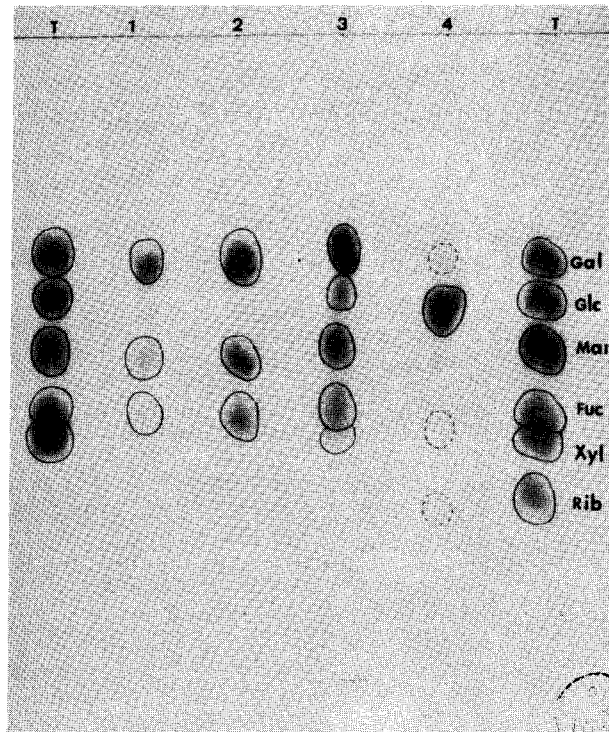


Figure 10

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques des fractions 1 à 4 désignées sur la figure 9. Système-solvant : pyridine/acétate d'éthyle/eau (1 : 2 : 2) ; durée de la chromatographie : 24 heures ; révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline. Gal : galactose ; Glc : glucose ; Man : mannose ; Fuc : fucose ; Xyl : xylose ; Rib : ribose.

Tableau XII

Composition en glucides (en mg p.litre d'urine) de différentes fractions urinaires.

PRECIPITE ALCOOLIQUE

	Précipité alcoolique	Surnageant alcoolique
Oses neutres	115 à 160	488 à 575
Osamines	35 à 60	traces
Acides sialiques	68 à 119	traces
Acides uroniques	43 à 74	242 à 273

PRECIPITE ALCOOLIQUE APRES DIALYSE

	Adialysable	Dialysable
Oses neutres	48 \pm 5	65 à 105
Osamines	28 \pm 3	12 à 29
Acides sialiques	40 \pm 5	33 à 74
Acides uroniques	9 \pm 3	33 à 65



b - La fraction dialysable du précipité éthanolique

- Analyse qualitative

L'analyse chromatographique de la fraction dialysable du précipité alcoolique urinaire révèle la présence d'un nombre élevé d'oligosaccharides (Fig.11 ; p.54). La précipitation alcoolique du matériel macromoléculaire s'est donc accompagnée d'une co-précipitation des oligosaccharides. Cette co-précipitation est presque totale car le surnageant alcoolique est essentiellement constitué de monosaccharides (Fig.11 ; p.54).

- Analyse quantitative

La méthode de fractionnement urinaire décrite ci-dessus constitue également une méthode de dosage des oligosaccharides urinaires. Leur taux, déterminé à partir d'une dizaine d'urines différentes, est de l'ordre de 150 à 250 mg par litre (Tableau XII ; p.52).

2 - LA FRACTION NON PRECIPITABLE PAR L'ETHANOL

a - Analyse qualitative

La figure 11 (p.54) montre que les surnageants alcooliques renferment la totalité des monosaccharides urinaires. La chromatographie monodimensionnelle sur papier de ces glucides, associée à l'utilisation d'un grand nombre de révélateurs spécifiques (Fig.12 ; p.55) met en évidence un nombre élevé de glucides, qu'il serait illusoire d'identifier par le simple examen de leur comportement chromatographique.

Le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (183), spécifique des aldoses, fournit des colorations variées suivant la nature de l'ose :

- A : coloration spécifique des 6-désoxyhexoses
- B et C : coloration spécifique des aldopentoses
- D et E : coloration spécifique des aldohexoses

Migrant plus rapidement que A, la bande n°1 (de nature cétosique) donne une coloration jaune orangé et présente en lumière ultra-violette une fluorescence jaune d'or très particulière.

Au dessus de E, un petit nombre seulement d'osides est repérable, principalement dans la zone des disaccharides.

Parmi les révélateurs spécifiques des cétooses, l'orcinol-trichloracétique de KLEVSTRAND et NORDAL (184) donne les meilleurs résultats, puisque 8 bandes peuvent être observées, qui fournissent en outre des colorations variées suivant la nature de l'ose :

- 1 : brun orangé ; 2 : rose (cétopentose) ; 3 : jaune-vert (cétohexose) ;
- 4 : rose (cétopentose) ; 5 : jaune-vert (cétohexose) ; 6 : bleu (heptulose) ;
- 7 : bleu-vert (mannoheptulose) ; 8 : jaune-vert (cétohexose).

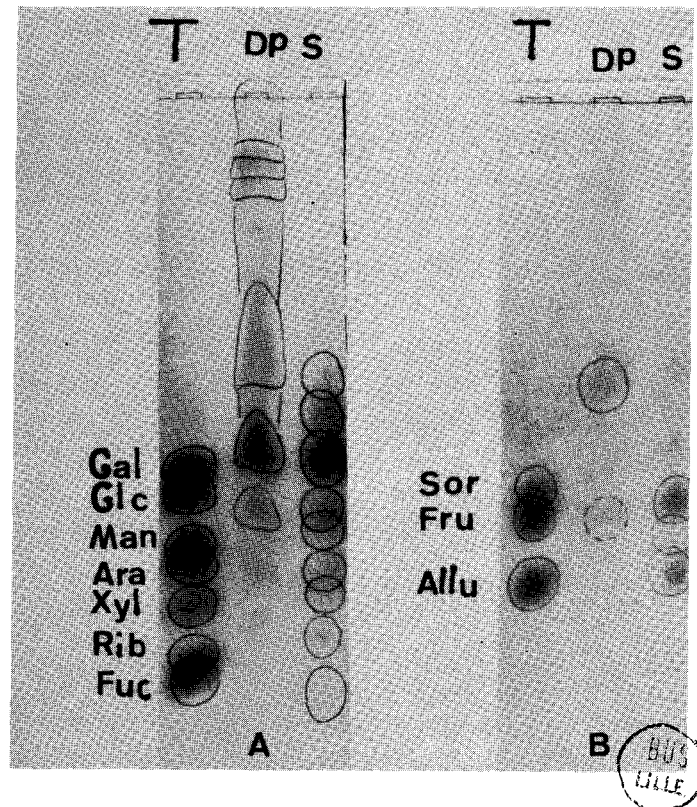


Figure 11

Chromatographie sur papier des fractions dialysables du précipité éthanolique (DP) et non précipitables par l'éthanol (S). Papier Whatman n° 3. Système-solvant : *n*-butanol/acide acétique/eau. T : solution témoin de sucres purs. Gal : galactose ; Glc : glucose ; Man : mannose ; Ara : arabinose ; Xyl : xylose ; Fuc : fucose ; Suc : saccharose ; Sor : sorbose ; Fru : fructose ; Allu : allulose. Révélateurs : A : oxalate d'aniline ; B : urée-chlorhydrique.

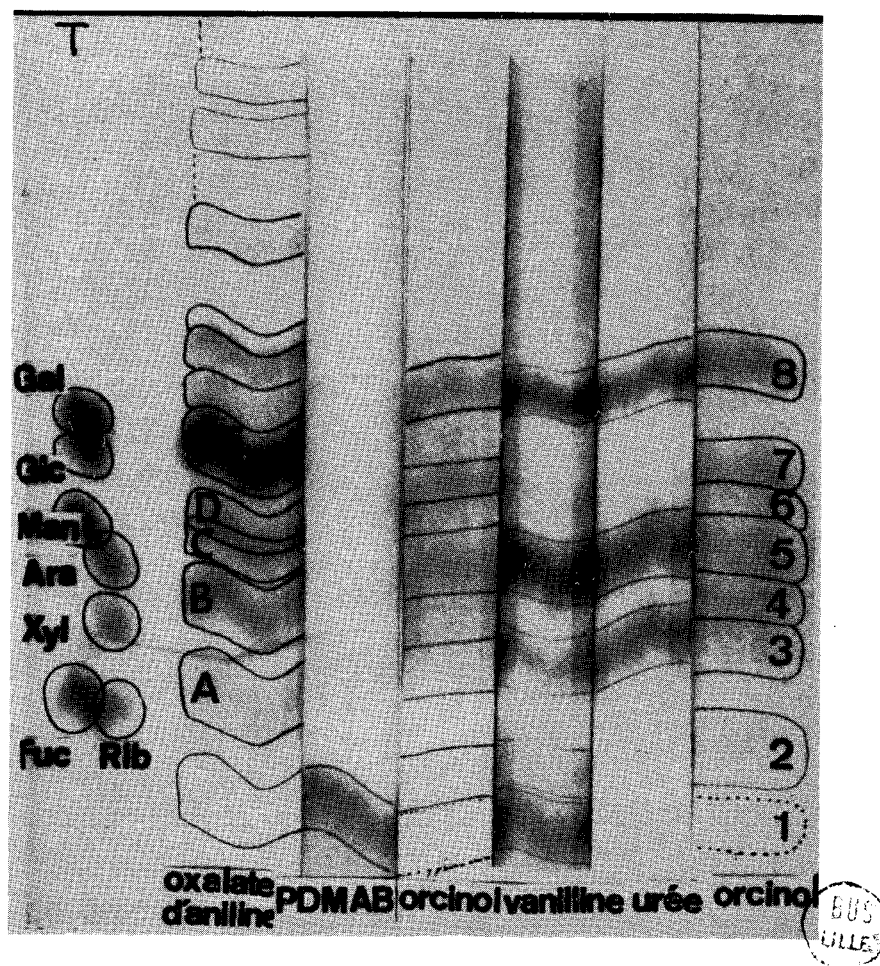


Figure 12

Chromatographie sur papier des glucides de la fraction "surnageant alcoolique". Papier Whatman n° 3. Système-solvant : *n*-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). T : solution témoin de sucres purs. 1 : désoxy-cétose ; 2 : ribulose + xylulose ; 3 : allulose ; 4 : 3-céto-fructose ; 5 : fructose ; 6 : sédoheptulose ; 7 : manno-heptulose ; 8 : saccharose ; A : fucose ; B : xylose ; C : arabinose ; D : mannose ; E + F : galactose + glucose.

Le réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde, spécifique des 2 et 3-désoxyoses, révèle la bande n°1.

La révélation avec le réactif d'ELSON-MORGAN de PARTRIDGE (185) fournit un résultat négatif.

La chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes-solvants : acétate d'éthyle/pyridine/eau (8:2:1) et phénol saturé d'eau permet de séparer tous les cétooses de l'urine (Fig.13 ; p.57). Elle montre, en outre, qu'il existe un troisième heptulose (n°5a).

b - Analyse quantitative

L'isolement d'une fraction urinaire refermant la totalité des monosaccharides a permis de doser ces derniers : les résultats, obtenus sur un nombre élevé d'échantillons sont reportés dans le Tableau XII (p.52). Nous pouvons observer que le taux de monosaccharides des urines de sujets normaux ne varie pas dans de larges proportions et nous notons, en outre, le taux extrêmement faible d'osamines et d'acides sialiques, rendus indosables par leur faible concentration et l'interférence des oses neutres (les cétooses en particulier interfèrent dans la détermination des acides sialiques par le procédé à la diphénylamine de WERNER et ODIN (186)).

3 - CONCLUSIONS

Nous avons mis au point un procédé de fractionnement des glucides urinaires qui associe la précipitation éthanolique et la dialyse sous cellophane. Nous avons pu ainsi fractionner les glucides de l'urine en trois fractions bien définies : les glycoprotides, les oligosaccharides et les monosaccharides. Ce procédé de fractionnement est également à la base d'une méthode de dosage et les résultats obtenus montrent que le taux de chacune des classes de glucides urinaires est remarquablement constant chez les sujets normaux.

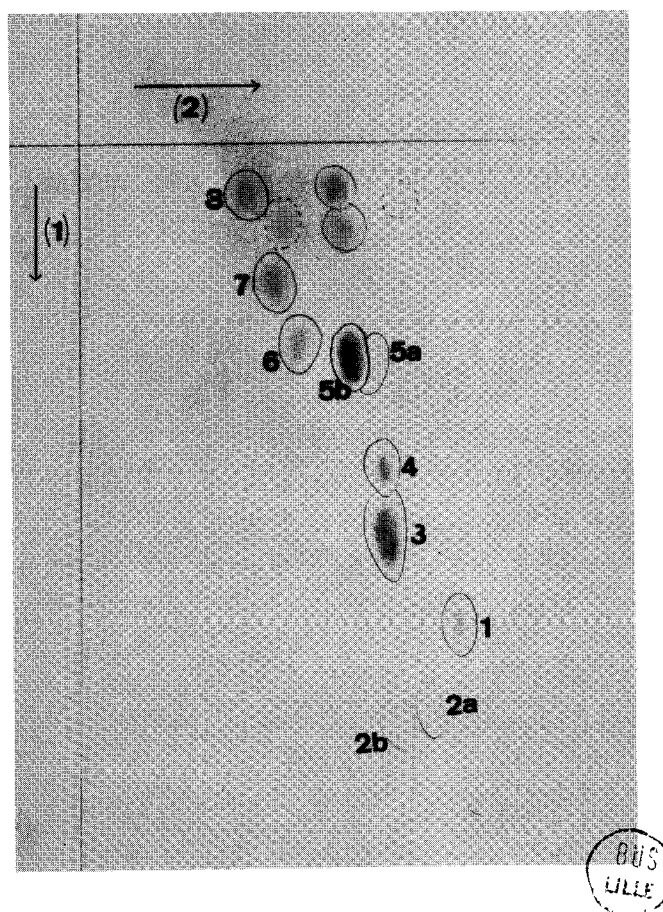


Figure 13

Chromatographie bidimensionnelle des cétooses urinaires. Papier Whatman n° 1. Système-Solvant (1) : acétate d'éthyle/pyridine/eau (8 : 2 : 1) ; système-solvant (2) : phénol saturé d'eau (atmosphère ammoniacale). Révélation par le réactif à l'orcinol trichloracétique. 1 : désoxy-cétose ; 2 a : ribulose ; 2 b : xylulose ; 3 : allulose ; 4 : 3-cétofructose ; 5 a allo-heptulose ; 5 b : fructose ; 6 : sédoheptulose ; 7 : manno-heptulose ; 8 : saccharose.

ISOLEMENT DES GLUCIDES URINAIRES

Nous avons décrit dans le chapitre précédent un procédé général de fractionnement des urines qui fournit en particulier deux fractions qui renferment respectivement les monosaccharides et les oligosaccharides que nous avons tenté d'isoler à l'état pur, dans un second temps, grâce à l'emploi des techniques chromatographiques classiques.

1° - ISOLEMENT DES MONOSACCHARIDES URINAIRES

I - MODE OPERATOIRE

A - PURIFICATION SUR COLONNE DE CHARBON-CELITE

Les solutions de monosaccharides sont purifiées par passage sur une colonne de charbon-célite, de manière à adsorber les faibles quantités d'oligosaccharides qui souillent les préparations. Les N-acétylosamines libres sont également adsorbées et seront éluées sélectivement par l'éthanol à 1,5 p.100 (voir p. 59).

B - PURIFICATION ET ISOLEMENT DES ALDOSES

1 - DESTRUCTION DES CETOSES PAR L'ACIDE CHLORHYDRIQUE

Les aldoses ont été purifiés en détruisant les cétooses par l'action de l'acide chlorhydrique (HCl 2 N ; 2 heures ; 100°C). Les solutions ont été ensuite déminéralisées par passage sur résine échangeuse d'anions (Duolite A-40 ; "mesh" 25-50 ; forme formiate).

2 - CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE DES ALDOSES

Les aldoses ont été isolés par chromatographie préparative sur papier Whatman n°3, dans les systèmes-solvants de PARTRIDGE (187) : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) et de JERMYN et ISHERWOOD (188) : acétate d'éthyle/pyridine/eau (8:2:1).

C - PURIFICATION ET ISOLEMENT DES CETOSES

1 - DESTRUCTION DES ALDOSES PAR L'EAU DE BROME

Les aldoses ont été sélectivement oxydés par le brome en acides aldoniques, selon le mode opératoire suivant : à 100 ml de solution glucidique à 5 p.100 sont successivement ajoutés 1 ml de brome et 1 g de carbonate de calcium. Après un contact de 18 heures, le brome en excès est éliminé par ventilation d'air froid et le carbonate de calcium centrifugé. La solution

surnageante est finalement purifiée par passages successifs sur résines échangeuses de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide) et d'anions (Duolite A-40 ; "mesh" 25-50 ; forme formiate). La solution effluente a été enfin évaporée à siccité sous forme d'un sirop.

2 - CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE DES CETOSES

a - Chromatographie préparative sur colonne de cellulose

Les cétooses ont été fractionnés par chromatographie préparative sur colonne de cellulose (type Chromax LKB), dans le système-solvant n-butanol/éthanol/eau (4:1:1). Des fractions de 15 ml étaient recueillies au collecteur de fractions et analysées par chromatographie sur papier dans le système solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5).

b - Chromatographie préparative sur papier

Les fractions obtenues précédemment étaient le plus souvent hétérogènes et l'isolement des cétooses a été achevé par chromatographie préparative sur papier Whatman n°3 à l'aide des systèmes-solvants de PARTRIDGE (189) : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) et de JERMYN et ISHERWOOD (190) : acétate d'éthyle/pyridine/eau (3:2:1)/

D - PURIFICATION ET ISOLEMENT DES N-ACÉTYLOSAMINES

Lors de la purification de la fraction monosaccharidique sur une colonne de Charbon-Célite (voir p. 50), les N-acétylosamines libres de l'urine ont été adsorbées et éluées par passage d'une solution éthanolique à 1,5 p.100. Les N-acétylosamines ont ensuite été isolées par chromatographie préparative sur papier Whatman n°3, dans le système-solvant de PARTRIDGE (191) : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5).

II - RESULTATS

A - ISOLEMENT DES ALDOSES

Les méthodes que nous venons de décrire nous ont permis d'isoler de l'urine 6 glucides (Fig.14 ; p.60) qui fournissent avec l'oxalate d'aniline les colorations spécifiques des méthylpentoses (glucide A), des aldopentoses (glucides B et C) et des aldohexoses (glucides D,E et F). Le fractionnement de 2 litres d'urine nous a fourni les quantités suivantes de ces glucides :

A : 2,4 mg	D : 2,8 mg
B : 12 mg	E : 38 mg
C : 7,5 mg	F : moins de 1 mg

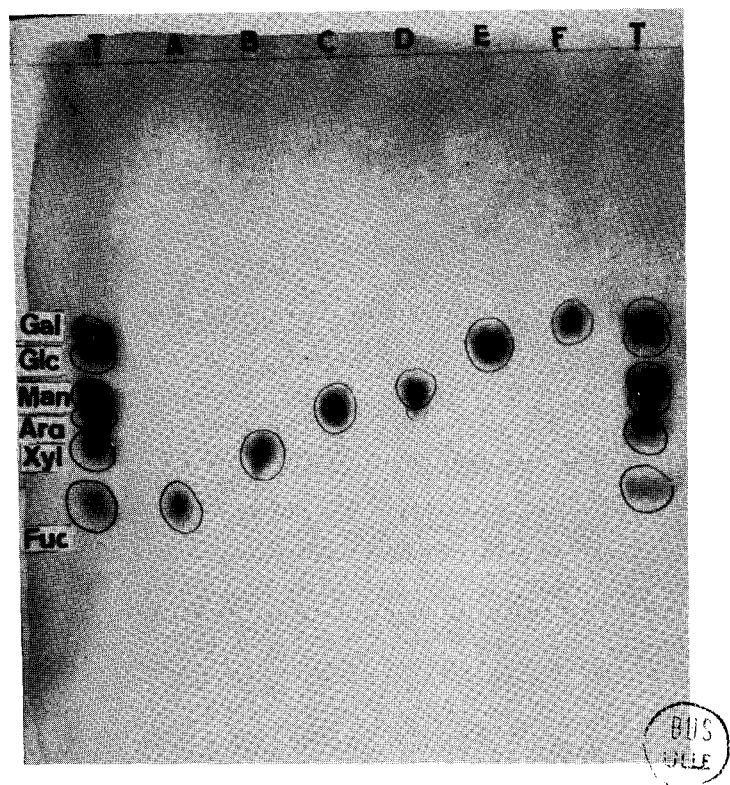


Figure 14

Chromatographie sur papier des aldoses isolés de l'urine. Papier Whatman n° 3. Révélation à l'oxalate d'aniline. Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). T : solutions témoins de sucres purs. A : fucose ; B : xylose ; C : arabinose ; D : mannose ; E : glucose ; F : galactose.

B - ISOLEMENT DES CETOSES

Nous avons isolé 7 fractions céto-siques (Fig.15 ; p.62), dont 5 correspondent à des préparations absolument pures. La fraction n°2 est constituée de deux glucides qui possèdent des comportements chromatographiques trop voisins pour qu'ils puissent être isolés par chromatographie préparative sur papier. La fraction n°5 est également constituée de deux glucides qui présentent un début de séparation chromatographique dans le système-solvant: phénol saturé d'eau. Le glucide 5 b prédomine nettement et nous avons pu l'isoler à l'état pur en faibles quantités, par chromatographies préparatives répétées dans ce système-solvant.

La révélation spécifique des céto-ses par le réactif à l'orcino-trichloracétique fournit les colorations caractéristiques des cétopentoses (2 a, 2 b et 4), des cétohexoses (3 et 5 b) et des cétoheptoses (5a, 6 et 7). Le fractionnement de 20 litres d'urine nous a permis d'isoler les quantités suivantes de chacun de ces céto-ses :

1	:	165 mg	
2a + 2b	:	4,5 mg	
3	:	324 mg	
4	:	25 mg	
5a + 5b	:	200 mg ; après purification :	5a : moins de 2 mg 5b : 90 mg
6	:	40 mg	
7	:	38 mg	

C - ISOLEMENT DES N-ACETYLOSAMINES

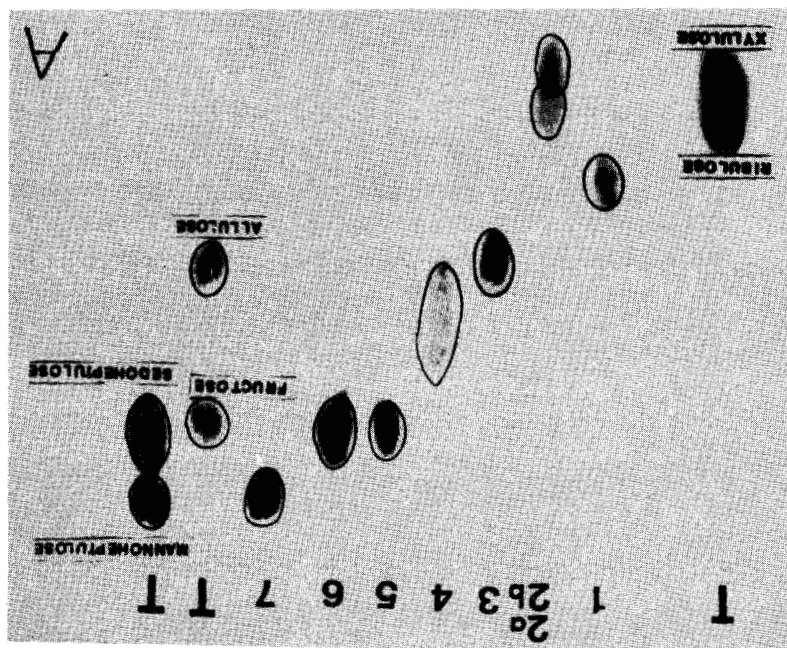
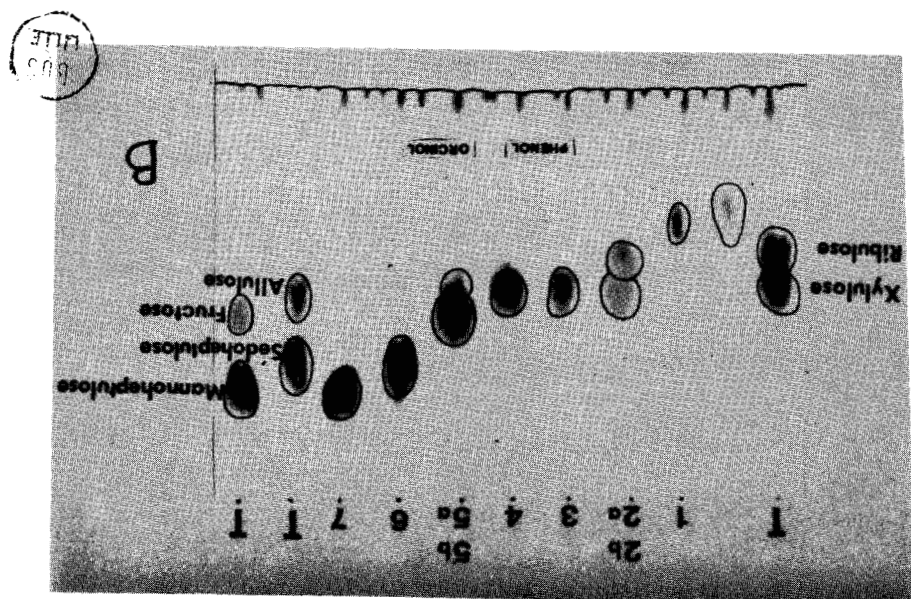
L'analyse chromatographique sur papier des N-acétylosamines libres éluées de la colonne de Charbon-Célite par l'éthanol à 1,5 p.100 ne fournit des résultats positifs que lorsque les solutions ont été concentrées 1000 à 2000 fois par rapport au volume d'urine traitée : la révélation par le réactif au p-diméthylamino-benzaldéhyde de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (192), après traitement du chromatogramme par une solution de carbonate de sodium met alors en évidence une seule tache qui possède le comportement chromatographique de la N-acétylglucosamine. Le dosage colorimétrique des N-acétylosamines par la méthode de GOOD et BESSMAN (193) montre que l'urine renferme 1 à 2 mg d'osamines libres par litre et confirme le résultat obtenu par PECHAN (194).

III - CONCLUSION

Nous avons caractérisé dans l'urine humaine et isolé à l'état pur 6 aldoses et 9 céto-ses dans des quantités généralement suffisantes pour que nous puissions envisager l'étude de leurs propriétés physico-chimiques.

Chromatographie sur papier des fractions 1 à 7 obtenues par chromatographie préparative des cétooses urinaires sur colonne de cellulose (colonne L.K.B.; type Chromax). Papier Whatman n° 3. Révélation à l'orcinol trichloracétique. Systèmes-solvants : A : acétate d'éthyle/pyridine/eau (8 : 2) ; B : phénol saturé d'eau (atmosphère ammoniacale). I : solutions témoins de sucres purs. Les chiffres désignent les fractions obtenues au cours de la chromatographie sur colonne de cellulose : 1 : desoxycétoose ; 2 a + 2 b : ribulose + xylofucose ; 3 : cellulose ; 4 : 3-cétofructose ; 5 a + 5 b : allo-heptulose + fructose ; 6 : sédoheptulose ; 7 : manno-heptulose.

Figure 15



Nous avons également isolé de faibles quantités de N-acétylosamines, dont seule l'étude chromatographique ou électrophorétique a pu être entreprise.

2° - ISOLEMENT DES MONOSACCHARIDES ACIDES

I - MODE OPERATOIRE

Les monosaccharides acides ont été isolés par chromatographie sur résine échangeuse d'anions (Dowex 1 x 8 ; "mesh" 200-400 ; forme formiate ; + 4°C) de la fraction "surnageante alcoolique". Après rinçage soigneux de la colonne par de l'eau distillée, les acides sialiques et uroniques ont été élués par le passage d'une solution d'acide formique à 1 puis à 5 p.100. Les solutions effluentes recueillies au collecteur de fractions et analysées à l'aide des réactifs à la diphénylamine de WERNER et ODIN (195), à l'acide periodique-acide thiobarbiturique d'AMINOFF (196) et au carbazol sulfurique de DISCHE (197). Les fractions renfermant de l'acide sialique ou de l'acide uronique ont été lyophilisées, avant d'être soumises à l'analyse chromatographique dans le système-solvant de PARTRIDGE (198) : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5).

II - RESULTATS

Le profil d'éluion est donné par la figure 16 (p.64). Les solutions d'acide formique à 1 et à 5 p.100 éluent respectivement les acides sialiques et les acides uroniques, qui sont ainsi fractionnés en deux pics bien distincts. L'analyse chromatographique des acides sialiques, dans le système-solvant de PARTRIDGE (199) : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5), montre l'existence d'une seule tache qui possède le comportement chromatographique de l'acide N-acétylneuraminique. L'analyse chromatographique des acides uroniques met en évidence 2 taches qui correspondent respectivement à l'acide glucuronique et à sa lactone.

Le procédé décrit plus haut permet, en outre, de doser l'acide sialique libre urinaire, opération qui était impossible à réaliser directement sur l'urine totale, en particulier à cause de l'interférence des cétooses. Le taux d'acide sialique libre, déterminé à partir d'une dizaine d'urines, est de 5 à 10 mg par litre.

III - CONCLUSION

Les monosaccharides acides de l'urine ont été isolés à l'état pur par chromatographie sur échangeur d'anions. Ce procédé constitue, en outre, une méthode de dosage de l'acide sialique urinaire.

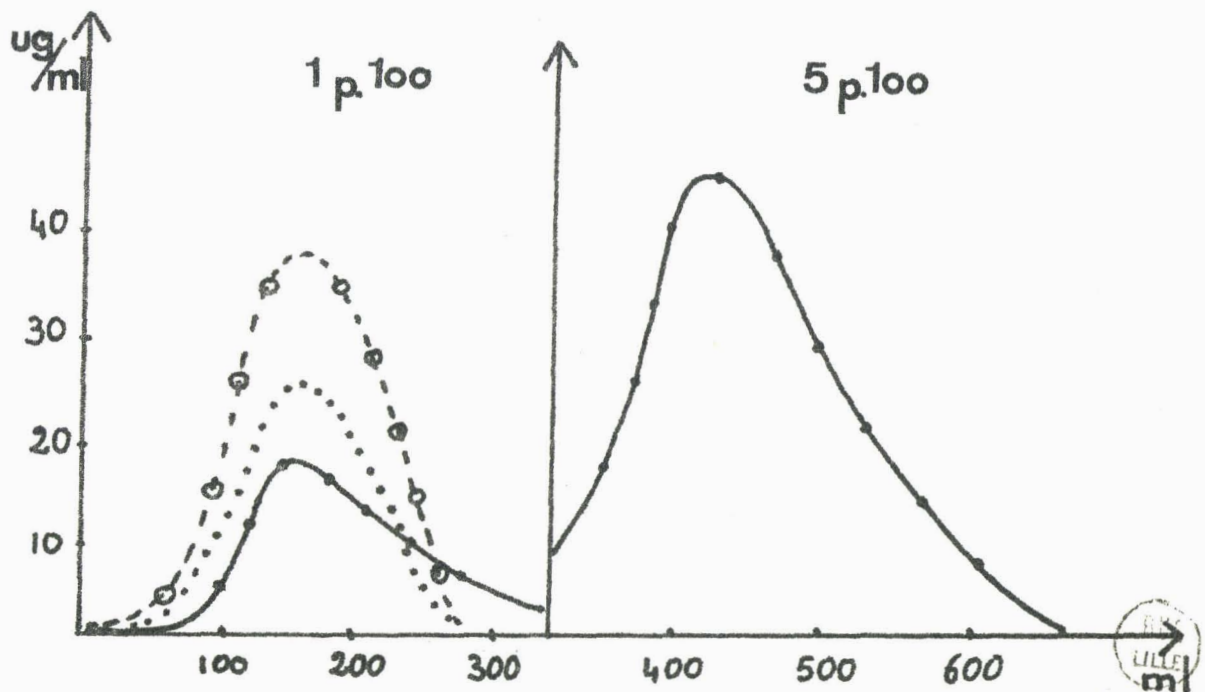


Figure 16

Courbe d'élution des acides sialiques et uroniques de la colonne de Dowex 1 x 8 ("mesh" 200-400, forme formiate) par des solutions d'acide formique à 1 et 5 p. 100 (---o---o---) : acides sialiques, déterminés par la méthode colorimétrique à la diphénylamine ; (.....) : acides sialiques, déterminés par la méthode colorimétrique à l'acide periodique-acide thiobarbiturique ; (—●—●—●—) acides uroniques déterminés par la méthode colorimétrique au carbazol sulfurique.

3° - ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

I - MODE OPERATOIRE

A - FRACTIONNEMENT DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES SUR COLONNE DE CHARBON-CELITE

La fraction dialysable du précipité alcoolique de 50 litres d'urine, purifiée préalablement sur résines échangeuses d'ions (voir p. 48) a été fractionnée sur une colonne de Charbon-Célite, selon le procédé de WHISTLER et DURSO (200).

1 - DEACTIVATION DU CHARBON

500 g de Charbon actif sont mis en suspension dans 2 litres d'HCl 6 N. Après un contact de 2 heures, le charbon est recueilli par décantation, puis lavé par 10 litres d'eau distillée sur entonnoir à verre fritté. Le charbon est ensuite séché à 37°C, réduit en poudre, puis lavé à nouveau par 10 litres d'eau distillée. Ces opérations sont réalisées 5 à 6 fois de manière à éliminer toute trace d'HCl.

2 - LAVAGE DE LA CELITE

500 g de Célite sont mis en suspension dans de l'eau distillée et les impuretés éliminées par plusieurs décantations successives. La Célite est enfin séchée à 37°C.

3 - MONTAGE DE LA COLONNE DE CHARBON-CELITE

Des quantités égales de Charbon et de Célite sont intimement mélangées sous forme d'une poudre homogène, qui est alors mise en suspension dans de l'eau distillée jusqu'à obtention d'une pâte liquide. Ce mélange est ensuite introduit dans une colonne de verre : environ 100 ml de suspension pour 1 g de glucides. Un écoulement régulier est assuré par l'emploi d'une pompe péristaltique, placée au sommet de la colonne.

4 - FRACTIONNEMENT DES OLIGOSACCHARIDES

Après le passage de la solution glucidique, la colonne est tout d'abord rincée par 4 litres d'eau distillée. La désorption des oligosaccharides est assurée grâce à un gradient discontinu d'éthanol de concentration croissante : 1,5 - 3,5 - 5 - 7,5 - 10 - 15 - 25 et 50 p.100 (4 litres de chacune de ces solutions). La colonne de charbon est enfin lavée par du méthanol à 90 p.100 de manière à extraire totalement les glucides restés adsorbés.

B - ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Les oligosaccharides de chacune des fractions alcooliques ont été isolés à l'état pur par chromatographie préparative dans un grand nombre de

systemes-solvants que nous decrivons au fur et a mesure de l'etude de chacun de ces sucres.

II - RESULTATS

La chromatographie sur papier de differentes fractions ethanologiques (Fig.17 ; p.67) montre que l'urine renferme un nombre tres eleve d'oligosaccharides dont la separation est tres satisfaisante apres leur elution de la colonne de Charbon-Celite. La chromatographie preparative sur papier nous a permis d'isoler 72 de ces composes dans un etat de purete satisfaisante : nous decrivons les diverses etapes de chromatographies preparatives successives effectuees dans le chapitre qui traite de l'etude de ces oligosaccharides (voir p.116).

III - CONCLUSIONS

L'association de la chromatographie sur colonne de Charbon-Celite et de la chromatographie preparative sur papier nous a permis d'isoler 72 oligosaccharides urinaires que nous etudierons de facon plus approfondie dans un prochain chapitre.

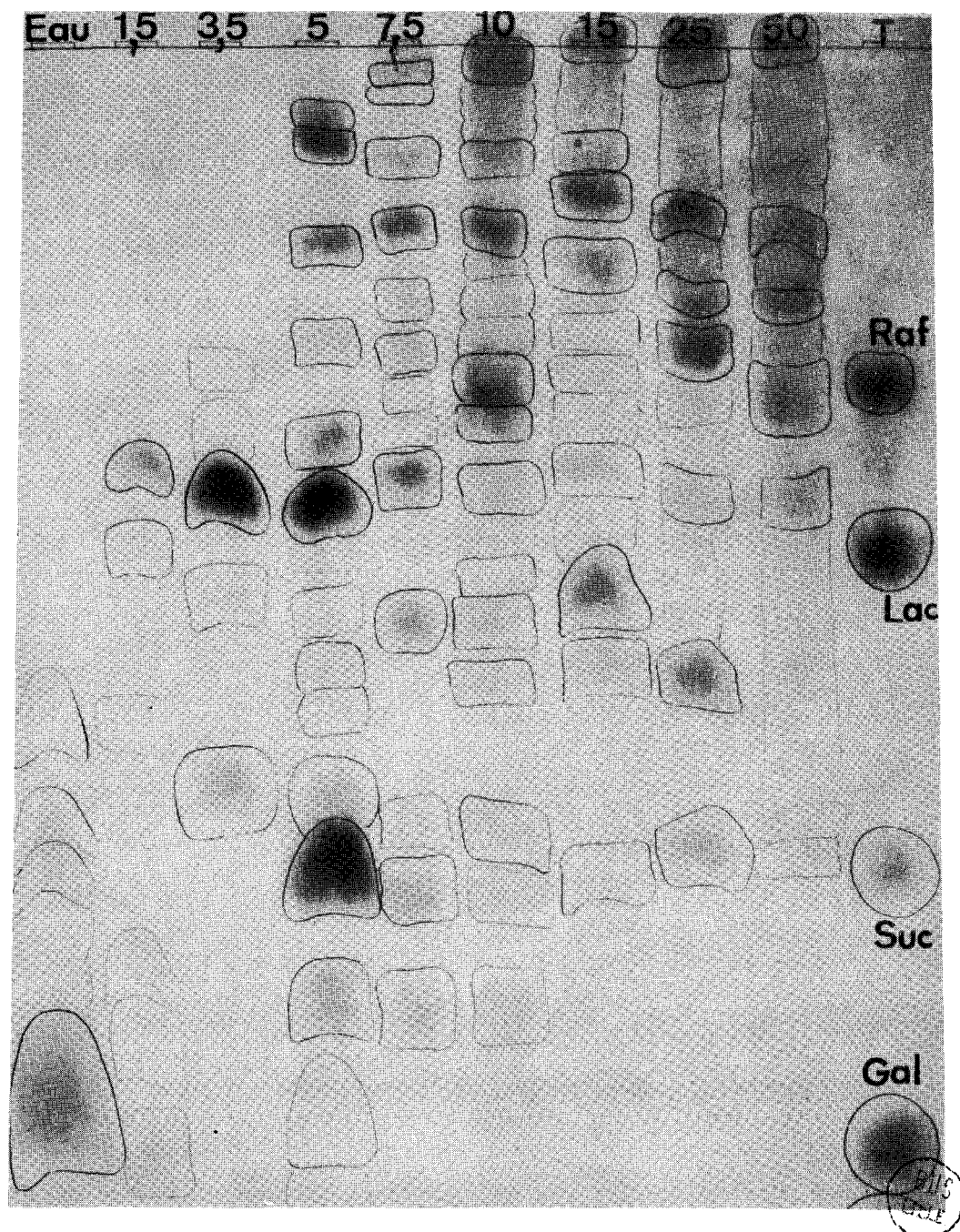


Figure 17

Chromatographie sur papier des fractions éthanoliques éluées de la colonne de Charbon-Célite. Papier Whatman n° 3. Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) (4 jours). Révélation : oxalate d'aniline. T : solution témoin de sucres purs : Raf : raffinose ; Lac : lactose ; Sac : saccharose ; Gal : galactose ; Glc : glucose ; Man : mannose ; Ara : arabinose.

ETUDE DES MONOSACCHARIDES URINAIRES

1° - MATERIEL ET METHODES

I - PREPARATION DES OSES DE REFERENCE

Le D-galactose, le D-glucose, le D-mannose, le L-arabinose, le D-xylose, le L-fucose, le D-fructose, le L-sorbose, le D-manno-heptulose, la N-acétylgalactosamine, la N-acétylglucosamine, la N-acétylmannosamine, l'acide glucuronique et l'acide N-acétylneuraminique étaient des préparations commerciales. Nous avons été amené à préparer un certain nombre de glucides non commercialisés, soit à partir de substrats naturels, soit par préparation ou synthèse chimique.

A - ISOLEMENT DE GLUCIDES A PARTIR DE MILIEUX NATURELS

1 - ISOLEMENT DU SEDOHEPTULOSE DE SEDUMS

a - Mode opératoire

Les feuilles de Sedum (S. acre et S. tectorum) renferment des quantités importantes de sédoheptulose (D-altr-heptulose) qui est extrait de la manière suivante : les feuilles de Sedum sont homogénéisées dans l'eau, à 4°C et la suspension obtenue est filtrée puis déminéralisée par passages successifs sur des résines échangeuses de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide) et d'anions (Duolite A-40 ; "mesh" 25-50 ; forme formiate). La solution effluente est ensuite traitée par l'eau de brome, en présence de carbonate de calcium, puis purifiée selon le protocole expérimental décrit p. 58 . Le sédoheptulose est enfin isolé à l'état pur par chromatographie sur papier Whatman n°3, dans le système-solvant de PARTRIDGE (201) : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5).

b - Résultats

Le sédoheptulose a été obtenu dans un état de pureté satisfaisant, comme le montre l'étude de ses propriétés physico-chimiques : comportement chromatographique, révélations spécifiques (Tableau XIV ; p.96); morphologie (Fig.32 ; p.98), point de fusions et pouvoir rotatoire de la phénylosazone (Tableau XV ; p.100).

2 - ISOLEMENT DES ACIDES SIALIQUES DE LA MUCINE SOUS-MAXILLAIRE DU BOEUF

a - Mode opératoire

Les mucines sous-maxillaires bovines renferment les acides N-glycolyl, N-acétyl, N-O-7,8 (ou 9)-diacétyl et N-O-triacétyl-neuraminique. L'acide N-O-4- diacétyl-neuraminique pourrait être obtenu à partir de la

mucine équine.

L'extraction des acides sialiques est réalisée selon un mode opératoire adapté de ceux de BLIX et coll. (202) et de SVENNERHOLM (203).

Les glandes salivaires, coupées en petits morceaux, sont extraites, plusieurs fois, par incubation dans de l'eau distillée (3 à 5 volumes) pendant 24 heures, à $+4^{\circ}\text{C}$. Les suspensions de mucine sont réunies et on ajoute de l'acide chlorhydrique 1 N jusqu'à dissolution de la mucine. Celle-ci est reprécipitée par addition de plusieurs volumes d'eau distillée. Cette manipulation est répétée une ou deux fois. La mucine est enfin lavée à l'eau distillée, à l'éthanol et à l'éther, puis séchée.

40 g de mucine sont suspendus dans 400 ml d'eau distillée et la suspension, constamment agitée, est amenée en 30 minutes à la température de l'ébullition qui est maintenue pendant une heure. L'hydrolysate est refroidi à la température du laboratoire, débarrassé de la fraction insoluble par centrifugation et passé successivement sur une colonne de Dowex 50 x 8 ("mesh" 25-50 ; forme acide ; 3 x 30 cm) et de Dowex 1 x 8 ("mesh" 200-400 ; forme formiate ; 3 x 30 cm). La colonne d'échangeur d'anions est soigneusement lavée à l'eau distillée et les acides sialiques sont déplacés par le passage d'une solution aqueuse d'acide formique 0,3 N. Le fractionnement est effectué avec un collecteur de fraction et l'élution des acides sialiques est suivie à l'aide d'une méthode de dosage des acides sialiques totaux (méthode à la diphenylamine de WERNER et ODIN (204)). Les solutions effluentes contenant de l'acide sialique sont rassemblées et lyophilisées.

b - Résultats

Le rendement est d'environ 1 g d'acides sialiques totaux. L'analyse chromatographique dans le système-solvant de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (205) : n-butanol/n-propanol/acide chlorhydrique 0,1 N (1:2:1) montre l'existence d'acide N-glycolylneuraminique (R_f : 0,34) et d'acide N-acétylneuraminique (R_f : 0,45). Les acides sialiques O-substitués s'accumulent en une tache unique au niveau du "front de démixion".

B - PREPARATION DES CETOSES PAR EPIMERISATION

1 - PRINCIPE DE LA REACTION

L'action des alcalis dégrade profondément la molécule des différents oses. Cependant, LOBRY DE BRUYN et VAN EKENSTEIN (206) ont montré que leur action ménagée conduisait à des épimérisations qui ont souvent été mises à profit pour réaliser les synthèses de cétooses divers.

Divers agents alcalins ont été utilisés, comme l'hydroxyde de calcium, de sodium ou de potassium, la pyridine et l'ammoniaque (voir à ce sujet, la

revue générale de SPECK (207)). On admet que ces transformations s'effectuent par l'intermédiaire d'une forme ène-diol (A) et probablement (B) puisqu'à partir du D-fructose ou du D-glucose, on obtient le D-allulose (Fig.18 ; p.73).

2 - MODE OPERATOIRE

Une solution de sucre à 10 g p.100 ml d'eau de chaux saturée est maintenue pendant 20 mn au bain-marie bouillant. La solution est ensuite refroidie et les aldoses sont oxydés sélectivement par l'eau de brome, en présence de carbonate de calcium (voir p. 58). Après purification de la solution sur résines échangeuses de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide) et d'anions (Duolite A-40 : "mesh" 25-50 ; forme formiate). Les cétooses sont isolés par chromatographie préparative sur colonne de cellulose (type Chromax LKB).

3 - RESULTATS

Les cétooses suivants ont été préparés selon le protocole expérimental décrit ci-dessus :

- le xylulose, à partir du D-xylose
 - le D-ribulose, à partir du D-arabinose
 - le D-allulose, à partir du D-fructose
 - le D-tagatose, à partir du D-galactose
- et le D-allo-heptulose, à partir du D-altrio-heptulose.

L'étude de leurs propriétés physico-chimiques (comportement chromatographique, révélations spécifiques, pouvoir rotatoire, point de fusion et pouvoir rotatoire de leurs phénylosazones) confirme l'état de pureté satisfaisant de chacune de ces préparations (Tableau XIV (p.96) et XV (p.100)).

II - ETUDES DES PROPRIETES PHYSICO- CHIMIQUES DES MONOSACCHARIDES URINAIRES

L'étude du comportement chromatographique d'un glucide inconnu, associée à l'emploi d'un grand nombre de révélateurs spécifiques peut contribuer à son identification, mais il est souhaitable de confirmer les résultats obtenus par l'utilisation d'un nombre élevé de critères physico-chimiques indiscutables, comme l'étude des osazones, par exemple. En outre, l'identification d'un glucide jusqu'à présent inconnu dans la nature demande la mise au point de méthodes chimiques d'investigation de sa structure et nécessite parfois d'effectuer la synthèse chimique.

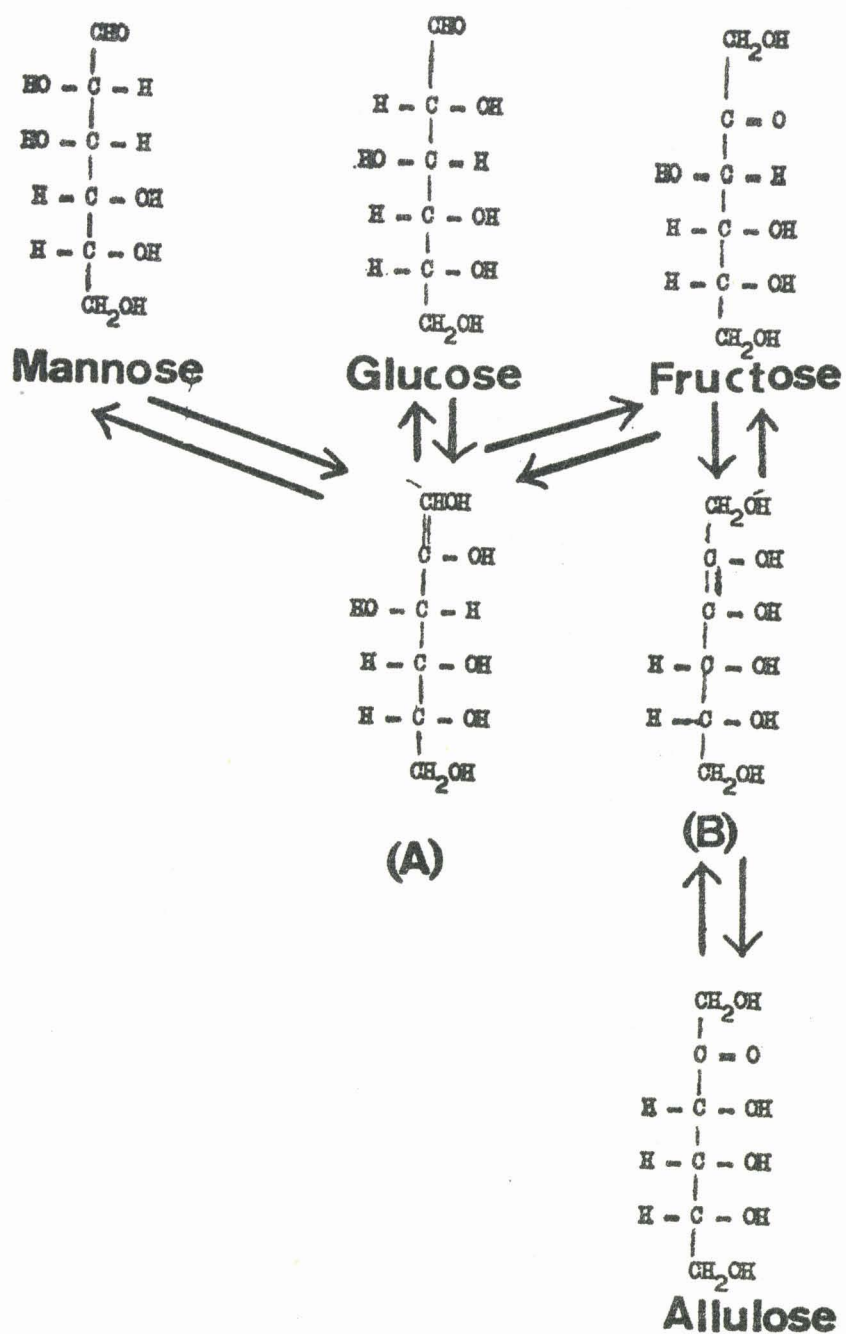


Figure 18



Mécanisme de l'épimérisation du D-glucose ou du D-fructose par les agents alcalins.

A - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

1 - SYSTEMES-SOLVANTS

Nous avons étudié le comportement chromatographique des glucides urinaires dans les 4-systèmes-solvants décrits plus haut (voir p. 47). Nous avons utilisé, en outre, le système-solvant de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (208) n-butanol/n-propanol/acide chlorhydrique 0,1 N (1:2:1) pour identifier les acides sialiques.

2 - REVELATEURS SPECIFIQUES

Nous avons utilisé les révélateurs spécifiques à l'oxalate d'aniline, de PARTRIDGE (209), au chlorure de triphényltétrazolium, de TREVELYAN et al. (210), à la p-anisidine, de HOUGH et al. (211), à l'urée phosphorique, de GREENE et MORRIS (212), à l'urée chlorhydrique, de DEDONDER (213), à l'orcinol trichloracétique, de KLEVSTRAND et NORDAL (214), à la vanilline, de GODIN (215), au p-diméthylaminobenzaldéhyde, de PARTRIDGE (216), au p-diméthylaminobenzaldéhyde trichloracétique, de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (217) et à l'acide thiobarbiturique, de WARREN (218).

B - METHODES ELECTROPHORETIQUES

1 - ELECTROPHORESE DES N-ACETYLOSAMINES

L'électrophorèse sur papier des N-acétylosamines a été effectuée avec une solution de borate de sodium à 1 p.100 ml, dans une cuve d'électrophorèse "en toit", sous une tension de 10 V/cm, pendant 4 heures. Les feuilles de papier sont immédiatement séchées à 100°C, puis imprégnées par pulvérisation du réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde trichloracétique de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (219).

2 - ELECTROPHORESE DES ACIDES URONIQUES

SPIK (220) a proposé une méthode d'électrophorèse des acides uroniques qui est effectuée en 2 temps :

1 - Electrophorèse préparative des acides uroniques à pH 3,9, dans le tampon de MICHL (221) et élution.

2 - Electrophorèse des acides uroniques, effectuée dans une cuve "en toit", sur papier Whatman n°3, dans le tampon boraté de HAUGH et LARSEN (222) puis révélation avec le réactif à l'oxalate d'aniline, après élimination des ions borate par pulvérisation préalable de méthanol acétique.

C - METHODES COLORIMETRIQUES

Les nombreux procédés colorimétriques de dosage des glucides fournissent des colorations dont les spectres d'absorption de la lumière visible peuvent être utilisés pour leur identification.

Les cétooses donnent avec le réactif de DISCHE-BORENFREUND (223) des colorations dont les maxima d'absorbance de la lumière sont de 540 nm pour les pentuloses, de 560 nm pour les hexuloses et 580 à 590 nm pour les heptuloses. Les réactions colorimétriques à la diphénylamine, de WERNER et ODIN (224) et à l'acide périodique-acide thiobarbiturique sont caractéristiques des acides sialiques.

D - PREPARATION DES PHENYL-OSAZONES

1 - REACTIF

Acétate de sodium	8 g
Acide acétique	16 ml
Bisulfite de sodium 36°Be	4 ml
Phénylhydrazine RP	4 ml
Eau	80 ml

2 - MODE OPERATOIRE

Un volume de solution aqueuse glucidique à 1 g p.100 ml est mélangé avec un volume du réactif et la solution maintenue 45 mn au bain-marie bouillant. La solution est ensuite refroidie lentement, à température ambiante, puis 24 heures à +4°C. Les cristaux sont recueillis sur verre fritté, lavé avec de petites quantités du réactif précédent, sans phénylhydrazine, et enfin avec de l'eau à +4°C.

Les cristaux d'osazones sont recristallisés 2 fois dans l'éthanol à 30 p.100 (v:v), lavés à l'eau distillée à +4°C, puis séchés sous vide.

3 - MICROMETHODE

Quand on désire se limiter à l'examen de la morphologie des cristaux d'osazone, une micro-méthode est alors utilisable : 20 à 30 ul de solution, renfermant 50 à 100 µg d'ose sont déposés au fond d'un verre de montre et on ajoute une quantité égale de réactif à la phénylhydrazine. Les solutions sont mélangées et aspirées dans une pipette Pasteur que l'on scelle à son extrémité. On maintient celle-ci au bain-marie bouillant pendant 45 mn et, après un lent refroidissement, la solution est déposée sur une lame de verre pour être examinée au microscope.

2° -- RESULTATS

I - ETUDE DES ALDOSES URINAIRES

A - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Les aldoses isolés de l'urine humaine possèdent respectivement le comportement chromatographique du fucose (A), du xylose (B), de l'arabinose (C), du mannose (D), du glucose (E) et du galactose (F) dans tous les systèmes-solvants utilisés.

B - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES ALDOSES URINAIRES

1 - POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE

Le pouvoir rotatoire spécifique des solutions aqueuses d'aldoses a été déterminé à l'aide du micropolarimètre ZEISS. Les valeurs obtenues sont rapportées dans le Tableau XIII (p.75) et précisent l'isomérisation optique des aldoses de l'urine : L-fucose, D-xylose, L-arabinose, D-mannose, D-glucose et D-galactose.

2 - SYNTHESE DES OSAZONES ET ETUDE DE LEURS PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Nous avons préparé les phénylosazones du xylose, de l'arabinose, du mannose, du glucose et du galactose urinaire et examiné au microscope la morphologie de leurs cristaux (Fig.19 ; p.76).

La détermination de leur point de fusion et de leur pouvoir rotatoire spécifique (Tableau XIII ; p. 75) confirme les résultats obtenus à partir des aldoses eux-mêmes.

3 - CONCLUSION ET DISCUSSION

Nous avons caractérisé la présence dans l'urine de faibles quantités d'aldoses que nous avons pu identifier avec certitude grâce à l'étude de leurs propriétés physico-chimiques. Il s'agit du L-fucose (1 à 10 mg/l), du D-xylose (5 à 50 mg/l), du L-arabinose (20 à 50 mg/l), du D-mannose (1 à 5 mg/l), du D-glucose (20 à 50 mg/l) et du D-galactose (0 à 3 mg/l).

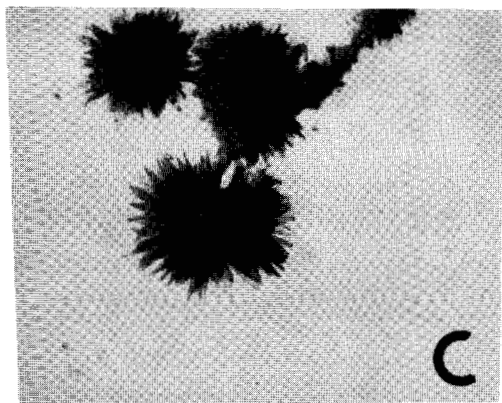
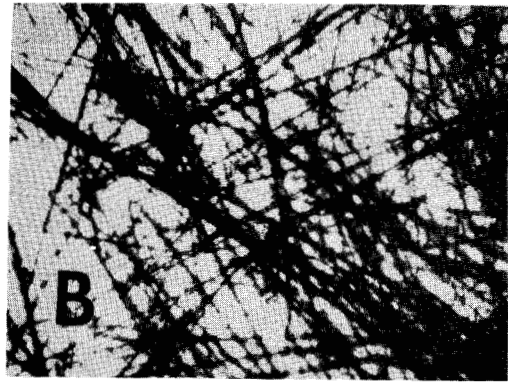
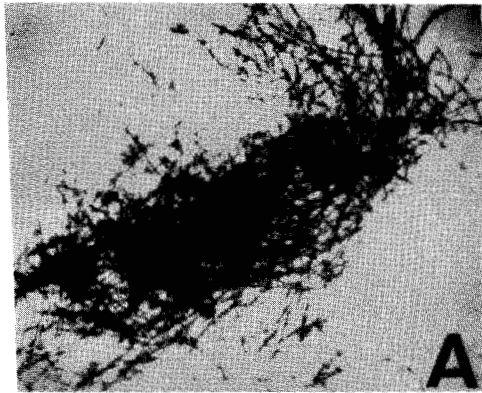
Nos résultats confirment et complètent les travaux de MONTREUIL (225) et de WHITE et HESS (226), qui avaient identifié ces aldoses par chromatographie sur papier. Nous notons par contre, l'absence de rhamnose et de ribose, dont la présence avait été signalée par différents auteurs qui semblent avoir confondu ces composés avec des cétooses qui possèdent une vitesse de migration identique et qui réagissent légèrement avec le réactif à l'oxalate d'aniline.

Tableau XIII

Propriétés physiques des aldoses purs ou isolés de
l'urine humaine.

	$[\alpha]_D^{20}$ des aldoses en solution aqueuse		$[\alpha]_D^{20}$ des phénylosazones en solution dans le mélange pyridine-éthanol (2:3)(v:v)	
	urinaires	purs	urinaires	purs
A : L-fucose	-74,5°	-77°	-59° à -23°	-60° à -23°
B : D-xylose	19°	19°	-24° à -47°	-23,5° à -48°
C : L-arabinose	107°	109°	-	-
D : D-mannose	9°	15°	-	-
E : D-glucose	52,9°	52,7°	-72° à -41°	-72,5° à -41°
F : D-galactose	78°	81°	-	-





LILLE

Figure I9

Microphotographie des cristaux de phénylosazone des aldoses isolés de l'urine. A :arabinose; B :xylose; C :galactose; D :mannose.

II - ETUDE DES CETOSES URINAIRES

A - LE CETOSE 1

1 - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

L'étude du comportement chromatographique ne permet pas d'identifier le cétose 1 à aucun des glucides habituellement rencontré dans la nature. Sa vitesse de migration, dans la plupart des systèmes-solvants, est celle des tétroses ou méthylpentoses (Tableau XIV ; p. 96). Les révélateurs spécifiques des glucides fournissent des colorations variées, caractéristiques des cétooses (coloration brun-jaune avec l'orcinol trichloracétique, rouge avec l'urée phosphorique) et des désoxyoses (coloration violette avec le réactif à la vanilline ou au p-diméthylaminobenzaldéhyde). La révélation par l'oxalate d'aniline donne une coloration et une fluorescence jaune d'or très particulière.

2 - ACTION DES ACIDES

Le cétose 1 est très labile vis à vis des agents acides, mêmes dilués : la destruction est totale sous l'action de l'acide sulfurique 0,1 N à 100°C, au bout de quelques minutes.

3 - REACTIONS COLORIMETRIQUES

Nous avons appliqué aux préparations du cétose 1 de nombreuses réactions colorimétriques et tracé les spectres d'absorption de la lumière visible (Figure 20 ; p.78). Nous avons obtenu des longueurs d'ondes maximales correspondant respectivement à l'acide N-acétylneuraminique (réactif à la diphenylamine), au fructose (réactif à la cystéine-carbazol) et au 2-désoxy-ribose (réactif à l'acide periodique-acide thiobarbiturique).

4 - SYNTHESE CHIMIQUE DU CETOSE 1

L'ensemble des propriétés chimiques décrites ci-dessus est en faveur de la structure d'un désoxy-cétohexose et nous avons tenté d'effectuer la synthèse chimique des 3-désoxy et 4-désoxy-cétohexoses.

a - Principe

Nous avons, dans un premier temps, préparé en mélange les lactones des acides 2-désoxy ribohexonique et 2-désoxy-arabohexoniques par condensation de l'acide cyanhydrique avec le désoxyribose (synthèse de FISCHER-KILIAMI (227)). Puis nous avons réduit ces lactones par le borohydrure d'aluminium et oxydé les 3-désoxy-hexitols formés par l'eau de brome, à 100°C.

b - Mode opératoire

Une solution de 1 g de désoxy-ribose dans 7 ml d'eau distillée, amenée à +4°C, est additionnée de 3 ml d'une solution aqueuse de

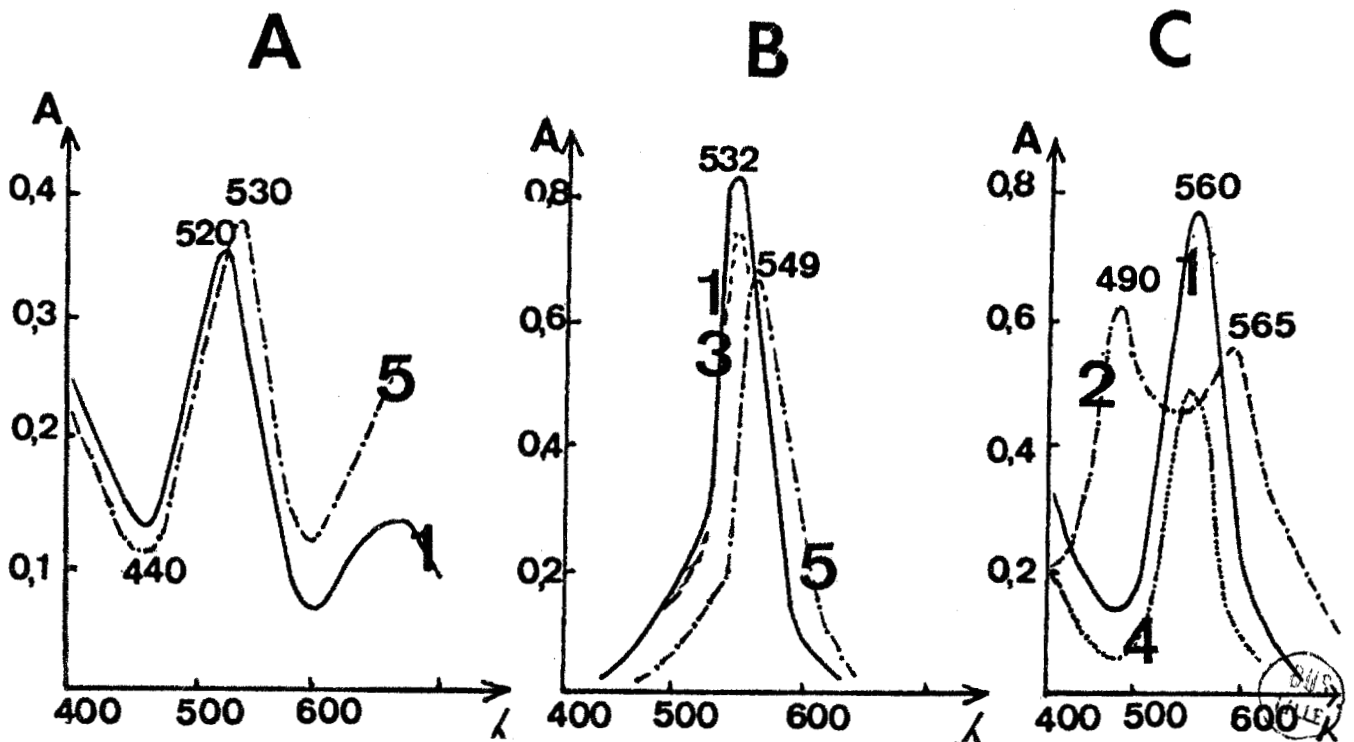


Figure 20

Courbes d'absorption des colorations données par le cétose 1 avec différents réactifs spécifiques des cétooses et des désoxyoses.

A : réactif à la diphenylamine ; B : réactif à l'acide periodique-acide thiobarbiturique ; C : réactif à la cystéine-carbazol.

(1) : cétose 1 ; (2) 2-désoxyglucose ; (3) 2-désoxyribose ;

(4) : fructose ; (5) acide N-acétylneuraminique.

600 mg de cyanure de sodium. Après 24 heures de contact à +4°C, la solution est portée au bain-marie bouillant durant 6 heures, en ajoutant de l'eau distillée à intervalles réguliers de manière à maintenir le volume constant. Les ions sodium sont retenus sur résine échangeuse de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide), et la solution effluente concentrée sous vide est amenée à 20 ml. Les lactones synthétisées à ce stade de la réaction sont réduites en hexitols par l'addition de 1 g de borohydrure d'aluminium dont l'action est prolongée 18 heures. Les ions aluminium sont éliminés par déminéralisation sur résine échangeuse de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide) et l'acide borique distillé avec le méthanol acétique. Le sirop obtenu après concentration sous vide est repris par 25 ml d'eau de brome saturée et la solution portée au bain-marie bouillant durant 20 minutes. Le brome en excès est éliminé par évaporation sous vide et l'acide bromhydrique formé au cours de l'oxydation retenu sur résine échangeuse d'anions (Duolite A-40 ; "mesh" 25-50, forme formiate).

c - Résultats

Au terme de cette expérimentation, l'analyse chromatographique dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) montre l'existence de 5 composés, qui fournissent les colorations spécifiques des cétooses et des désoxyoses avec les réactifs à la vanilline, à l'orcinol trichloracétique et au p-diméthylaminobenzaldéhyde et qui correspondent probablement aux 5 désoxycétooses dont les formules sont représentées dans la figure 21 (p.80). L'un de ces composés, en particulier, possède le comportement chromatographique du cétoose 1 urinaire, et a pu être isolé en quantité appréciable par chromatographie préparative sur papier (Fig.22 ; p.81). Les réactions colorimétriques à la diphénylamine, à la cystéine-carbazol et à l'acide périodique-acide thiobarbiturique appliquée aux préparations de cétoose 1 de synthèse fournissent des spectres d'absorbance de la lumière en tous points semblables à ceux obtenus avec le cétoose urinaire.

Le procédé de synthèse que nous avons utilisé permet donc d'identifier le cétoose urinaire à un désoxycétohexose, sans que l'on puisse cependant préciser la position de la fonction cétonique dans la molécule. La figure 21 (p.80) représente les 5 structures possibles qui peuvent leur être attribuées.

5 - OXYDATION PERIODIQUE DU CETOSE 1

Nous avons identifié les produits de l'oxydation périodique du cétoose 1, isolé de l'urine ou obtenu par synthèse chimique, au terme de l'expérimentation suivante :

a - Protocole expérimental

A 0,3 ml de solution aqueuse des glucides suivants :

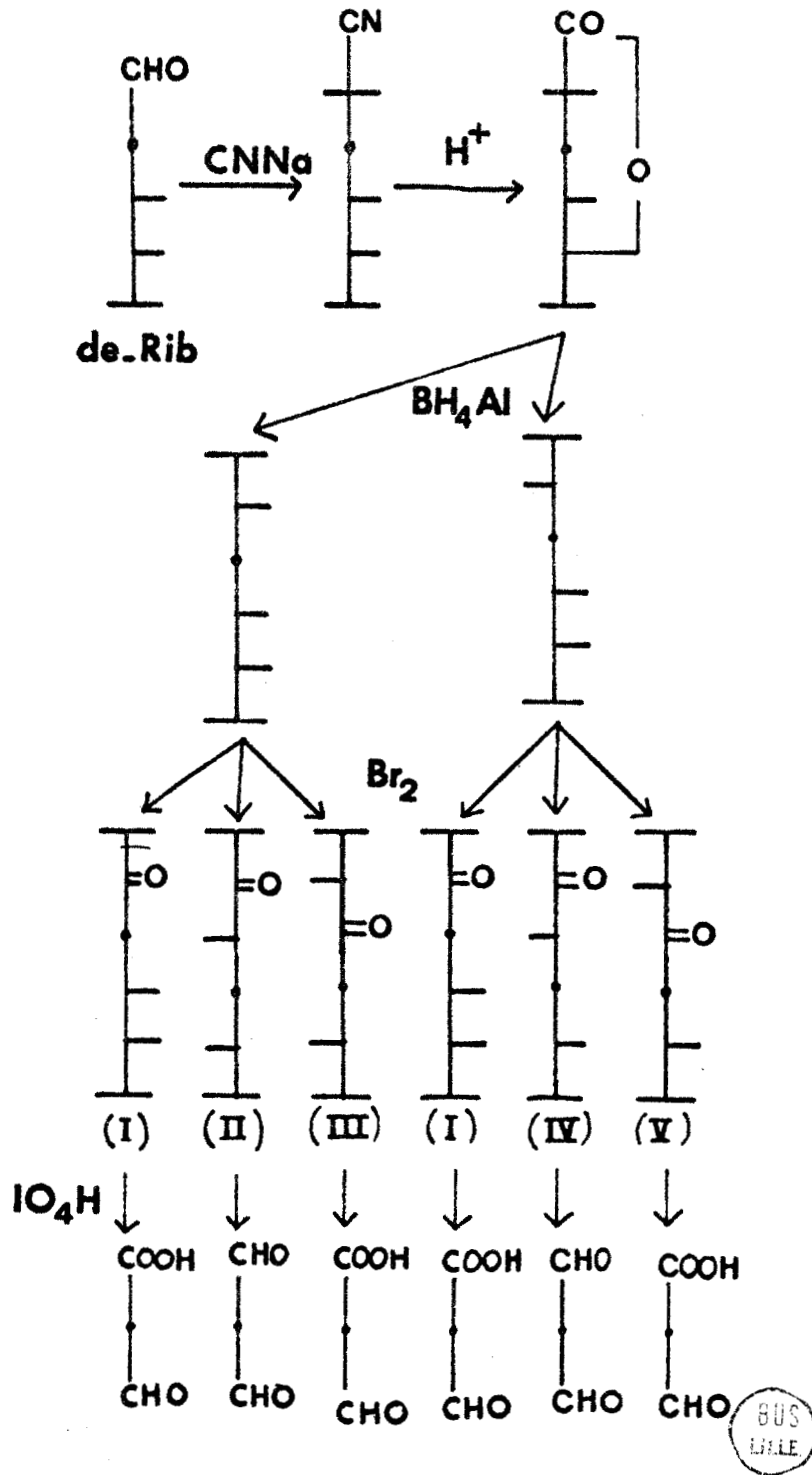


Figure 2I

Synthèse des désoxycétoses. Seuls les composés II et IV (4-désoxyallulose et 4-désoxyfructose) sont oxydés en malonaldéhyde sous l'action de l'acide périodique.

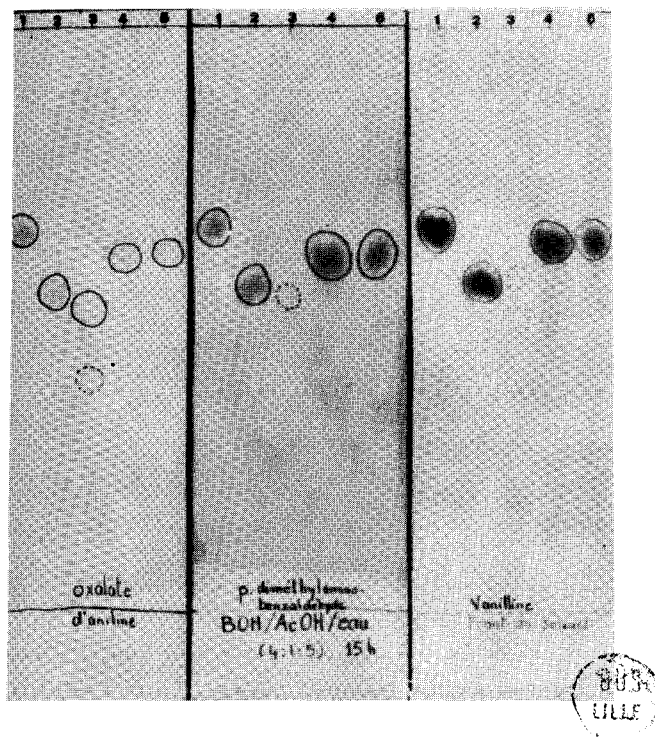


Figure 22

Chromatographie des désoxy-oses. Papier Whatman n° 1. Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) ; Révélation à l'oxalate d'aniline (A) au p-diméthylaminobenzaldéhyde (B) et à la vanilline (C)
 1 : 2-désoxyglucose ; 2 : 2-désoxyribose ; 3 : produit d'oxydation du 2-désoxy-ribitol par le brome. 4 : cétose 1 isolé de l'urine ; 5 : 4-désoxy-hexulose de synthèse.

acide N-acétyl-neuraminique (5 mg), désoxyribose (5 mg), cétose 1 (environ 5 mg) est ajouté 0,5 ml du réactif suivant : IO_4Na 2 M + H_2SO_4 2 M. Après 20 mn de contact, à température ambiante, le pH de la solution est amené à 7 par addition d'eau saturée de baryte et après centrifugation, le surnageant est passé successivement sur une paire de colonnes (1 x 10 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50x8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide) puis d'anions (Dowex 1 x 8 ; "mesh" 200-400 ; forme formiate). Après rinçage par 50 ml d'eau distillée, la colonne de résine anionique est éluée par de l'acide formique 0,33 N. Des fractions aqueuses et formiques de 3 ml sont recueillies et les produits de l'oxydation périodique dosés par l'acide thiobarbiturique. Les fractions fournissant une coloration positive sont lyophilisées, puis soumises à l'électrophorèse sur papier dans le tampon de MICHL de pH 3,9. Les électrophorégrammes ont été révélés par pulvérisation d'une solution d'acide thiobarbiturique.

b - Résultats

Nous vérifions que l'acide formylpyruvique, obtenu par oxydation périodique de l'acide N-acétyl-neuraminique est retenu quantitativement sur la résine échangeuse d'anions (Fig.23 ; p.83). Les produits d'oxydation du désoxyribose et du cétose 1 sont neutres et fournissent tous deux avec la réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique le spectre d'absorption caractéristique du malonalaldéhyde (maximum : 532 nm). L'électrophorèse sur papier (Fig.24 ; p.84) confirme la neutralité du produit de l'oxydation périodique du cétose 1.

Ce résultat indique que la fonction cétonique n'est pas en α du radical méthylène et exclut la possibilité des structures (1), (3) et (5) représentées dans la figure 21 (p.80).

6 - CONCLUSION ET DISCUSSION

Nous avons caractérisé dans l'urine humaine un 4-désoxyhexulose, dont la structure exacte reste à établir. Toutefois, il n'existe pour ce cétose que deux formes possibles, le 4-désoxyfructose (ou tagatose) et le 4-désoxyallulose (ou sorbose), et ce n'est que lorsque nous aurons synthétisé isolément ces deux composés et étudié leurs propriétés physico-chimiques, que nous pourrions identifier le 4-désoxycétose urinaire.

WHITE et NESS (228) avaient signalé dans l'urine la présence d'un glucide qui possède le comportement chromatographique du 4-désoxyhexulose décrit ci-dessus et qui fournissait avec le réactif au citrate d'aniline une coloration jaune-orangé (voir Figure 4 ; planche A ; glucide n°11 ; p.17). Les auteurs pensaient que ce glucide pouvait être l'érythrose, mais n'avaient pas poursuivi son identification. A notre connaissance, les 4-désoxyhexuloses n'ont jamais été caractérisés jusqu'à présent dans la nature. La présence d'un

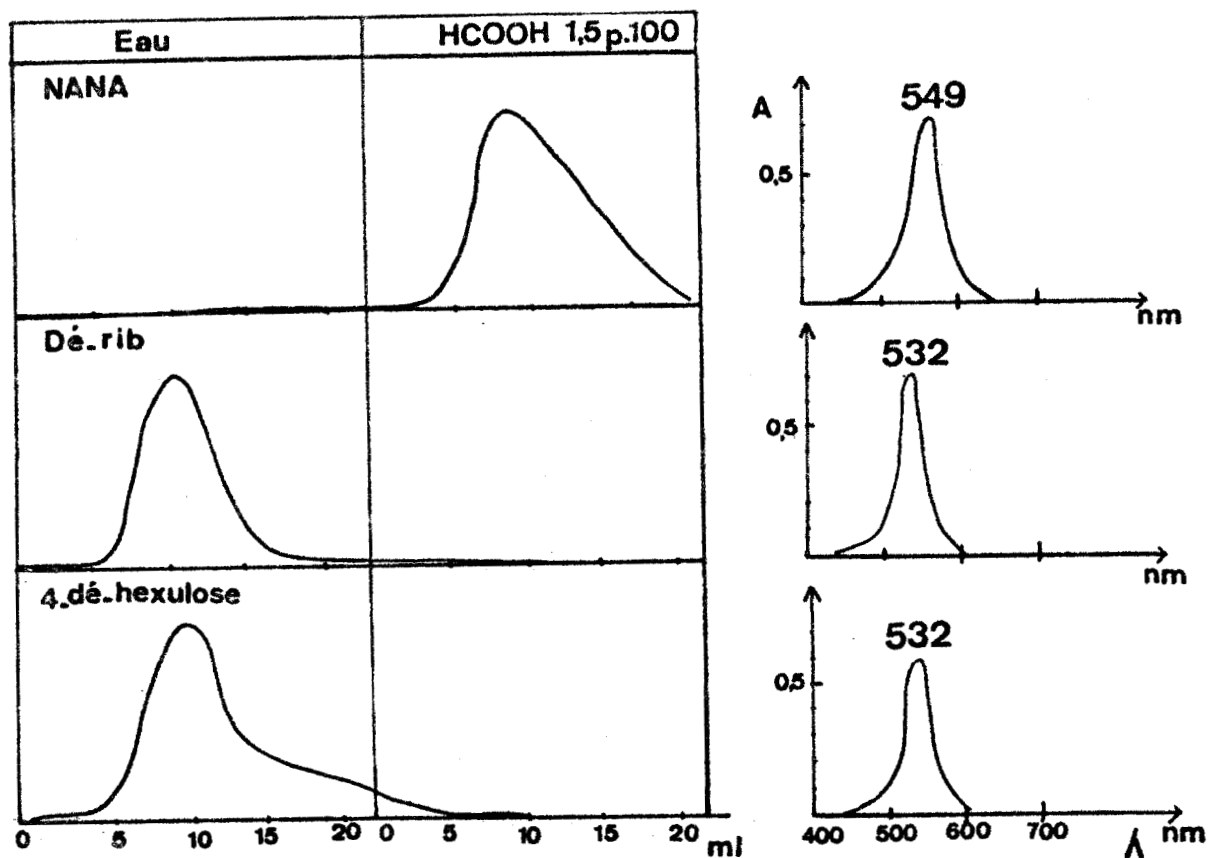


Figure 23

Planche A : Chromatographie sur résine échangeuse d'anions des chromogènes obtenus par oxydation périodique des désoxyoses.

Planche B : Courbes d'absorbance des colorations fournies par les chromogènes avec le réactif à l'acide thiobarbiturique.

NANA : acide N-acétylneuraminique ; Dé-rib. : désoxy-ribose.

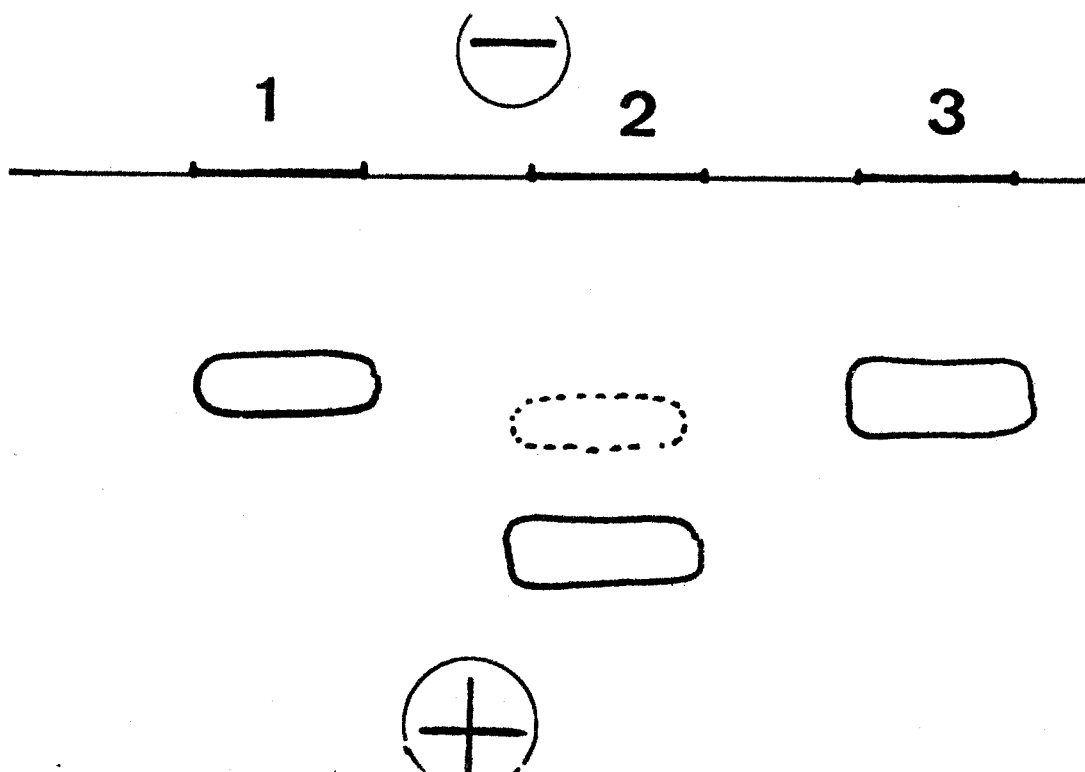


Figure 24

BUS
LILLE

Electrophorèse dans le tampon de MICHL (pH 3,9) des chromogènes obtenus par l'action de l'acide periodique sur le 2-désoxyribose (A), l'acide N-acétylneuraminique (B) et le 4-désoxycétose de synthèse.

tel glucide dans l'urine pose donc le problème de son origine, dont nous discuterons dans un prochain chapitre (voir p.107).

B - LES CETOSES 2a et 2b

Les cétooses 2a et 2b existent dans l'urine en très faibles quantités et possèdent, d'autre part, un comportement chromatographique très voisin dans la plupart des systèmes-solvants. Il ne nous a pas été possible de les isoler à l'état pur et leur identification a été réalisée sur un mélange des deux composés.

1 - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Les cétooses 2a et 2b possèdent respectivement le comportement chromatographique du ribulose et du xylulose dans tous les systèmes-solvants utilisés (Tableau XIV ; p.96). Les colorations obtenues avec différents révélateurs spécifiques des cétooses sont celles des cétopentoses (Tableau XV ; p.100).

2 - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES OSAZONES

Nous avons préparé les phénylosazones du mélange de cétopentoses et nous avons étudié leur comportement chromatographique sur couche mince de silice dans le système-solvant de RINK et HERRMANN (229) : les phénylosazones des cétooses 2a et 2b possèdent respectivement les vitesses de migration de la ribosazone ($R_f : 0,91$) et de la xylosazone ($R_f : 0,72$) (Figure 25 ; p.86).

3 - CONCLUSION ET DISCUSSION

L'urine humaine renferme de faibles quantités de xylulose (1 à 5 mg/litre) et du ribulose (1 à 5mg/litre). Nos résultats confirment ceux de FUTTERMAN et ROE (230,231) qui avaient pu, de leur côté, préciser que le xylulose était de la forme L, comme dans le cas de pentosurie.

C - LE CETOSE 3

1 - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Le cétoose 3 possède dans tous les systèmes-solvants utilisés la vitesse de migration de l'allulose, préparé par épimérisation chimique du fructose (Tableau XIV ; p.96). Les réactions colorées, obtenues avec différents révélateurs spécifiques des cétooses, sont celles des cétohexuloses (Tableau XIV ; p.100).

2 - POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE

Le pouvoir rotatoire spécifique du cétoose 3 ($+3,1$) correspond à peu de différence près, à celui du D-allulose ($+3,8$).

3 - REACTION COLORIMETRIQUE DE DISCHE-BORENFREUND (232)

Le cétoose 3 et l'allulose fournissent avec le réactif de DISCHE-

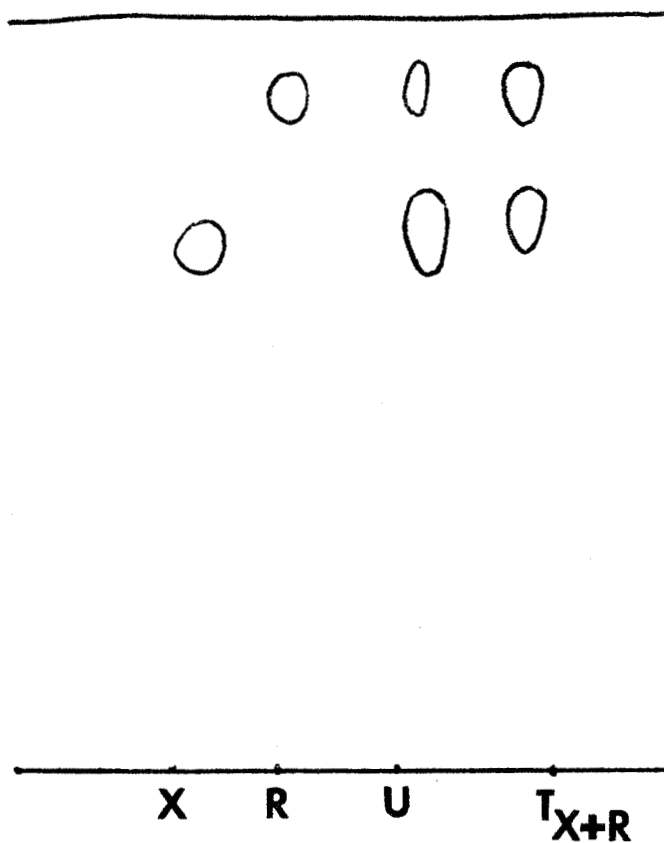


Figure 25

Chromatographie sur couche mince de silice des phénylosazones des cétopentoses urinaires. Système-solvant : chloroforme - dioxanne - tétrahydrofuranne - tétraborate de sodium 0,1 M (40 : 20 : 20 : 1,5).

X : xylosazone témoin; R : ribosazone témoin;

U : osazones des cétopentoses 2a et 2b isolés de l'urine

BORENFREUND, à la cystéine-carbazol, des colorations identiques dont la longueur d'onde maximum d'absorbance de la lumière est de 560 nm (Figure 29 ; p. 93).

4 - SYNTHESE DES OSAZONES

Nous avons comparé les principales propriétés physico-chimiques des phénylosazones de l'allulose urinaire et témoin : l'étude de la morphologie des cristaux (Fig.30 ; p.94), de leur point de fusion et de leur pouvoir rotatoire spécifique (Tableau XV ; p.100) confirme qu'il s'agit du D(+) allulose.

5 - CONCLUSION ET DISCUSSION

L'urine renferme 10 à 30 mg de D(+)allulose par litre. La présence dans l'urine d'un cétose inconnu avait déjà été signalée par MONTREUIL et BOULANGER (233) et par WHITE et HESS (234), avant que MONTREUIL et GOUBET (235) ne l'aient identifié à l'allulose, par chromatographie sur papier. Il était, en outre, intéressant de préciser le pouvoir rotatoire spécifique de ce cétose, qui ne semble pas, jusqu'à présent, être largement répandu dans la Nature. En effet, sa présence a seulement été signalée, à l'état libre, dans le résidu infermentescible de mélasses de canne à sucre (ZERBAN et SATTLER) (236), parmi les produits d'oxydation de l'allitol par Acetobacter xylinium (STEIGER ET REICHSTEIN) (237), dans diverses espèces d'Itea (HOUGH et STACEY) (238) et, sous une forme combinée : la psicofuranine, dans des filtrats de Streptomyces hygroscopicus (EBLE et coll.) (239) Le problème de son origine dans l'urine humaine sera donc envisagé plus loin (voir p.107).

D - LE CETOSE 4

1 - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Le cétose 4 possède la vitesse de migration d'un hexose dans la plupart des systèmes-solvants (Tableau XIV ; p.96) mais fournit avec les réactifs spécifiques des cétoles les colorations d'un cétopentose (Tableau XIV ; p. 96).

2 - SYNTHESE DU CETOSE 4

L'épimérisation du fructose par l'eau de chaux conduit à la formation d'un glucide à l'état de traces qui possède le comportement chromatographique du cétole urinaire 4 (observation personnelle). Nous avons alors pensé qu'il pouvait s'agir du "glucose" ou 3-cétofructose dont l'existence avait été posée en hypothèse par LOBRY DE BRUYN et VAN EKENSTEIN (240) et dont les tentatives de caractérisation étaient depuis restées vaines.

L'épimérisation du fructose ne fournit cependant que des quantités infimes de 3-cétofructose et nous avons utilisé, pour le préparer, un procédé

personnel qui consiste à oxyder le mannitol, à chaud, par le brome.

a - Mode opératoire

1 g de mannitol est dissous dans 10 ml d'eau saturée en brome et la solution est portée à ébullition pendant 20 mn. Après refroidissement, le brome est éliminé par ventilation d'air froid et l'acide bromhydrique formé au cours de la réaction est éliminé par passage sur une résine échangeuse d'anions (Duolite A-40 ; "mesh 25-50" ; forme formiate). L'analyse chromatographique est effectuée dans le système-solvant : acétate d'éthyle/ pyridine/eau (8:2:1), qui seul, permet de séparer efficacement le fructose du 3-cétofructose.

b - Résultats

Le protocole expérimental décrit ci-dessus permet de préparer avec un faible rendement un cétose qui possède le comportement chromatographique du cétose 4 de l'urine. Le mécanisme d'action du brome sur le mannitol permet d'identifier ce cétose au 3-cétofructose (Fig.26 ; p.89).

3 - PROPRIETES CHIMIQUES DU 3-CETOFRICTOSE

Nous avons confirmé l'identification du 3-cétofructose sur la base de l'expérimentation suivante : dans un premier temps, le glucide 4 isolé de l'urine et le 3-cétofructose de synthèse ont été réduits par le borohydrure de potassium et les 2 hexitols épimères formés ont été oxydés, dans un second temps, par l'eau de brome à 100°C. L'identification, parmi les produits d'oxydations bromique, de l'allulose, du tagatose et du fructose (Fig.27 ; p.90) nous conduit à la conclusion que les deux hexitols étaient l'altritol et le mannitol, qui ne peuvent s'être formés, par réduction, qu'à partir du 3-cétofructose (Fig.26 ; p.89).

4 - CONCLUSION ET DISCUSSION

L'urine humaine renferme 5 à 10 mg de 3-cétofructose. Ce cétose avait déjà été décrit par WHITE et HESS (241) (cétose 5 de la planche B ; Fig.4 ; p.17) qui ne formulaient aucune hypothèse quant à sa nature. Ce glucide n'a jamais été caractérisé dans aucun milieu naturel et nous discuterons plus loin de son origine possible dans l'urine humaine. Nous noterons enfin que ces travaux sur le 3-cétofructose urinaire nous ont permis de démontrer que l'épimérisation du fructose par l'eau de chaux conduisait bien à la formation de "glutose", comme le pensaient LOBRY DE BRUYN et VAN EKENSTEIN (242), résultat qui confirme le mécanisme d'épimérisation des glucides décrit par ces auteurs.

E - LE CETOSE 5a

1 - IDENTIFICATION DE L'ALLO-HEPTULOSE

Le cétose 5a existe dans l'urine à l'état de traces et possède

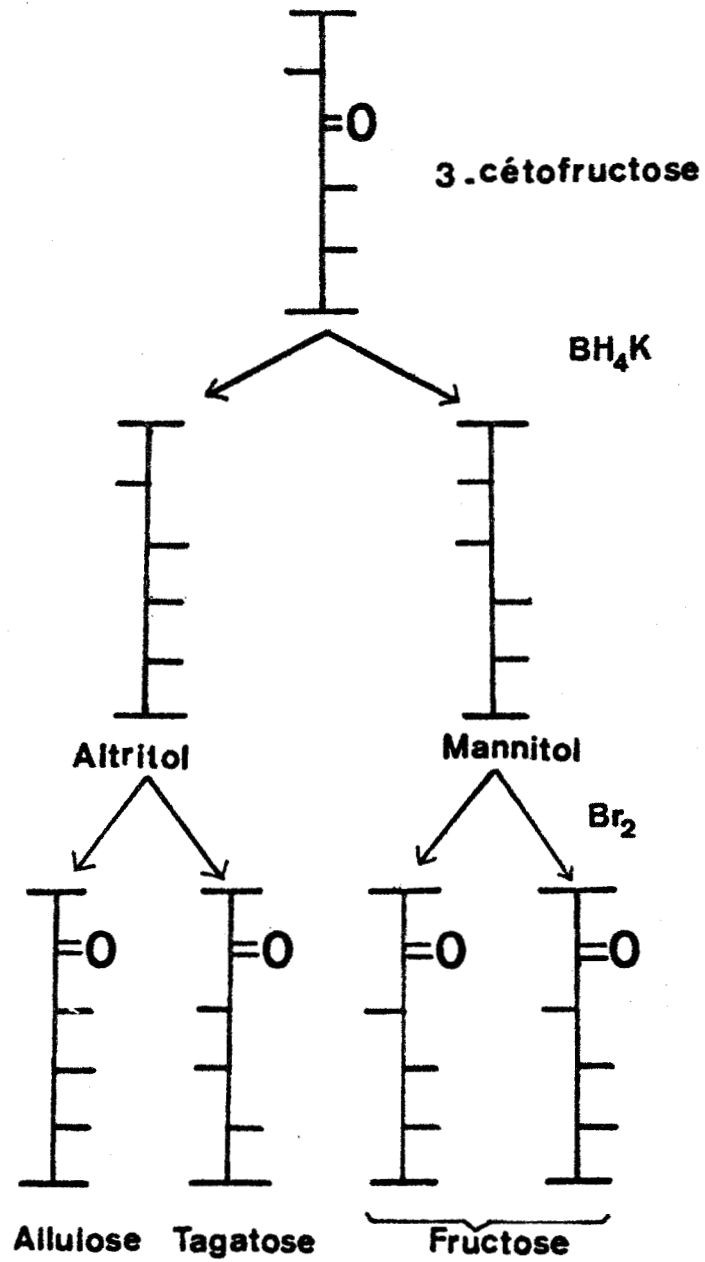


Figure 26

Schéma des réactions chimiques utilisées pour identifier le 3-cétofructose.



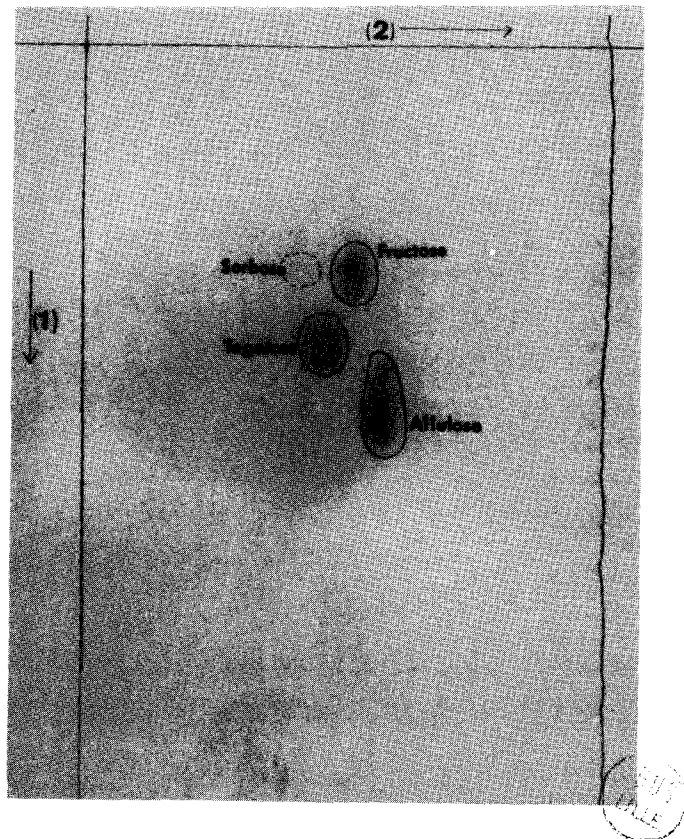


Figure 27

Chromatographie bidimensionnelle sur papier des cétooses obtenus par oxydation bromique de l'altritol et de mannitol formés par la réduction du 3-céto-fructose par le borohydrure de potassium. Papier Whatman n° 3. Système-solvant (1) : acétate d'éthyle/pyridine/eau (8 : 2 : 1) ; système-solvant (2) : phénol saturé d'eau (atmosphère ammoniacale). Révélation par l'urée chlorhydrique. Le cercle tracé en pointillé marque l'emplacement virtuel du sorbose, absent du milieu réactionnel.

dans la plupart des systèmes-solvants un comportement chromatographique trop voisin de celui du fructose pour que nous puissions l'isoler à l'état pur par chromatographie préparative sur papier. Nous avons dû limiter notre étude à celle de son comportement chromatographique, que nous avons comparé avec celui des heptuloses dont il fournit les réactions colorimétriques spécifiques (Tableau XIV ; p.96). Il possède, d'autre part, la vitesse de migration de l'allo-heptulose de synthèse (*) ou préparé par épimérisation du sédoheptulose par l'eau de chaux (Figure 28 ; p.92). Le comportement chromatographique très différent des 7 autres heptuloses possible (Tableau XIV ; p.96) exclut tout risque d'erreur d'interprétation.

2 - CONCLUSION ET DISCUSSION

L'urine renferme 1 à 5 mg/litre d'allo-heptulose. Ce glucide n'a été identifié jusqu'à présent qu'une seule fois, par BEGBIE et RICHTMYER (243) qui l'ont isolé d'extraits de Primula officinalis. L'origine alimentaire de ce cétose semble donc plausible et des travaux ultérieurs permettront sans nul doute de mieux définir sa répartition dans le monde végétal.

F - LE CETOSE 5b

1 - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Le cétose 5b possède dans tous les systèmes-solvants utilisés la vitesse de migration du fructose (Tableau XIV ; p.95). Il fournit avec les révélateurs spécifiques des cétoles les colorations caractéristiques des hexuloses (Tableau XIV ; p.95).

2 - POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE

Le pouvoir rotatoire spécifique du cétose 5b en solution aqueuse est identique à celui du D-fructose soit $[\alpha]_D^{20} = -92,4^\circ$

3 - REACTION COLORIMETRIQUE DE DISCHE-BORENFREUND (244)

Le cétose 5b et le fructose fournissent avec le réactif de DISCHE-BORENFREUND, à la cystéine-carbazol, une coloration bleue dont la longueur d'onde maximum d'absorbance de la lumière est identique : 560 nm (Fig.29 ; p.93).

4 - SYNTHESE DES OSAZONES

L'étude comparée de la morphologie (Fig.30 ; p.94), du point de fusion et du pouvoir rotatoire spécifique (Tableau XV ; p.100) des cristaux de

(*) Un échantillon d'allo-heptulose de synthèse nous a été aimablement fourni par N.K. RICHTMYER à qui nous adressons nos vifs remerciements.

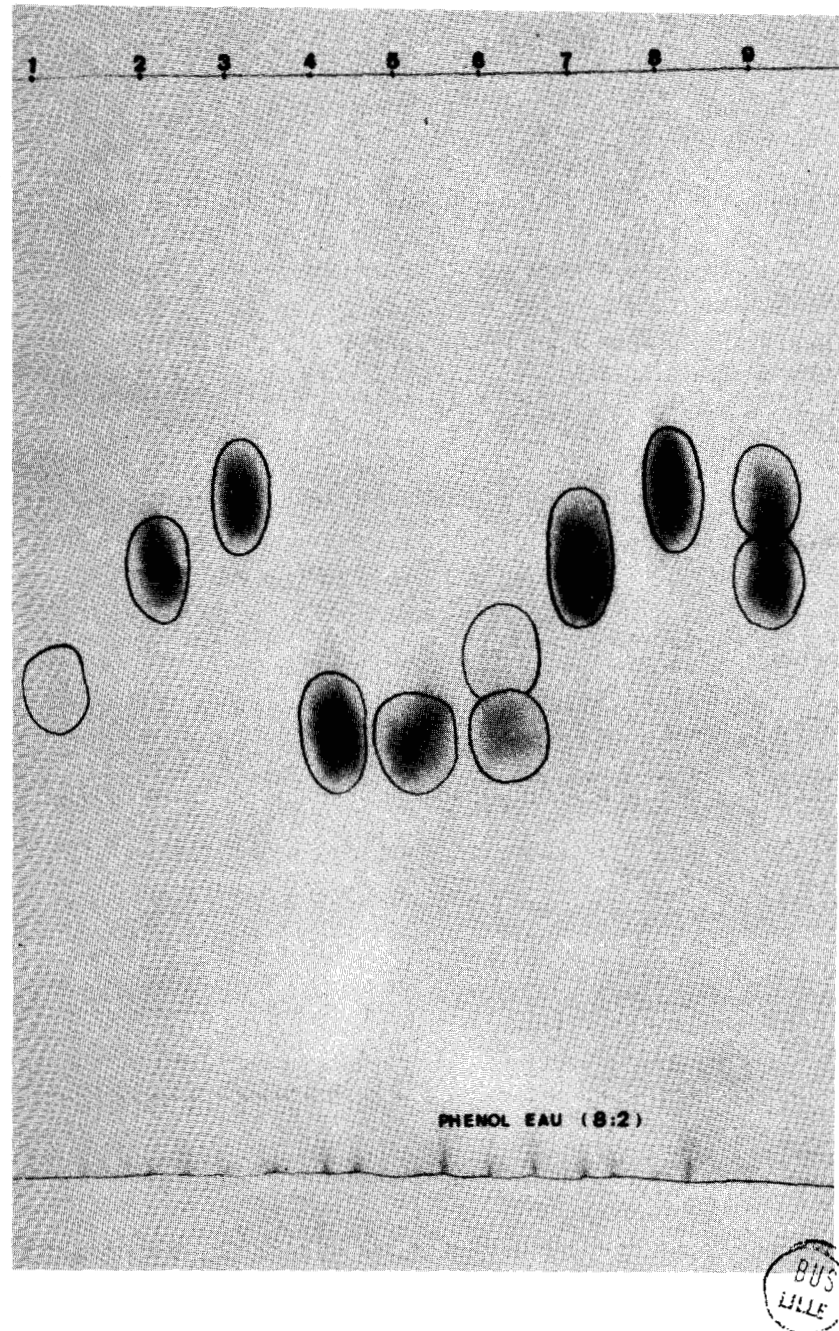


Figure 28

Chromatographie sur papier des heptuloses isolés de l'urine. Papier Whatman n° 1. Système-solvant : phénol saturé d'eau. Sucres témoins : 1 : fructose ; 2 : sédoheptulose ; 3 : mannoheptulose ; 4 : allo-heptulose de synthèse (RICHTMYER) ; 5 : allo-heptulose obtenu par épimérisation du sédoheptulose ; 9 : mélange de 2 et 2. Sucres urinaires : 6 : fructose + allo-heptulose ; 7 : sédoheptulose ; 8 : manno-heptulose.

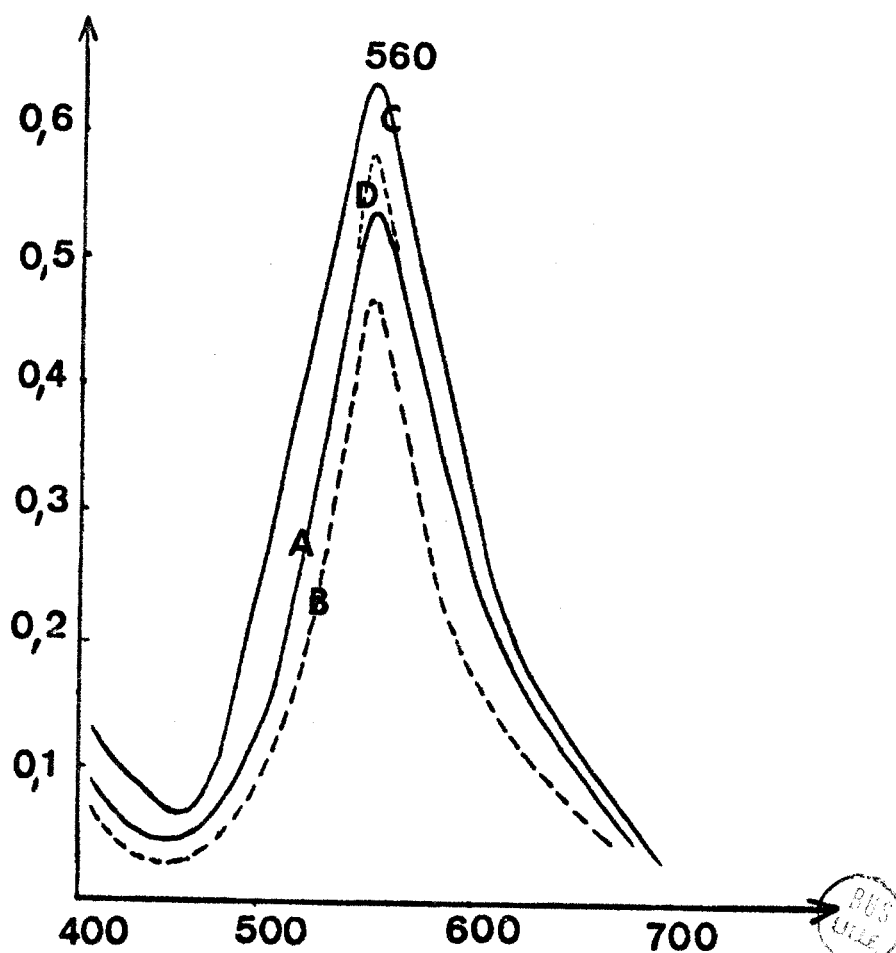


Figure 29

Courbes d'absorption des colorations données par l'allulose urinaire (A), l'allulose de synthèse (B), le fructose urinaire (C) et le fructose commercial (D) avec le réactif de DISCHE-BORENFREUND (245) à la cystéine-carbazol.

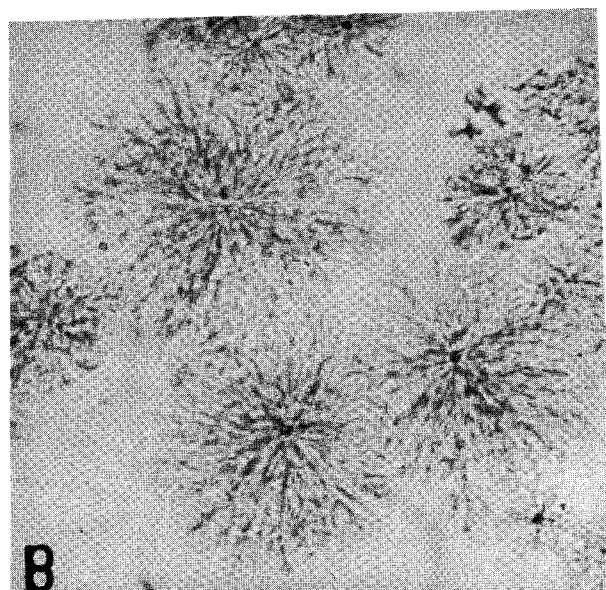
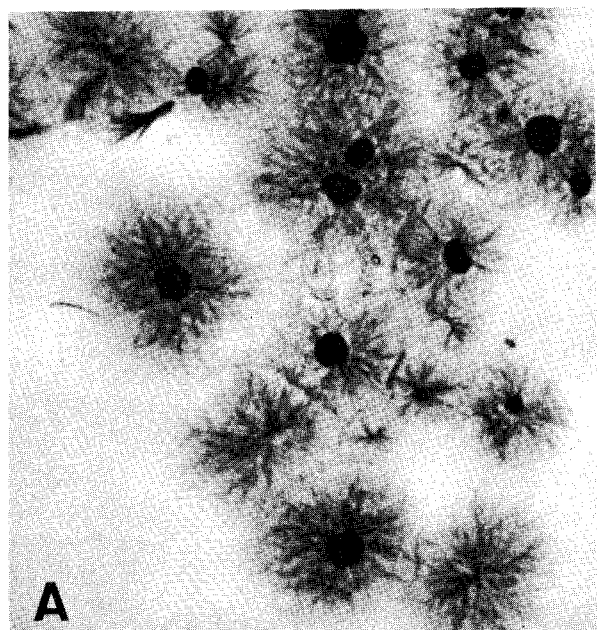


Figure 30

Micro-photographie des cristaux de phénylosazone de l'allulose de synthèse (A) de l'allulose urinaire (B), du fructose commercial (C) et du fructose urinaire (D)

phénylosazone du fructose commercial et du cétose 5b confirme que ce dernier est le D-fructose.

5 - CONCLUSION ET DISCUSSION

L'urine renferme 10 à 30 mg de D-fructose. Ce taux, relativement constant chez l'adulte est parfois légèrement supérieur chez le très jeune enfant. La présence de fructose dans l'urine humaine normale avait été signalée par MONTREUIL et BOULANGER (246), WHITE et HESS (247) et FLEURY, MALAGEAU et EBERHARD (248). Nous confirmons que le fructose urinaire est le D-fructose, seule forme rencontrée dans la nature jusqu'à présent.

G - LE CETOSE 6

1 - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

La vitesse de migration du cétose 6 est celle du sédoheptulose dans tous les systèmes-solvants utilisés (Fig.28 ; p.92 et Tableau XIV ; p. 96).

Les révélations spécifiques des cétooses, appliqués aux préparations du cétose 6, confirment qu'il s'agit d'un heptulose (Tableau XIV ; p. 96).

2 - REACTION COLORIMETRIQUE DE DISCHE-BORENFREUND

Le cétose 6 et le sédoheptulose de référence fournissent avec le réactif de DISCHE-BORENFREUND (249) à la cystéine-carbazol des colorations dont les longueurs d'onde d'absorbance maximales sont identiques : 550 nm (Fig.31 ; p.97).

3 - SYNTHESE DES OSAZONES

L'étude comparée de la morphologie (Fig.32 ; p.98), du point de fusion et du pouvoir rotatoire spécifique (Tableau XV ; p.100) des cristaux de phénylosazone du sédoheptulose préparé à partir des feuilles de Sedum et du sédoheptulose isolé de l'urine confirme que ce dernier est le D-alto-heptulose.

4 - CONCLUSION ET DISCUSSION

L'urine humaine renferme 5 à 10 mg de sédoheptulose par litre. Nous confirmons les résultats de WHITE et HESS (250) et montrons, en outre, qu'il s'agit bien du D-alto-heptulose, cétose très largement répandu dans le monde végétal, et métabolite intermédiaire du cycle de la photosynthèse et de la chaîne des pentoses.

H - LE CETOSE 7

1 - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Le cétose 7 possède dans tous les système-solvants utilisés la vitesse de migration du manno-heptulose (Tableau XIV ; p.96)et fournit avec

T a b l e a u XIV

Comportement chromatographique dans différents systèmes-solvants et réactivité de divers cétooses purs et extraits des urines humaines

Nature et origine (a) des cétooses	Systèmes-solvants (b)				Réactifs (c)				
	1 R _F	2 R _{ME} (d)	3 R _{FRU} (e)	4 R _F	A	Ur	O	V	PDMAB
Erythrulose (P)	-	-	-	0,81	brun				
Ribulose (P et U)	0,32	-	2,88	0,63	brun		rose		
Xylulose (P et U)	0,32	-	3,16	0,58	brun		pourpre		
Allulose (P et U)	0,28	-	1,95	0,57	brun	bleu	jaune	bleu	
3-cétofructose (P et U)	0,26	-	-	0,59	brun	rose	rouge		
Fructose (P et U)	0,22	-	1	0,19	0,51	brun	bleu	jaune	bleu
Sorbose (P)	0,23	-	-	0,42	brun	bleu	jaune	bleu	
Tagatose (P)	0,23	-	1,30	0,48	brun	bleu	jaune	bleu	
Desoxycetose X (U)	0,37	-	2,50	0,72	jaune			bleu	violet
Heptuloses									
Allo- (P et U)	0,23	-	-	0,60	brun			orange	
Altro- (P et U)	0,18	1,20	-	0,19	0,46	brun		orange	
Galacto- (P)	-	0,88	-	0,15	0,48	brun		orange	
Gluco- (P)	-	0,93	-	0,16	0,42	brun		orange	
Gulo- (P)	-	-	-	0,21	0,53	brun		orange	
Ido- (P)	-	-	-	0,22	0,50	brun		orange	
Manno- (P et U)	0,15	1	-	0,16	0,40	brun		orange	
Talo- (P)	-	1,38	-	-	-	brun		orange	

(a) P : échantillons purs du commerce ou de synthèse ; U : glucides d'origine urinaire ; (b) systèmes-solvants : 1 : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) ; 2 : acétate d'éthyle/pyridine/eau (8 : 2 : 1) ; 3 : acétate d'éthyle/acide acétique/eau (3 : 1 : 3) ; 4 : phénol saturé d'eau en atmosphère ammoniacale ; (c) réactifs : A : oxalate d'aniline ; Ur : urée chlorhydrique ; O : orcinol trichloracétique ; V : vanilline ; PDMAB : p-diméthylaminobenzaldéhyde trichloracétique ; (d) : vitesse de migration par rapport au manno-heptulose ; (e) : vitesse de migration par rapport au fructose.

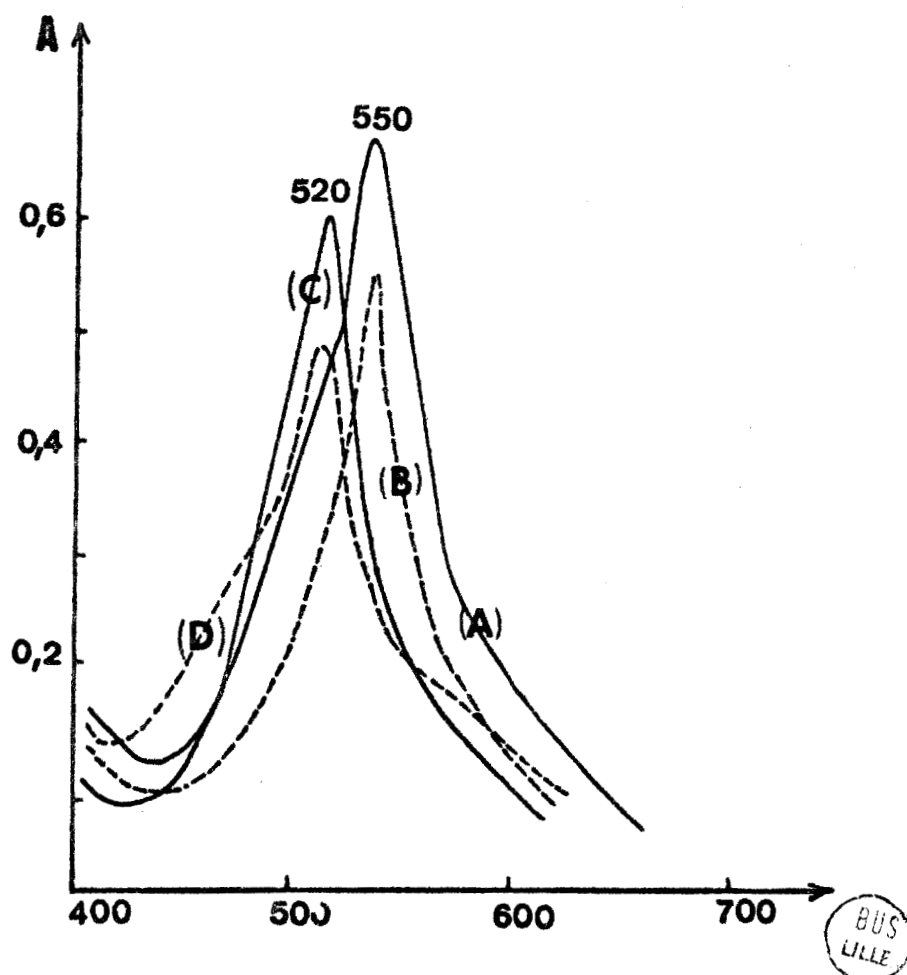


Figure 31

Courbes d'absorption des colorations données par le sédoheptulose préparé à partir de feuilles de sédum (A), le sédoheptulose isolé de l'urine (B), le manno-heptulose commercial (C) et le manno-heptulose isolé de l'urine (D) avec le réactif de DISCHER-BORENFREUND (259) à la cystéine-carbazol.

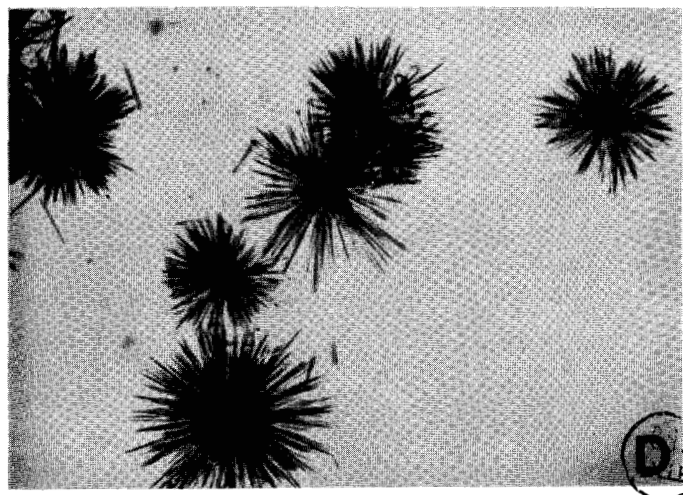
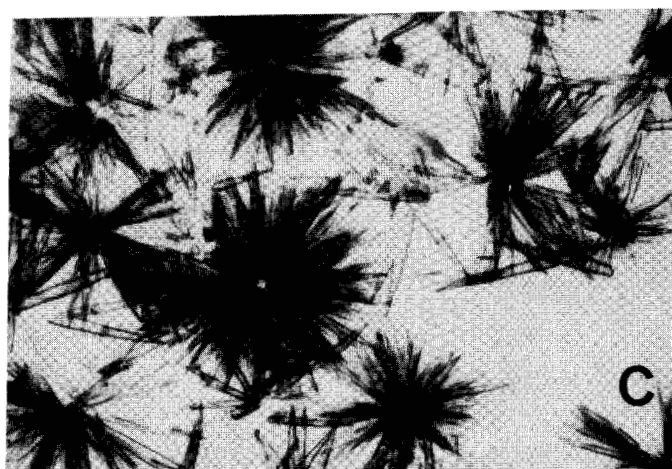
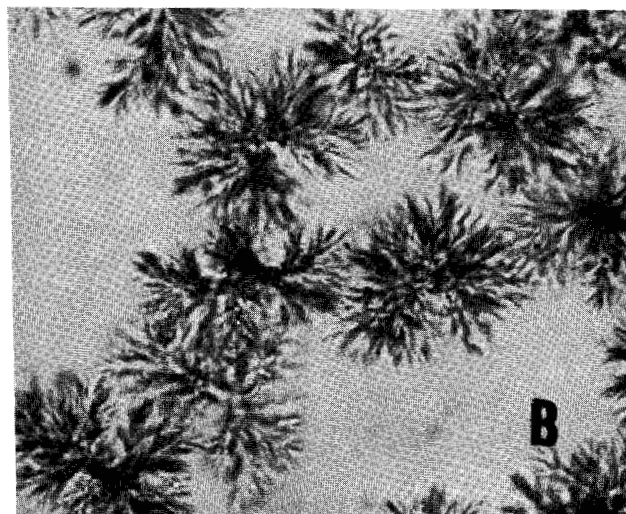
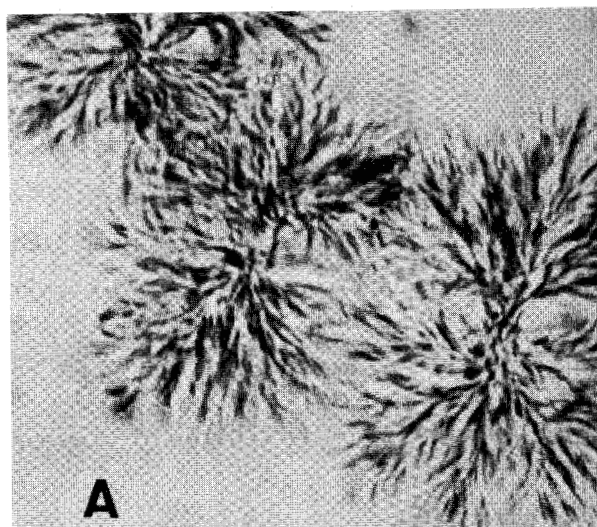


Figure 32

Micro-photographie des cristaux de phénylosazone du sédoheptulose isolé de Sedum (A), du sédoheptulose urinaire (B), du mannoheptulose commercial (C) et du manno-heptulose urinaire (D).

les révélateurs spécifiques des cétooses les colorations spécifiques des heptuloses (Tableau XIV ; p.100).

2 - FOUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE

Le pouvoir rotatoire spécifique du cétoose 7 : $[\alpha]_D^{20} = +28^{\circ}5$ correspond à celui du D-manno-heptulose commercial : $[\alpha]_D^{20} = +29^{\circ}3$

3 - REACTION COLORIMETRIQUE DE DISCHE-BORENFREUND (260)

Le cétoose 7 et le manno-heptulose de référence fournissent avec le réactif à la cystéine-carbazol des colorations identiques dont la longueur d'onde d'absorbance maximale est de 520 nm (Fig.31 ; p.97).

4 - SYNTHESE DES OSAZONES

L'étude comparée de la morphologie (Fig.32 ; p.98) du point de fusion et du pouvoir rotatoire spécifique (Tableau XV ; p.100); des cristaux de phénylosazone du cétoose 7 et du D-manno-heptulose commercial confirme qu'il s'agit bien du D-manno-heptulose.

5 - CONCLUSION ET DISCUSSION

L'urine humaine renferme 4 à 8 mg de D-manno-heptulose par litre. Nous confirmons les résultats de WHITE et HESS (261) et précisons d'autre part, l'isomérisation optique de ce cétoose urinaire.

Le D-manno-heptulose est peu répandu dans la Nature et seuls quelques Végétaux en renferment des quantités plus ou moins importantes : l'Avocatier (Persea gratissima) (LAFORGE) (262), Medicago sativa, Papaver somniferum et Ficus carica (Revue générale de BEGBIE et RICHTMYER) (263). Nous envisagerons plus loin le problème de son origine dans l'urine.

III - ETUDE DES N-ACÉTYLOSAMINES URINAIRES

Le très faible taux de N-acétylosamines urinaires ne nous a pas permis d'isoler des quantités suffisantes de ces substances pour étudier leurs propriétés physico-chimiques et nous avons dû nous limiter à l'étude de leur comportement électrophorétique.

A - IDENTIFICATION ELECTROPHORETIQUE DES N-ACÉTYLOSAMINES URINAIRES

L'électrophorèse sur papier des N-acétylosamines dans le système-tampon borate de sodium à 1 p.100, montre l'existence dans l'urine de N-acétylglucosamine, accompagnée d'une faible quantité de N-acétylgalactosamine (Fig.33 ; p.101).

B - CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Nous avons montré que l'urine humaine normale renfermait de la N-acétylglucosamine et de la N-acétyl-galactosamine libre, à l'état de traces

T a b l e a u X V

Propriétés physiques comparées des phénylosazones de
cétoses purs et de cétozes urinaires.

Nature des cétoses	Origine	P.F. (a)	$[\alpha]_D^{20}$ (b)	
D-allulose	Pur	159-163	- 74 → - 68	} Pyridine
	Urine	156-160	- 74 → - 66	
D-fructose	Pur	207	- 72 → - 40	} Pyridine- éthanol (2:3) (v:v)
	Urine	200-201	- 68 → - 35	
Heptuloses :				
<u>D-manno</u>	Pur	198-199	+ 80 → - 7	} id.
	Urine	195-196	+ 81 → - 5	
<u>D-altro</u>	Pur	191-192	- 64 → - 47	} id.
	Urine	190-192	- 64 → - 48	

(a) en degrés centigrades ; (b) en degrés.



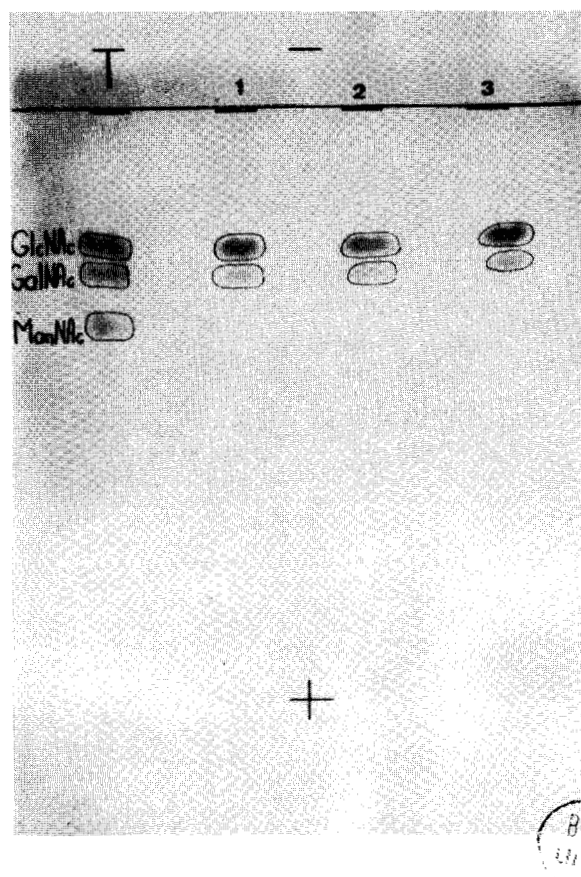


Figure 33

Electrophorèse sur papier des N-acétylosamines urinaires. Papier Whatman n° 3. Système-tampon : borate de sodium à 1 p. 100. Révélation par le p-diméthylaminobenzaldéhyde.

(de 1 à 2 mg par litre). Ces valeurs sont en parfait accord avec celles de PECHAN (264) et peuvent sembler particulièrement faibles si l'on considère le rôle important des osamines dans le métabolisme des glycoprotéines.

IV - ETUDES DES ACIDES URONIQUES URINAIRES

A - IDENTIFICATION ELECTROPHORETIQUE DES ACIDES URONIQUES

Les préparations d'acides uroniques ou de lactones isolées de l'urine par chromatographie préparative sur échangeur d'anions et sur papier (voir p.63) ont été identifiées par électrophorèse sur papier dans le système tampon de HAUGH et LARSEN (265). Les lactones étaient mises en solution dans l'ammoniaque à 1 p.100 de manière à ouvrir les ponts lactoniques.

L'application de ce procédé électrophorétique nous a permis de mettre en évidence l'acide glucuronique, à l'exclusion de tout autre acide uronique (Figure 34 ; p.103). Le taux de l'acide uronique libre isolé de l'urine par chromatographie sur résine échangeuse d'ions représente 50 à 80 p.100 de l'acide uronique total urinaire.

B - CONCLUSION ET DISCUSSION

L'acide glucuronique est le seul acide uronique présent dans l'urine humaine. Seule, une certaine proportion de l'acide glucuronique urinaire total existe à l'état libre, la différence étant probablement constituée de glucurono-conjugués dont nous n'avons pas poursuivi l'étude.

V - ETUDE DES ACIDES SIALIQUES URINAIRES

A - IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES SIALIQUES URINAIRES

La chromatographie sur papier des acides sialiques isolés de l'urine humaine normale dans les systèmes-solvants de NORDAL et OIETH (266) : acétate d'éthyle/pyridine/eau (3:1:3) et de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (267) : n-butanol/n-propanol/acide chlorhydrique 0,1 N (1:2:1) montre l'existence d'un seul composé, révélé avec le réactif à l'orcinoïl trichloracétique (Fig.35 ; p.104) qui possède le comportement chromatographique de l'acide N-acétylneuraminique. La révélation au p-diméthylaminobenzaldéhyde met en évidence, outre le composé précédent, un certain nombre de taches dont certaines possèdent le comportement chromatographique des acides N,O-di ou tri-acétylneuraminiques (Fig.35 ; p.104). Cependant, la révélation à l'orcinoïl trichloracétique, bien que plus sensible, fournit avec ces composés un résultat négatif.

B - CONCLUSION ET DISCUSSION

L'urine humaine renferme 6 à 10 mg d'acide N-acétylneuraminique

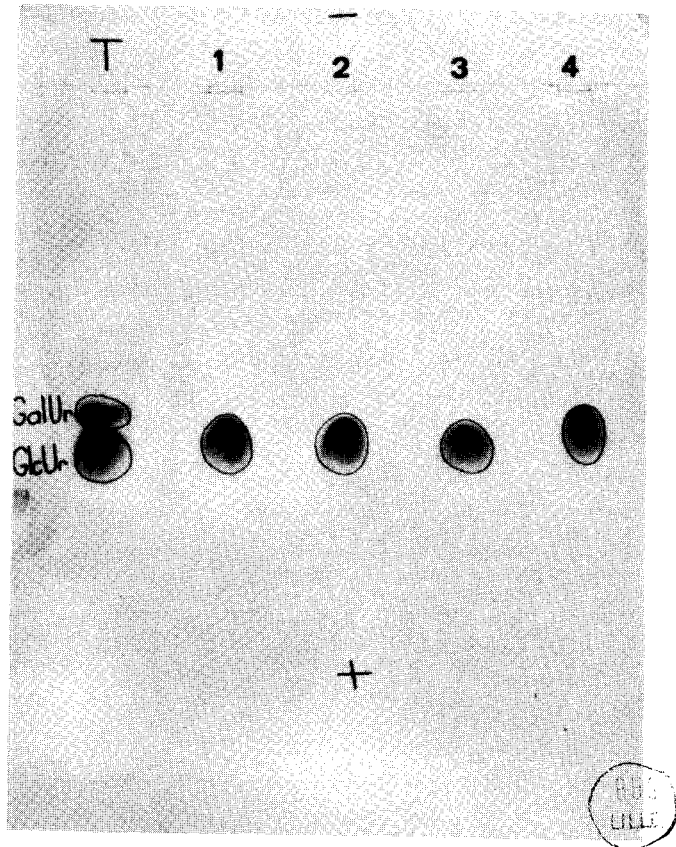


Figure 34

Electrophorèse sur papier des acides uroniques urinaires. Papier Whatman n° 3. Système-tampon de HAUGH et LARSEN (268). Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

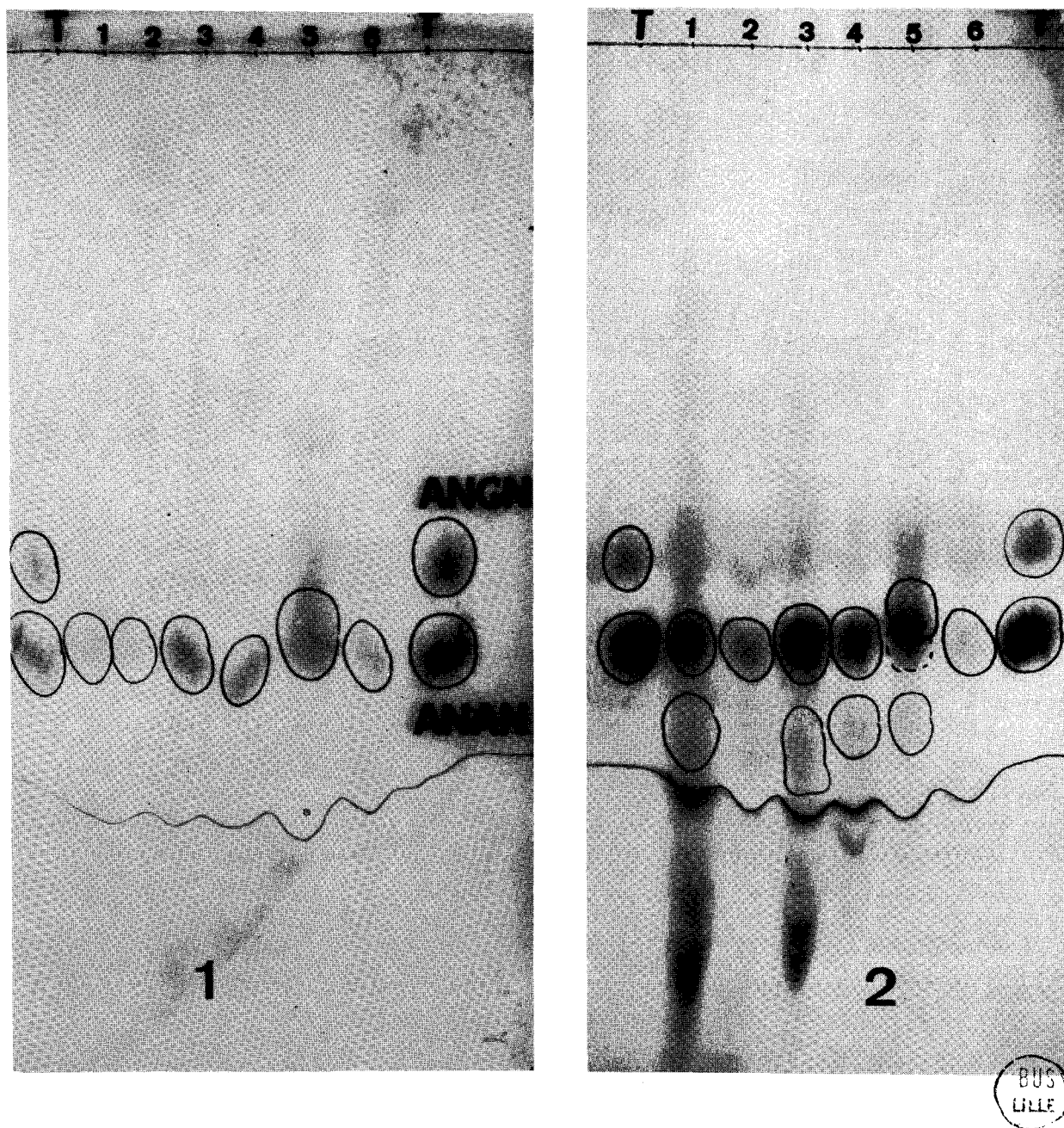


Figure 35

Chromatographie sur papier des acides sialiques urinaires.
 Papier Whatman n° 3. Système-solvant : *n*-butanol/*n*-propanol/
 HCl 0,1 N (1 : 2 : 1). Révélatons : (1) : Orcinol trichloro-
 cétique ; (2) : *p*-diméthylaminobenzaldéhyde. T : solutions
 témoins de glucides purs ; ANGN : acide N-glycolylneuraminique ;
 ANAN : acide N-acétylneuraminique.

par litre. Les autres acides sialiques (N-glycolyl et N-O-di ou triacétylneuraminiques) sont absents de nos préparations : en effet, ces acides sialiques réagissent également avec les réactifs au p-diméthylaminobenzaldéhyde et à l'orcinol trichloracétique et les substances mises en évidence par chromatographie sur papier et ne réagissant qu'avec le réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde sont probablement des produits de dégradation de l'acide N-acétylneuraminique.

3° - CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude sur les monosaccharides urinaires sont les suivantes :

1 - Nous avons mis au point une série de procédés chromatographiques qui, associés à la détermination des propriétés physico-chimiques des glucides ou de leurs phénylosazones, nous a permis d'identifier dans les urines humaines normales, les monosaccharides suivants :

a - Monosaccharides neutres

 - Aldoses : le D-galactose, le D-glucose, le D-mannose, le L-arabinose, le D-xylose et le L-fucose.

 - Cétoles : le ribulose, le xylulose; le D-allulose, le 3-cétofructose, le D-fructose, les allo- D-altro- et D-manno-heptuloses et un 4-désoxyhexulose.

 - N-acétylosamines : la N-acétylglucosamine et la N-acétylgalactosamine.

b - Monosaccharides acides

 L'acide N-acétylneuraminique et l'acide D-glucuronique.

2 - Nos résultats confirment ceux de MONTREUIL et al. (269) pour le fructose, le galactose, le glucose, le mannose, l'arabinose, le xylose, le fucose et l'allulose ; ceux de FUTTERMAN et ROE (270) pour le xylulose et le ribulose et ceux de WHITE et HESS (271) pour les manno- et sédoheptuloses.

Ces différents auteurs avaient identifié les monosaccharides de l'urine sur la base d'une seule étude chromatographique. L'application de critères physico-chimiques classiques nous ont permis, en outre, d'établir la nature de l'isomérisation optique de la plupart de ces composés.

3 - Nous avons enfin décrit des sucres qui n'avaient jamais été caractérisés dans l'urine, tels : l'allo-heptulose, la N-acétyl-galactosamine et l'acide N-acétylneuraminique ou même identifiés dans la Nature tels le

3-cétofructose et le 4-désoxyhexulose.

4 - La présence dans l'urine de sucres aussi peu habituels que ne le sont l'allulose, le 3-cétofructose ou l'allo-heptulose nous a amené à envisager l'étude de l'origine de ces sucres.

DISCUSSION : ORIGINE DES MONOSACCHARIDES URINAIRES

L'origine de certains sucres urinaires peut s'expliquer aisément. Ils peuvent ainsi provenir soit de l'alimentation, comme le glucose, le fructose, l'arabinose et le xylose -sucres largement répandus dans le monde végétal-, soit de métabolisme intermédiaire des glucides, comme le ribulose, le fructose et le sédoheptulose, soit enfin de la dégradation de glycoprotéines sériques ou tissulaires, comme les N-acétylosamines, l'acide N-acétylneuraminique, le galactose, le mannose et le fucose. Nous avons recherché l'origine possible des autres glucides et vérifié, en particulier, que la présence d'allulose ou de 3 cétofructose dans l'urine ne constituait pas un artefact dû à une épimérisation chimique ou biochimique survenant durant le fractionnement de l'urine ou dans le tractus urinaire. Nous avons étudié enfin l'influence du régime alimentaire ou de l'activité physique des individus sur l'élimination des monosaccharides de l'urine.

1 - EPIMERISATION CHIMIQUE

a - pH de l'urine

Nous avons vérifié que le pH des différentes urines fraîchement recueillies était nettement acide dans chacun des cas (5 pH 6,5). Ces urines contenaient toutes de l'allulose et du 3-cétofructose, sans que l'on puisse mettre en cause une épimérisation chimique qui aurait transformé le glucose ou le fructose en allulose et 3-cétofructose.

b - L'ammoniaque urinaire

Une solution de fructose à 1 p.100 est amenée à pH 9 avec de l'ammoniaque. Cette même solution de fructose a été additionnée au 1/10 par de l'ammoniaque à 5 p.100. Ces solutions ont été portées à 37°C pendant 7 h et au bain-marie bouillant pendant des temps variables. La recherche de l'allulose a été effectuée par contrôle chromatographique.

Nous avons constaté seulement la formation d'allulose dans le cas où la solution de fructose à 10 p.100 d'ammoniaque avait été portée au bain-marie pendant une assez longue durée, ce qui est évidemment incompatible avec les données biologiques.

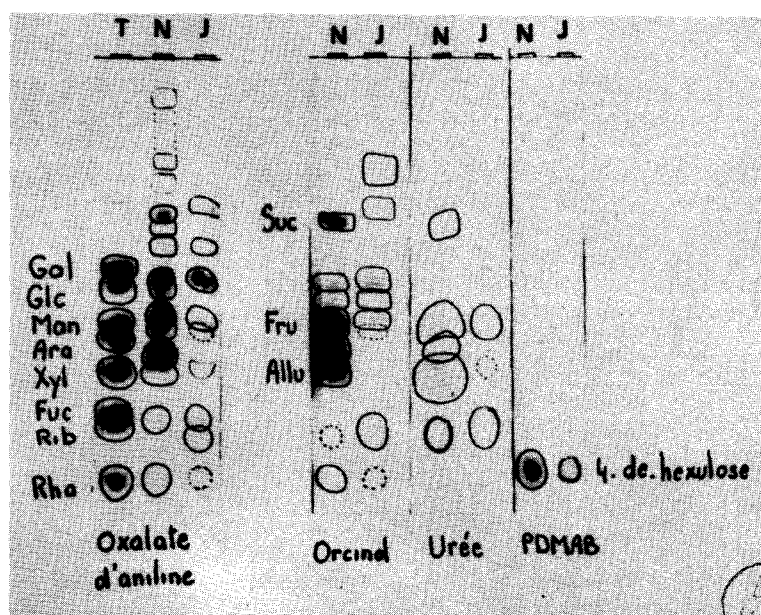


Figure 36

Analyse chromatographique des glucides urinaires au terme d'un jeûne glucidique de trois jours. Papier Whatman n° 3. Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Révélatifs : A : oxalate d'aniline ; B : orcinol trichloracétique ; C : urée chlorhydrique ; D : p-diméthylaminobenzaldéhyde. N : urine normale, concentrée 100 fois, J : urine après trois jours de jeûne, concentrée 200 fois. T : solutions témoins de sucres purs.

c - Passage sur résine échangeuse d'ions

Nous avons vérifié qu'une solution de fructose n'était en rien altérée par le passage sur les colonnes de Dowex 50 ou de Duolite A-40 qui ont servi au fractionnement de l'urine.

2 - EPIMERISATION BIOCHIMIQUE

La fraction "surnageant alcoolique" à laquelle n'a été ajouté aucun agent antibiotique (toluène ou chloroforme) contient de l'allulose. A la fraction adialysable du précipité, qui ne renferme pas d'allulose, est alors ajouté 50 mg de fructose. Après une dialyse de 3 jours contre de l'eau distillée, les fractions adialysables et dialysables ne renferment pas d'allulose.

D'autre part, nous avons établi la présence d'allulose dans les urines de rats "germ-free".

Ces considérations nous permettent de conclure que l'allulose ne se forme pas à partir du fructose sous l'action d'une épimérase qui serait contenue dans l'adialysable urinaire ou sous l'action d'enzymes bactériennes.

3 - ORIGINE ALIMENTAIRE

Nous avons recherché l'allulose dans un grand nombre d'aliments glucidiques courants (pain, confiture, pommes de terre) et ces analyses ont toutes fourni des résultats négatifs.

Après un jeûne glucidique total des trois jours, l'analyse chromatographique (Fig.36 ; p.107) montre que la concentration de certains glucides urinaires est étroitement liée au régime alimentaire : l'allulose, le 3-cétofructose, le manno-heptulose, le xylose et l'arabinose ont totalement disparu. D'autres ont vu seulement leur taux décroître : c'est le cas du galactose, du mannose, du fucose, du ribulose, du xylulose, du sédoheptulose et du fructose, qui possèdent donc une origine métabolique (métabolisme des glycoprotéines ou métabolisme intermédiaire des glucides libres). L'urine recueillie après un jeûne glucidique de trois jours renferme encore un taux appréciable de 4-désoxyhexulose : il posséderait donc probablement un rôle métabolique qui reste à définir. Son existence dans l'urine humaine est à rapprocher cependant des travaux de EGYUD, Mc LAUGHLIN et SZENT-GYÖRGYI (272), qui ont isolé du foie de rat un glucide assez voisin ; le 3-désoxy-D-glucosulose. Un régime alimentaire purement végétarien (fruits et légumes verts consommés crus) provoque une diminution du taux de la plupart des sucres de l'urine. En particulier le 3-cétofructose et l'allulose disparaissent complètement et le 4-désoxyhexulose n'apparaît qu'à l'état de traces (fig.37 ; p.109).

Un régime présentant une surcharge en glucides (confitures, miel) modifie sensiblement la composition en glucides urinaires : quantités accrues de lactose, de saccharose, de glucose et de fructose et parfois de

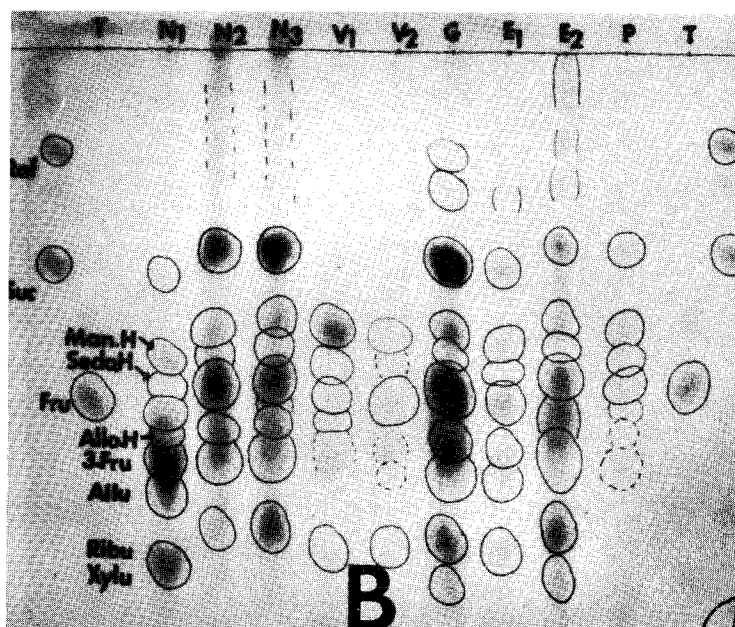
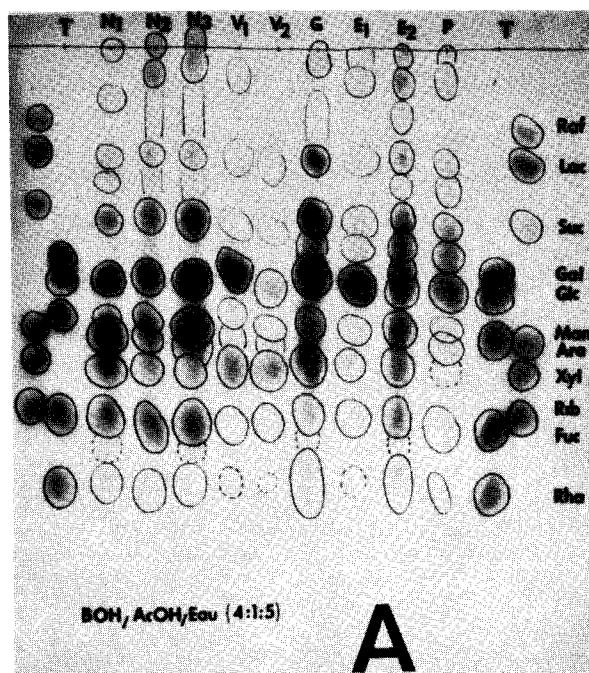


Figure 31

Analyse chromatographique de l'urine dans des conditions physiologiques diverses. Papier Whatman n° 3. Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Révélation : A : oxalate d'aniline ; B : orcinol trichloroacétique. N : urine normale ; V : régime végétarien ; G : surcharge glucidique ; E : effort physique important ; P : surcharge protidique ; T : solutions témoins de sucres purs : Raf : raffinose ; Lac : lactose ; Suc : sucrose ; Gal : galactose ; Glc : glucose ; Man : mannose ; Ara : arabinose ; Xyl : xylose ; Rib : ribose ; Fuc : fucose ; Rha : rhamnose ; Man-H : manno-heptulose ; Sédo-H : sédoheptulose ; Fru : fructose ; Allo-H : alloheptulose ; 3-Fru : 3-cétofructose ; Allu : allulose ; Ribu : ribulose ; Xylu : xylulose. Le 4-désoxyhexulose possède la vitesse de migration du rhamnose (planche A).

4-désoxyhexulose (Fig.37 ; p.109).

Lors d'un effort physique important, nous obtenons des résultats différents suivant l'individu : tantôt élévation du taux de glucides et principalement de celui du 4-désoxyhexulose, tantôt diminution du taux de glucides, portant également surtout sur le 4-désoxyhexulose.

Les résultats précédents seraient donc en faveur de l'origine alimentaire d'un certain nombre de glucides urinaires et en particulier de l'allulose et du 3-cétofructose. En ce qui concerne ces deux cétooses, qui n'ont jamais été mis en évidence dans l'alimentation humaine, nous pensons cependant qu'il s'agit en réalité d'un artéfact dû au traitement des aliments par la cuisson. En effet, nous avons pu vérifier que l'urine de divers mammifères strictement herbivores tels le boeuf, le cheval ou le mouton ne renfermait pas la moindre trace d'allulose ou de 3-céto-fructose, tandis que divers animaux de laboratoire (rats, cobayes) nourris essentiellement avec des aliments traités industriellement excrétaient ces deux glucides. Le 4-désoxycétoose était présent dans tous les cas.

D'autre part, ZERBAN et al. (273) ont observé qu'une solution de saccharose portée durant plusieurs heures à ébullition renfermaient ensuite de faibles traces d'allulose. L'allulose et le 3-cétofructose auraient pour origine la cuisson prolongée de certains aliments glucidiques, qui provoquerait l'épimérisation d'une faible quantité de glucose et de fructose. Les produits d'épimérisation tels que l'allulose ou le 3-cétofructose, non métabolisés par l'organisme ne seraient alors décelables et identifiables qu'après avoir été concentrés dans l'urine.

En conclusion, l'origine des monosaccharides neutres urinaires est double. Elle est, d'une part, alimentaire (glucose, fructose, arabinose, xylose, allo-heptulose, manno-heptulose, allulose et 3-cétofructose) et d'autre part métabolique : métabolisme des glycoprotéines (galactose, mannose, fucose) et métabolisme intermédiaire des glucides libres (ribulose, xylulose, sédoheptulose). L'origine métabolique du 4-désoxyhexulose reste à établir avec certitude.

ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

1° - MATERIEL ET METHODES

I - NUMEROTATION DES OLIGOSACCHARIDES

Nous avons décrit précédemment (voir p. 66) les méthodes de fractionnement qui nous ont permis d'isoler à l'état pur 72 préparations d'oligosaccharides dont nous étudierons maintenant les structures. La numérotation de ces oligosaccharides est la suivante :

Fraction aqueuse : 5 osides, numérotés EAU 1 à EAU 5

Fractions éthanoliques :

1,5 p.100 : 7 osides, A₁ à A₇
 3,5 p.100 : 4 osides, B₁ à B₄
 5 p.100 : 12 osides, C₁ à C₁₂
 7,5 p.100 : 8 osides, D₁ à D₈
 10 p.100 : 10 osides, E₁ à E₁₀
 15 p.100 : 9 osides, F₁ à F₉
 25 p.100 : 5 osides, G₁ à G₅
 50 p.100 : 2 osides, H₁ à H₂

Lavage par le méthanol à 90 p.100 : 10 osides, I₁ à I₁₀

II - METHODES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE
DES OSIDES

A - COMPOSITION CENTESIMALE

La composition centésimale en oses "neutres", osamines, acides uroniques et acides sialiques a été déterminée par l'application des méthodes colorimétriques décrites précédemment p.46 .

B - IDENTIFICATION DES OSES "NEUTRES" ET DETERMINATION DE LEUR COMPOSITION
MOLAIRE

1 - HYDROLYSE CHLORHYDRIQUE

Les oses "neutres" et les osamines ont été libérées par une hydrolyse chlorhydrique : 1 à 2 mg d'oside sont dissous dans 2 ml d'acide chlorhydrique 2 N et la solution est portée à 100°C durant 2 heures. Les hydrolysats sont amenés à une normalité d'environ 0,1 N et passés successivement sur une

paire de colonnes de résines échangeuses de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide) et d'anions (Duolite A-40 ; "mesh" 25-50 ; forme formiate). Le liquide effluent est concentré sous vide à un faible volume (2 à 5 ml) puis évaporé à siccité sous exsiccateur, en présence de soude, en ajoutant de temps en temps du méthanol pour éliminer les dernières traces d'acide chlorhydrique non retenues par l'échangeur d'anions (SPIK et al.) (274).

2 - IDENTIFICATION ET DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE DES OSES "NEUTRES"

Le résidu sec des hydrolysats chlorhydriques est repris par 0,1 à 0,2 ml d'eau et soumis à l'analyse chromatographique dans les systèmes-solvants suivants : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2:1:2) ou n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5), dans le cas de la présence de xylose.

Les rapports molaires des oses neutres ont été déterminés selon le procédé de DATE (275) modifié : des carrés de papier de 5 cm de coté, encadrant les taches d'oses neutres révélés par le réactif au phtalate d'aniline sont découpés et élués par une solution d'éthanol à 20 p.100 d'acide chlorhydrique 0,1 N, pendant 2 heures et l'absorbance des solutions est mesurée à 390 nm, au spectrophotomètre. Sur chaque chromatogramme sont introduits des témoins internes contenant des quantités connues d'oses. La précision du procédé atteint 1 p.100 (SPIK) (276).

C - IDENTIFICATION DES OSAMINES ET DETERMINATION DE LEUR COMPOSITION MOLAIRE

1 - IDENTIFICATION DES OSAMINES

Après purification des hydrolysats chlorhydriques sur échangeurs d'ions (p.111) les osamines sont éluées de la résine cationique par le passage d'une solution d'acide chlorhydrique 0,8 N. La solution obtenue est évaporée à siccité sous vide et les osamines identifiées par l'emploi de deux procédés différents :

a - Procédé de désamination oxydative des osamines de GARDEIL et coll. (277)

Le résidu sec obtenu ci-dessus est repris par 3 ml d'eau distillée et on ajoute 2 ml d'une solution de ninhydrine (0,48 g de ninhydrine dans 100 ml de citrate de sodium 0,1 M de pH 4,7). On maintient à 100°C pendant 30 mn. La solution obtenue est filtrée et purifiée par un passage sur une échangeur de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide ; 1cm x 10cm) puis d'anions (Duolite A-40 ; "mesh" 25-50 ; forme formiate ; 1cm x 10cm). Le liquide effluent est évaporé à siccité et le résidu est soumis à l'analyse chromatographique à l'aide d'un des systèmes-solvants suivants : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) ou acétate d'éthyle/pyridine/eau (2:1:2).

Dans ces conditions, la glucosamine et la mannosamine conduisent à l'arabinose et la galactosamine au lyxose, pentoses facilement identifiables dans la plupart des systèmes-solvants. Lorsque le pentose est l'arabinose, il est nécessaire d'avoir recours à une autre technique d'identification des osamines pour différencier la glucosamine de la mannosamine.

b - Identification des N-acétylosamines

La séparation électrophorétique en tampon borate permet l'identification des dérivés acétylés des trois osamines que le procédé précédent ne parvenait pas à discriminer. La N-réacétylation est effectuée selon le procédé de ROSEMAN et LUDOWIEG (278) : à 1 ml de solution renfermant 0,5 à 1 mg d'osamines, sont ajoutés successivement 1,5 ml d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 0,5 g p.100 ml et 20 ul d'anhydride acétique. La solution est abandonnée pendant 24 h à 20°C, puis déminéralisée sur échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide ; 1 x 10 cm). La solution effluente est évaporée à siccité et les N-acétylosamines sont soumises à l'analyse électrophorétique, à l'aide du système-tampon boraté décrit précédemment p. 72 .

2 - COMPOSITION MOLAIRE EN OSAMINES

Lorsqu'un oligosaccharide ne renferme qu'un seul type d'osamine, la composition molaire en ces dernières est déterminée à partir de la composition centésimale.

Dans le cas d'un oside renfermant 2 osamines différentes, la composition molaire en osamines peut être déterminée en appliquant le procédé de chromatographie sur échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 200-400 ; forme H⁺) proposé par GARDELL (279) : 0,5 mg d'osamines totales en solution dans 0,5 ml d'acide chlorhydrique 0,3 N sont déposés au sommet d'une colonne d'échangeur de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 200-400 ; 0,7 x 40 cm) préalablement régénérée par l'acide chlorhydrique 4 N et lavée avec 50 à 100 ml d'acide chlorhydrique 0,3 N. Des fractions de 0,5 ml sont recueillies toutes les 10 mn à l'aide d'un collecteur automatique et les osamines sont dosées dans chaque tube, après neutralisation, par la méthode d'ELSON et MORGAN (280), modifiée par BELCHER, NUTTE et SAMBROOK (281). Des courbes sont ensuite tracées. Les quantités respectives de chaque osamine sont déterminées à ± 5 p.100 près, en effectuant la somme des quantités dosées dans les tubes correspondants à chacun des pics.

Ce procédé permet d'obtenir d'excellentes séparations de la glucosamine et de la galactosamine. Toutefois, la mannosamine et la glucosamine donnent un pic unique.

D - IDENTIFICATION DES ACIDES SIALIQUES ET DETERMINATION DE LEUR COMPOSITION MOLAIRE

Les acides sialiques qui entrent dans la composition de certains oligosaccharides ont été identifiés selon le mode opératoire suivant :

Les acides sialiques sont libérés par hydrolyse acide ménagée (H_2SO_4 0,01 N ; 100°C ; 1 heure) puis purifiés par passage successif de l'hydrolysats sur une colonne de Dowex 50 x 8 ("mesh" 25-50 ; forme acide) et de Dowex 1 x 8 ("mesh" 200-400 ; forme formiate). Les acides sialiques sont ensuite élués de l'échangeur d'anions par une solution d'acide formique 0,4 N et la solution effluente évaporée à siccité par lyophilisation. L'analyse chromatographique est réalisée à l'aide du système-solvant de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (282) : n-butanol/n-propanol/HCl 0,1 N (1:2:1).

L'acide N-glycolylneuraminique a été recherché en appliquant le procédé de dosage de l'acide glycolique proposé par KLENK et UHLENBRUCK (283) :

Réactifs : Solution de 2,7-dihydronaphtaline (recristallisé) dans l'acide sulfurique concentré de densité 1,8 (10 mg dans 100 ml) (réactif d'EEGRIWE) (285).

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

Mode opératoire : Ajouter à 1 ml de solution d'acide sialique (correspondant à 1 à 10 µg d'acide glycolique) 1 ml d'acide sulfurique 2 N. Maintenir à 100°C pendant 1 heure.

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

A 0,2 ml de l'hydrolysats, ajouter 4 ml de réactif d'EEGRIWE. Chauffer 20 mn à 100°C. Mesurer la densité optique à 546 nm.

La détermination de la composition molaire en acides sialiques a été effectuée simplement en tenant parti de la composition centésimale établie par l'application de la méthode colorimétrique de WERNER et ODIN (284) à la diphénylamine.

E - IDENTIFICATION DES ACIDES URONIQUES ET COMPOSITION MOLAIRE

L'identification des acides uroniques a été effectuée après une hydrolyse chlorhydrique des osides (HCl 2N ; 2 h ; 100°C) et fractionnement sur résine échangeuse d'anions (Dowex 1 x 8 ; "mesh" 200-400 ; forme formiate). Les acides uroniques ont été déplacés par une solution d'acide formique à 5 p.100 et identifiés par analyse électrophorétique dans le système-tampon de HAUGH et LARSEN (286). La composition molaire des acides uroniques a été

déterminée par le dosage de ces derniers selon la méthode colorimétrique au carbazol sulfurique de DISCHE (287).

F - IDENTIFICATION DE L'OSE REDUCTEUR TERMINAL

1 à 2 mg d'oside, en solution dans 1 ml d'eau distillée, sont réduits par 5 à 10 mg de borohydrure de potassium, à 4°C, pendant 15 heures. L'excès de borohydrure est décomposé par l'addition de quelques gouttes d'acide acétique et la solution obtenue purifiée par passage sur une colonne de résine échangeuse de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide). Le liquide effluent est évaporé à siccité et le résidu repris plusieurs fois par quelques millilitres de méthanol à 10 p.100 d'acide acétique, que l'on évapore par ventilation, afin d'éliminer l'acide borique sous forme de borate de méthyle. La composition centésimale en glucide et la composition molaire en oses "neutres" sont ensuite déterminés sur l'oside réduit selon les procédés décrits plus haut.

2° - RESULTATS

I - LA FRACTION EAU

5 oligosaccharides ont été isolés de la fraction aqueuse effluente de la colonne de Charbon-Célite (Fig.38 ; p.117). Une première chromatographie préparative dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) fournit les mélanges (1 + 3 + 5) et (2 + 4). Ces 5 osides ont été obtenus à l'état pur grâce à l'emploi du système-solvant acétate d'éthyle/pyridine/eau (2:1:2).

Le comportement chromatographique de ces composés est donné dans le Tableau XVI ; p.118).

A - L'OSIDE EAU 1 (65 mg)

L'oside EAU 1 possède le comportement chromatographique du saccharose dans les différents systèmes-solvants utilisés (Tableau XVI ; p.118). Il fournit, en outre, avec le réactif à l'urée chlorhydrique la coloration bleue spécifique des cétohexoses. D'autre part, il ne réagit pas avec le réactif au chlorure de triphényltétrazolium.

L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 100°C ; 1 h) ne libère que du glucose ; seule l'hydrolyse ménagée par l'acide sulfurique 0,1 N (1 heure ; 100°C) permet de libérer intact le fructose, décelé par le réactif à l'urée chlorhydrique.

Le dosage des oses neutres totaux avant et après traitement par le

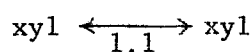
borohydrure de sodium ne montre aucune diminution du taux des oses (Tableau XVII ; p. 119).

Ces résultats nous permettent donc d'identifier l'oside EAU 1 au saccharose.

B - L'OSIDE EAU 2 (2,5 mg)

L'oside EAU 2 possède le comportement chromatographique d'un disaccharide (Tableau XVI ; p.118 et Fig.38 ; p.117). Il fournit avec le réactif à l'oxalate d'aniline la coloration rouge spécifique des aldopentoses. Il ne réagit pas avec le réactif au chlorure de triphényltétrazolium.

L'hydrolyse chlorhydrique (2 N ; 100°C ; 1 h) ne libère que du xylose (Fig.39 ; p.120). Le dosage des oses avant et après réduction par le borohydrure de sodium (Tableau XVII ; p.119) montre que l'oside EAU 2 possède la structure d'un dissaccharide non réducteur, dont la structure est la suivante :



C - L'OSIDE EAU 3 (1,2 mg)

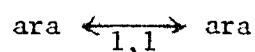
L'oside EAU 3 possède le comportement chromatographique d'un disaccharide (Tableau XVI ; p.118 et Fig.38 ; p.117).

L'hydrolyse chlorhydrique ne libère que du glucose (Fig.39 ; p.120). Après action du borohydrure de sodium, 40 p.100 du glucose a disparu (Tableau XVII ; p.119).

L'oside EAU 3 est donc un dimère du glucose.

D - L'OSIDE EAU 4 (16 mg)

L'oside EAU 4 possède le comportement chromatographique d'un disaccharide (Tableau XVI ; p.118 et Fig.38 ; p.117). Il fournit avec le réactif à l'oxalate d'aniline la coloration rouge spécifique des pentoses. La réaction au chlorure de triphényltétrazolium est négative. L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 100°C ; 1 h) ne libère que de l'arabinose. Le dosage des oses avant et après réduction par le borohydrure de sodium (Tableau XVII ; p.119) montre que l'oside EAU 4 possède la structure suivante :



E - L'OSIDE EAU 5 (1,5 mg)

L'oside EAU 5 possède le comportement chromatographique d'un disaccharide (Tableau XVI ; p.118 et Fig.38 ; p.117). L'hydrolyse chlorhydrique ne libère que du galactose. Après action du borohydrure de sodium, 42 p.100 de galactose a été réduit. L'oside EAU 5 est donc un dimère du galactose.

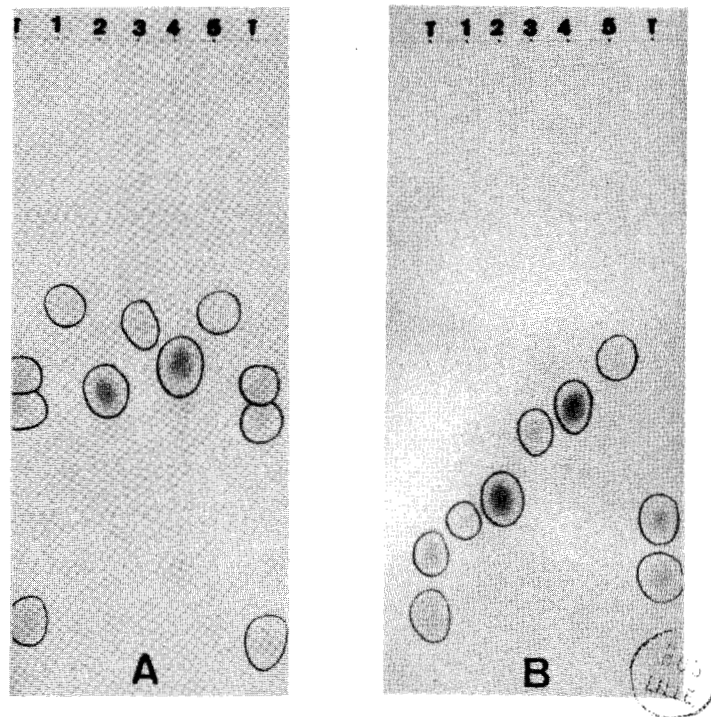


Figure 38

Chromatographie sur papier des oligosaccharides isolés de la fraction aqueuse effluente de la colonne de Charbon-Célite. Papier Whatman n° 3. Systèmes-solvants : A : *n*-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) ; B : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2). Révélation à l'oxalate d'aniline.

T a b l e a u X V I

Comportement chromatographique des osides de la fraction EAU

Osides	Systèmes-solvants (*)	
	1	2
EAU 1	0,80	0,95
EAU 2	1,05	0,91
EAU 3	0,83	0,78
EAU 4	0,93	0,75
EAU 5	0,78	0,66

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

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

Dans les deux cas la vitesse de migration est comparée à celle du galactose.

BIBLI
LILLE

T a b l e a u X V I I

Action du borohydrure de sodium sur les osides isolés de la fraction aqueuse

Osides	Quantités d'oses neutres dosés à l'orcinol sulfurique (en µg/ml)	
	avant réduction	après réduction
EAU 1	180	174
EAU 2	207	208
EAU 3	172	106
EAU 4	285	274
EAU 5	110	68



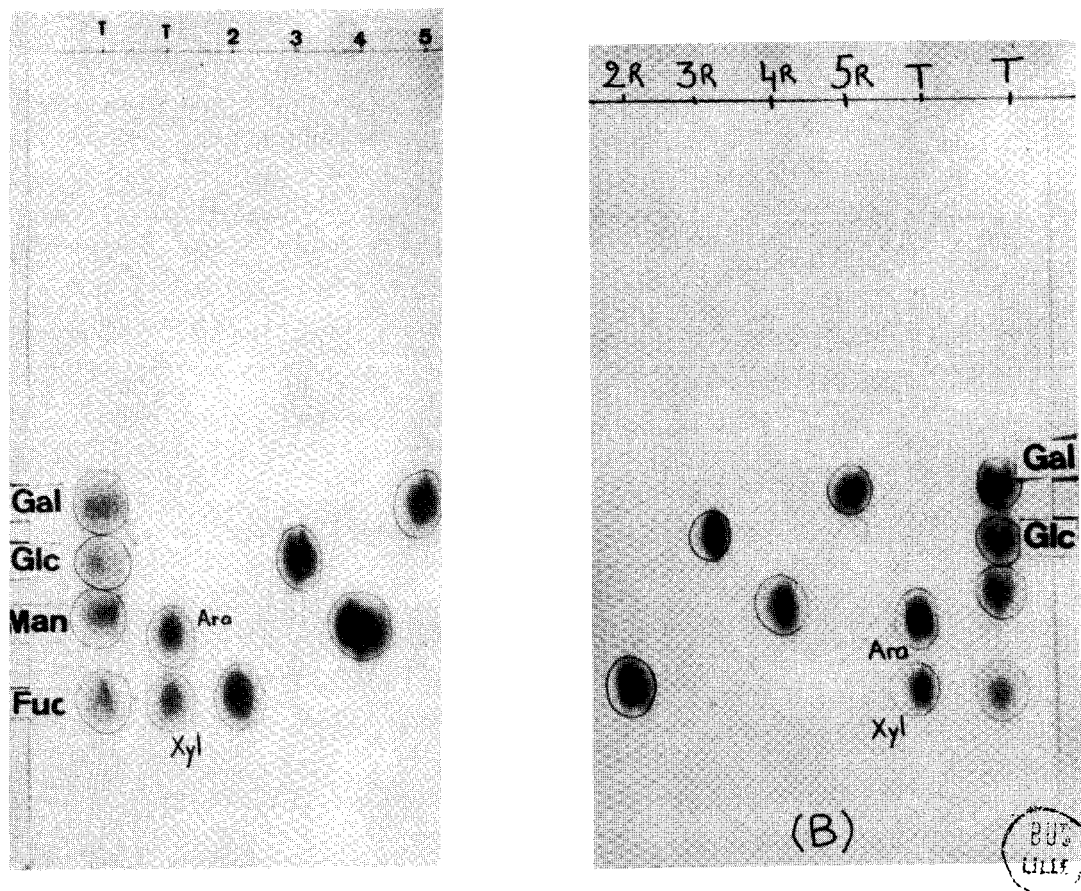


Figure 39

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques des oligosaccharides de la fraction EAU. Papier Whatman n° 1. Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2). Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline. T : solutions témoins de glucides purs. 1 à 5 : hydrolysats des osides de la fraction EAU ; 1 R à 5 R : hydrolysats de ces mêmes osides après réduction par le borohydrure de sodium.

F - CONCLUSION

Les 5 oligosaccharides isolés de la fraction aqueuse effluente de la colonne de Charbon-Célite possèdent les compositions suivantes :

EAU 1	glc $\xleftrightarrow{1,2}$ fru
EAU 2	xyl $\xleftrightarrow{1,1}$ xyl
EAU 3	glc \longrightarrow glc
EAU 4	ara $\xleftrightarrow{1,1}$ ara
EAU 5	gal \longrightarrow gal

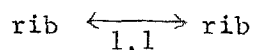
II - LA FRACTION 1,5 p.100 EN ETHANOL : FRACTION A

7 oligosaccharides ont été isolés de la fraction 1,5 p.100 en éthanol (Fig.40 ; p.123). Les osides (1), (2+3+4), (5+6) et (7) ont été obtenus avec le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5), puis chacun des composés a pu être isolé à l'état pur avec le système-solvant acétate d'éthyle/pyridine/eau (2:1:2). Leur comportement chromatographique est donné dans le Tableau XVIII ; p.124). La plupart des osides de la fraction A n'a pu être isolée qu'en de faibles quantités et seule la structure de 4 d'entre eux à pu être étudiée.

A - L'OSIDE A 1 (4 mg)

L'oside A 1, dont le comportement chromatographique est donné dans le Tableau XVIII (p.124) fournit avec le réactif à l'oxalate d'aniline la coloration rouge des aldopentoses. Il ne réagit pas avec le réactif au chlorure de triphényltétrazolium.

L'action du borohydrure n'entraîne aucune variation du taux des oses. L'hydrolyse chlorhydrique libère exclusivement du ribose (Fig.41 ; p. 125). La vitesse de migration de l'oside A 1 étant celle d'un disaccharide, nous lui attribuons la structure suivante :

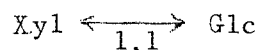
B - LE GLUCIDE A 2 (2,5 mg)

Le glucide A 2 possède le comportement chromatographique du glucose. L'action du borohydrure de sodium le détruit à 95 p.100. Il s'agit donc de glucose qui n'a pas été totalement élué lors du rinçage du charbon par l'eau.

C - L'OSIDE A 3 (0,8 mg)

L'oside A 3 fournit avec le réactif à l'oxalate d'aniline la coloration rouge caractéristique des pentoses. Il ne réagit pas avec le réactif

au chlorure de triphényltétrazolium. L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 100°C ; 1 h) libère du glucose et du xylose, en quantités équimoléculaires et du ribose à l'état de traces (Fig.41 ; p.125). L'action du borohydrure de sodium est nulle. L'oside A 3 possède donc la structure suivante :



D - LE GLUCIDE A 4 (16 mg)

Le glucide A 4 possède des comportements chromatographiques très différents selon que le système-solvant est acide ou basique (Tableau XVIII ; p.124 et Fig.40 ; p.123). Il fournit les colorations spécifiques des acides sialiques avec les révélateurs à l'orcinol trichloracétique ou au p-diméthylaminobenzaldéhyde. L'étude de son comportement chromatographique dans le système-solvant : acétate d'éthyle/acide acétique/eau (3:1:3) et n-butanol/n-propanol/HCl 0,1 N (1:2:1) confirme que le glucide A 3 est l'acide N-acétylneuraminique.

E - LES OSIDES A 5 et A 6

Les osides A 5 et A 6 ont été isolés en trop faibles quantités (moins de 0,5 mg) pour que l'on puisse entreprendre l'étude de leur structure. Ils renferment exclusivement de l'acide uronique et leur comportement chromatographique (Tableau XVIII ; p.124 et Fig.40 ; p.123) est celui de disaccharides

F - L'OSIDE A 7 (moins de 1 mg)

L'oside A 7 fournit avec le réactif à l'urée chlorhydrique la coloration bleue spécifique des céto-hexoses. L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2N) libère du glucose et des traces de fructose. L'hydrolyse ménagée (H₂SO₄ 0,1 N ; 1 h) libère du glucose et du fructose, dans des rapports (estimés approximativement par estimation visuelle) 1 : 2 (Fig.41 ; p.125). La faible quantité mise à notre disposition ne nous a pas permis de poursuivre l'étude de la structure de ce gluco-difructose.

G - CONCLUSION

Nous avons identifié les constituants de la fraction à 1,5 p.100 d'éthanol aux glucides suivants :

<u>A 1</u>	Rib $\xleftrightarrow[1,1]{} \text{Rib}$	<u>A 4</u>	acide N-acétylneuraminique
<u>A 2</u>	Glc	<u>A 5</u>	probablement GlcUr \rightarrow GlcUr
<u>A 3</u>	Xyl $\xleftrightarrow[1,1]{} \text{Glc}$	<u>A 6</u>	probablement GlcUr \rightarrow GlcUr
		<u>A 7</u>	(2 Fru, Glc)

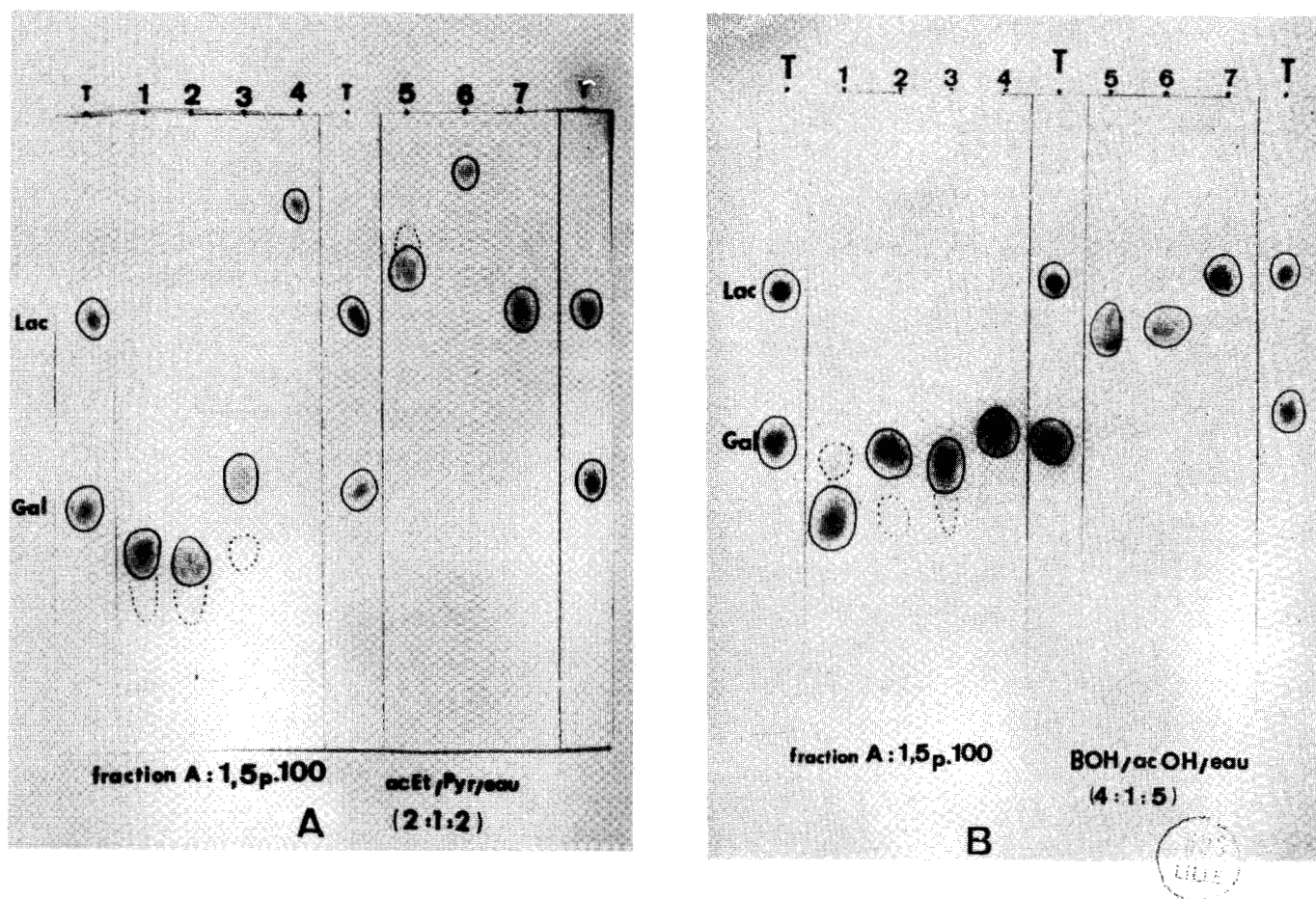


Figure 40

Chromatographie sur papier des oligosaccharides isolés de la fraction 1,5 p. 100 d'éthanol. Papier Whatman n° 3. Systèmes-solvants : A : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2) ; B : *n*-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Révélation à l'oxalate d'aniline.

T a b l e a u X V I I I

Comportement chromatographique des osides de la fraction A
(1,5 p. 100 d'éthanol)

Osides	Systèmes-Solvants (*)	
	1	2
A 1	2,15	2,14
A 2	1,85	2,20
A 3	1,95	1,81
A 4	1,79	0,44
A 5	1,28	0,80
A 6	1,28	0,32
A 7	1	1,04

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

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

Les vitesses de migration sont données par rapport à celle du lactose.



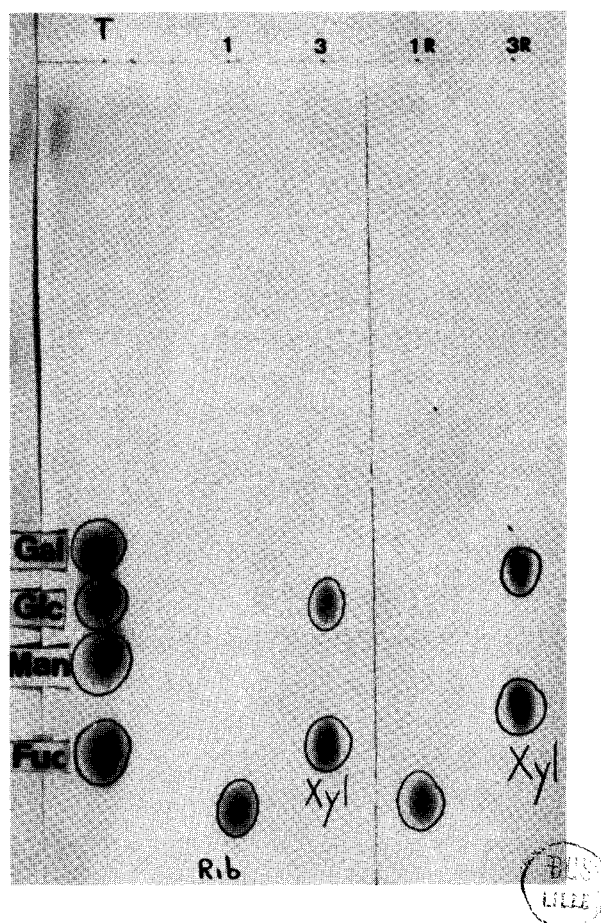


Figure 41

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques des osides de la fraction 1,5 p. 100 avant (A) et après réduction par le borohydrure de sodium (B). Papier Whatman n° 1 ; système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2).

III - LA FRACTION 3,5 p.100 EN ETHANOL : FRACTION B

4 oligosaccharides ont été isolés de la fraction à 3,5 p.100 d'éthanol (Fig.42 ; p.127), par chromatographie préparative sur papier dans les systèmes solvants n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) : isolement de B 1, B 2 et B 3 + B 4, et phénol saturé d'eau (en atmosphère ammoniacale) ; isolement de B 3 et B 4.

Le comportement chromatographique de ces osides est décrit dans le tableau XIX (p.128).

A - L'OSIDE B 1 (84 mg)

L'oside B 1 fournit avec le réactif à l'urée chlorhydrique la coloration bleue spécifique des cétohexoses. Il possède en outre le comportement chromatographique du saccharose. Ce résultat est confirmé par l'hydrolyse ménagée par l'acide sulfurique dilué (H_2SO_4 0,1 N ; 100°C ; 1 h) qui libère du glucose et du fructose dans des rapports équimoléculaires. L'action du borohydrure de sodium est en outre négative.

L'oside B 1 est donc le saccharose.

B - L'OSIDE B 2 (2,2 mg)

L'oside B 2 libère, après hydrolyse chlorhydrique (1,5 N ; 1,5 h) un mélange équimoléculaire de galactose et de glucose. Le glucose disparaît totalement après l'action du borohydrure de sodium (Fig.43 ; p.129). Il s'agit donc d'un oside de la forme (galactose \rightarrow glucose), différent cependant du lactose, dont il ne possède pas le comportement chromatographique.

C - L'OSIDE B 3 (89 mg)

L'oside B 3 possède le comportement chromatographique du lactose. L'hydrolyse chlorhydrique libère du galactose et du glucose en quantités équimoléculaires. Ce dernier disparaît totalement après action du borohydrure de sodium (Fig.43 ; p.129). L'oside B 3 est donc le lactose.

D - L'OSIDE B 4 (7 mg)

L'oside B 4, qui possède le comportement chromatographique du lactose dans la plupart des systèmes-solvants, a pu être caractérisé grâce à l'emploi du système-solvant : phénol saturé d'eau. L'hydrolyse chlorhydrique libère du galactose et du glucose, dans des proportions équimoléculaires. Le glucose est totalement réduit après action du borohydrure de sodium (Fig.43 ; p.129). L'oside B 4 est donc un isomère du lactose.

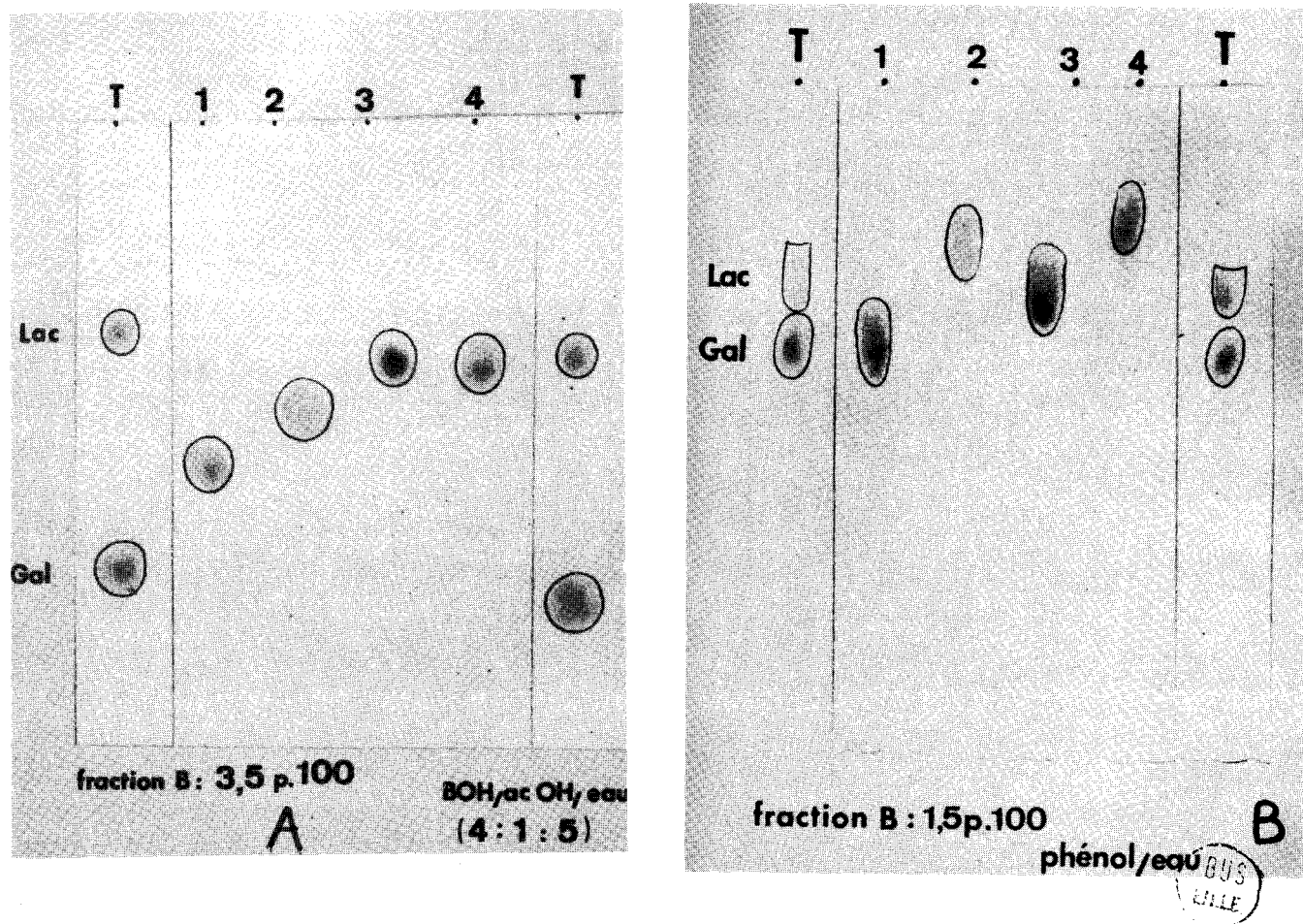


Figure 42

Chromatographie sur papier des oligosaccharides isolés de la fraction 3,5 p. 100 d'éthanol. Papier Whatman n° 3. Système-solvant : A : n-butanol/ acide acétique/eau (4 : 1 : 5) ; B : phénol saturé d'eau (atmosphère ammoniacale). Révélation à l'oxalate d'aniline.

T a b l e a u X I X

Comportement chromatographique des oligosaccharides de la fraction B.
(3,5 p. 100 d'éthanol)

Osides	Systèmes-Solvants (*)	
	1 RL (**)	2 R _f
B 1	1,58	0,39
B 2	1,12	0,225
B 3	1	0,29
B 4	1,05	0,19

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

(2) : phénol saturé d'eau, en atmosphère ammoniacale

(**) Vitesse de migration, comparée à celle du lactose.

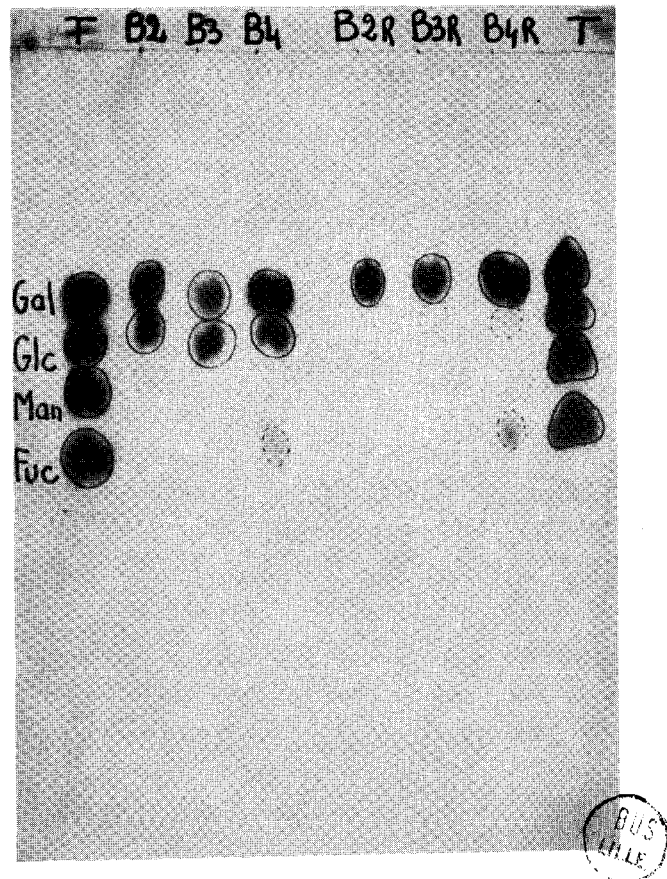


Figure 43

Chromatographie des hydrolysats chlorhydriques des osides de la Fraction B, avant et après réduction par le borohydure de sodium. Papier Whatman n° 1. Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2). Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

E - CONCLUSIONS

Les osides de la fraction B (3,5 p.100) possèdent les structures suivantes :

- B 1 glc \rightarrow fru (saccharose)
 B 2 gal \rightarrow glc
 B 3 gal $\xrightarrow{\beta-1,4}$ glc (lactose)
 B 4 gal \rightarrow glc

IV - LA FRACTION à 5 p.100 D'ETHANOL : FRACTION C

Nous avons isolé 12 osides de la fraction éthanolique à 5 p.100, grâce à l'utilisation successive des systèmes-solvants n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) et acétate d'éthyle/pyridine/eau (2:1:2). Le comportement chromatographique de ces osides, obtenus dans un état de pureté satisfaisant (Fig. 44 ; p.133) est donné dans le Tableau XX (p.134).

A - L'OSIDE C 1 (18 mg)

Le glucide C 1 fournit après hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 100°C ; 1 h) du glucose et du fucose en quantités équimoléculaires (Fig.45 ; p.135 et Tableau XXI ; p.136). Après action du borohydrure de sodium, le glucose est totalement réduit. L'oside C 1 possède donc la structure suivante :

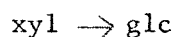


B - LE GLUCIDE C 2

Le glucide C 2 possède un comportement chromatographique à celui du glucide A 4 décrit précédemment (voir p.122). L'application des mêmes critères physico-chimiques a permis de vérifier qu'il s'agissait également de l'acide N-acétylneuraminique.

C - L'OSIDE C 3 (23 mg)

L'oside C 3 fournit avec le révélateur à l'oxalate d'aniline la coloration rouge spécifique des aldopentoses. L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 100°C ; 1 h) libère des quantités égales de glucose et de xylose (Fig.45 ; p.135 et Tableau XXI ; p.136). Après l'action du borohydrure de sodium, le glucose est totalement réduit (Fig.45 ; p.135 et Tableau XXI ; p.136). Ces résultats permettent d'attribuer à l'oside C 3 la structure suivante :

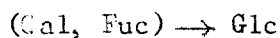


D - L'OSIDE C 4 (11 mg)

L'oside C 4 fournit avec le réactif à l'urée chlorhydrique la coloration bleue spécifique des cétohexoses et possède le comportement chromatographique du saccharose. La réaction au chlorure de triphényltétrazolium est négative. L'hydrolyse acide ménagée (H_2SO_4 0,1 N ; $100^\circ C$; 1 h) libère du glucose et du fructose en quantités équimoléculaires et confirme que l'oside C 4 est bien le saccharose.

E - L'OSIDE C 6 (22 mg)

L'hydrolyse chlorhydrique de l'oside C 6 libère du galactose, du glucose et du fucose en quantités équimoléculaires (Fig.45 ; p.135). La composition molaire de l'oside C 6, déterminée avant et après réduction par le borohydrure de sodium (Tableau XXI ; p.136) indique que le glucose est en position terminale réductrice. L'oside C 6 est le trisaccharide suivant :

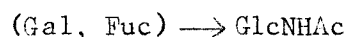
F - L'OSIDE C 7 (1,4 mg)

L'oside C 7 renferme des oses et des osamines dans le rapport 2,3 : 1. Après action du borohydrure de sodium, la totalité des osamines a disparu, tandis que le taux des oses n'a pas été sensiblement modifié.

L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; $100^\circ C$; 1 h) libère du galactose et du fucose dans des proportions équimoléculaires (Fig.45 ; p.135 et Tableau XXI ; p.136).

La désamination oxydative de l'osamine (éluée de l'échangeur de cations) conduit à l'arabinose (Fig.46 ; p.137).

Ces résultats permettent d'attribuer à l'oside C 7 la structure suivante :

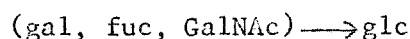
G - L'OSIDE C 8 (1,8 mg)

Les rapports $\frac{\text{oses}}{\text{osamines}}$ déterminés avant et après réduction par le borohydrure de sodium sont respectivement 2,4 : 1 et 1,6 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 1 h) libère du galactose et du glucose dans les proportions 1 : 1,28 ; ce rapport devient 1 : 0,31 après réduction (Fig.45 ; p.135 et Tableau XXI ; p.136). La désamination oxydative de l'osamine éluée de l'échangeur de cations, fournit du lyxose (Fig.46 ; p.137) caractéristique de la galactosamine. La structure de l'oside C 8 est donc :



H - L'OSIDE C 9 (8,2 mg)

L'oside C 9 renferme des oses et des osamines, dans des rapports, déterminés avant et après réduction par le borohydrure de sodium, de 3,4 : 1 et 2,4 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique libère du galactose, du glucose et du fucose, dans le rapport 1 : 1,16 : 1 (Fig.45 ; p.135 et Tableau XXI; p.136). La totalité du glucose disparaît sous l'action du borohydrure de sodium. La désamination oxydative de l'osamine, éluée de la résine échangeuse de cations, conduit au lyxose (Fig.46 ; p.137) caractéristique de la galactosamine. La structure de l'oside C 9 est donc la suivante :

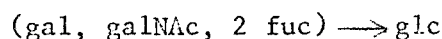
I - L'OSIDE C 10 (16 mg)

L'oside C 10 renferme des oses et des osamines dans les rapports 4,64 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique libère du galactose, du glucose, du mannose dans les proportions 1 : 0,64 : 0,20 : 1,65.

Après action du borohydrure de sodium, ces rapports deviennent :
1 : 0,23 : 0,21 : 1,61.

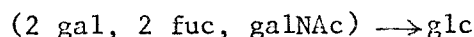
La désamination oxydative de l'osamine fournit du lyxose, caractéristique de la galactosamine (Fig.46 ; p.137) et de légères traces d'arabinose, caractéristiques de la glucosamine.

Nous nous trouvons ici en présence d'un mélange d'osides, où prédomine nettement un constituant majeur possédant la structure :

J - L'OSIDE C 11 (18 mg)

L'oside C 11 renferme des oses et des osamines, dans des rapports, déterminés avant et après réduction par le borohydrure de sodium, de 5,5 : 1 et 4,5 : 1.

L'hydrolyse chlorhydrique libère du galactose, du glucose et du fucose dans les proportions : 2 : 1,05 : 1,89. Le glucose disparaît totalement après traitement par le borohydrure de sodium. La désamination oxydative de l'osamine, éluée de l'échangeur de cations, conduit au lyxose, caractéristique de la galactosamine. L'oside C 11 possède donc la structure suivante :

K - L'OSIDE C 12 (0,8 mg)

L'oside C 12 renferme des oses et des osamines, dans des rapports, déterminés avant et après réduction par le borohydrure de sodium, de 4,8 : 1 et 3,9 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique libère du galactose, du mannose et du fucose, dans des rapports, déterminés avant et après réduction, respectivement

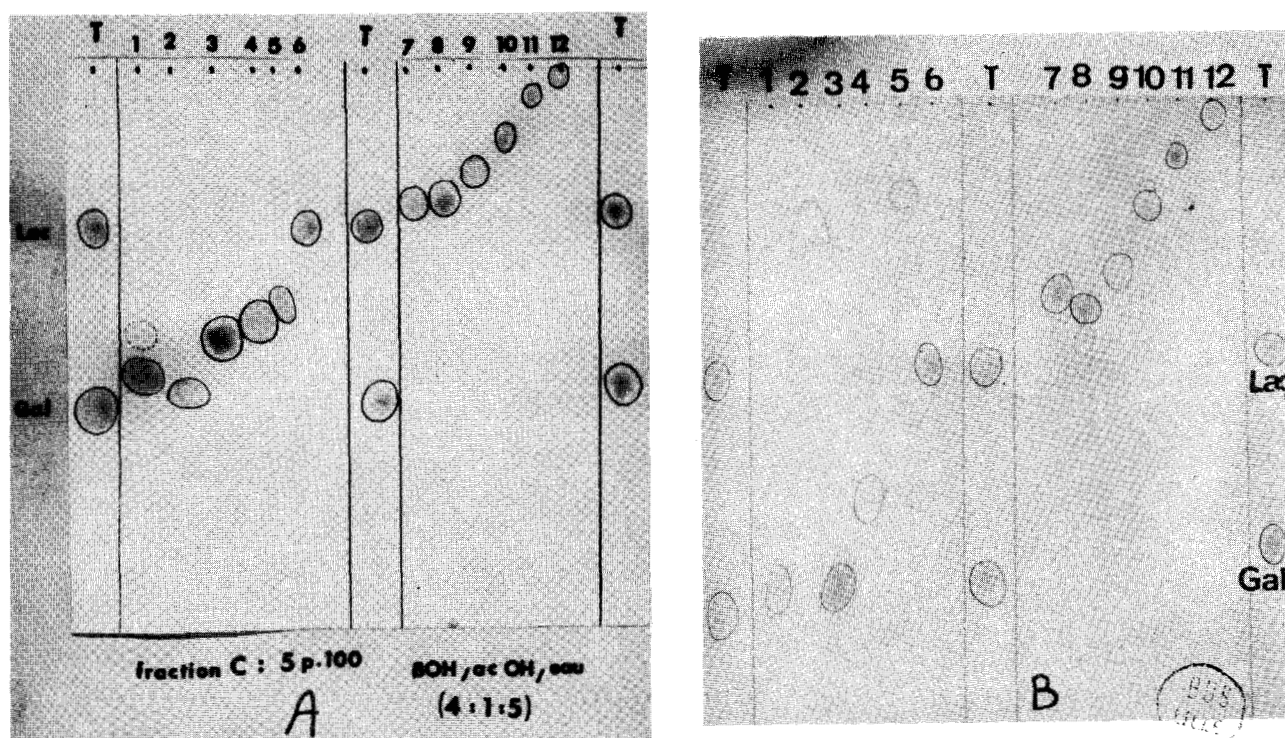


Figure 44

Chromatographie sur papier des oligosaccharides de la fraction C :
 5 p. 100 d'éthanol. Papier Whatman n° 3. Systèmes-solvants : A :
n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) ; B : acétate d'éthyle/
 pyridine/eau (2 : 1 : 2). Révélation par le réactif à l'oxalate
 d'aniline.

T a b l e a u XX

Comportement chromatographique des oligosaccharides de la fraction C

Osides	Systèmes-Solvants (*)		
	1	2	3
C 1	1,90	1,76	
C 2	2,02	0,44	
C 3	1,68	1,79	
C 4	1,58	1,47	
C 5	1,48	0,33	
C 6	1,00	0,97	
C 7	0,86	0,74	
C 8	0,84	0,80	
C 9	0,69	0,70	0,77
C 10	0,46	0,50	0,58
C 11	0,19	0,28	0,32
C 12	0,06	0,06	

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

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

(3) : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3)

Les vitesses de migration sont comparées à celle du lactose.



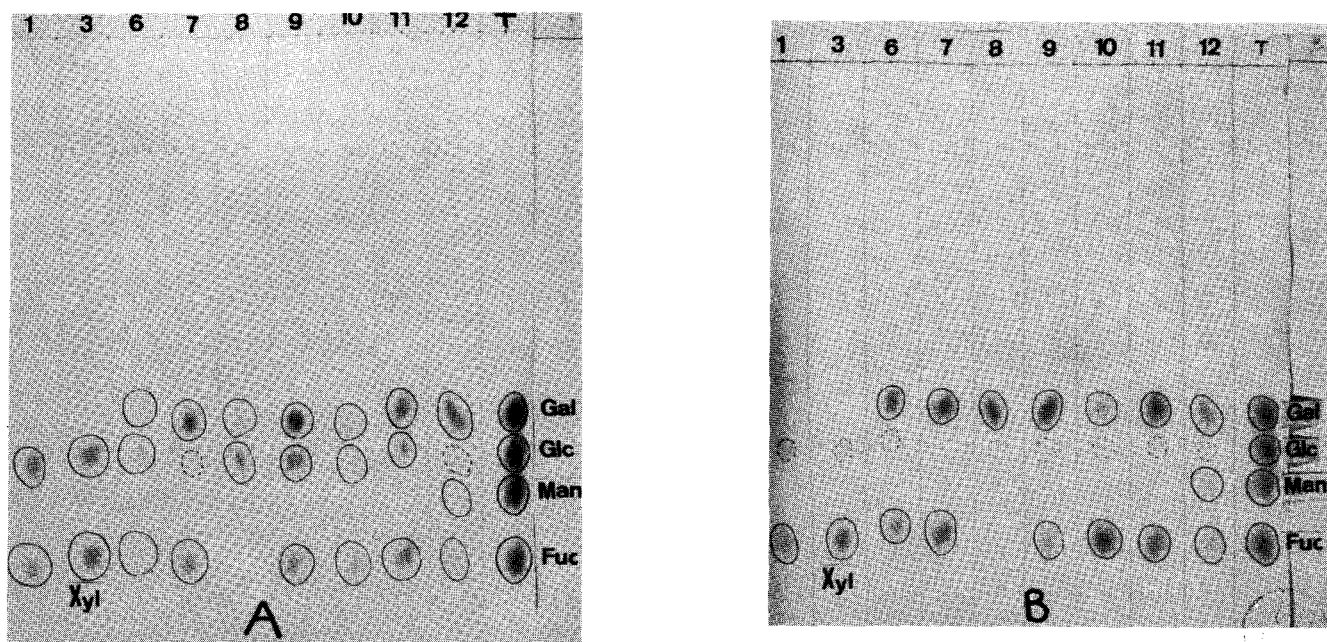


Figure 45

Chromatographie des hydrolysats chlorhydriques des osides de la fraction C, avant et après réduction (planche A) et après réduction (planche B) par le borohydrure de sodium. Papier Whatman n° 1. Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2). Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

T a b l e a u XXI

Composition molaire des oligosaccharides de la fraction C (5 p. 100 en éthanol)

		C 1	C 3	C 6	C 7	C 8	C 9	C 10	C 11	C 12
avant réduction	Oses				2,3	2,4	3,4	4,64	5,5	4,8
	Osamines	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	Gal			1	1,27	1	1	1	2	2,90
	Glc	1,08	1,10	1,14		1,28	1,16	0,64	1,05	
	Man							0,20		1
	Fuc	1		0,92	1		1	1,65	1,89	
	Xyl		1							
	GalNAc					1	1	1	1	
	GlcNAc				1	0	0	+		
après réduction	Oses				++	1,6	2,4	-	4,5	3,9
	Osamines	0	0	0	0	1	1	-	1	1
	Gal			1	++	1	1	1	2	2,08
	Glc	0,1	0	0,1		0,31	0,1	0,23	0	
	Man							0,21		1
	Fuc	1		0,92	++		1	1,61	2,02	0,81
	Xyl		1							
	GalNAc					1	1	+++	1	
	GlcNAc				0	0	0	+		

BMS
LILLE

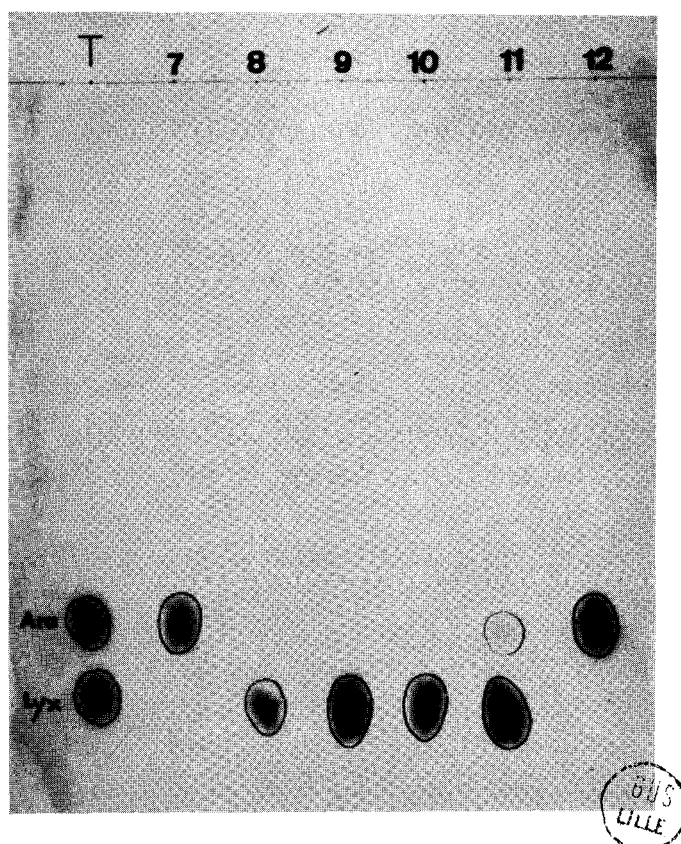
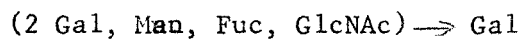


Figure 46

Chromatographie sur papier des produits de la désamination oxydative par la ninhydrine de la "fraction osamine" des hydrolysats acides des osides de la fraction C. Papier Whatman n° 3. Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline. T : mélange de glucides purs ; Ara : arabinose ; Lyx : lyxose.

de 2,90 : 1 : 1 et 2,08 : 1 : 0,81.

La désamination oxydative de l'osamine, élue de la résine échangeuse de cations, conduit à l'arabinose. L'oside C 12 est donc de la forme :



L - CONCLUSION

L'étude des osides de la fraction C (5 p.100 d'éthanol) nous a permis de caractériser les glucides suivants :

- C 1 Fuc \rightarrow Glc
- C 2 Acide N-acétylneuraminique
- C 3 Xyl \rightarrow Glc
- C 4 Glc \rightarrow Fru
- C 5 non identifié
- C 6 (Gal, Fuc) \rightarrow Glc
- C 7 (Gal, Fuc) \rightarrow GlcNAc
- C 8 (Gal, GalNAc) \rightarrow Glc
- C 9 (Gal, Fuc, GalNAc) \rightarrow Glc
- C 10 (Gal, 2 Fuc, GalNAc) \rightarrow Glc
- C 11 (2 Gal, 2 Fuc, GalNAc) \rightarrow Glc
- C 12 (2 Gal, Man, Fuc, GlcNAc) \rightarrow Gal

V - LA FRACTION 7,5 p.100 EN ETHANOL : FRACTION D

8 osides ont été isolés de la fraction D (Fig.47 ; p.139) et leur comportement chromatographique est décrit dans le Tableau XXII (p.140). Leur composition molaire, déterminée avant et après réduction par le borohydrure de sodium, est précisée dans le Tableau XXIII (p.141).

A - LE GLUCIDE D 1 (11 mg)

Le glucide D 1 a été identifié à l'acide N-acétylneuraminique, d'après l'étude de son comportement chromatographique dans différents systèmes-solvants (acétate d'éthyle/acide acétique/eau (3:1:3) et n-propanol/n-butanol/HCl 0,1 N (1:2:1) et l'examen des courbes d'absorption des colorations qu'il fournit avec les réactifs à la diphénylamine et à l'acide periodique-acide thiobarbiturique.

B - L'OSIDE D 2 (19 mg)

L'oside D 2 ne renferme que des oses neutres. L'hydrolyse chlorhydrique libère du glucose et du fucose dans les rapports 1,11:1. La totalité du glucose disparaît après réduction par le borohydrure de sodium (Fig.48 ; p.142 et Tableau XXIII ; p.141). La structure de l'oside D 2 est donc :

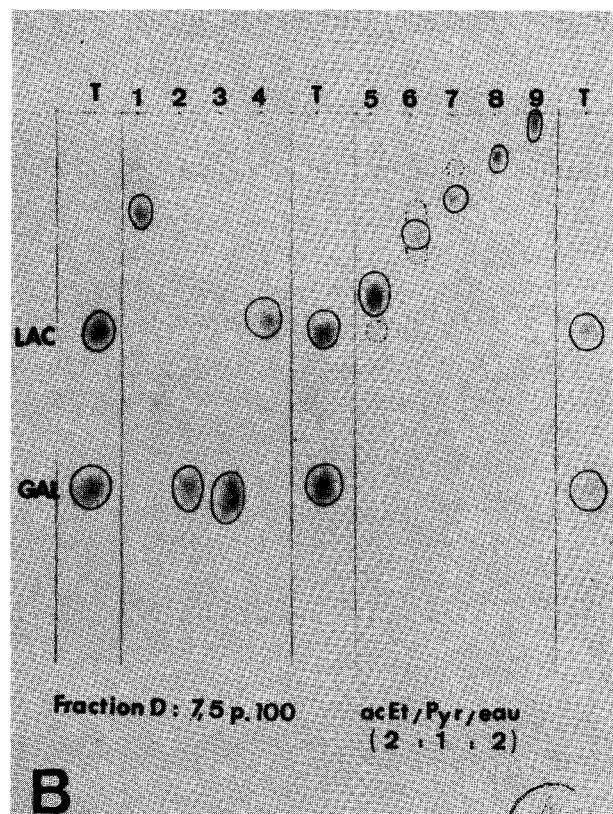
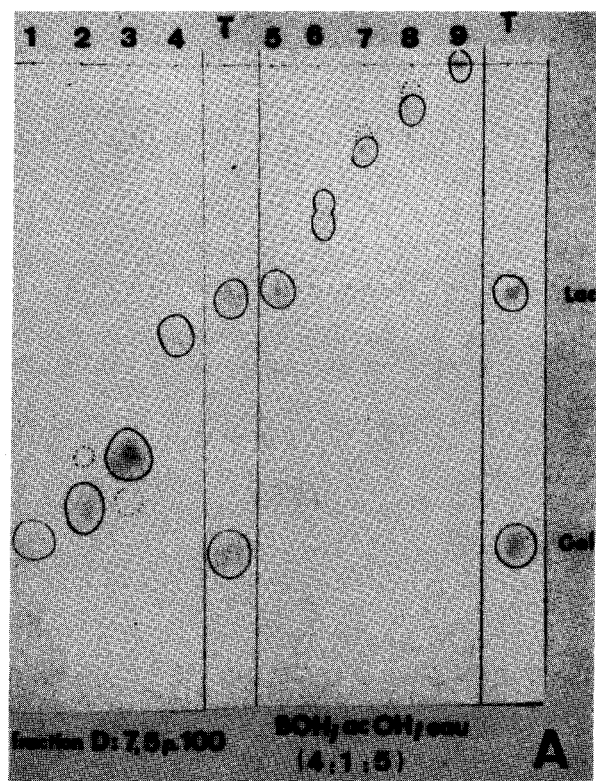


Figure 47

Chromatographie sur papier des oligosaccharides isolés de la fraction 7,5 p. 100 d'éthanol. Papier Whatman n° 3. Systèmes-solvants : A : *n*-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) ; B : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2). Révélation à l'oxalate d'aniline.

T a b l e a u XXII

Comportement chromatographique des osides de la fraction D
(7,5 p. 100 en éthanol)

Osides	Systèmes-Solvants (*)		
	1	2	3
D 1	1,96	0,44	
D 2	1,86	1,74	
D 3	1,66	1,76	
D 4	1,15	0,93	
D 5	0,96	0,83	
D 6	-	-	
D 7	0,38	0,45	0,535
D 8	0,19	0,28	0,32

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

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

(3) : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3)

Les vitesses de migration sont données par rapport à celle du lactose.

T a b l e a u XXIII

Composition molaire des oligosaccharides de la fraction D (7,5 p. 100 en éthanol)

	D 2	D 3	D 4	D 5	D 7	D 8
avant réduction	Oses			2,3	1,6	4,3
	Osamines	0	0	1	1	± 1
	Gal			1,26	1	2
	Glc	1,11	1,02		0,1	1,33
	Man				0,27	0,40
	Fuc	1		1	0,96	2,25
	Xyl		1			
	GalNAc				1	0 (±)
	GlcNAc				0,5	+
après réduction	Oses			1,3	6,69	
	Osamines			1	1	
	Gal			0,23	1	2
	Glc	0,2	0		±	± 0,42
	Man				0,26	0
	Fuc	1		1	0,96	2,36
	Xyl		1			
	GalNAc			1	0	0
	GlcNAc				±	±

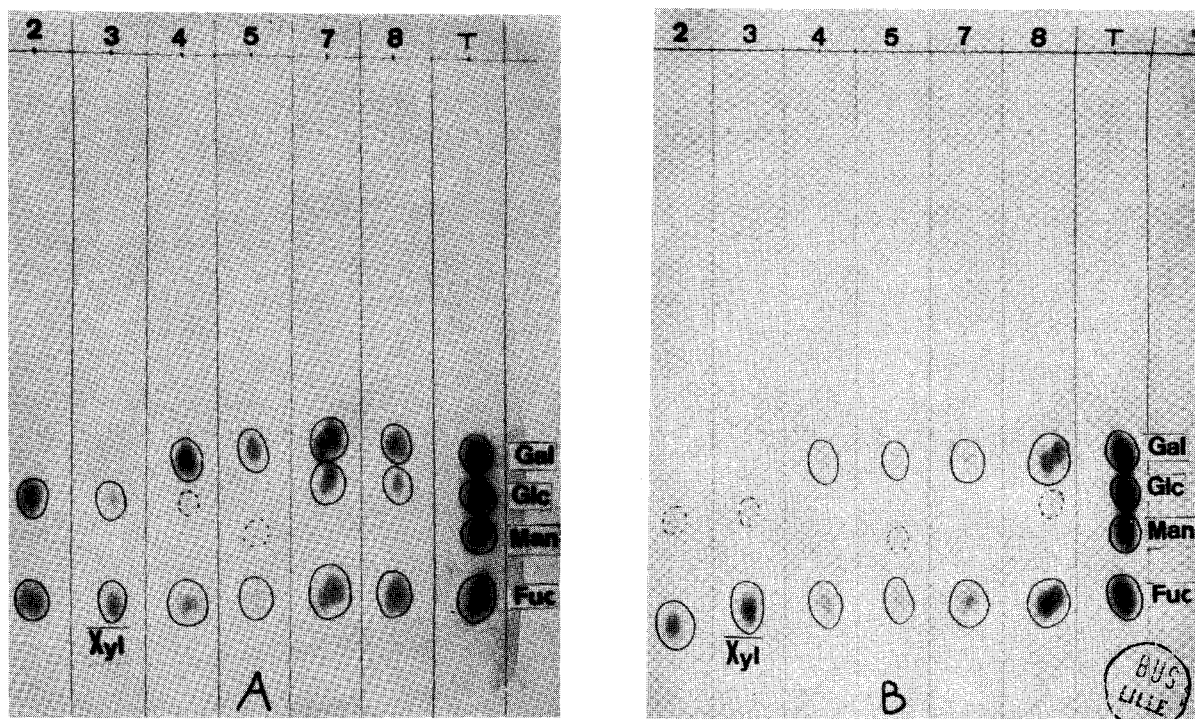


Figure 48

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques des osides de la fraction D, avant réduction (planche A) et après réduction (planche B) par le borohydrure de sodium. Papier Whatman n° 1. Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2). Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.



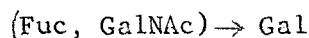
C - L'OSIDE D 3 (8 mg)

L'oside D 3 ne renferme que des oses neutres. L'hydrolyse chlorhydrique libère du glucose et du xylose dans les rapports 1,02:1. La totalité du glucose disparaît après réduction par le borohydrure de sodium. La structure de l'oside D 3 est donc :



D - L'OSIDE D 4 (4,2 mg)

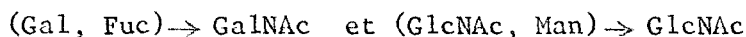
L'oside D 4 renferme des oses et des osamines, dans des rapports, déterminés avant et après réduction par le borohydrure de sodium, respectivement de 2,3:1 et 1,3:1. L'hydrolyse chlorhydrique, réalisée avant et après réduction par le borohydrure de sodium, libère du galactose et du fucose dans les proportions 1,26:1 et 0,23:1 (Tableau XXIII ; p.141). La désamination oxydative de l'osamine, élue de l'échangeur de cations, conduit au lyxose, caractéristique de la galactosamine (Fig.49 ; p.144). La structure de l'oside D 4 est donc :



E - L'OSIDE D 5 (1,5 mg)

L'oside D 5 renferme des oses et des osamines, dans des rapports, déterminés avant et après réduction par le borohydrure de sodium, respectivement de 1,6:1 et 6,69:1. Ces valeurs indiquent la présence d'osamine en position réductrice terminale.

L'hydrolyse chlorhydrique, réalisée avant et après réduction, libère du galactose, du glucose, du mannose et du fucose (Fig.48 ; p.142) dans les rapports 1:0,1:0,27:0,96 et 1:±:0,26:0,96. La désamination oxydative des osamines fournit un mélange de lyxose et d'arabinose, dans le rapport 2:1. Après réduction de l'oside par le borohydrure de sodium, la désamination oxydative des osamines élues de l'échangeur de cations ne fournit que de l'arabinose (Fig.49 ; p.144). Compte tenu, enfin, du comportement chromatographique de D 5, qui est celui d'un trisaccharide, nous pensons qu'il s'agit d'un mélange de deux trisaccharides, possédant respectivement les structures suivantes :



F - L'OSIDE D 7 (8 mg)

L'oside D 7 renferme des oses et des osamines dans le rapport 10 : 1. Ce rapport montre que le D 7 est en réalité le mélange de plusieurs constituants. L'hydrolyse chlorhydrique, effectuée avant et après réduction

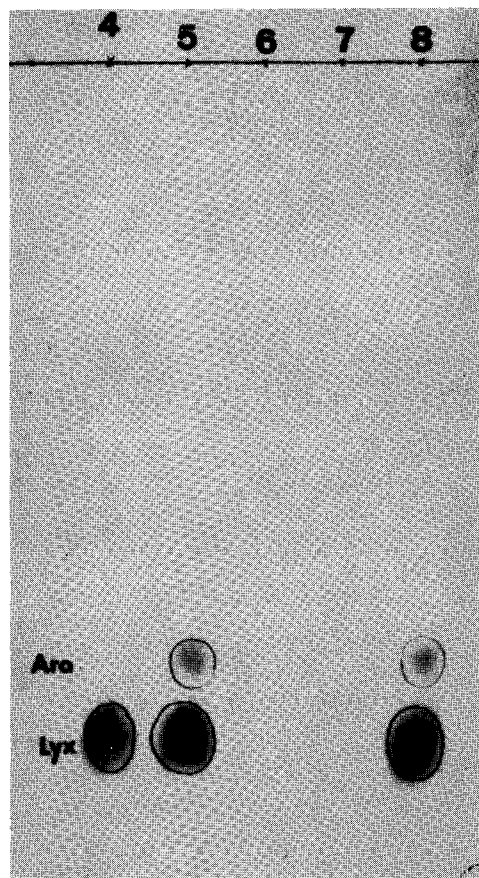


Figure 49

Chromatographie sur papier des produits de la désamination oxydative par la ninhydrine de la "fraction osamine" des hydrolysats acides des osides de la fraction D. Papier Whatman n° 3. Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline. T : mélange de glucides purs. Ara : arabinose ; Lyx : lyxose.

par le borohydrure de sodium, libère du galactose, du glucose, du mannose et du fucose dans les proportions suivantes :

2 : 1,33 : 0,40 : 2,25 et 2 : 0 : 0 : 2,36

La désamination oxydative des osamines, éluées de l'échangeur de cations, met en évidence du lyxose et de l'arabinose à l'état de traces (Fig.49 ; p.144). Nous nous trouvons donc en face d'un mélange de glucides, parmi lequel prédomine très nettement l'oside :

(2 Gal, 2 Fuc) → Glc

tandis que les souillures sont constituées d'au moins deux osides, l'un renfermant du mannose et de la N-acétyl-glucosamine, et l'autre, du galactose, du fucose et de la N-acétyl-galactosamine.

G - L'OSIDE D 8 (22 mg)

L'oside D 8 renferme des oses et des osamines dans le rapport 4,3 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique libère du galactose, du glucose, du mannose et du fucose dans les rapports :

2 : 1,05 : 0,60 : 2,50.

Ce rapport devient après réduction par le borohydrure de sodium :

2 : 0,42 : 0,73 : 2,45.

La désamination oxydative des osamines fournit du lyxose et des traces d'arabinose. En tenant compte du fait que l'oside D 8 a le comportement chromatographique d'un hexasaccharide et considérant le mannose et la glucosamine comme les produits d'hydrolyse d'un second oside contaminant, nous attribuons à l'oside D 8 la structure :

(2 Gal, 2 Fuc, GalNHAc) → Glc

H - CONCLUSION

L'étude des osides de la fraction D (7,5 p.100 d'éthanol) nous a permis de caractériser les glucides suivants :

- D 1 acide N-acétyl-neuraminique
- D 2 Fuc → Glc
- D 3 Xyl → Glc
- D 4 (Fuc, GalNac) → Gal
- D 5 (Gal, Fuc) → GalNac et (Man, GlcNac) → GlcNac
- D 6 non identifié
- D 7 (2Gal, 2Fuc) → Glc
- D 8 (2Gal, 2 Fuc, GalNac) → Glc

VI - LA FRACTION E (10 p.100 d'ETHANOL)

10 osides ont été isolés de la fraction éthanolique à 10 p.100 (Fig.50 ; p.147). 4 d'entre eux sont acides (Fig.51 ; p.148). Leur comportement chromatographique est précisé dans le Tableau XXIV (p.149). Leur composition molaire, déterminée avant et après réduction est donnée dans le Tableau XXV (p.150).

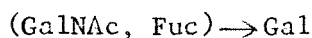
A - L'OSIDE E 1 (0,7 mg)

L'oside E 1 a été isolé en de très faibles quantités. Il renferme des oses neutres et des acides uroniques dans la proportion 1 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique libère du glucose. Après réduction par le borohydrure, le glucose disparaît, tandis que des traces d'acides uroniques restent décelables par la méthode colorimétrique au carbazol. Les trop faibles quantités de substrats qui étaient à notre disposition ne nous ont pas permis d'identifier l'acide uronique.

B - L'OSIDE E 2 (2,2 mg)

L'oside E 2 renferme des oses et des osamines, dans les rapports; déterminés avant et après réduction par le borohydrure de sodium, de 1,75 : 1 et 1,1 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique libère du galactose, du glucose et du fucose (Fig.52 ; p.151), dans les proportions 1,1 : 0,2 : 1. Après réduction, ces rapports sont : 0,39 : 0 : 1

La désamination oxydative de l'osamine conduit au lyxose (Fig.53 ; p.151). L'oside E 2 possède la structure du trisaccharide suivant :



souillé probablement d'un disaccharide constitué de galactose et de glucose.

C - L'OSIDE E 3 (moins de 1 mg)

L'oside E 3, isolé en de très faibles quantités, renferme des oses neutres et des acides uroniques, dans les proportions 2,2 : 1. L'ose neutre a été identifié au glucose. Faute de substrat, la structure de cet oside n'a pu être étudiée plus en détail.

D - L'OSIDE E 4 (1,4 mg)

L'oside E 4 renferme des oses neutres et des acides sialiques dans les proportions 1,16 : 1. Après réduction, seul subsiste l'acide sialique. L'ose neutre a été identifié au galactose. L'oside E 4 possède la structure suivante : Acide sialique \rightarrow Galactose.

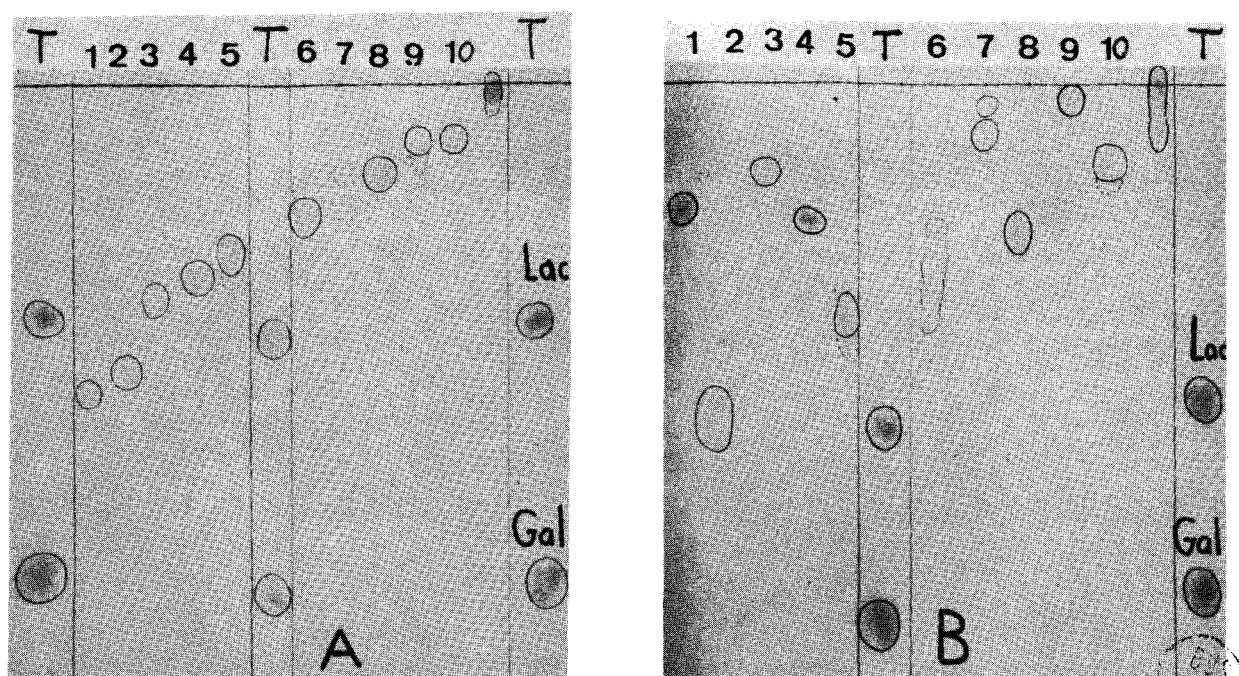


Figure 50

Chromatographie sur papier des oligosaccharides isolés de la fraction 10 p. 100 d'éthanol (Fraction E). Papier Whatman n° 3. Systèmes-solvants : A : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) ; B : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2). Révélation à l'oxalate d'aniline.

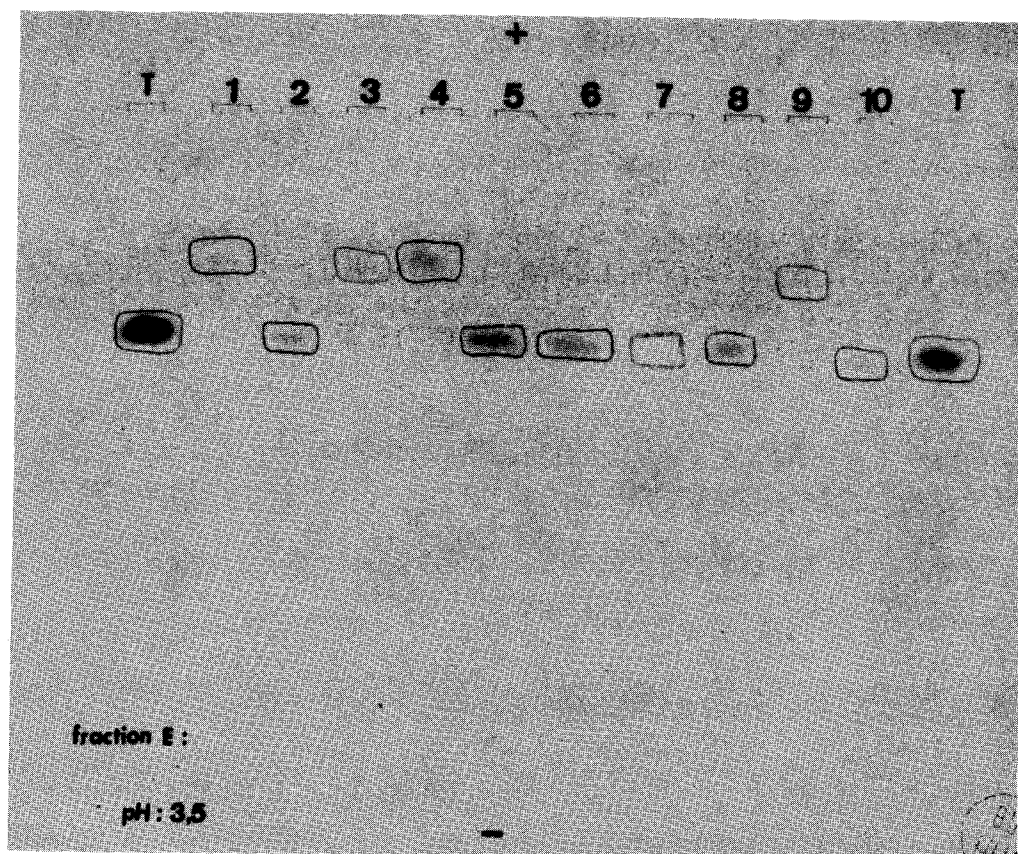


Figure 51

Electrophorèse sur papier des osides de la fraction E. Papier Whatman n° 3.
Système-tampon de MICHL (288) de pH 3,5. T : solution témoin de lactose.

Tableau XXIV

Comportement chromatographique des osides de la fraction E

Osides	Systèmes-Solvants (*)	
	1	2
E 11	1,30	0,37
E 2	1,19	0,95
E 3	0,88	0,25
E 4	0,78	0,41
E 5	0,67	0,68
E 6	-	-
E 7	-	-
E 8	0,36	0,45
E 9	0,23	0,05
E 10	0,20	0,25

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

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

Les vitesses de migration sont données par rapport à celle du lactose.



Tableau XXV

Composition molaire des osides de la fraction E

		E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 8	E 10	
avant réduction	Oses	1,1	1,75	2,2	1,16	6,1	2,62	2,85	
	Osamines	0	1	0	0	1	1	1	
	Acides Sialiques	0	0	0	1				
	Acides Uroniques	1	0	1	0				
	Gal		1,1		++	0,68	0,72	0,54	
	Glc	++	0,2	++		0,51	0,40	0,28	
	Man					1	1	1	
	Fuc		1			0,37	0,68	0,57	
	GalNAc		1,2					0,25	
	GlcNAc					++	++	1	
	après réduction	Oses	0	1,1	0	0,24	16	5,72	5,2
Osamines			1		0	1	1	1	
Acides Sialiques					1				
Acides Uroniques		++		++	0				
Gal			0,39			0,60	0,68	0,49	
Glc			±			0,21	0,11	0,16	
Man						1	1	1	
Fuc			1			0,35	0,70	0,51	
GalNAc			++					+	
GlcNAc								+	



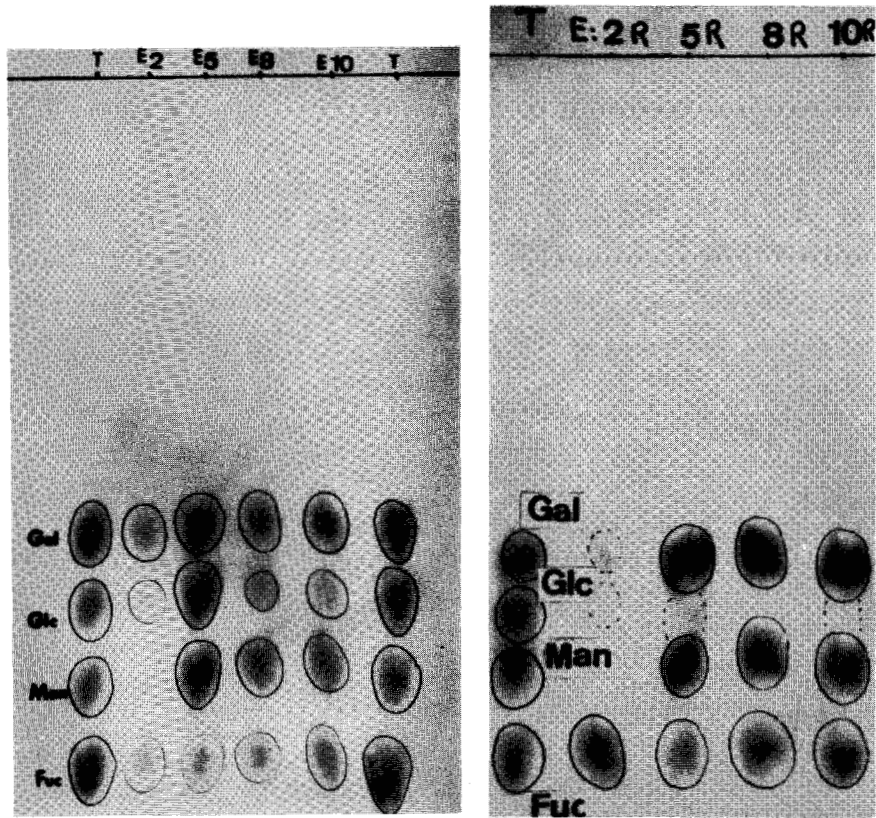


Figure 52

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques des osides de la fraction E, avant et après réduction par le borohydrure de sodium. Papier Whatman n° 1. Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2). Révélation à l'oxalate d'aniline.

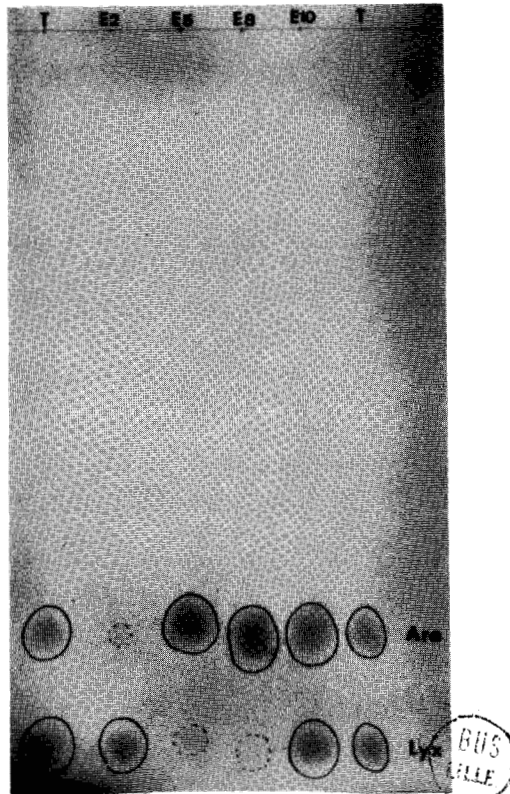


Figure 53

Chromatographie sur papier des produits de la désamination oxydative par la ninhydrine de la "fraction osamine" des hydrolysats acides des osides de la fraction E. Papier Whatman n° 3. Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2). Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

E - L'OSIDE E 5 (1,2 mg)

L'oside E 5 renferme des oses et des osamines dans le rapport 6 : 1. Ce rapport devient 16 : 1 après réduction par le borohydrure de sodium. L'hydrolyse chlorhydrique libère du galactose, du glucose, du mannose et du fucose (Fig.52 ; p.151), dans des rapports, déterminés avant et après réduction par le borohydrure de sodium, de 0,68 : 0,51 : 1 : 0,37 et 0,60 : 0,31 : 1 : 0,35.

La désamination oxydative de l'osamine, élue de l'échangeur de cations conduit à l'arabinose (Fig.53 ; p.151). Ces valeurs témoignent de l'hétérogénéité du composé E 5, qui possède 2 oses en position réductrice terminale, du glucose et de la N-acétylosamine. L'un a des osides a fort probablement la structure suivante :

(2 Gal, Fuc) → Glc, tandis que le second est soit un tri-, soit un tétrasaccharide dont les structures possibles sont :

(2 Man) → GlcNAc ou

(2 Man, GlcNAc) → GlcNAc

F - L'OSIDE E 8 (8 mg)

L'oside E 8 renferme des oses et des osamines dans des rapports déterminés avant et après réduction par le borohydrure de sodium, de 2,62 : 1 et 5,12 : 1. De même, les rapports molaires des oses neutres, libérés par hydrolyse chlorhydrique avant et après réduction (Fig.52 ; p.151), sont, pour le galactose, le glucose, le mannose et le fucose :

0,72 : 0,40 : 1 : 0,68 et

0,68 : 0,11 : 1 : 0,70.

La désamination oxydative de l'osamine conduit exclusivement à l'arabinose. Ces résultats ne s'expliquent que par l'existence du mélange de deux osides dont les structures respectives sont :

(a) (2Gal, 2Fuc) → Glc

(b) (2Man, GlcNAc) → GlcNAc

Le glucide E 8 possède d'ailleurs le comportement chromatographique de D 7, qui a été identifié à (a).

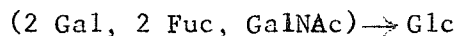
G - L'OSIDE E 10 (1,4 mg)

L'oside E 10 renferme des oses et des osamines dans des rapports déterminés avant et après réduction par le borohydrure de sodium de 2,85 : 1 et 5,28 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique, réalisée avant et après réduction, libère du galactose, du glucose, du mannose et du fucose (Fig.52 ; p.151) dans les proportions :

0,54 : 0,28 : 1 : 0,57

et 0,49 : 0,16 : 1 : 0,51

La désamination oxydative des osamines, éluées des résines échangeuses d'ions, conduit à un mélange d'arabinose et de lyxose (Fig.53 ; p.151), dans les rapports, estimés par approximation, de 3 à 4 : 1. Le composé E 10 est en fait le mélange de deux oligosaccharides, le premier constitué de galactose, glucose, fucose et galactosamine, selon le schéma :



et le second de mannose et de glucosamine. Ce dernier possède au moins deux osamines, dont l'une en position réductrice terminale. Nous n'avons pu malheureusement déterminer avec certitude le rapport $\frac{\text{mannose}}{\text{N-acétylglucosamine}}$.

H - CONCLUSION

Les oligosaccharides isolés de la fraction E possèdent les structures suivantes :

E 1	acide uronique \rightarrow glucose
E 2	(GalNAc, Fuc) \rightarrow Gal
E 3	(acide uronique) + Glc
E 4	Acide sialique \rightarrow Gal
E 5	(2 Gal, Fuc) \rightarrow Glc + (2 Man) \rightarrow GlcNAc ou (2 Man, GlcNAc) \rightarrow GlcNAc
E 6	} non identifiés
E 7	
E 8	(2 Gal, 2 Fuc) \rightarrow Glc + (2 Man, GlcNAc) \rightarrow GlcNAc
E 9	non identifié
E 10	(2 Gal, 2 Fuc, GalNAc) \rightarrow Glc + (n Man, GlcNAc) \rightarrow GlcNAc

VII - LA FRACTION A 15 p.100 D'ETHANOL : FRACTION F

9 oligosaccharides ont été isolés de la fraction à 15 p.100 d'éthanol (Fig.54 ; p.154). Les osides 3,4,5 et 7 donnent en électrophorèse dans le tampon de MICHL (pH 3,5) 2 bandes migrant respectivement dans la zone des glucides neutres et acides (Fig.55 ; p.154).

Après avoir été isolés par électrophorèse préparative sur papier, ces osides, acides ou neutres, se dédoublent à nouveau, ce qui nous amène à penser que nous nous trouvons en présence des formes lactoniques et acides d'un même oligosaccharide renfermant un constituant acide. Le comportement chromatographique des osides de la fraction F est donné dans le Tableau XXVI ; p.155).

A - L'OSIDE F 1 (1,8 mg)

L'oside F 1 fournit avec le réactif à l'urée-chlorhydrique, la coloration bleue spécifique des cétohexoses. L'hydrolyse ménagée (H_2SO_4 , 0,1 N, 100°C, 1 h)

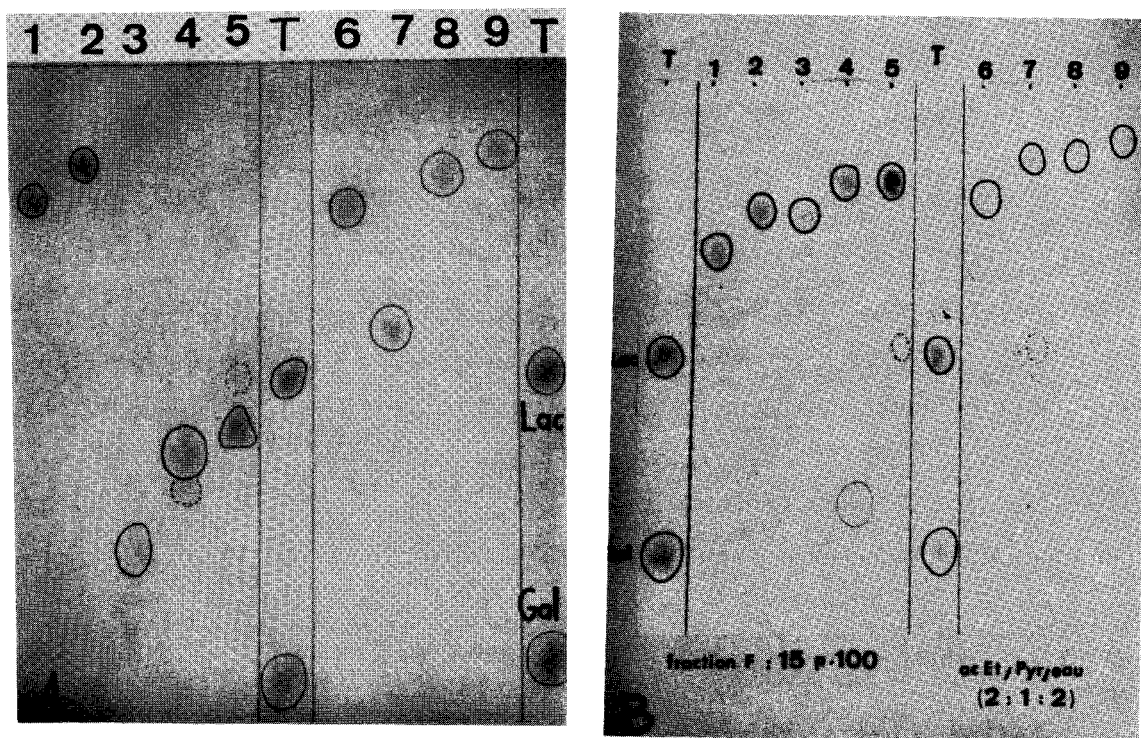


Figure 54

Chromatographie sur papier des osides de la fraction F (15 p. 100 d'éthanol). Papier Whatman n° 3. Systèmes-solvants : A : *n*-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) ; B : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2). Révélation à l'oxalate d'aniline.

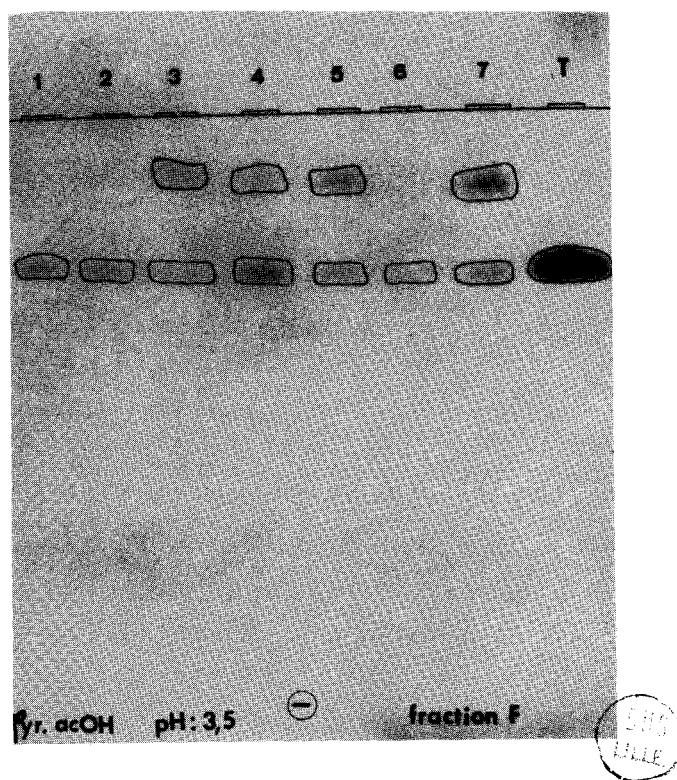


Figure 55

Electrophorèse sur papier des osides de la fraction F. Papier Whatman n° 3. Système tampon de MICHL (289) de pH 3,5. Révélation à l'oxalate d'aniline.

T a b l e a u XXVI

Comportement chromatographique des osides de la fraction F
(15 p. 100 d'éthanol)

Osides	Systèmes-Solvants (*)	
	1	2
F 1	0,45	0,61
F 2	0,32	0,47
F 3	1,57	0,48
F 4	1,25	0,36
F 5	1,17	0,36
F 6	0,46	0,42
F 7	0,85	0,28
F 8	0,36	0,26
F 9	0,29	0,21

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

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

Les vitesses de migration sont données par rapport à celle du lactose.

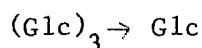


conduit à un mélange, dans les rapports estimés visuellement sur les chromatogrammes, de 1 : 3. La faible quantité de substrat en notre possession ne nous a pas permis de préciser la structure de ce gluco-tri-fructose.

B - L'OSIDE F 2 (14 mg)

L'oside F 2 ne contient que des oses neutres. L'hydrolyse chlorhydrique ne libère que du glucose. Le degré de polymérisation, déterminé en dosant le glucose avant et après réduction est de : $n = \frac{216}{216 - 155} = 4,2$

La structure de l'oside F 2 est donc :

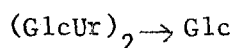


C - L'OSIDE F 3 (1,2 mg)

L'oside F 3 possède le comportement chromatographique et électrophorétique d'une substance acide (Figure 55 ; p.154). Les dosages colorimétrique à l'orcinol sulfurique et au carbazol sulfurique indiquent qu'il renferme des oses neutres et des acides uroniques dans le rapport 1 : 1,76. Après réduction la totalité des oses neutres disparaît.

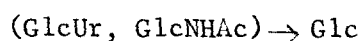
L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 1 h) libère exclusivement du glucose et un glucide possédant le comportement chromatographique de la glucurone. (Fig.56 ; p.157). Cette dernière a été isolée par chromatographie préparative sur papier, reprise par une goutte d'ammoniaque à 5 p.100 et soumise à l'électrophorèse dans le tampon boraté de HAUGH et LARSEN (290)

L'acide uronique, révélé par l'oxalate d'aniline a le comportement chromatographique de l'acide glucuronique. La structure de l'oside F 3 est donc



D - L'OSIDE F 4 (moins de 1 mg)

L'oside F 4 possède les propriétés d'un glucide acide. Les dosages colorimétriques indiquent qu'il renferme des oses neutres, des osamines et des acides uroniques dans les rapports 1,1 : 1 : 0,97 (Tableau XXVII ; p. 158). Ce rapport devient 0 : 1 : 1 après réduction par le borohydrure de sodium. L'hydrolyse chlorhydrique libère du glucose, de la glucosamine (identifiée par désamination oxydative) et de la glucurone). La structure de l'oside F 4 est donc :



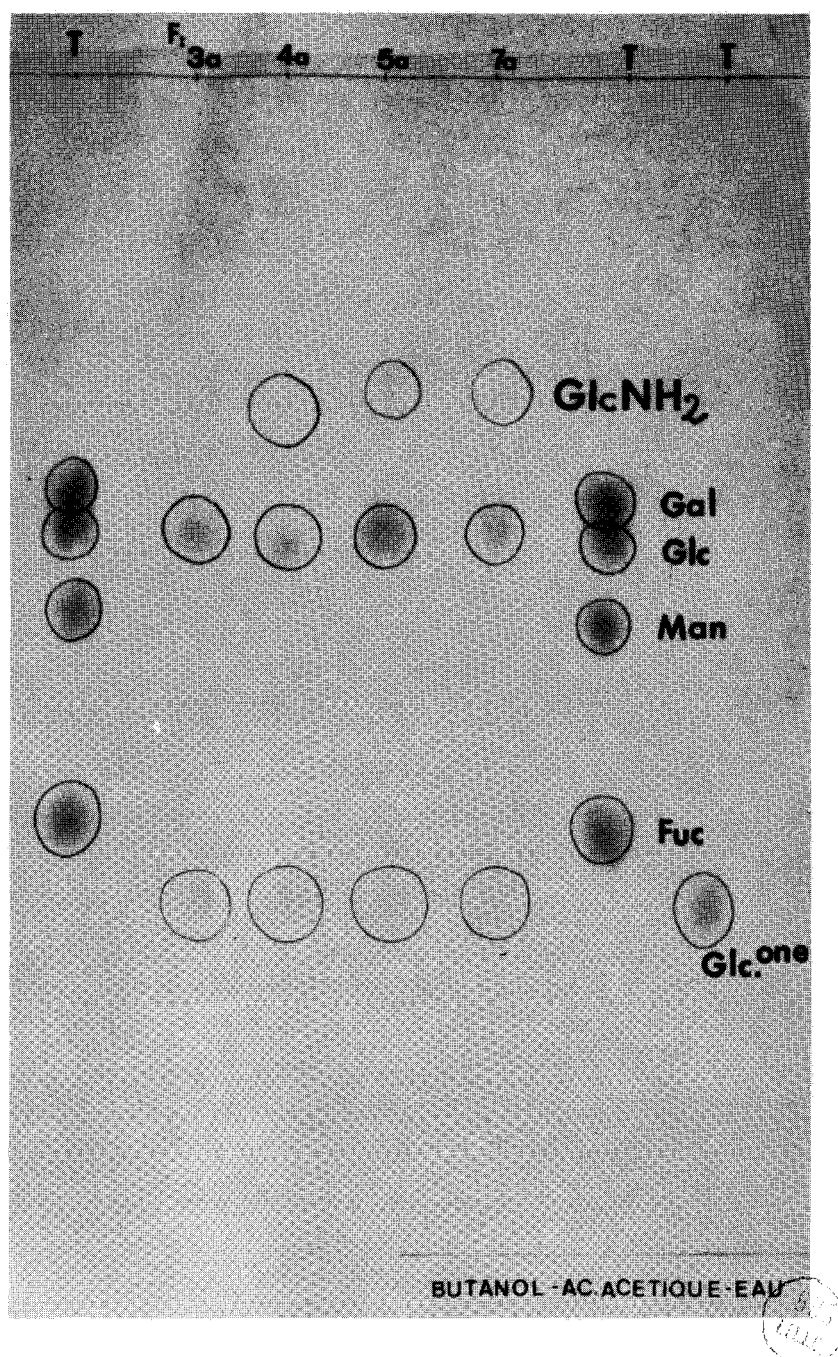


Figure 56

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques des osides de la fraction F. Papier Whatman n° 1. Système-solvant : n-butanol/ acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Révélation à l'oxalate d'aniline.

Tableau XXVII

Composition molaire des osides de la fraction F

		F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	F 7	F 8	F 9
avant réduction	Oses			1	1,1	1,20	1,28	1,20	4,19	4,7
	Osamines	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	Acides Uroniques			1,76	0,97	1,05		1,18		
	GlcUr			++	+	++		++		
	Gal						0,54		2	1,85
	Glc	1	4	++	+	++	0,61	++	1,20	0
	Man						1			1
	Fuc						0,51		0,90	1,83
	FRU	3								
	GalNac					0	++	0	1	0
	GlcNac				+	++	++	++		++
	après réduction	Oses			0,29	0	0	2,26	0	3,22
Osamines					+	++	1	++	1	0
Acides Uroniques				1,76	+	++		++		
GlcUr				++	+	++		++		
Gal							0,57		2	1,87
Glc			3	0	0	0	1,19	0	0	0
Man							1			1
Fuc							0,51		0,95	1,60
FRU										
GalNac							++		1	
GlcNac					+	±	++			0

BUS
LIFE

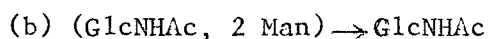
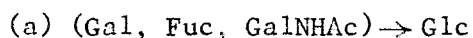
E - L'OSIDE F 5 (0,940 mg)

L'oside F 5 possède les propriétés d'un glucide acide. Il renferme des oses neutres, des osamines et des acides uroniques dans les rapports, déterminés avant réduction par le borohydrure de sodium de 1,20 : 1 : 1,05. Les oses neutres disparaissent totalement après réduction. L'hydrolyse chlorhydrique libère du glucose, de la glucosamine et de la glucurone (Fig.56 ; p. 157). L'oside F 5 possède donc la structure suivante :

F - L'OSIDE F 6 (2,3 mg)

L'oside F 6 renferme des oses neutres et des osamines, dans des rapports, déterminés avant et après réduction, de 2,8 : 1 et 2,26 : 1. Il est constitué de galactose, de glucose, de mannose et de fucose. La majeure partie du glucose est détruite par l'action du borohydrure de sodium. La désamination oxydative des osamines conduit à un mélange d'arabinose et de lyxose (Fig.58 ; p.160), dans le rapport d'environ 2 : 1. Après réduction par le borohydrure de sodium, ce rapport tend vers 1.

Compte tenu que F 6 possède le comportement chromatographique d'un tétrasaccharide, ces résultats ne sont interprétables que si l'on considère F 6 comme étant constitué du mélange des deux oligosaccharides possédant les structures suivantes :

G - L'OSIDE F 7 (moins de 0,5 mg)

L'oside F 7, isolé en de très faibles quantités a pu être identifié à un trisaccharide renfermant du glucose, en position terminale réductrice, de l'acide uronique et une osamine. La faible quantité de substrat ne nous a pas permis d'identifier avec certitude l'osamine et l'acide uronique.

H - L'OSIDE F 8 (2,2 mg)

L'oside F 8 renferme des oses neutres et des osamines dans les rapports, déterminés avant et après réduction : 4,19 ; 1 et 3,22 : 1. Il est composé de galactose, de glucose, de fucose et de galactosamine (Fig. 57 ; p.160 et 58 ; p.160) dans les rapports 2 : 1,20 : 0,90 : 1. Le glucose est totalement détruit après réduction par le borohydrure de sodium. L'oside F 6 possède donc la composition suivante :



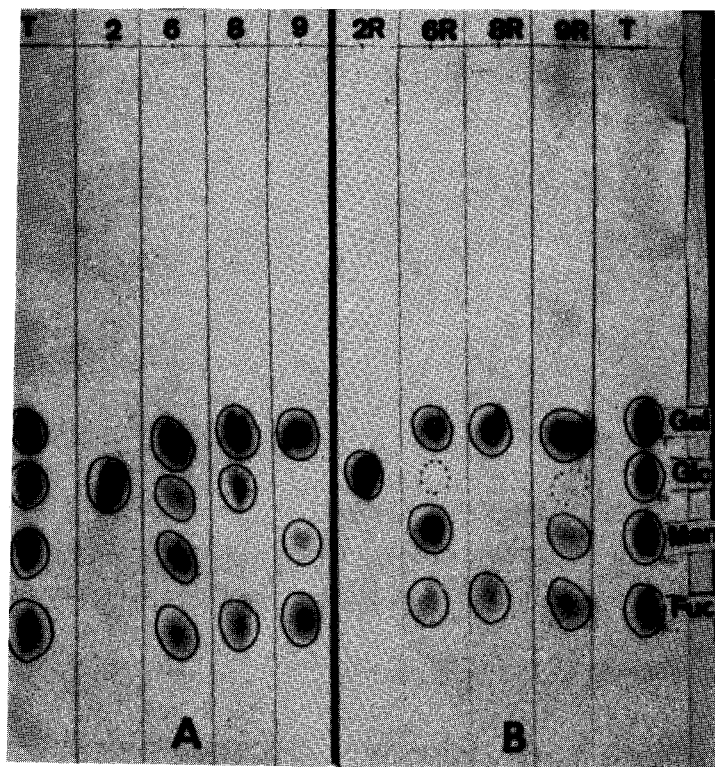


Figure 57

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques des osides neutres de la fraction F (15 p. 100 d'éthanol) avant (A) et après réduction (B) par le borohydrure de sodium. Papier Whatman n° 1. Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2). Révélation à l'oxalate d'aniline.

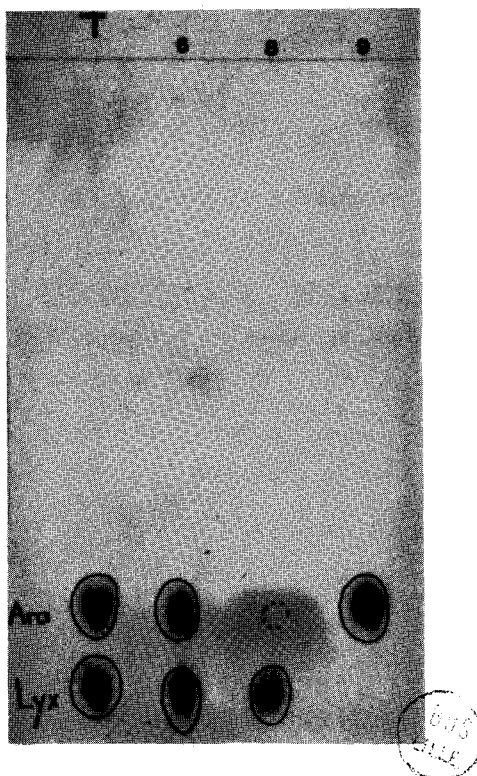


Figure 58

Chromatographie des produits de la désamination oxydative par la ninhydrine de la "fraction osamine" des hydrolysats acides des osides de la fraction F. Papier Whatman n° 3. Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

I - L'OSIDE F 9 (4,2 mg)

L'oside F 9 renferme des oses et des osamines dans les rapports 4,7 : 1. Après réduction, ce rapport devient 12 : 1 et montre que l'osamine est en position terminale réductrice. L'hydrolyse chlorhydrique libère du galactose, du mannose et du fucose (Fig.57 ; p.160) dans des rapports qui restent pratiquement inchangés après réduction :

1,85 : 1 : 1,83 et 1,87 : 1 ; 1,60

La désamination oxydative de l'osamine, éluée de l'échangeur de cations conduit à l'arabinose (Fig.58 ; p.160) caractéristique de la glucosamine. L'oside F 9 possède donc la structure suivante :

(2 Gal, Man, 2 Fuc) → GlcNAc

J - CONCLUSION

Les osides de la fraction F (15 p.100 d'éthanol) possèdent les structures suivantes :

F 1	(3 Fru, Glc)	
F 2	(3 Glc) → Glc	
F 3	(2 GlcUr) → Glc	
F 4	(GlcUr, GlcNHAc) → Glc	
F 5	(GlcUr, GlcNHAc) → Glc	
F 6	(Gal, Fuc, GalNHAc) → Glc + (GlcNHAc, 2 Man)	GlcNHAc
F 7	(Ac. Ur, osamine) → Glc	
F 8	(2 Gal, GlcNHAc, Fuc) → Glc	
F 9	(2 Gal, Man, 2 Fuc) → GlcNHAc	

VIII - LA FRACTION A 25 p.100 D'ETHANOL. : FRACTION G

5 osides ont été isolés de la fraction à 25 p.100 d'éthanol, par chromatographie préparative sur papier dans les systèmes-solvants : n-butanol/ acide acétique/eau (4:1:5) et acétate d'éthyle/pyridine/eau (2:1:2). Ces 5 osides possèdent le comportement électrophorétique de glucides acides (Fig. 59 ; p.162). Les composés G 1 et G 2 se dédoublent en deux bandes migrant respectivement dans la zone des composés neutres et acides. Chacun de ces sucres, isolé à l'état pur par électrophorèse préparative sur papier fournit à nouveau deux bandes qui correspondent donc aux formes lactone et acide d'une même substance. Le comportement chromatographique et la composition molaire des osides de la fraction G sont donnés dans les Tableaux XXVIII (p.163) et XXIX (p.164).

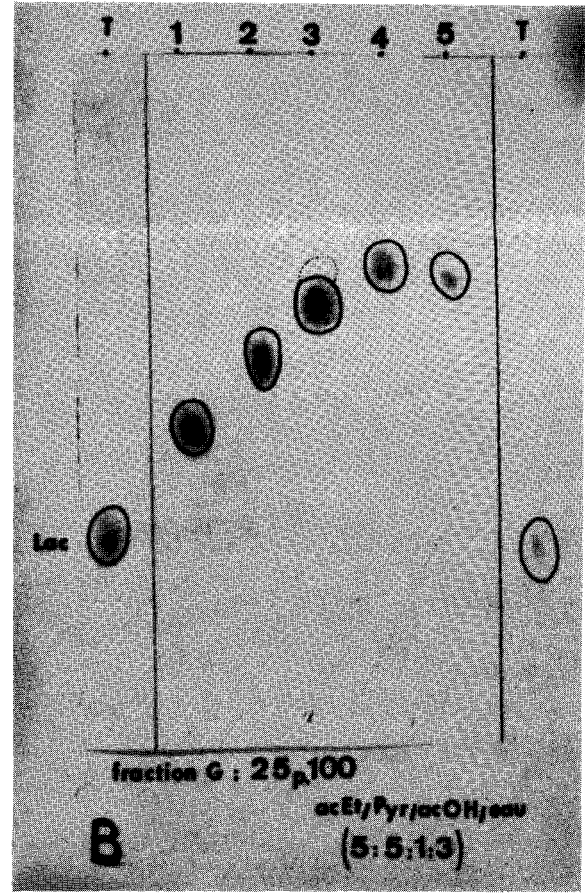
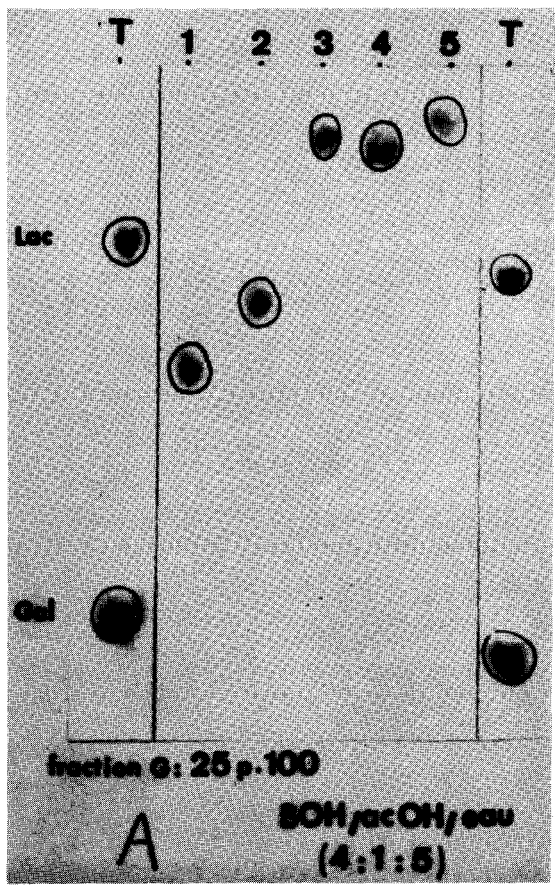


Figure 59

Chromatographie sur papier des oligosaccharides isolés de la fraction 25 p. 100 d'éthanol (fraction G). Papier Whatman n° 3. Systèmes-solvants : A : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) ; B : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3).

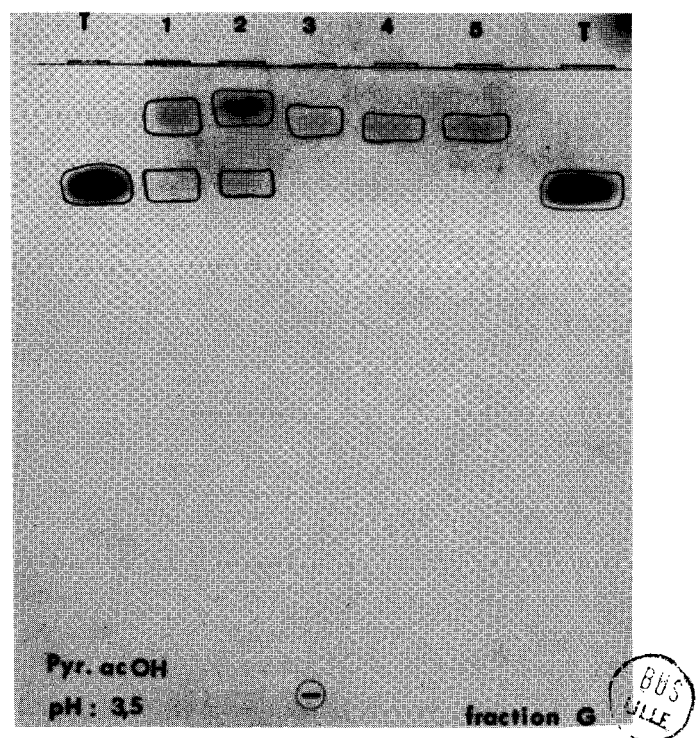


Figure 60

Electrophorèse sur papier des oligosaccharides de la fraction G. Papier Whatman n° 3. Système tampon de MICHL (291) de pH 3,9.

T a b l e a u XXVIII

Comportement chromatographique des osides de la fraction G
(25 p. 100 d'éthanol)

	Systèmes-Solvants (*)		
	1	2	3
1	1,68	0,50	0,77
2	1,26	0,49	0,62
3	0,37	0,47	0,51
4	0,42	0,37	0,43
5	0,27	0,40	0,45

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

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

(3) : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3)

Les vitesses de migration sont données par rapport à celle du lactose.

T a b l e a u XXIX

Composition molaire des osides de la fraction G

		G 1	G 2	G 3	G 4	G 5
avant réduction	Oses		1	2,2	1,30	2,14
	Osamines	1			1,02	
	Acides Uroniques	1,06	1,03			
	Acides Sialiques			1	1	1
	Gal			1	1	1
	Glc		1	1,16		1,14
	NANA			1	1	1
	GlcUr	1,06	1,03			
	GlcNAc	1			1	
	après réduction	Oses		0,2	1,25	++
Osamines		0			0	
Acides Uroniques		++	1			
Acides Sialiques				1	++	1
Gal				1	++	1
Glc			0	0		0,1
NANA				1	++	1
GlcUr		1	1			
GlcNAc		0			0	

BUS
LILLE

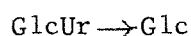
A - L'OSIDE G 1 (3,4 mg)

L'oside G 1 renferme des osamines et des acides uroniques dans le rapport 1 : 1,06 et la totalité des osamines est réduite après action du borohydrure de sodium (Tableau XXVIII ; p.163). L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 2 h ; 100°C) libère de la glucosamine, identifiée après désamination oxydative par la ninhydrine (Fig.62 ; p.166) et de l'acide glucuronique identifié par électrophorèse dans le système-tampon de HAUGH et LARSEN (292).

Ces résultats nous permettent d'attribuer à l'oside G 1 la structure suivante : $\text{GlcUr} \rightarrow \text{GlcNHAc}$

B - L'OSIDE G 2 (4,6 mg)

L'oside G 2 renferme des oses neutres et des acides uroniques dans le rapport 1 : 1,03. L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 2 h ; 100°C) libère du glucose et de l'acide glucuronique (Fig.61 ; p.166). Le glucose disparaît après action du borohydrure de sodium (Fig.63 ; p.166). L'oside G 2 possède donc la structure :

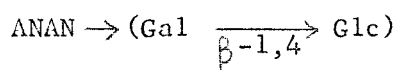


C - L'OSIDE G 3 (13,1 mg)

L'oside G 3 renferme des oses neutres et des acides sialiques dans le rapport 2,2 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 1 h ; 100°C) libère du galactose et du glucose dans les proportions 1 : 1,16 (Figure 64 ; p.167 et Tableau XXVIII ; p.163). Le glucose est en position terminale réductrice (Fig.64 ; p.167).

L'hydrolyse acide ménagée de l'oside G 3 (H_2SO_4 0,1 N ; 100°C ; 15 mn) libère de l'acide N-acétylneuraminique, identifié par chromatographie sur papier dans le système-solvant n-butanol/n-propanol/HCl 0,1N (1:2:1) et du lactose (Fig.65 ; p.167).

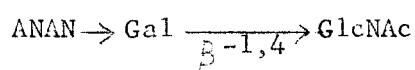
La structure de l'oside G 3 est donc celle d'un sialyllactose :



D - L'OSIDE G 4 (1,8 mg)

L'oside G 4 renferme des oses neutres, des osamines et des acides sialiques dans les rapports 1,3 : 1,02 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 1 h ; 100°C) libère du galactose et de la glucosamine (Fig.64 ; p.167). La glucosamine est en position terminale réductrice. L'hydrolyse acide ménagée (H_2SO_4 0,1 N ; 100°C ; 15 mn) libère de l'acide N-acétylneuraminique et un diholoside possédant le comportement chromatographique de la N-acétyllactosamine (Fig. 65 ; p. 167).

L'oside G 4 possède donc la structure suivante :



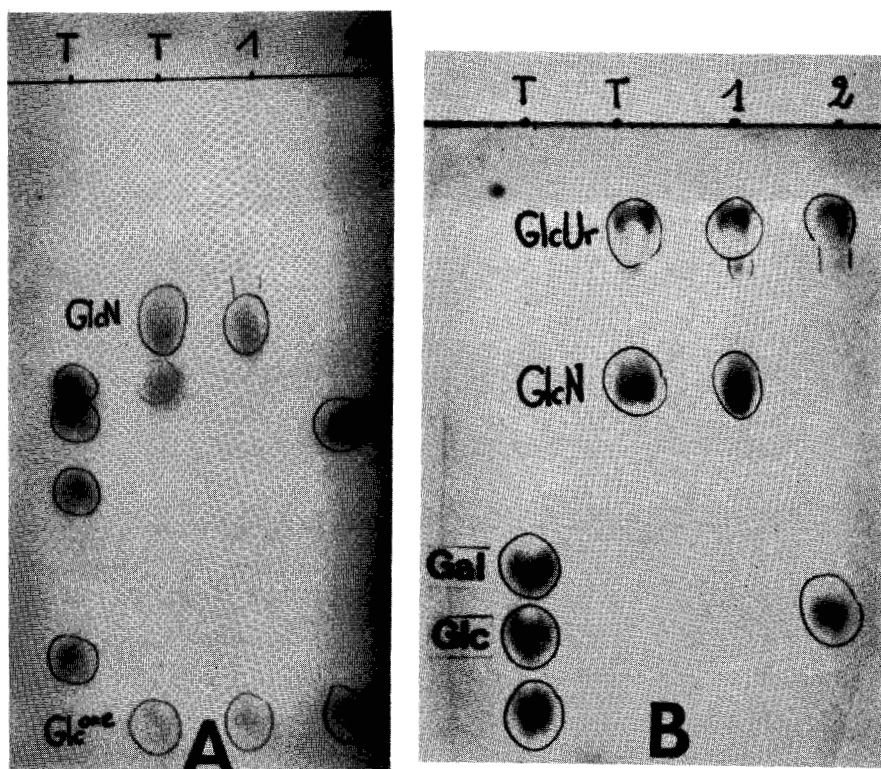


Figure 61

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques des osides G 1 et G 2. Papier Whatman n° 3. Systèmes-solvants : A : *n*-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) ; B : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2).

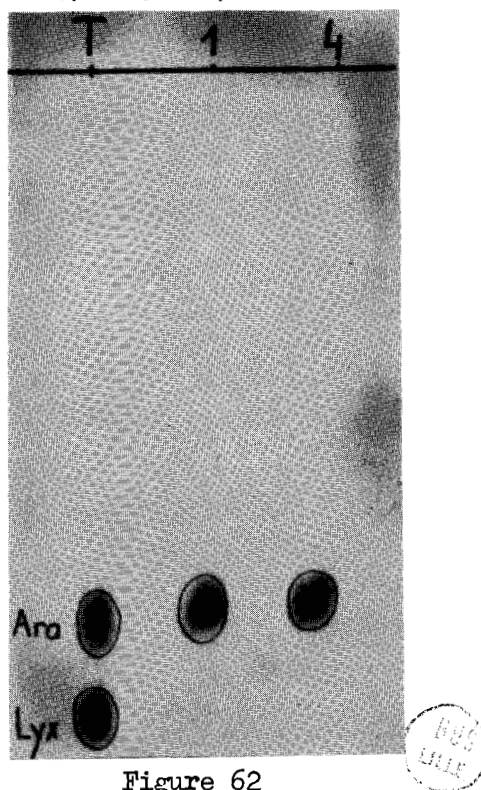


Figure 62

Chromatographie sur papier des produits de la désamination oxydative par la ninhydrine de la "fraction osamine" des hydrolysats acides des osides G 1 et G 4. Papier Whatman n° 3 ; Système-solvant : *n*-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

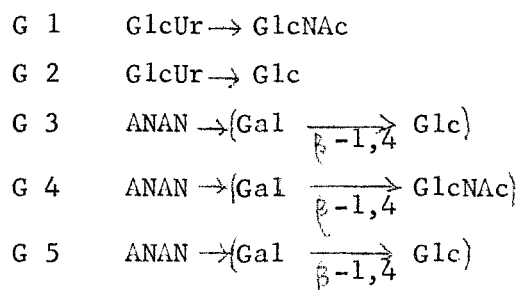
E - L'OSIDE G 5 (3,2 mg)

L'oside G 5 renferme des oses neutres et des acides sialiques dans les rapports 2,14 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique (HCl ; 100°C ; 1 h) libère du galactose et du glucose dans des proportions équimoléculaires (Fig.64 ; p.167). Le glucose est en position terminale réductrice. L'hydrolyse acide ménagée (H₂SO₄ 0,1 N ; 100°C ; 15 mn) libère de l'acide N-acétylneuraminique et du lactose (Fig.65 ; p.167).

L'oside G 5 possède donc la structure d'un sialylactose :

F - CONCLUSION

Les osides isolés de la fraction à 25 p.100 d'éthanol possèdent les structures suivantes :

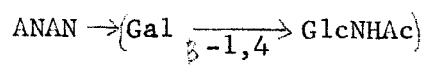
IX - LA FRACTION A 50 p.100 D'ETHANOL : FRACTION H

Seuls deux osides ont pu être isolés de la fraction H dans un état de pureté satisfaisant. Leur comportement chromatographique et leur composition molaire en oses sont donnés dans les Tableaux XXX et XXXI (p.169).

A - L'OSIDE H 1

L'oside H 1 renferme des oses neutres, des osamines et des acides sialiques dans les rapports 1,2 : 0,96 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 100°C ; 1 h) libère du galactose et de la glucosamine dans des proportions équimoléculaires (Fig.66 et 67 ; p.170). La glucosamine est en position réductrice terminale.

L'hydrolyse acide ménagée (H₂SO₄ 0,1 N ; 100°C ; 15 mn) libère de l'acide N-acétylneuraminique et un diholoside possédant la vitesse de migration de la N-acétyllactosamine (Fig.68 ; p.170). L'oside H 1 possède donc la structure de la sialyllactosamine :



T a b l e a u X X X

Comportement chromatographique des osides de la fraction H

	Systèmes-Solvants (*)	
	1	2
H 1	0,435	0,78
H 2	0,40	0,45

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

(2) : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3)

Les vitesses de migration sont données par rapport à celle du lactose

T a b l e a u X X X I

Composition molaire des osides de la fraction H

	H 1	H 2
avant réduction		
Osés	1,2	1,95
Osamines	0,96	0
Acides Sialiques	1	1
Gal	1	1
Glc	0	1,02
GlcNAc	0,91	0
après réduction		
Osés	1,2	1,1
Osamines	0	0
Acides Sialiques	1	1
Gal	++	++
Glc	0	0
GlcNAc	0	0

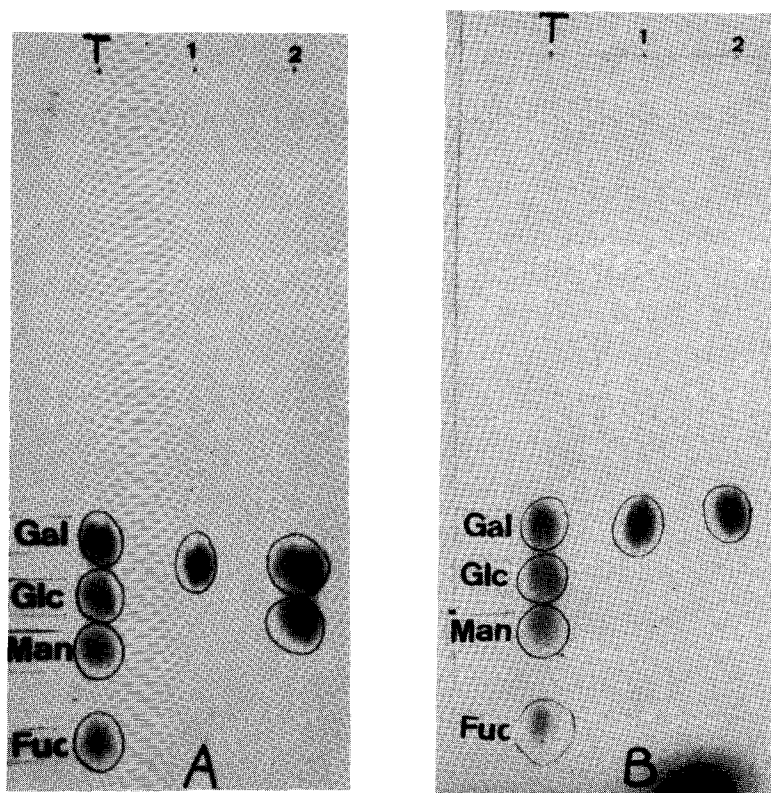


Figure 66

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques des osides de la fraction H. A : avant réduction ; B : après réduction par le borohydride de sodium.

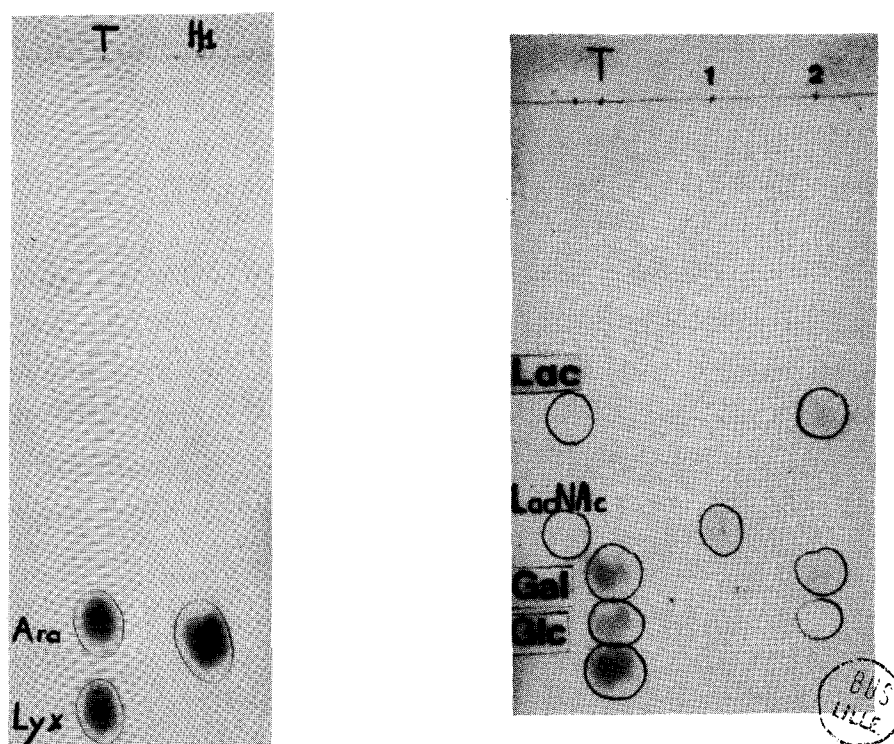


Figure 67

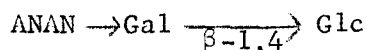
Chromatographie sur papier des produits de la désamination oxydative par la ninhydrine de la "fraction osamine" de l'hydrolysate acide de l'oside H 1.

Figure 68

Chromatographie sur papier des produits de l'hydrolyse partielle des osides H 1 et H 2 par H_2SO_4 dilué (0,1 N ; 100° C ; 15 mn).

B - L'OSIDE H 2

L'oside H 2 renferme des oses neutres et des acides sialiques dans les rapports 1,95 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 100°C ; 2 h) libère du galactose et du glucose en proportions équimoléculaires (Fig.66 ; p.170 et Tableau XXXI ; p.169). L'hydrolyse acide ménagée libère de l'acide N-acétylneuraminique et du lactose (Fig.68 ; p.170). La structure de l'oside H 2 est donc :

X - LA FRACTION A 90 p.100 DE METHANOL : FRACTION I

Le rinçage de la colonne de charbon-Célite par le méthanol à 90 p.100 nous a permis d'isoler encore un certain nombre d'osides, en général de haut poids moléculaire. Seule l'étude de 4 d'entre eux, obtenus à l'état pur et en quantité suffisante, a pu être entreprise. Leur comportement chromatographique et leur composition molaire en oses sont données dans les Tableaux XXXII et XXXIII (p.172).

A - L'OSIDE I 2 (11 mg)

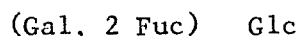
L'oside I 2 renferme des oses neutres et des osamines dans le rapport 1,91 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N ; 2 h ; 100°C) libère du galactose et du fucose, dans des proportions équimoléculaires et le galactose est réduit par la borohydrure de sodium (Fig.70 ; p.173). La désamination oxydative de l'osamine conduit au lyxose (Fig.71 ; p.173). L'oside I 2 possède donc la structure suivante :

B - L'OSIDE I 4 (8 mg)

L'oside I 4 ne renferme pas d'osamines. L'hydrolyse chlorhydrique libère du galactose, du glucose et du fucose, dans des rapports, déterminés avant et après réduction par le borohydrure de sodium, de :

$$1 : 1,09 : 1,81 \text{ et } 1 : 0,1 : 1,92$$

L'oside I 4 possède donc la structure suivante :

C - L'OSIDE I 7 (3,2 mg)

L'oside I 7 renferme des oses et des osamines dans des rapports, déterminés avant et après réduction par le borohydrure de sodium, de 2,15 : 1 et 4,10 : 1. L'hydrolyse chlorhydrique libère du galactose, du glucose, du mannose et du fucose, dans les proportions déterminées avant

Tableau XXXII

Comportement chromatographique des osides de la fraction I

	Systèmes-Solvants (*)	
	1	2
I 2	1,16	0,93
I 4	0,49	0,62
I 7	0,48	0,42
I 10	0,31	0,34

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

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

Les vitesses de migration sont données par rapport à celle du lactose.

Tableau XXXIII

Composition molaire des osides de la fraction I

		I 2	I 4	I 7	I 10
avant réduction	Oses	1,91	++	2,15	4,05
	Osamines	1	0	1	1
	Gal	1,17	1	0,30	1
	Glc		1,09	0,32	1,04
	Man			1	0
	Fuc	1	1,81	0,55	1,93
	GalNAc	1		0	0,97
	GlcNAc			1	
après réduction	Oses	1,08		4,10	3,28
	Osamines	1		1	1
	Gal	0	1	0,32	1
	Glc		0,1	0,10	0
	Man			1	0
	Fuc	1,08	1,92	0,58	1,97
	GalNAc	1		0	0,95
	GlcNAc			0,5	

BNS
Lille

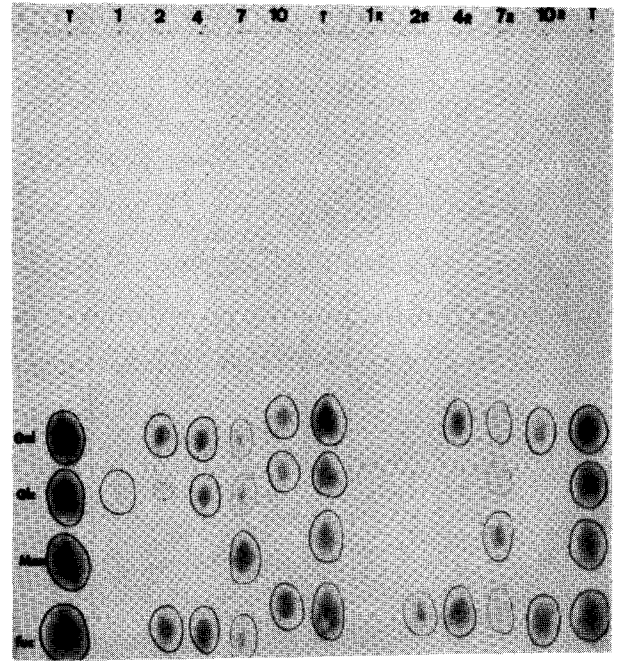
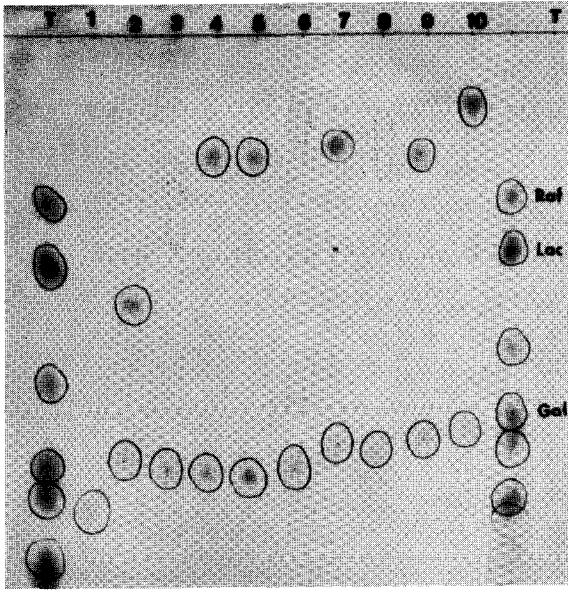


Figure 69

Chromatographie sur papier des oligosaccharides de la fraction I. Papier Whatman n°3. Système-solvant: n-butanol | acide acétique | eau (4:1:5). Révélation à l'oxalate d'aniline.

Figure 70

Chromatographie des hydrolysats chlorhydriques des osides de la fraction I, avant (1 à 10) et après réduction (1R à 10R) par le borohydrure de sodium. Papier Whatman n°1. Système-solvant: acétate d'éthyle | pyridine | eau (2:1:2). Révélation à l'oxalate d'aniline.

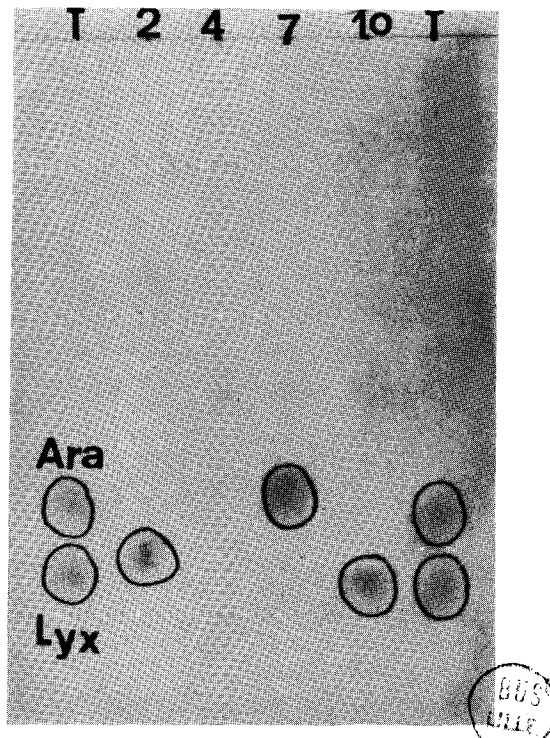


Figure 71

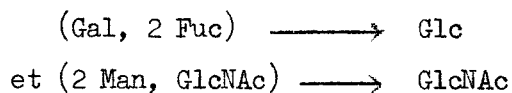
Chromatographie des produits de la désamination oxydative par la ninhydrine de la fraction "osamine" des hydrolysats acides des osides de la fraction I. Papier Whatman n°3. Système-solvant: n-butanol | acide acétique | eau (4:1:5). Révélation à l'oxalate d'aniline.

et après réduction par le borohydrure de sodium :

0,30 : 0,32 : 1 : 0,55

0,32 : 0,10 : 1 : 0,58

La désamination oxydative de l'osamine conduit à l'arabinose (Fig. 71 ; p. 173). Ces résultats s'expliquent si l'on considère que le composé I 7 est le mélange des deux osides suivants :



D - L'OSIDE I 10 (18 mg)

L'oside I 10 renferme des oses et des osamines dans les rapports suivants :

avant réduction : 4,05 : 1

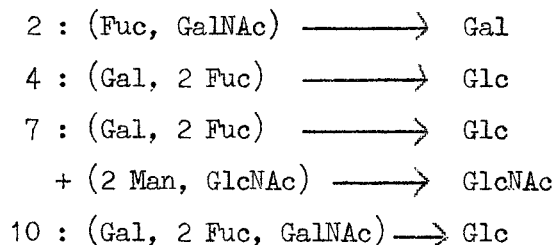
après réduction par BH_4K : 3,28 : 1

L'hydrolyse chlorhydrique (Fig. 70 ; p. 173) libère du galactose, du glucose et du fucose dans les rapports 1 : 1,04 : 1,93. Le glucose est en position terminale réductrice. La désamination oxydative de l'osamine conduit au lyxose (Fig. 71 ; p. 173). La structure de l'oside I 10 est donc :



E - CONCLUSION

Les structures des osides de la fraction I sont les suivantes :



3 ^e CONCLUSION ET DISCUSSION

Le Tableau XXXIV (p. 176) résume les résultats obtenus après l'étude des 72 préparations d'oligosaccharides isolées de l'urine humaine normale. 37 composés ont été en fait caractérisés, car certaines préparations étaient identiques. L'urine renferme en réalité un nombre beaucoup plus élevé d'oligosaccharides, 50 à 80 environ, dont les taux varient de quelques μg à plusieurs dizaines de mg par l. L'étude des osides de haut poids moléculaire, en particulier, n'a pas été entreprise, faute de pouvoir les isoler à l'état pur avec les techniques chromatographiques actuellement utilisées.

Le lactose et le saccharose, dont la présence dans les urines normales avait été signalée dès 1953 par MONTREUIL (292) représentent près du quart de la totalité des osides urinaires. Viennent ensuite le xylosido-glucose (également signalé par MONTREUIL) (293), et le fucosido-glucose, puis toute une famille de composés renfermant en proportions variables du galactose, du fucose, de la N-acétylgalactosamine et du glucose, ce dernier occupant la position terminale réductrice.

Trois de ces osides ont été précédemment décrits par LUNDBLAD (294) (voir p. 21) qui avait établi une corrélation entre leur présence dans l'urine et la nature du groupe sanguin de l'individu.

Nous avons également isolés quelques osides acides, renfermant de l'acide N-acétylneuraminique, et qui correspondent aux osides décrits par HUTTUNEN (295), qui en a précisé la structure (voir p. 21).

Nous avons, en outre, montré l'existence d'osides qui se trouvent dans l'urine qu'en très faibles quantités, et qui renferment, d'une part, du mannose et de la N-acétylglucosamine (cette dernière occupant toujours la position réductrice terminale) et d'autre part de l'acide glucuronique, de la N-acétylglucosamine, et parfois du glucose.

ORIGINE DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

Il sera particulièrement intéressant de rechercher l'origine des oligosaccharides urinaires, dont la plupart correspondent à des produits du catabolisme de constituants glucidiques sériques ou tissulaires, malheureusement souvent mal

Tableau XXXIV (suite)

	Désignation de l'oside	Vitesse de migration (*)			
		1	2	3	
N-acétylgalac- tosamine	(Gal, GalNAc) →Glc	C 8	0,84	0,80	
	(Fuc, GalNAc) →Gal	D 4	1,15	0,93	
	(Fuc, GalNAc) →Gal	E 2	1,19	0,95	
	(Fuc, GalNAc) →Gal	I 2	1,16	0,93	
	(Gal, Fuc, GalNAc) →Glc	C 9	0,69	0,70	0,77
	(Gal, Fuc, GalNAc) →Glc	E 5	0,67	0,68	
	(Gal, 2 Fuc, GalNAc) →Glc	C 10	0,46	0,50	0,58
	(Gal, 2 Fuc, GalNAc) →Glc	I 10	0,31	0,34	
	(2 Gal, Fuc, GalNAc) →Glc	F 8	0,36	0,26	
	(2 Gal, 2 Fuc, GalNAc) →Glc	C 11	0,19	0,28	0,32
Osides acides	(2 Gal, 2 Fuc, GalNAc) →Glc	D 8	0,19	0,28	0,32
	(2 Gal, 2 Fuc, GalNAc) →Glc	E 10	0,20	0,25	
	GlcUr →Glc	G 2	1,26	0,49	0,62
	GlcUr →Glc	E 1	1,30	0,37	
	2 GlcUr →Glc	F 3	1,57	0,48	
	GlcUr →GlcNAc	G 1	1,68	0,50	0,77
	(GlcUr, GlcNAc) →Glc	F 4	1,25	0,36	
	(GlcUr, GlcNAc) →Glc	F 5	1,17	0,36	
	ANAN →Gal	E 4	0,78	0,41	
	ANAN →Gal →Glc	G 3	0,37	0,47	0,51
	ANAN →Gal →Glc	G 5	0,27	0,40	0,45
	ANAN →Gal →Glc	H 2	0,27	0,40	0,45
	ANAN →Gal →GlcNAc	G 4	0,42	0,37	0,43
ANAN →Gal →GlcNAc	H 1		0,435	0,78	

définis. Nous sommes donc ici amenés à ne formuler que des hypothèses quant à l'origine probable de certains constituants urinaires.

1 - ORIGINE ALIMENTAIRE

La présence dans l'urine de certains oligosaccharides est étroitement liée avec l'alimentation : c'est le cas, par exemple, du lactose, du saccharose, du maltose et des osides à pentoses qui disparaissent totalement après un jeûne glucidique de trois jours. Le taux des autres oligosaccharides diminue considérablement, mais on peut aisément caractériser des substances renfermant essentiellement du galactose, du glucose, du fucose et de la N-acétylgalactosamine.

2 - ORIGINE GLYCOPROTIDIQUE

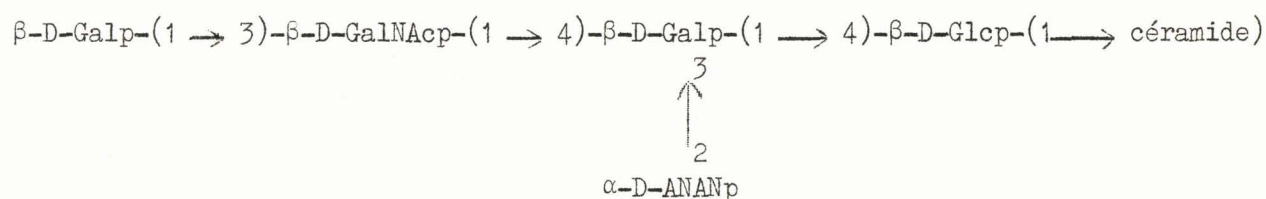
Les oligosaccharides constitués de galactose, mannose, fucose et glucosamine possèdent une composition analogue à celle de fragments isolés de glycoprotéines sériques diverses. Ils ne sont présents dans l'urine cependant qu'à l'état de traces, de même que les aldoses étudiés précédemment : galactose, mannose et N-acétylglucosamine.

3 - ORIGINE GLYCOLIPIDIQUE

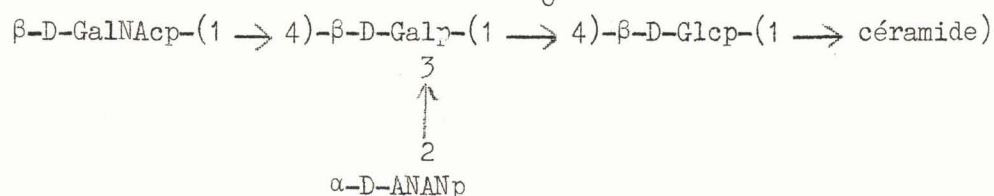
Les oligosaccharides à glucose réducteur représentent, après le lactose et le saccharose, le groupe le plus important. Les osides à acide N-acétylneuraminique (sialyllactose et sialyllactosamine), en particulier, peuvent être très aisément considérés comme des produits de dégradation de gangliosides (Fig. 72 ; p. 178).

Les osides neutres, composés de galactosamine, de fucose, de galactose et de glucose, ne peuvent, par contre, être rattachés à aucune structure glucidique connue. Ils représentent une certaine analogie avec les osides du lait de Femme décrits par KUHN (296) et par MONTREUIL (297) (Fig. 19 ; p. 76) et encore avec les fucoglycolipides à activité Lewis b récemment caractérisés par HAKOMORI et ANDREWS (298) dans des tissus glandulaires épithéliaux et dont le taux augmente considérablement dans les tissus tumoraux (Fig. 73 ; p. 178). Cependant, dans ces deux cas, l'osamine est toujours la N-acétylglucosamine. Seuls, les gangliosides et les globosides (asialogangliosides) renferment de la N-acétylgalactosamine, et il est raisonnable de penser qu'un certain nombre d'oligosaccharides de l'urine sont des fragments de fucoglobosides cellulaires jusqu'à présent inconnus.

Monosialoganglioside 1 ou GM 1 ou G 1 ou A 2 :



Monosialoganglioside 2 ou GM 2 ou G₀ ou A 1 :



Tétrasialoganglioside ou C 4 :

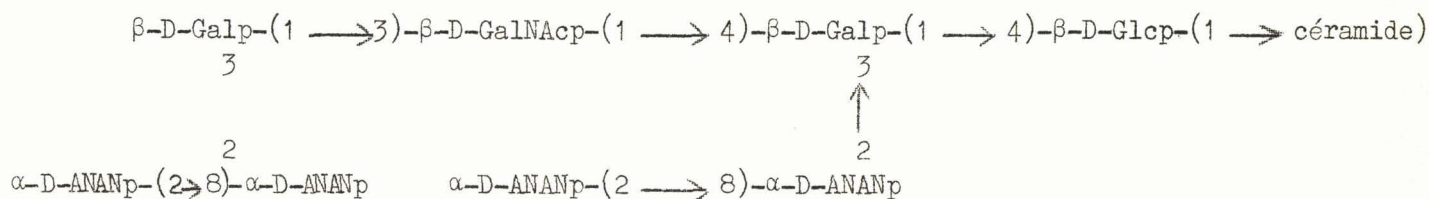


Figure 72

Structure de quelques gangliosides, selon KUHN (299)

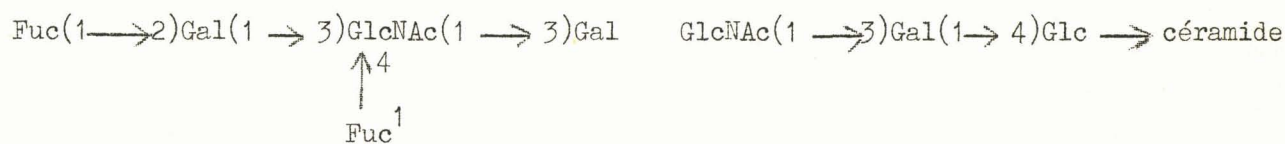
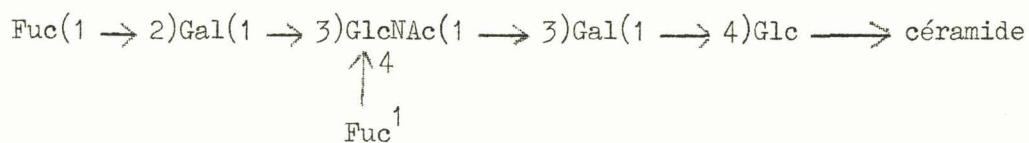
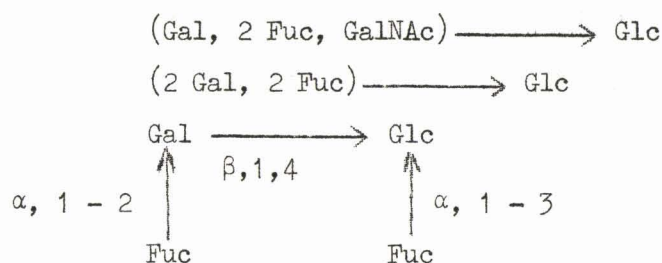


Figure 73

Structure des glycolipides isolés de tissus tumoraux
par HAKOMORI et ANDREWS (300)

LUNDBLAD (301), d'autre part, a montré que les osides urinaires urinaires suivants :



étaient respectivement spécifiques des urines de sujets de groupes A₁, B et O(H) sécréteurs. Cependant, ces constituants ne peuvent provenir de substances solubles de groupes sanguins, dans lesquelles le glucose n'a jamais été mis en évidence. Seule peut-être établie une certaine analogie entre ces glucides urinaires et des glycolipides érythrocytaires isolés par HAKOMORI et JEANLOZ (302) qui renferment de la galactosamine, du galactose et du glucose, mais qui sont cependant dépourvus de fucose.

4 - AUTRES ORIGINES

Les oligosaccharides urinaires acides renfermant de l'acide glucuronique, de la N-acétylglucosamine et du glucose sont certainement des produits de dégradation de glycosamino-glycannes, dans la composition desquels, cependant, le glucose n'a jamais été mis en évidence. Il y a peut-être lieu également de considérer un certain nombre d'osides urinaires comme des produits de transosidation due à l'action d'enzymes bactériens au niveau du tractus urinaire. Seule une expérimentation ultérieure permettra de confirmer ou d'infirmier cette dernière hypothèse.

APPLICATIONS A L'ETUDE COMPAREE DES
URINES NORMALES ET PATHOLOGIQUES

Après avoir dressé, dans un premier temps, la liste la plus complète possible des glucides libres urinaires, nous avons entrepris d'appliquer nos techniques à l'étude comparée d'un grand nombre d'urines normales et pathologiques. Les résultats obtenus sont encore fragmentaires, mais démontrent l'intérêt que présente la poursuite de ces travaux qui demanderont plusieurs années de recherches.

Nous décrirons dans ce chapitre les résultats qui concernent d'une part la mise en évidence d'un nouveau type de méliturie, la Sialurie, et d'autre part la description d'un nouveau cas de gangliosidose généralisée, caractérisée en particulier par une oligosaccharidosurie.

Nous décrirons enfin la mise au point d'une méthode de routine qui permet d'explorer rapidement et de manière précise la composition en osides des urines, et rapporterons les premiers résultats obtenus de l'étude comparée des urines normales et pathologiques.

1° DESCRIPTION D'UN NOUVEAU TYPE DE MELITURIE : LA SIALURIE

La découverte de ce nouveau type de méliturie chez un enfant de trois ans est le résultat d'un travail d'équipe qui a réuni le Service de Pédiatrie du Professeur FONTAINE, le Service de Biochimie du Professeur BISERTE et les Services de Biochimie de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et de la Faculté des Sciences du Professeur MONTREUIL. L'étude biochimique a été réalisée en collaboration avec Mademoiselle G. SPIK.

I - OBSERVATION

L'étude clinique et ultrastructurale a fait l'objet d'une publication de FONTAINE, BISERTE, MONTREUIL, DUPONT et FARRIAUX (303), que nous résumons ici brièvement.

1 - OBSERVATION CLINIQUE

La sémiologie clinique du jeune Eric Les. associe une hypotrophie importante et un retard du développement psycho-moteur. Dès l'âge de 16 mois, l'enfant présente une première crise convulsive généralisée. A trois ans, on trouve :

- une dysmorphie faciale légère (racine du nez élargie, épicanthus),
- une déformation thoracique en "tonneau",
- des anomalies osseuses (retard de l'âge osseux ; malformations vertébrales : vertèbres bipartites, les parties antérieure et postérieure du corps vertébral n'étant pas soudées),
- une hépatomégalie (foie lisse, dur, non douloureux).

Au cours de l'hospitalisation, l'enfant présentera plusieurs épisodes d'acidose métabolique, dont l'une, particulièrement sévère (pH : 7,10), mettra sa vie en danger.

L'évolution clinique a été depuis favorable et l'enfant présente un développement psycho-affectif progressif, mais retardé.

2 - OBSERVATION BIOCHIMIQUE

L'exploration biologique "standard" est globalement normale. On retient simplement :

- une hyperaminoacidémie exclusive pour le glycoacide et la sérine,
- une élévation des acides cétoniques sanguins (acides α -cétoglutarique et pyruvique),
- une méliturie permanente, signalée dès l'âge de 29 mois, et correspondant à un pouvoir réducteur, exprimé en glucose, de 10 g p. l. La chromatographie sur papier met en évidence une tache qui possède un comportement chromatographique voisin de celui du saccharose.

3 - OBSERVATION ANATOMIQUE

L'examen au microscope électronique du parenchyme hépatique (prélevement par biopsie chirurgicale) met en évidence des lésions nucléolaires importantes ainsi que la présence de dépôts d'aspect cristalloïde intra-mitochondriaux. On note enfin la présence de fibres collagènes dans le cytoplasme. Aucune lésion anatomique n'a été décelée au niveau du rein.

II - MISE EN EVIDENCE D'UNE SIALURIE

Nous avons poursuivi l'étude biochimique des urines du jeune Eric Les. et tenté en particulier d'identifier les glucides responsables de l'important pouvoir réducteur.

A - MATERIEL ET METHODES

L'analyse des urines a été effectuée (par chromatographie directe de dépôts de 10 ul) dans trois systèmes-solvants, choisis à la suite d'études critiques effectuées au laboratoire, parmi les nombreux mélanges qui ont été proposés pour identifier les acides sialiques :

- Système-solvant n° 1 : n-butanol/n-propanol/HCl 0,1 N (1 : 2 : 1) (SVENNERHOLM et SVENNERHOLM) (304) ; papier Whatman n° 1 ; chromatographie descendante de 18 à 24 h.

- Système-solvant n° 2 : acétate d'éthyle/acide acétique/eau (3 : 1 : 3) (NORDAL et OISETH) (305) ; papier Whatman n° 1 ; chromatographie descendante de 18 à 24 h.

- Système-solvant n° 3 : n-butanol/pyridine/HCl 0,1 n (5 : 3 : 2) (BOURRILLON et MICHON) (306) ; papier Schleicher et Schull 2043 b lavé aux acides ; chromatographie descendante de 18 à 24 h.

Les chromatogrammes ont été révélés à l'aide des réactifs spécifiques suivants : réactifs au p-diméthylaminobenzaldéhyde de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (307), au résorcinol de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (308), à l'orcinol trichloracétique de KLEVSTRAND et NORDAL (309) et à l'acide thiobarbiturique de WARREN (310).

La caractérisation et le dosage de l'acide sialique ont été réalisés en appliquant, aux urines diluées 250 à 500 fois avec de l'eau distillée, les procédés colorimétriques de WERNER et ODIN (311) (réactif à la diphenylamine), de SVENNERHOLM (312) (réactif au résorcinol) et d'AMINOFF (313) (réactif à l'acide thiobarbiturique). Dans tous les cas, nous avons tracé les spectres d'absorption de la lumière visible et nous les avons comparés aux courbes fournies par des échantillons commerciaux d'acide N-acétylneuraminique (SIGMA ; KOCH-LIGT). L'application des méthodes précédentes a, en outre, permis de doser l'acide sialique présent dans les urines du jeune enfant.

B - RESULTATS

1 - L'analyse chromatographique des urines, effectuée dans les trois systèmes-solvants que nous avons décrits plus haut, révèle la présence d'un composé qui donne les colorations spécifiques des acides sialiques et qui possède, en outre, le comportement chromatographique de l'acide N-acétylneuraminique (Fig. 74 ; p. 184).

2 - L'application aux urines des procédés colorimétriques d'identification et de dosage des acides sialiques a apporté les résultats suivants :

a) Les colorations et les courbes d'absorbance sont identiques à celles que fournissent l'acide N-acétylneuraminique pur. Les valeurs des longueurs d'ondes d'absorption maximale sont conformes aux données de la littérature scientifique (Tableau XXXV ; p. 184).

b) La réaction à l'acide periodique-acide thiobarbiturique de WARREN (314), spécifique des acides N-acétyl et N-glycolylneuraminiques libres, est positive.

c) L'application des trois procédés colorimétriques que nous avons cités plus haut et qui permettent de doser les acides sialiques ont apporté des résultats identiques : l'urine du jeune malade contient des quantités d'acide sialique (exprimée en acide N-acétylneuraminique) qui varient entre 11 et 36 g par litre et l'élimination journalière oscille entre 5,8 et 7,2 g.

C - CONCLUSIONS

Les résultats fournis par l'application, aux urines d'un jeune malade, de procédés chromatographiques et colorimétriques de recherche et de dosage des acides sialiques dans les milieux biologiques est en faveur de l'existence de quantités élevées d'acide N-acétylneuraminique libre. Ce fait surprenant méritait que les analyses soient poussées plus loin dans le but d'isoler l'acide sialique à l'état pur et de l'identifier en déterminant ses constantes physico-chimiques.

III - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE L'ACIDE N-ACÉTYLNEURAMINIQUE

A - ISOLEMENT ET CRISTALLISATION DE L'ACIDE SIALIQUE URINAIRE

L'urine a été fractionnée par précipitation éthanolique selon le mode opératoire décrit p. 48 .

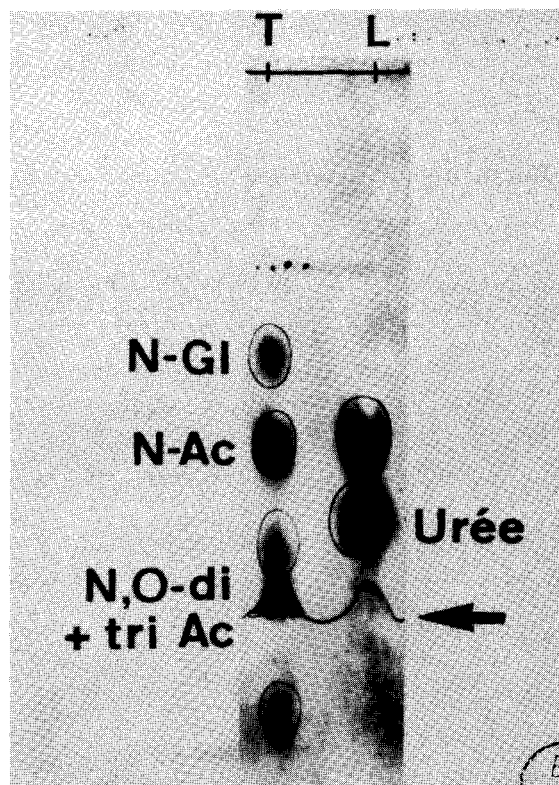


Figure 74

Chromatographie directe sur papier Whatman n°1 de l'urine de sialurique dans le système-solvant : n-butanol | n-propanol | HCl 0,1 N (1:2:1) de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM(315). Révélation par le réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (316); T : mélange témoin des acides N-glycolyl (N-Gl), N-acétyl (N-Ac), N,O-diacétyl et triacétyl (N,O-di, triAc)-neuraminiques; L : dépôt de 10 ul d'urine. La flèche indique le front de démixion du système-solvant.

T a b l e a u X X X V

Longueurs d'ondes d'absorption maximale des colorations données, avec divers réactifs, par les urines du jeune sialurique, par l'acide sialique et par l'acide N-acétylneuraminique commercial.

Nature du réactif	Analyse directe de l'urine	Acide sialique urinaire	Acide N-acétylneuraminique pur	Données de la littérature
Diphénylamine (WERNER et ODIN) (317)	520 (*)	520 (*)	520 (*)	530 (WERNER et ODIN) (318)
Résorcinol (SVENNERHOLM) (319)	585 et 640	585 et 630	585 et 640	585 et 640 (MONTREUIL et SPIK) (320) 580 et 630 (WERNER et ODIN) (321)
Acide thiobarbiturique (AMINOFF) (322)	552	550	550	549 (WERNER et ODIN) (323) 550 (MONTREUIL et SPIK) (324)

(*) min : 440 mμ dans les trois cas (donnée de la littérature (WERNER et ODIN) : 440 mμ)

Le résidu sec du surnageant alcoolique est ensuite repris par un volume déterminé d'eau distillée et une partie aliquote de la solution, correspondant à 5 g d'acide sialique, est purifiée selon le procédé de SVENNERHOLM (326). La préparation est passée successivement sur une colonne de résine à échange de cations (Dowex 50 x 8 ; mesh 25 - 50 ; forme acide ; 2 x 25 cm), puis d'anions (Dowex 1 x 8 ; mesh 200 - 400 ; forme formiate ; 3 x 50 cm). Les colonnes sont ensuite soigneusement rincées avec 2 l d'eau distillée et l'acide sialique est déplacé de l'échangeur d'anions avec une solution d'acide formique 0,25 M. Des fractions de 15 ml sont recueillies dont on détermine la teneur en acide sialique par le procédé colorimétrique d'AMINOFF (327). Les fractions renfermant de l'acide sialique sont rassemblées et la solution obtenue est concentrée au dixième de son volume par évaporation sous pression réduite, à une température inférieure à 35° C. On ramène ensuite la préparation à son volume initial par addition d'eau distillée et on répète 3 fois ce mode opératoire. On élimine, de cette manière, la plus grande partie de l'acide formique présent dans la solution que l'on peut finalement lyophiliser.

A partir de la poudre amorphe ainsi obtenue (4,5 à 4,8 g), on isole, à l'état cristallisé, l'acide N-acétylneuraminique en appliquant le procédé de SVENNERHOLM (328). La poudre est dissoute dans 3 fois son poids d'eau distillée et, à la solution obtenue, on ajoute 10 volumes de méthanol redistillé. Le mélange est porté à 40° C jusqu'à complète dissolution. On ajoute 15 volumes d'éther redistillé dont l'addition provoque, en général, l'apparition d'un précipité amorphe qui est éliminé par filtration. On additionne encore la solution limpide de 10 volumes d'éther. La cristallisation commence aussitôt. On laisse reposer à la température du laboratoire pendant 24 h et on ajoute de nouveau 10 volumes d'éther. Au bout de 48 h, les cristaux sont recueillis sur verre fritté, lavés avec un mélange de méthanol et d'éther (1 : 3) (v : v) et séchés sous vide en présence de potasse. Les cristaux que nous avons obtenus (Fig. 75 ; p.186) sont morphologiquement identiques aux cristaux d'acide N-acétylneuraminique décrits par SVENNERHOLM (329), par GOTTSCHALK (330) et par RIBADEAU, DUMAS et ALAIS (331). Les rendements sont très élevés puisque nous isolons, à partir de 5 g de préparation brute (obtenue à partir de 150 à 500 ml d'urine), de 3,5 à 4 g d'acide sialique cristallisé.

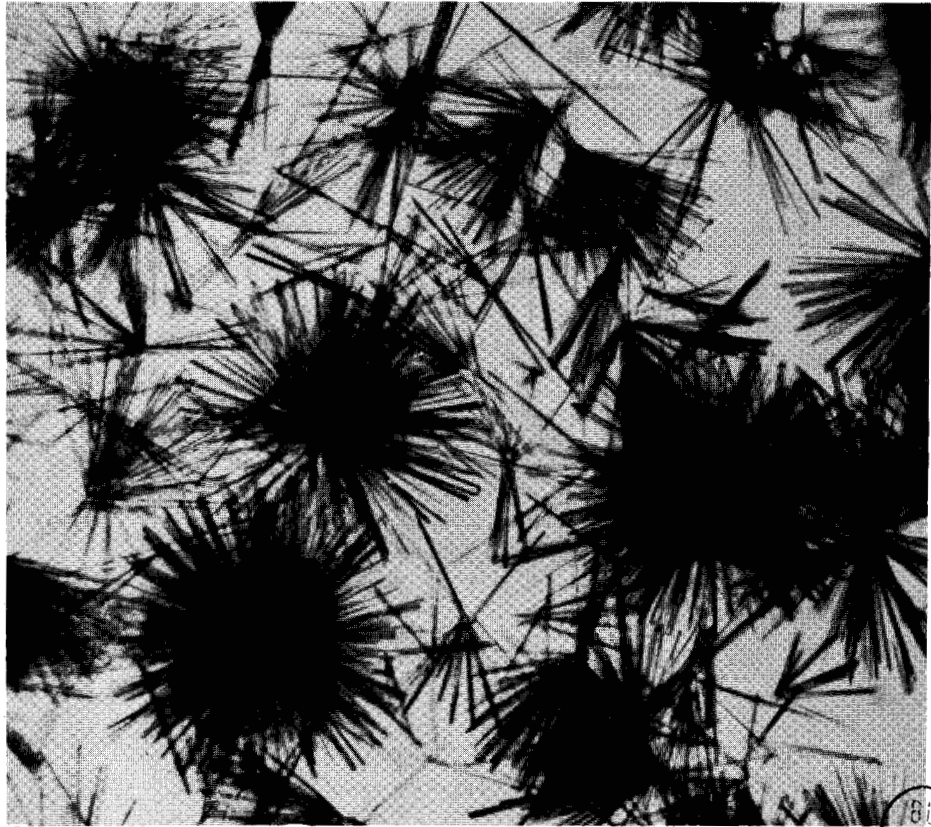


Figure 75

Microphotographie de cristaux d'acide N-acétylneuraminique urinaire

B - ETUDE DES PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE L'ACIDE SIALIQUE URINAIRE

1 - POUVOIR ROTATOIRE

Le pouvoir rotatoire spécifique des solutions aqueuses d'acide sialique a été déterminé à l'aide du micropolarimètre ZEISS. L'acide sialique urinaire, en solution dans l'eau, possède un pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_{20}^D$ de -32° . Il ne donne pas le phénomène de la mutarotation. Ces propriétés sont celles de l'acide N-acétylneuraminique (GOTTSCHALK) (332).

2 - POINT DE FUSION

L'acide sialique urinaire fond en se décomposant à $180 - 183^\circ \text{C}$ (valeurs de la littérature : $185 - 187^\circ \text{C}$) (GOTTSCHALK) (333).

3 - COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE

La chromatographie sur papier a été effectuée dans les systèmes-solvants décrits plus haut. Les réactions colorées et la vitesse de migration de l'acide sialique urinaire ont été comparées à celles de témoins purs latéraux.

Dans tous les systèmes-solvants que nous avons utilisés, l'acide sialique urinaire possède, en chromatographie sur papier, le même comportement et donne les mêmes réactions colorées que les échantillons commerciaux d'acide N-acétylneuraminique.

4 - SPECTRE INFRA-ROUGE

Le spectre d'absorption de l'infra-rouge a été tracé sur des échantillons d'acide sialique urinaire et d'acide N-acétylneuraminique de référence, après pastillage dans le bromure de potassium, à l'aide d'un spectrophotomètre IR Perkin-Elmer, modèle 21.

Les spectres d'absorption de l'infra-rouge par l'acide sialique urinaire sont absolument identiques à ceux que donnent, à quantités égales, les échantillons d'acide N-acétylneuraminique pur (Fig. 76; p. 188) et à ceux qui ont été décrits par FISCHMEISTER (334).

5 - ANALYSE ELEMENTAIRE

L'analyse élémentaire de l'acide sialique urinaire qui a été effectuée par le Service Central de Microanalyse du Centre National de la Recherche Scientifique, est la suivante :

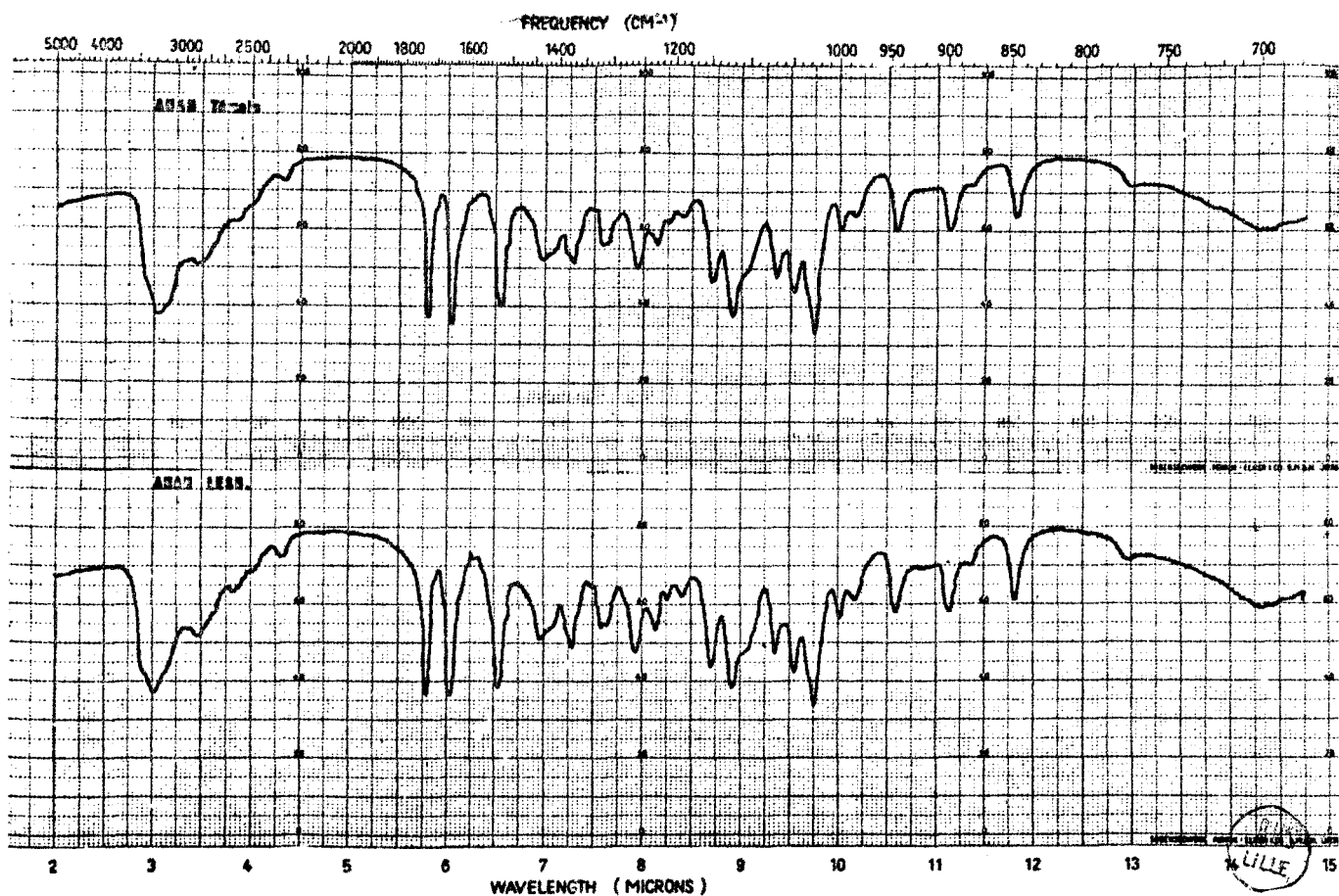


Figure 76

Spectres d'absorption de l'infra-rouge par l'acide N-acétylneuraminique pur - (T) et de l'acide N-acétylneuraminique urinaire - (L). Abscisses inférieures : longueurs d'ondes en μ ; abscisses supérieures : fréquences en cm^{-1} .

C : 43,3 p. 100 ; H : 6, 24 p. 100 ; N : 4,52 p. 100 ; O : 45,75 - 45,85 p. 100.
Elle est identique, aux erreurs d'expérience près, à celle de l'acide N-acétylneuraminique : C : 42,4 p. 100 ; H : 6,15 p. 100 ; N : 4,5 p. 100 ; O : 46,6 p. 100.

6 - REACTIONS COLOREES

L'application, aux préparations d'acide sialique urinaire et aux échantillons commerciaux d'acide N-acétylneuraminique, des procédés colorimétriques de WERNER et ODIN (335), de SVENNERHOLM (336) et d'AMINOFF (337) fournit des courbes d'absorption de la lumière visible rigoureusement superposables. Nous avons précisé, dans le Tableau XXXV (p. 184), les longueurs d'onde d'absorption maximales des colorations données par les deux sortes d'acides sialiques et illustré par la figure 77 (p. 190) un résultat caractéristique.

C - ETUDE DE LA STRUCTURE DE L'ACIDE SIALIQUE URINAIRE

1 - OXYDATION PERIODIQUE

L'oxydation periodique des échantillons d'acide sialique a été effectuée selon le protocole expérimental de GLICK et al. (338). La consommation d'acide periodique suivie par spectrophotométrie dans l'ultra-violet (GLICK, CHEN et ZILLIKEM) (339) a été calculée par extrapolation des courbes d'oxydation de l'acide sialique urinaire et de l'acide N-acétylneuraminique de référence. Ces courbes sont superposables (Fig. 78 ; p. 190) et, dans les deux cas, trois moles d'acide periodique ont été consommées par mole d'acide sialique et dans des temps courts (inférieurs à 7 h).

2 - ACTION DE LA N-ACÉTYLNEURAMINATE LYASE

Nous avons fait agir, sur les échantillons d'acide sialique pur et d'acide sialique urinaire, la N-acétylneuraminat-lyase (4. 1. 3. 3.) (N-acétylneuraminique-aldolase de Clostridium perfringens Sigma ; grade I) dans les conditions décrites par COMB et ROSEMAN (340) et nous avons identifié les produits de la réaction : l'acide pyruvique et la N-acétylmannosamine. Le mode opératoire que nous avons appliqué est le suivant : une solution de 10 mg d'acide sialique urinaire et de 2 mg d'enzyme dans 2 ml de phosphate de potassium 0,2 M de pH 7,2 est maintenue à 37° C pendant des temps variant de 4 h à 48 h et le dosage colorimétrique de la N-acétylmannosamine libérée est effectué sur chaque prélèvement par la méthode de GOOD et BESSMAN (341). On détermine de cette manière les conditions optimales à appliquer en vue des recherches ultérieures. Pour la préparation

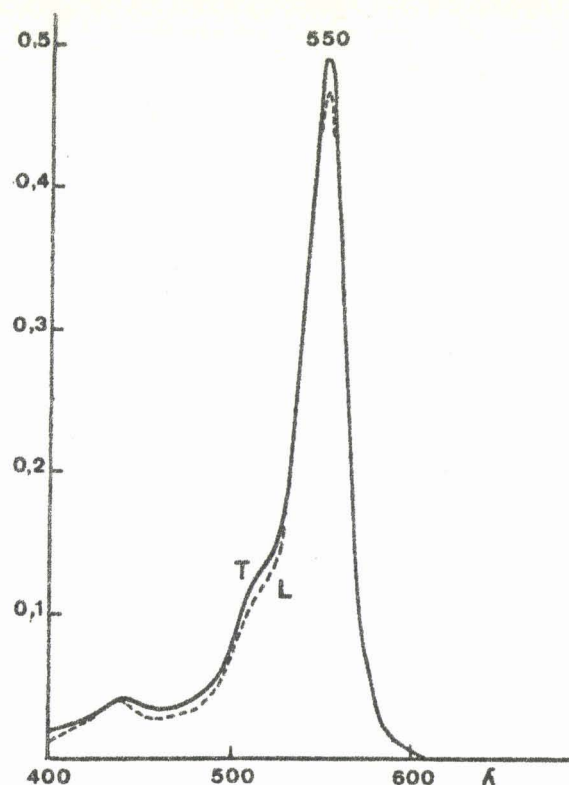


Figure 77

Spectres d'absorption des colorations données par la réaction à l'acide périodique-acide thiobarbiturique avec des échantillons d'acide N-acétylneuraminique pur (spectre T) et extrait des urines du malade L.. (spectre L). En abscisses : longueurs d'ondes ; en ordonnées : absorbances.

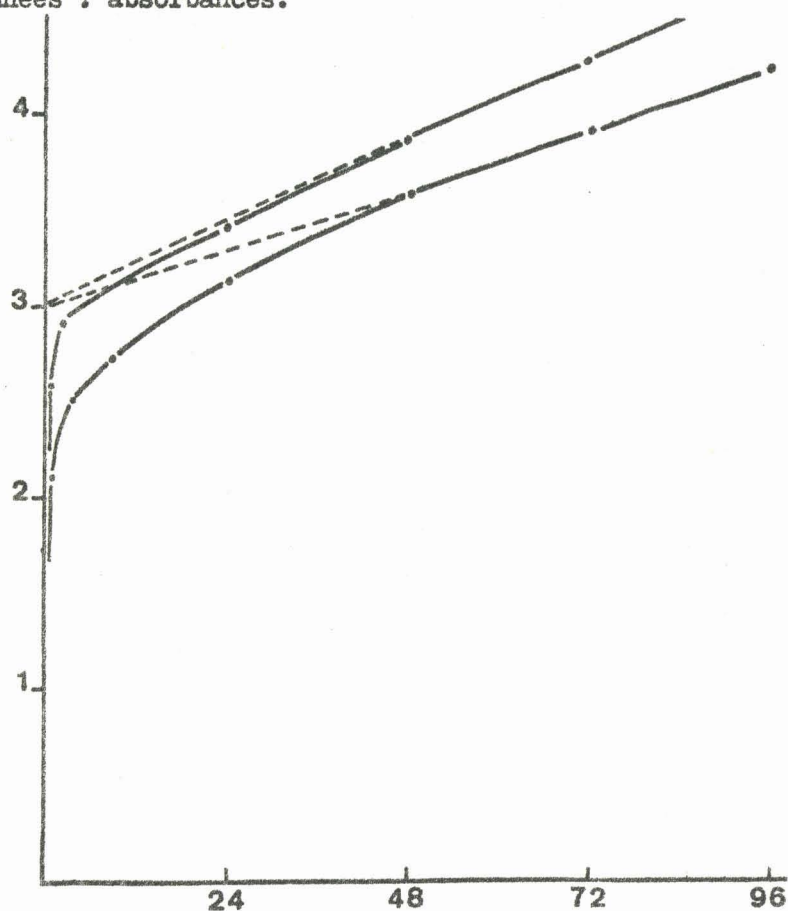


Figure 78

Courbes d'oxydation par l'acide périodique de l'acide sialique urinaire (L) et de l'acide N-acétylneuraminique (T). En abscisses : temps écoulé ; en ordonnées : moles d'acide périodique consommées.

BUS
LILLE

enzymatique dont nous disposions, la libération de la N-acétylmannosamine était maximale au bout de 24 h (62 p. 100 de la quantité théorique).

L'acide pyruvique libéré au cours de la réaction a été identifié et dosé par le procédé chromatographique de BISERTE et DASSONVILLE (342) : une quantité de la solution réactionnelle correspondant à environ 500 ug d'acide pyruvique est traitée, pendant 30 mn à 30° C, par 1 ml d'une solution à 2 g p. 100 ml de 2,4-dinitrophénylhydrazine dans l'acide chlorhydrique 2 N. Les dinitro-phénylhydrazones sont extraites par l'éther sulfurique et la solution est évaporée à siccité à 35° - 40° C. Le résidu est repris par 2 ml d'une solution aqueuse d'ammoniac 1 N et 2 ml de chloroforme. La séparation des hydrazones est effectuée par chromatographie descendante, pendant 24 h, sur papier Whatman n° 1, dans le système-solvant : alcool iso-amylique/éthanol à 96 p. 100/eau (75 : 15 : 60) (Fig. 79 ; p. 192). Les phénylhydrazones sont dosées en mesurant à 460 mμ l'absorbance des éluats des taches par la soude 1 N.

La N-acétylmannosamine libérée a été identifiée, par électrophorèse sur papier, dans la fraction "neutre" des solutions de réaction passées sur des colonnes (2 x 20 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; mesh 25 - 50 ; forme acide) et d'anions (Duolite A - 40 ; mesh 25 - 50 ; forme formiate). L'électrophorèse sur papier a été effectuée dans les conditions suivantes : solution aqueuse de borate de sodium à 1 g p. 100 ml, de pH 9,2 ; 10 V/cm pendant 4 h ; révélation par le réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde de PARTRIDGE (343) des électrophorégrammes préalablement séchés à 100° C pendant 15 mn, dès la fin de l'électrophorèse (Fig. 80 ; p. 192).

Agissant sur l'acide N-acétylneuraminique pur et sur l'acide sialique urinaire, la N-acétylneuraminase libère, dans les deux cas, en proportions équimolaires, de l'acide pyruvique et de la N-acétylmannosamine (2,2 mg de N-acétylmannosamine et 0,88 mg d'acide pyruvique, à partir de 5 mg d'acide sialique).

3 - RECHERCHE DE L'ACIDE GLYCOLIQUE CONJUGUE

La recherche de l'acide glycolique a été effectuée dans des hydrolysats acides ménagés (H_2SO_4 0,5 N, à 100° C, pendant 10 h) de l'acide sialique urinaire, selon le procédé de GIBBONS (344), à l'aide du réactif d'EEGRIVE (345) au 2,7-dihydroxynaphtalène. Elle a été négative.

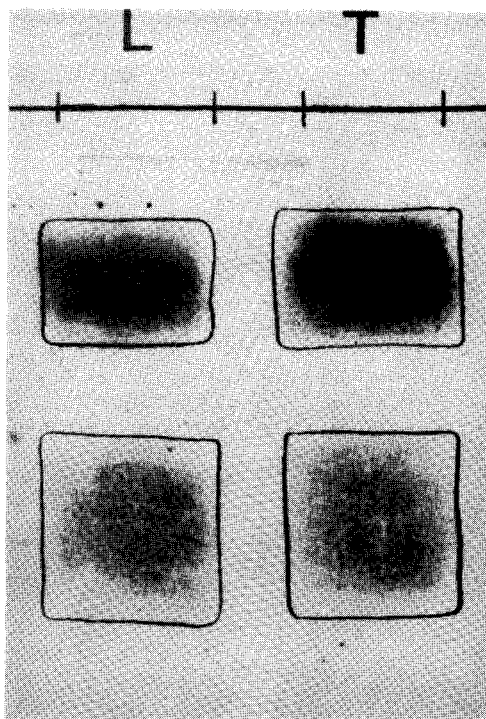


Figure 79

Chromatographie des 2,4-dinitrophénylhydrazones de l'acide pyruvique libéré par l'action de la N-acétylneuraminase lyase (4 : 1 : 3 : 3) (N-acétylneuraminase aldolase) sur une préparation d'acide N-acétylneuraminique urinaire (L) et sur un échantillon d'acide N-acétylneuraminique pur (T).

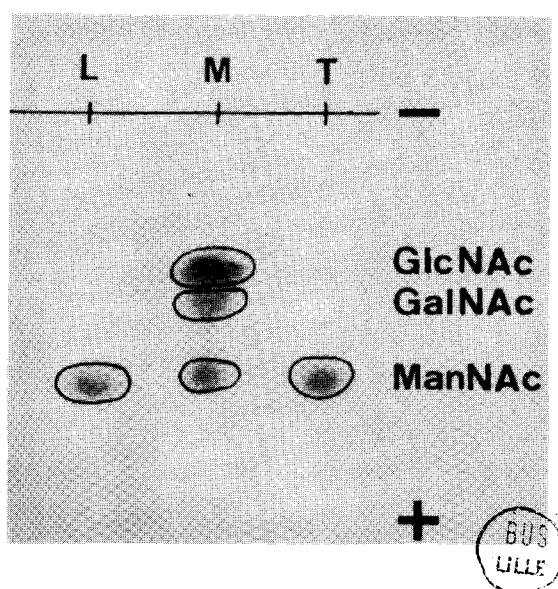


Figure 80

Etude électrophorétique de la N-acétylmannosamine libérée par l'action de la N-acétylneuraminase lyase sur une préparation d'acide N-acétylneuraminique urinaire (L) et sur un échantillon d'acide N-acétylneuraminique pur (T). Conditions de l'électrophorèse : tampon borate à 1 g p. 100 ml, de pH 9,2 ; 10 V/cm pendant 4 h ; Glc NAc ; Gal NAc et Man NAc : respectivement N-acétylglucosamine, -galactosamine et -mannosamine.

4 - CONCLUSIONS

L'acide sialique que nous avons isolé de l'urine du jeune malade, en quantités élevées et à l'état cristallisé, possède toutes les propriétés physico-chimiques et la structure de l'acide N-acétylneuraminique.

IV - DETERMINATION DU COEFFICIENT D'EPURATION PLASMATIQUE ou "CLEARANCE".

La mise en évidence d'une sialurie nous a amené à envisager la détermination du coefficient d'épuration plasmatique, ou "clearance" de l'acide N-acétylneuraminique. Après avoir vérifié la parfaite innocuité d'injections massives d'acide sialique chez divers animaux de laboratoire (2 g pour des rats de 500 à 600 g), nous avons limité cette dose à 3 g, chez un jeune enfant de trois ans.

A - MATERIEL ET METHODES

1 - INJECTION DE L'ACIDE SIALIQUE

Une solution aqueuse de 3 g d'acide sialique, amenée à pH7 par l'addition de carbonate acide de sodium, est mélangée à du sérum physiologique. Une première injection intraveineuse de 1 g d'acide sialique est effectuée en 15 mn, suivie d'une deuxième injection de 2 g étalée sur 2 h. Des prélèvements de 5 ml de sang sont effectués à intervalles réguliers, tandis que l'urine est recueillie heure par heure.

2 - DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE URINAIRE ET PLASMATIQUE

L'acide sialique libre urinaire a été dosé directement sur l'urine diluée 50 à 1 000 fois, selon la méthode à la diphénylamine de WERNER et ODIN (346). Le dosage de l'acide sialique libre plasmatique a nécessité un fractionnement préalable, réalisé selon le procédé décrit par MONTREUIL et coll. (347) pour le dosage des glucides conjugués du sérum humain : Quelques ml de plasma sont introduits dans un tube à centrifuger taré et additionnés de 10 volumes d'éthanol à 96 p. 100. Après une agitation énergique, suivie d'un repos de 10 mn,

le précipité est recueilli par centrifugation, puis remis en suspension dans l'eau distillée, et de nouveau additionné de 10 volumes d'éthanol à 96 p. 100. Le précipité est ensuite soumis à trois lavages successifs avec l'éthanol à 80 p. 100 et trois lavages avec l'acétone. Les fractions éthanoliques sont recueillies et évaporées à siccité sous pression réduite. Le résidu sec du surnageant alcoolique est repris par 10 à 15 ml d'eau distillée, délipidé à l'éther, et passé enfin sur une colonne de résine échangeuse d'anions (Dowex 1 x 8 ; "mesh" 200 - 400 ; forme formiate ; 1 cm x 10 cm ; $t^{\circ} = + 4^{\circ} C$). Après rinçage soigneux par l'eau distillée, l'acide sialique est élué par 60 ml d'acide formique 0,33 N, et la solution obtenue est lyophilisée. Le résidu sec est repris par quelques ml d'eau distillée, et l'acide N-acétylneuraminique libre dosé selon la méthode colorimétrique à l'acide periodique - acide thiobarbiturique d'AMINOFF (348).

B - RESULTATS

1 - MESURE DE LA "CLEARANCE" DE L'ACIDE SIALIQUE CHEZ LE JEUNE ERIC LES. (SIALURIE)

La "clearance" de l'acide sialique a été déterminée directement à partir des données cliniques que nous disposons, et qui sont rassemblées dans le Tableau XXXVI (p. 195).

En appliquant la formule classique (voir p. 6) : $C = \frac{UV}{P} \cdot \frac{1,73}{S}$
avec $S = 0,690 \text{ m}^2$, nous obtenons les quatre valeurs suivantes :

$$C_1 = 126 ; C_2 = 121 ; C_3 = 124 ; C_4 = 51$$

Si l'on ne tient pas compte de la quatrième mesure obtenue avec un débit urinaire trop faible, nous obtenons une "clearance" moyenne de 124, qui correspond exactement à la "clearance" d'une substance filtrée par le tubule rénal (valeur théorique : 120).

2 - MESURE DE LA "CLEARANCE" DE L'ACIDE SIALIQUE CHEZ UN JEUNE ENFANT DE TROIS ANS

Les résultats des dosages de l'acide sialique urinaire et plasmatique sont donnés dans le Tableau XXXVII (p. 195), et représentés graphiquement dans la figure 81 (p. 196).

Nous avons calculé la "clearance" de l'acide sialique en utilisant les dosages des trois premières heures. La concentration plasmatique de l'acide sialique a été calculée en prenant les moyennes des valeurs mesurées durant ces mêmes intervalles de temps :

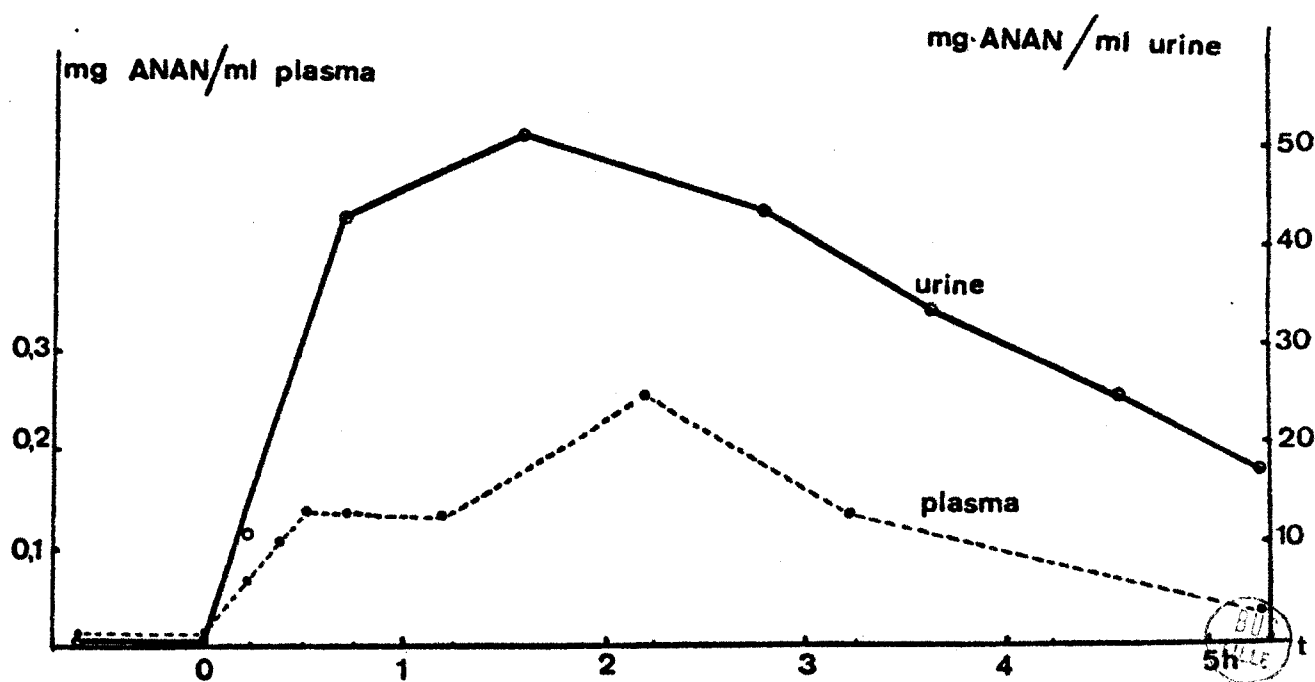


Figure 81

Variation du taux d'acide N-acétylneuraminique plasmatique et urinaire au cours de la détermination de la "clearance".

$$- \text{ de 15 mn à 75 mn : } P_1 = \frac{72,8 + 107,5 + 138,6 + 136,2 + 125}{5 \times 10^3} = 0,118$$

$$C_1 = 120,6$$

$$- \text{ de 75 mn à 135 mn : } P_2 = \frac{125 + 127}{2 \times 10^3} = 0,191$$

$$C_2 = 153,3$$

$$- \text{ de 135 mn à 195 mn : } P_3 = \frac{257 \text{ à } 132}{2 \times 10^3} = 0,194$$

$$C_3 = 117,3$$

(S = 0,615 m²)

La "clearance" moyenne ainsi mesurée est de 130,6.

D'autre part, la quantité d'acide N-acétylneuraminique retrouvée dans les urines est de 2,475 g, soit 82,5 p. 100 de la quantité initiale injectée.

C - CONCLUSION ET DISCUSSION

Les valeurs de la "clearance" de l'acide N-acétylneuraminique déterminée chez un jeune enfant présentant une sialurie et chez un jeune enfant du même âge sont pratiquement identiques : 124 et 130,6.

En comparant ces valeurs avec celle de la "clearance" d'une substance de référence ("clearance" de l'inuline = 120), nous pouvons conclure que l'acide N-acétylneuraminique est éliminé au niveau du néphron par un simple phénomène de filtration glomérulaire.

V - MISE EN EVIDENCE D'UNE N-ACETYLGLUCOSAMINURIE ET D'UNE

N-ACETYLMANNOSAMINURIE

Nous avons effectué un bilan complet de la composition en glucides libres de l'urine du jeune Eric Les., et observé la présence, dans la fraction monosaccharidique "neutre", d'un composé X (Fig. 82 ; p. 198) qui fournit avec le réactif d'ELSON et MORGAN (349) la coloration spécifique des N-acétylosamines, et que nous nous sommes efforcé d'identifier.

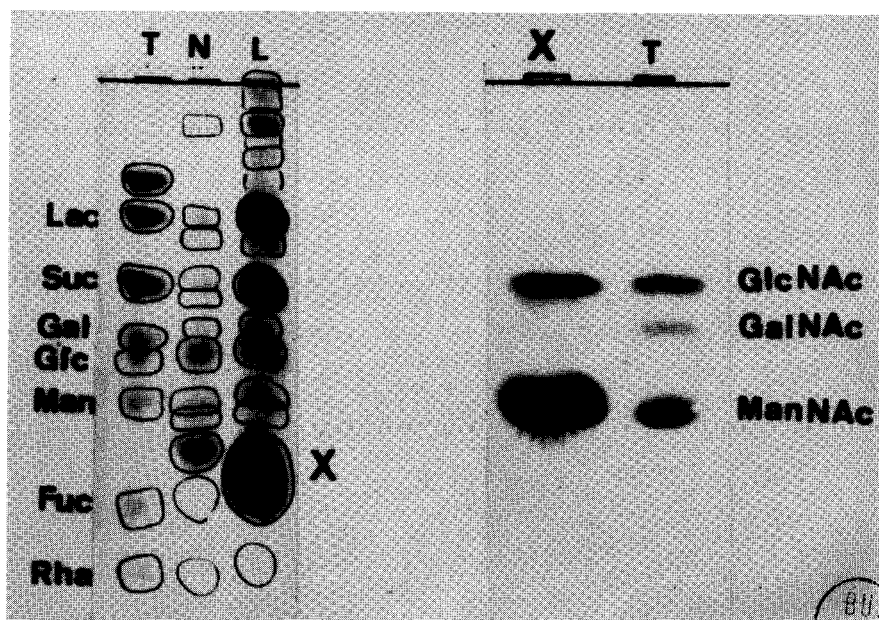


Figure 82

Identification des N-acétylosamines de l'urine du jeune Eric Les.
Planche A : Chromatographie sur papier de la "fraction neutre" du surnageant alcoolique de l'urine. Papier Whatman n° 3. Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

Planche B : Electrophorèse sur papier des N-acétylosamines de l'urine du jeune Eric Les. Papier Whatman n° 3. Système-tampon : borate de sodium à 1 p. 100. Révélation au p-diméthylaminobenzaldéhyde trichloracétique, après séchage du papier à 100° C.

T : Mélange témoin de sucres purs ; N : urine normale ; L : Urine du jeune Eric Les. ; X : N-acétylhexosamines à identifier.

A - MATERIEL ET METHODES

1 - METHODES COLORIMETRIQUES DE DOSAGE

Les N-acétylosamines libres totales ont été dosées dans la fraction neutre des surnageants urinaires selon la méthode de GOOD et BESSMAN (350).

Le rapport N-acétylmannosamine/N-acétylglucosamine a été déterminé selon le procédé de LUDOWIEG et BENMAMAN (351), qui permet de doser sélectivement la mannosamine. Cette dernière méthode a été appliquée après avoir hydrolysé les osamines par l'acide chlorhydrique 4 N, durant 4 h, à 100° C.

2 - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES

Les N-acétylosamines de l'urine ont été isolées par chromatographie préparative sur papier, dans le système-solvant de PARTRIDGE (352) : n-butanol/ acide acétique/eau (4 : 1 : 5).

L'identification des N-acétylosamines a été effectuée par électrophorèse sur papier dans le système tampon boraté décrit précédemment (voir p. 191).

B - RESULTATS

Les N-acétylosamines libres de l'urine du jeune Eric Les. possèdent les comportements électrophorétiques respectifs de la N-acétylglucosamine et de la N-acétylmannosamine (Fig. 82 ; p. 198).

L'élimination journalière des N-acétylhéxosamines est donnée dans le Tableau XXXVIII (p. 200). Les taux varient de 540 à 765 mg, pour un rapport N-acétylmannosamine/N-acétylglucosamine de 2,6 à 3,1.

C - CONCLUSION

La sialurie du jeune Eric Les. est accompagnée d'une N-acétylglucosaminurie et d'une N-acétylmannosaminurie. Les taux observés de chacun de ces deux glucides sont de 200 à 500 fois supérieurs aux taux rencontrés dans les urines normales.



T a b l e a u XXXVIII

Elimination journalière des N-acétylosamines dans les urines normales
 et dans l'urine du jeune Eric Les.
 (Résultats exprimés en mg/24 h)

	N-acétyl- osamines totales	N-acétyl- mannosamine (*)	N-acétyl- glucosamine (**)	N-acétyl- galactosamine	$\frac{\text{N-acétylmannosamine}}{\text{N-acétylglucosamine}}$
Urines normales	1 à 2 mg	0	+	+	
Eric Les.					
1	670	484	186	+	2,6
2	540	380	160	+	2,4
3	765	580	185	+	3,1

(*) Dosée sous la forme de mannosamine libre par la méthode de LUDOWIEG et BENMAMAN (353)

(**) Dosée par différence

BUS
LILLE

VI - CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Nous avons mis en évidence un nouveau type de méлитurie, la Sialurie, caractérisée par une élimination très importante d'acide N-acétylneuraminique (5,8 à 7,2 g p. 24 h), de N-acétylglucosamine (160 à 185 mg p. 24 h) et de N-acétylmannosamine (380 à 580 mg p. 24 h). L'ensemble des faits cliniques, décrits par ailleurs par FONTAINE et coll. (354), permettent de bien caractériser cette nouvelle maladie métabolique, dont l'origine demeure cependant obscure. Nous ne pouvons en effet que très difficilement argumenter sur la défection possible d'enzymes du métabolisme de l'acide sialique (Fig. 83 ; p. 202), et seule nous paraît plus probable l'hypothèse d'un dysfonctionnement de gènes régulateurs qui expliquerait la présence simultanée dans les milieux biologiques de N-acétylglucosamine, de N-acétylmannosamine et d'acide N-acétylneuraminique.

2° DESCRIPTION D'UNE OLIGOSACCHARIDOSURIE ACCOMPAGNANT
UN NOUVEAU TYPE DE GANGLIOSIDOSE A GM₂.

La gangliosidose (*) est une maladie métabolique du nourrisson, caractérisée par une thésaurismose de gangliosides de type GM₁ ou GM₂ (Fig. 72 ; p. 178). On distingue ainsi la maladie de TAY-SACHS "typique", ou gangliosidose à GM₂, due à un déficit d'isoenzyme (disparition de la fraction β-galactosaminidase la plus rapide en électrophorèse sur gel d'amidon), et la gangliosidose à GM₁, avec thésaurismose généralisée et déficit de β-galactosidase.

SANDHOFF (355) a rapporté récemment une observation particulière, différant du TAY-SACHS "typique", caractérisée par une accumulation généralisée de gangliosides GM₂ et un déficit total en hexosaminidases.

FONTAINE et al. (356) ont décrit la deuxième observation de ce type de gangliosidose. Cependant les auteurs ont ajouté une étude ultrastructurale plus complète, et nous avons, d'autre part, procédé à l'étude des constituants glucidiques de l'urine du jeune enfant, et avons comparé les résultats avec ceux obtenus à partir d'urines de TAY-SACHS typiques.

(*) Revue générale de PHILIPPART (357)

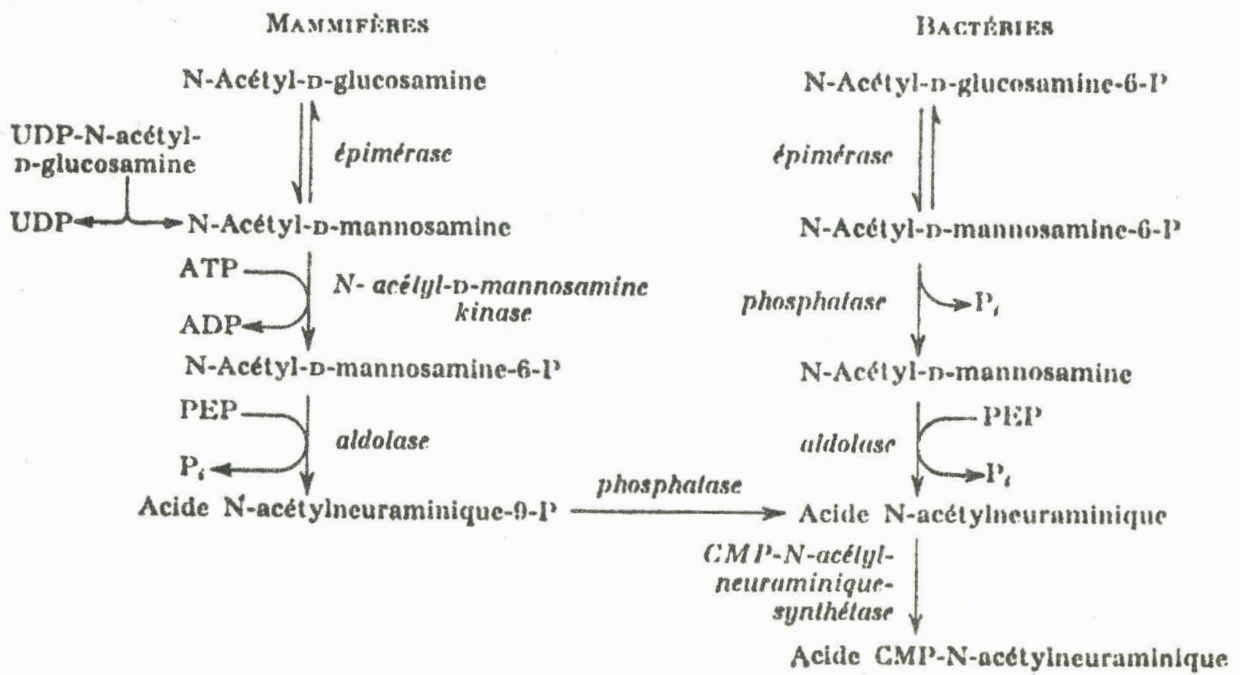


Figure 83

Métabolisme de l'acide N-acétylneuraminique.



I - MATERIEL ET METHODES

Les urines ont été fractionnées selon le procédé général décrit précédemment (voir p. 48). Les oligosaccharides ont été isolés de la fraction dialysable du précipité éthanolique par chromatographie préparative dans le système-solvant de JERMYN et ISHERWOOD (358) : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2).

Le taux des glucides libres ou conjugués urinaires a été déterminé par l'application des méthodes colorimétriques décrites p. 46.

II - RESULTATS

A - DOSAGE DES GLUCIDES

1 - GLUCIDES CONJUGUES

Les taux de glucides conjugués (oses, osamines, acides uroniques et acides sialiques) des deux urines de maladie de TAY-SACHS et de l'urine du jeune Franck B. ne sont pas très différents de ceux des urines normales (Tableau XXXIX ; p. 204). Cependant, le taux d'acide sialique conjugué est nettement augmenté dans l'un des deux cas de TAY-SACHS et chez le jeune Franck B.

2 - GLUCIDES LIBRES

a - Urines de maladie de TAY-SACHS

L'élimination des monosaccharides "neutres" totaux est sensiblement accrue (Tableau XL ; p. 204). Cette augmentation porte essentiellement sur le xylose et sur l'arabinose (Fig. 84 ; p. 206). Par contre, le taux d'élimination des acides sialiques n'est pas modifié. Les variations les plus importantes concernent les oligosaccharides dont l'excrétion est augmentée de 2 à 3 fois (Tableau XLI ; p. 204).

b - Urines du jeune Franck B.

Contrairement aux deux malades précédents, le jeune Franck B. élimine des quantités normales de monosaccharides "neutres" et des quantités nettement plus élevées d'acide sialique et d'oligosaccharides (6 à 10 fois le taux normal) (Tableau XLI ; p. 204).

T a b l e a u XXXIX

Elimination journalière (en mg) des glucides conjugués (oses "neutres", acides uroniques, osamines et acide sialique) dans les urines d'enfants normaux, de maladie de TAY-SACHS et du jeune Franck B.

	Osés	Acides Uroniques	Osamines	Acide Sialique (*)
Enfants normaux (de 2 à 6 ans)	23 - 41	5,8 - 8,5	14 - 29	13,8 - 30
TAY-SACHS 1	30,5	9,2	---	24
TAY-SACHS 2	19,8	7,3	---	19,5
Franck B.	32	10,5	20,7	28,8

(*) acide N-acétylneuraminique

T a b l e a u XL

Elimination journalière (en mg) des monosaccharides (oses "neutres" et acide sialique) dans les urines d'enfants normaux, de maladie de TAY-SACHS et du jeune Franck B.

	Osés "neutres"	Acide Sialique (*)
Enfants normaux (de 2 à 6 ans)	300 à 500	0 à 10
TAY-SACHS 1	780	5
TAY-SACHS 2	535	12
Franck B.	435	85

(*) acide N-acétylneuraminique

T a b l e a u XLI

Elimination journalière (exprimée en mg p. 24 h d'oses "neutres", d'osamines et d'acide sialique totaux) d'oligosaccharides dans les urines d'adultes, d'enfants normaux, de maladie de TAY-SACHS et du jeune Franck B.

	Osés "neutres"	Osamines	Acide Sialique (*)
Adultes	65 à 105	12 à 30	30 à 70
Enfants normaux	50 à 80	---	50
TAY-SACHS 1	210	---	---
TAY-SACHS 2	140	41	92
Franck B.	580	216	48

(*) acide N-acétylneuraminique

BUS
LILLE

B - IDENTIFICATION DES OLIGOSACCHARIDES

1 - URINES DE MALADIE DE TAY-SACHS

L'analyse chromatographique des hydrolysats des osides des deux urines de maladie de TAY-SACHS montre la présence de quantités importantes de galactose, de glucose, de fucose, de N-acétylgalactosamine, et de traces de mannose et de N-acétylglucosamine. Ces résultats sont très voisins de ceux que fournit l'analyse des urines normales. En outre, l'une des deux urines de maladie de TAY-SACHS renfermait d'importantes quantités de sialyl-lactose qui a été identifié par une hydrolyse acide douce, qui a libéré du lactose et de l'acide N-acétylneuraminique.

2 - URINES DU JEUNE FRANCK B.

Les osides présents dans l'urine du jeune Franck B. renferment essentiellement du mannose et de la N-acétylglucosamine (Fig. 85 ; p. 206).

Les rapports molaires des oses sont les suivants :

oside :	Rapport oses/osamine		ose :	n
	avant réduction	après réduction		
3 :	1,1	2,12	osamine	4
4 :	1,05	2,08	"	4
5 :	1,54	1,05	"	5
6 :	1,08	1,58	"	6
7 :	1,12	1,39	"	8
:	:	:	:	:

L'étude de la structure de ces cinq oligosaccharides montre donc qu'ils portent tous la N-acétylglucosamine en position réductrice terminale et qu'il s'agit respectivement de deux tétraoses, d'un pentose, d'un hexaose et d'un octaose.

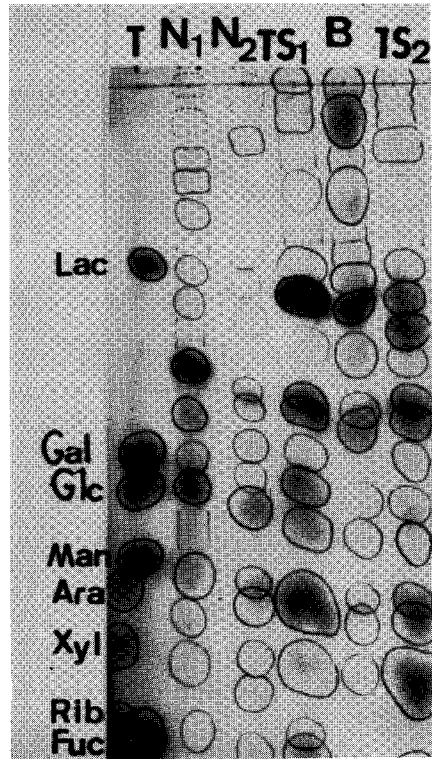


Figure 84

Chromatographie sur papiers des glucides libres d'urines d'enfants normaux (N 1 et N 2) de maladie d' TAY-SACHS (TS 1 et TS 2) et du jeune Frank B. (B). Papier Whatman n° 3. Système-solvant : n-butanol/ acide acétique/eau (4 : 1 : 5).

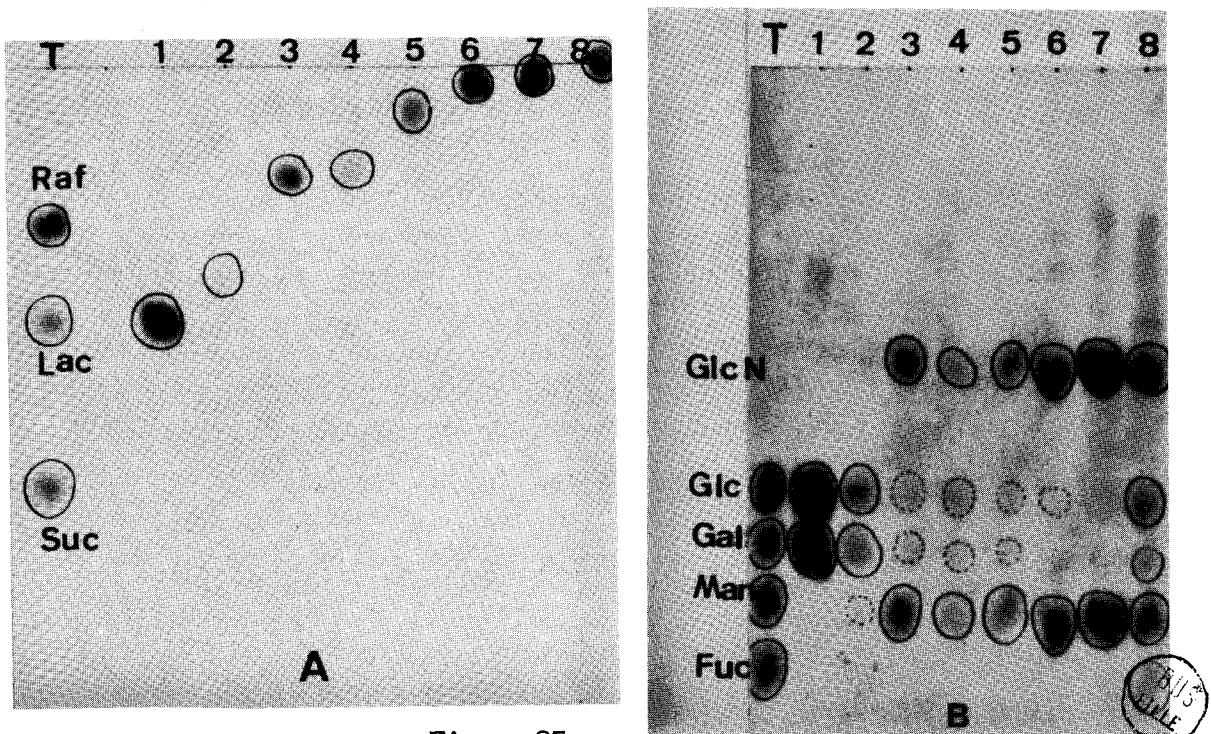


Figure 85

Planche A : Comportement chromatographique des oligosaccharides urinaires isolés de l'urine du jeune Franck B. Papier Whatman n° 3. Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Révélation à l'oxalate d'aniline.
Planche B : Chromatographie des hydrolysats chlorhydriques des oligosaccharides isolés de l'urine du jeune Franck B. Papier Whatman n° 1. Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2). Révélation à l'oxalate d'aniline.

III - CONCLUSION ET DISCUSSION

Nous avons montré l'existence d'un cas isolé d'oligosaccharidurie caractérisé par l'élimination d'osides polymères du mannose et de la glucosamine. Seule, une étude comparée plus complète d'urines pathologiques permettrait de dire si cette élimination massive d'oligosaccharides est spécifique de ce type de gangliosidose à GM₂.

L'origine de ces osides s'explique ici sans nul doute par un blocage du catabolisme des glycoprotéines, du à l'absence totale d'hexosaminidase. L'absence de surcharge glycoprotéinique dans le sérum et l'urine, et la présence d'une osamine en position terminale réductrice témoigne de l'action, au niveau du foie, d'une N-aspartidylglucosaminidase, qui a détaché le glycanne de la protéine. L'existence simultanée de tétraoses, pentaoses et octaoses pourrait enfin provenir de glycannes en voie de synthèse, l'action éventuelle d'endo-mannosidases libérant en effet des osides à mannose réducteur.

3^o DESCRIPTION D'UN PROCEDE DE ROUTINE PERMETTANT
L'EXPLORATION RAPIDE DE LA COMPOSITION EN OSIDES
DES URINES - PREMIERES APPLICATIONS

Nous avons décrit, dans un chapitre précédent, un procédé général de fractionnement et de dosage des glucides libres et conjugués de l'urine, dont l'application, cependant, se prête mal à un long travail de routine. Nous avons alors cherché à simplifier cette méthode et nous sommes parvenu à mettre au point un procédé rapide d'étude des glucides libres urinaires.

I - DESCRIPTION D'UN PROCEDE DE ROUTINE

D'ETUDE DES GLUCIDES LIBRES URINAIRES

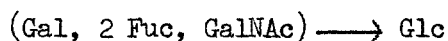
L'urine (200 à 300 ml) est recueillie sur un mélange de chloroforme et de toluène, puis entreposée 24 h à + 4° C et filtrée. Elle est ensuite passée sur une paire de colonnes de résines échangeuses de cations (Dowex 50 x 8 ;

"mesh" 25 - 50 ; forme H^+ ; 2 cm x 40 cm) et d'anions (Duolite A 40 ; "mesh" 25 - 50 ; forme formiate ; 2 cm x 40 cm). Après rinçage des résines par 200 ml d'eau, la solution effluente est passée sur une colonne de Charbon-Célite (2 cm x 10 cm), qui est rincée par 500 ml d'eau. Les osides sont enfin élués de la colonne de Charbon-Célite par des solutions éthanoliques à 7,5 et 50 p. 100, de 500 ml chacune. Les fractions éthanoliques sont concentrées sous vide et reprises par une petite quantité d'eau (0,2 ml pour 200 ml d'urine initiale). L'analyse chromatographique est réalisée dans le système-solvant de FISHER et NEBEL (359) : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) et les révélations sont effectuées à l'aide du révélateur à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (360).

II - PREMIERES APPLICATIONS

Nous avons appliqué ce procédé d'exploration des glucides libres urinaires à l'étude comparée de la composition en osides des urines de sujets normaux ou cancéreux. Les résultats obtenus sont décrits dans la figure 86 (p. 209).

Ces résultats obtenus sont encore très fragmentaires, mais ils montrent néanmoins que la composition en oligosaccharides urinaires varie largement d'un individu à l'autre, en fonction de son groupe sanguin. Ces variations sont très sensibles dans la fraction 7,5 p. 100 en éthanol, mais difficilement analysables dans la fraction à 50 p. 100, qui est beaucoup plus complexe. Toutes les urines de sujets de groupe A, en particulier, (urines 1, 6, 8, 9, 11, 12) renferment le pentasaccharide suivant :



qu'on ne retrouve pas dans les urines AB ou O. Les urines de groupe A, (9, 11 et 12) possèdent cependant une composition différente de 1, 6 et 8 (voir Fig. 86 ; p. 209).

Les urines de sujets cancéreux ne présentent pas de variations significatives par rapport aux urines de sujets normaux.

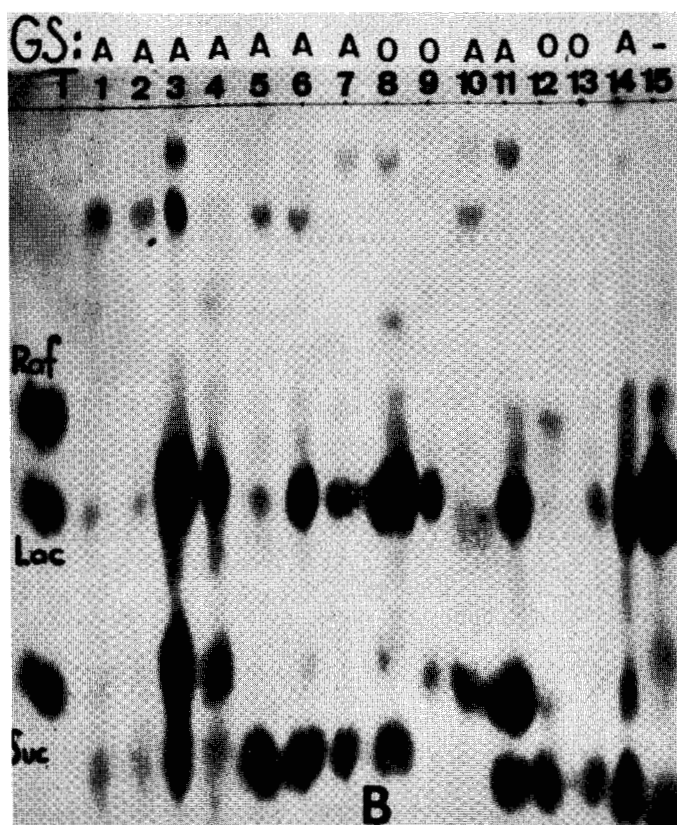
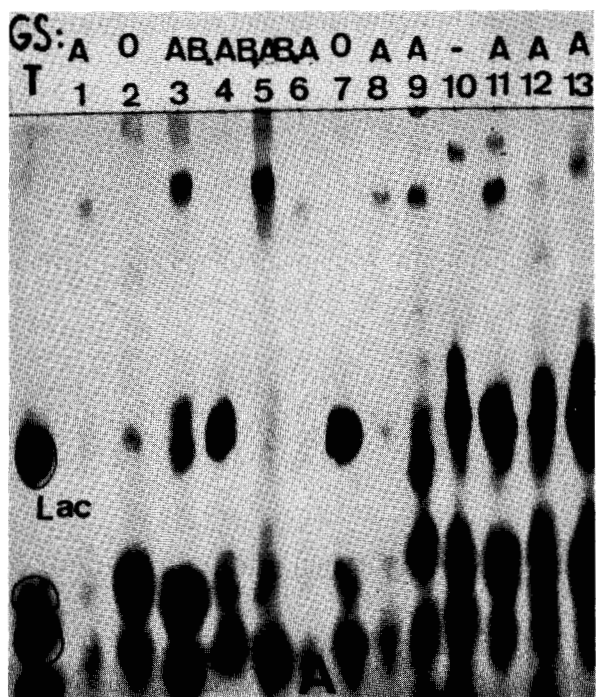


Figure 86

Chromatographie sur papier des oligosaccharides urinaires de différents individus, sains ou cancéreux, fractionnés sur Charbon-Célite selon le protocole expérimental décrit page 207. Papier Whatman n° 3. Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3).

Planche A : urines de sujets normaux. Planche B : urines de sujets cancéreux.

III - CONCLUSION ET DISCUSSION

La composition en osides des urines est étroitement liée à la nature du groupe sanguin de chaque individu. Ce fait est particulièrement net dans le cas du groupe A, caractérisé par la présence constante d'un pentasaccharide renfermant du galactose, du fucose, de la N-acétylgalactosamine et du glucose. Il est cependant nécessaire d'observer qu'il s'agit ici d'un oside qui n'a jamais été identifié jusqu'ici parmi les substances isolées des antigènes de groupe sanguin. En outre, chez certains individus du groupe A, nous avons observé la présence d'autres osides de plus haut poids moléculaire. Ces différences, observées au sein d'un même groupe sanguin, rendent donc nécessaire l'étude de la composition en osides d'un très grand nombre d'urines de sujets dont nous connaissons avec précision les groupes sanguins des systèmes ABO (H), Rhesus, Lewis, Kell, etc... et éventuellement les groupes tissulaires (antigènes leucocytaires et plaquettaires), de manière à tenter d'établir une classification des urines en fonction de leur composition. Ce n'est qu'après avoir atteint ce premier but que nous pourrons étudier utilement les variations éventuelles de la composition en oligosaccharides des urines de sujets cancéreux, dans lesquelles nous n'avons pas pu déceler jusqu'à présent de constituants anormaux. Les travaux récents de HAKAMORI et ANDREWS (361), qui ont isolé de tissus tumoraux un glycolipide anormal à activité de groupe sanguin (voir p. 178) nous incitent cependant à poursuivre ces travaux rendus possibles par la mise au point d'un procédé de routine rapide et reproductible.

CONCLUSIONS GENERALES

Les recherches que nous avons effectuées nous ont conduit à mettre au point un procédé général de fractionnement des urines dont l'application a permis, d'une part, l'étude approfondie de la composition en glucides libres de l'urine humaine normale, et d'autre part, la découverte d'un nouveau type de méliurie, la Sialurie. Nous avons, en outre, décrit l'existence d'une oligosaccharidosurie associée à un cas de gangliosidose généralisée, et entrepris l'étude comparée de la composition en oligosaccharides des urines normales et pathologiques. Les principaux résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

I - MISE AU POINT D'UN PROCÉDE GENERAL DE
FRACTIONNEMENT DES URINES

Nous avons mis au point, au terme d'un travail effectué en équipe, un procédé de fractionnement des urines qui associe la précipitation éthanolique et la dialyse et qui permet d'obtenir de façon reproductible, trois fractions glucidiques, glycoprotidique, oligosaccharidique et monosaccharidique. Ce procédé est à la base d'une méthode de dosage des glycoprotides totaux urinaires et constitue la première étape du fractionnement des glycoprotéines urinaires, actuellement poursuivi au laboratoire.

Nous avons ensuite procédé à l'isolement des monosaccharides et oligosaccharides de l'urine, grâce à l'utilisation des méthodes classiques de chromatographie préparative sur papier ou sur Charbon-Célite.

Nous avons enfin, dans le cadre d'une étude limitée aux seuls glucides libres de l'urine, mis au point un procédé simple et rapide mieux adapté aux impératifs d'un travail de routine.

II - ETUDE DES GLUCIDES LIBRES DE L'URINE NORMALE

Nous nous sommes efforcé de dresser une liste aussi complète que possible des glucides de l'urine humaine normale. Nous avons pu, de cette façon, identifier 19 monosaccharides et 37 oligosaccharides, dont la plupart n'avait pas encore été décrits.

A - LES MONOSACCHARIDES URINAIRES

Les monosaccharides urinaires ont été identifiés, dans la plupart des cas, grâce à l'étude de leurs propriétés physico-chimiques : comportement chromatographique, pouvoir rotatoire spécifique, synthèse des phénylosazones.

Nous avons ainsi caractérisé les monosaccharides suivants :

- Aldoses : D-galactose (0 à 3 mg p. l.), D-glucose (20 à 50 mg p. l.), D-mannose (1 à 5 mg p. l.), L-arabinose (20 à 50 mg p. l.), D-xylose (5 à 50 mg p. l.) et L-fucose (1 à 10 mg p. l.).

- Cétooses : L-xylulose (1 à 5 mg p. l.), ribulose (1 à 5 mg p. l.), D-allulose (10 à 30 mg p. l.), D-fructose (10 à 30 mg p. l.), 3-cétofructose (5 à 10 mg p. l.), 4-désoxyhexulose (5 à 10 mg p. l.), allo-heptulose (1 à 5 mg p. l.), D-althroheptulose (5 à 10 mg p. l.) et D-mannoheptulose (4 à 8 mg p. l.).

- N-acétylhexosamines : N-acétylglucosamine et N-acétylgalactosamine (moins de 1 mg p. l.).

- Acides sialiques : acide N-acétylneuraminique (6 à 10 mg p. l.).

- Acides uroniques : acide glucuronique (100 à 150 mg p. l.)

La présence dans l'urine d'allo-heptulose, de 3-cétofructose et de 4-désoxyfructose) n'avait jamais été décrite auparavant. Nous avons précisé, d'autre part, l'isomérisie optique des autres monosaccharides urinaires, dont l'identification n'avait été effectuée jusqu'à présent que sur la base de leur comportement chromatographique.

Les monosaccharides de l'urine ont une double origine :

- alimentaire (c'est le cas du glucose, de l'arabinose, du xylose, du manno-heptulose, du 3-cétofructose, qui disparaissent après un jeûne glucidique total de 2 à 3 jours).

- et métabolique (métabolisme des glycoprotéines : galactose, mannose, fucose, N-acétylhexosamines, acide sialique, et métabolisme intermédiaire des glucides libres : sédoheptulose, ribulose, xylulose).

Le 4-désoxyhexulose, qui ne disparaît totalement de l'urine qu'après un jeûne de trois jours, a peut-être également une origine métabolique.

B - LES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

Nous avons caractérisé 37 oligosaccharides urinaires, dont la liste est donnée dans le Tableau XXXIV (p. 175). Ils peuvent être classés d'après leur composition en oses en sept groupes :

1. osides d'origine alimentaire : lactose, saccharose, maltose.
2. osides à pentoses : Xyl \rightarrow Glc ; Ara \rightarrow Ara ; Rib \rightarrow Rib ; Xyl \rightarrow Xyl, etc..., d'origine alimentaire probable.
3. osides possédant la composition d'osides du lait de femme : (Fuc, Gal) \rightarrow Glc ; (2 Fuc, Gal) \rightarrow Glc ; (2 Fuc, 2 Gal) \rightarrow Glc.
4. osides renfermant du mannose et de la N-acétylglucosamine, d'origine glycoprotéinique.
5. osides renfermant simultanément du galactose, du fucose, de la N-acétylgalactosamine et du glucose en position terminale réductrice, qui seraient les produits de dégradation de glycolipides encore inconnus.
6. osides acides renfermant de l'acide N-acétylneuraminique, qui proviennent du métabolisme des gangliosides (sialyllactose) ou des glycoprotéines (sialyllactosamine).
7. osides acides renfermant de l'acide glucuronique, de la N-acétylglucosamine et du glucose, qui pourraient être considérés comme des produits du métabolisme des glycosaminoglycannes, s'il ne se posait le problème de la présence de glucose en position terminale réductrice.

III - DECOUVERTE D'UN CAS DE SIALURIE

En collaboration avec le Service de Pédiatrie des Services Hospitaliers de Lille (Professeur FONTAINE), nous avons décrit le premier cas mondial de sialurie, caractérisé par une élimination journalière de 5,8 à 7,2 g d'acide N-acétylneuraminique, de 380 à 580 mg de N-acétylmannosamine et de 160 à 180 mg de N-acétylglucosamine. Aucune explication de ce trouble métabolique n'a pu être encore proposée, mais l'hypothèse du dysfonctionnement d'un gène régulateur nous semble la plus logique.

IV - MISE EN EVIDENCE D'UNE OLIGOSACCHARIDOSURIE

ACCOMPAGNANT UN CAS DE GANGLIOSIDOSE

FONTAINE et al. (362) ont décrit le 2^o cas de gangliosidose à GM₂, avec déficit total en β -hexosaminidase. Nous avons montré, d'autre part, que l'urine du jeune malade renfermait environ 800 mg (par diurèse) d'oligosaccharides, essentiellement composés de mannose et de N-acétylglucosamine. L'élimination de ces osides urinaires est très certainement provoquée par le déficit total de β -hexosaminidases, qui perturbe ici non seulement le catabolisme des gangliosides, mais en outre celui des glycoprotéines.

V - ETUDE COMPAREE DES URINES NORMALES ET

PATHOLOGIQUES

Nous avons entrepris enfin une série de travaux qui demanderont un certain temps encore et qui ont pour objet l'étude comparée de la composition en oligosaccharides des urines normales et pathologiques. Nos résultats sont certes très fragmentaires, mais prouvent dès maintenant que la composition en osides des urines normales varie en fonction de facteurs parmi lesquels le groupe sanguin de l'individu joue un grand rôle, bien que l'on ne puisse établir de corrélation entre les structures des osides de groupes sanguins et celles des osides urinaires. Les variations observées fréquemment au sein d'un même groupe sanguin rendent d'autre part nécessaire de considérer l'influence possible des autres groupes dont les antigènes sont encore mal connus, et éventuellement celle des groupes "tissulaires". Il s'agit donc là d'un travail de longue haleine qui n'aura pour but d'établir une classification des urines d'après leur composition en glucides. Parallèlement, nous poursuivrons l'étude des urines pathologiques, urines de cancéreux en particulier, afin de tenter de mettre en évidence des variations qualitatives ou quantitatives caractéristiques du dysfonctionnement de la cellule tumorale.

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

- ALAGILLE D., Revue du Praticien, 1965, 15, 1911 (10)
- AMINOFF D., Biochem. J., 1961, 81, 384 (173, 196, 313, 322, 327, 337, 348)
- ANDERSON A.J. et Mac LAGAN N.F., Biochem. J., 1955, 59, 638 (102, 146, 153)
- ASTRUP T. et NISSEN U., Nature, 1964, 203, 255 (105)
- BALAZS E.A. et JEANLOZ R.W., In The Amino Sugars Volume II A, 1965, Acad. Press.
éd. New-York
- BASU D., Biochem. J., 1969, 112, 379 (121, 130)
- BEGBIE R. et RICHTMYER N.K., Carbohyd. Res., 1966, 2, 272 (243, 263)
- BELCHER R., NUTTENT A.J. et SAMBROOK C.N., Analyst., 1954, 79, 201 (169, 281)
- BENARD H. et RAMBERT P. dans Chimie Pathol. Masson éd. Paris, 1952, 854 (9)
- BERENSON G.S. et DALFERES E.R., Biochem. Biophys. Acta, 1965, 101, 183 (100)
- BERENSON G.S. et DALFERES E.R., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 101, 183 (137)
- BERGGARD I., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1959, 64, 156 (58)
- BERGGARD I., Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 413 (68, 75)
- BERGGARD I., Nature, 1963, 199, 174 (71, 77)
- BERGGARD I., Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 546 (73, 86)
- BERGGARD I., Nature, 1960, 187, 776 (88)
- BERGGARD I., In Protides of the Biological Fluids, 12ème Colloque, Bruges,
H. PEETERS éd., 1964, 285 (106)
- BERGGARD I., Arkiv. Kemi, 1962, 18, 291 (109)
- BERGGARD I., Arkiv. Kemi, 1961, 18, 291 (111)
- BERGGARD I., Arkiv. Kemi, 1961, 18, 291 (125, 140)
- BERGGARD I., CLEVE H. et BEARN A.G., Clin. Chim. Acta, 1964, 10, 1 (78, 79, 80,
82, 83, 84)
- BHATTI T. et CLAMP J.R., Clin. Chim. Acta, 1968, 22, 563 (7)
- BISERTE G. et DASSONVILLE B., Clin. Chim. Acta, 1956, 1, 49 (342)
- BISERTE G., HAVEZ R. et HAYEM-LEVY A., Path. Biol., 1959, 7, 123 (61)

- BISERTE G., LEVY A. et HAVEZ R., *Cancérologie*, 1957, 3, 7 (145, 149, 154)
- ELIX G. et LINDBERG E., *Acta, Chem. Scand.*, 1960, 14, 1 809 (202)
- EOAS N.F., *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1956, 92, 122 (36)
- BOURRILLON R., CORNILLOT P. et GOT R., *Clin. Chim. Acta*, 1962, 7, 506 (107)
- BOURRILLON R., CORNILLOT C. et GOT R., *Clin. Chim. Acta*, 1962, 7, 506 (113)
- BOURRILLON R., CORNILLOT P., MICHON J. et GOT R., *Clin. Chim. Acta*, 1963, 8, 513 (89)
- BOURRILLON R., GOT R. et MICHON J., *In Protides of the Biological Fluids*, 8ème Colloque, Bruges, H. PEETERS éd., 1960, 202 (59)
- BOURRILLON R. et GOUSSAULT Y., *Carbohydr. Res.*, 1968, 8, 175 (49, 52)
- BOURRILLON R. et VERNAY J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 117, 319 (120, 129)
- BOYCE W.H., GARVEY F.K. et NORFLEET C.M., *J. Clin. Invest.*, 1954, 33, 1 287 (60)
- CARRION A., BOURRILLON R. et CABEZAS J.A., *Clin. Chimica Acta*, 1969, 25, 351 et 1969, 26, 481 (114, 115)
- CHERIAN M.G. et RADHAKRISHNAN A.N., *Indian J. Biochem.*, 1966, 3, 101 (119, 128)
- COMB D.G. et ROSEMAN S., *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2 529 (340)
- DATE J.W., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1958, 10, 155 (30)
- DATE J.W., *J. Clin. Lab. Invest.*, 1958, 10, 149 et 444 (31, 275)
- DATE J.W., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1958, 10, 149 (46, 51)
- DEDONDER R., *Bull. Soc. Chim. France*, 1952, 19, 874 (179, 213)
- DI FERRANTE N. et RICH C., *Clin. Chim. Acta*, 1956, 1, 519 (132)
- DI FERRANTE N. et RICH C., *Lab. Clin. Med.*, 1956, 48, 491 (133)
- DISCHE Z., *J. Biol. Chem.*, 1947, 167, 189 (167, 197, 287)
- DISCHE Z., *Mikrochemie*, 1930, 8, 4 (171)
- DISCHE Z. et BORENFREUND E., *J. Biol. Chem.*, 1951, 192, 583 (223, 232, 244, 245, 249, 259, 260)
- DONAGGIO A., *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1933, 8, 1 456 (101)
- EBLE T.E., HOEKSEMA H., BOYACK G.A. et SAVIGE G.M., *Antibiotics and Chemotherapy* 1959, 9, 419 (239)
- EEGRIWE E., *Z. Anal. Chem.*, 1932, 89, 121 (285, 345)

- EGYUD L.G., Mac LAUGHLIN J.A. et SZENT-GYÖRGYI A., Proc. ANath. Acad. Sci. US.
1967, 57, 1 422 (272)
- ELSON L.A. et MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1933, 27, 1 824 (280, 349)
- EYLAR E.H., Fed. Proc., 1963, 22, 538 (108)
- FISCHER E., Ann., 1892, 270, 64 (227)
- FISCHMEISTER I., Ark. Kemi, 1958, 13, 247 (334)
- FISHER F.G., et NEBEL H.G., Z. Physiol. Chem., 1955, 302, 10 (359)
- FLEURY P. et EBERHARD R., Ann. Biol. Clin., 1965, 23, 1 175 (29, 33)
- FLEURY P., MALANGEAU P. et EBERHARD R., Ann. Biol. Clin., 1960, 18, 115 (28, 248)
- FONTAINE G., BISERTE G., MONTREUIL J., DUPONT A. et FARRIAUX J.P. avec la collaboration de STRECKER G., SPIK G., PUVION E., PUVION-DUTILLEUL F., SEZILLE G. et PICQUE M.T., Helv. Paediat. Acta, 1968, 23, Suppl. XVII (303, 354)
- FONTAINE G., MAILLARD E., FARRIAUX J.P., STRECKER G., MONTREUIL J., RESIBOIS A. TONDEUR M., JONNIAUX G., LOEB H. et VAN HOOF F., Pediat. Res. (sous presse) et La Presse Médicale, 1970, 78, 603 (356)
- FREUDENBERG K. et EICHEL H., Ann. Chem., 1934, 510, 240 (92)
- FUTTERMAN S. et ROE J.H., J. Biol. Chem., 1955, 215, 257 (27, 230, 271)
- GARDELL S., HEIJENSUOLD F. et ROCHNORLUND A., Acta Chem. Scand., 1950, 4, 970 (277)
- GARDELL S., Acta Chem. Scand., 1953, 7, 207 (279)
- GIBBONS R.A., Analyst, 1962, 87, 178 (344)
- GLICK M.C., CHEN I.W. et ZILLIKEN F., J. Biol. Chem., 1962, 237, 981 (336, 339)
- GOOD T.A. et BESSMAN S.P., Anal. Biochem., 1964, 9, 253 (170, 193, 341, 350)
- GOT R. et BOURRILLON R., ~~Biochim. Biophys. Acta, 1962, 58, 74 (90)~~ *Nature 1961 189 234/90*
- GODIN P., Nature, 1954, 174, 134 (181, 215)
- GOTTSCHALK A., The Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances, CAMBRIDGE University Press, New-York, 1960 (330, 333)
- GOUBET B., Diplôme d'Etudes Supérieures, 1961, Faculté des Sciences, Lille (26, 141)
- GRANT G.H., J. Clin. Path., 1957, 10, 360 (69, 87)
- GREENE F.L. et MORRIS P., Anal. Chem., 1958, 30, 1 164 (212)
- GURIN S., BACHMAN C. et WILSON D.W., J. Biol. Chem., 1940, 133, 477 (91)

- HAKAMORI S., KAWAUCHI H. et ISHIMODA T., *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 65, 546 (116)
- HAKAMORI S.I. et ANDREWS H.D., *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 202, 225 (298, 300, 361)
- HAKAMORI S.I., ISHIMODA T., KAWAUCHI H. et EIDOH F., *J. Biochem. (Tokio)*, 1961, 49, 308
- HAKAMORI S.I. et JEANLOZ R.W., *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 2 827 (302)
- HAKAMORI S., KAWAUCHI H. et ISHIMODA T., *Nature*, 1961, 190, 265 (151, 155)
- HAMERMAN D. et HATCH F.T., *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1955, 78, 5 907 (35)
- HAMERMAN D. et HATCH F.T., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1955, 89, 279 (56)
- HAMERMAN D., HATCH F.T., REIFE A. et BARTZ K.W., *J. Lab. Clin. Med.*, 1955, 46, 848 (123, 138)
- HEREMANS M. Th., VAERMAN J.P. et HEREMANS J.F., In *Protides of the Biological Fluids*, 7ème Colloque, Bruges, H. PEETERS éd., 1960, 396 (62)
- HAUGH A. et LARSEN B., *Acta Chem. Scand.*, 1961, 15, 1 395 (222, 265, 268, 286, 290)
- HOUGH L., JONES J.K.N. et WADMAN W.H., *J. Chem. Soc.*, 1950, 1 702 (211)
- HOUGH L. et STACEY B.E., *Phytochemistry*, 1963, 2, 315 (238)
- HSIA D.Y., In *Inborn Errors of Metabolism*, Year Book Medical Publishers éd., 1966, 180 (11)
- HUTTUNEN J.K., *Ann. Med., Exptl. Biol. Fenniae (Helsinki)* 1966, 44, Suppl. 12, 3 (45, 50, 295)
- HUTTUNEN J.K., *Abstr. 2nd Meeting of Federation of European Biochemical Societies, Meeting Edition, Warsaw, 1966*, 241 (39)
- JERMYN M.A. et ISHERWOOD F.A., *Biochem. J.*, 1949, 44, 402 (175, 188, 190, 358)
- KALCKAR H.M., BRAGANCA B. et MUCH-PETERSON A., *Nature*, 1953, 172, 1 038 (13)
- KALLE E., DEBIASI S., KARYPIDIS C., HEIDE K. et SCHWICK H.G., *Acta Isotopica*, 1964, 4, 103 (160)
- KAO K.Y.T., HIZER C.A., DAWSON R.L. et Mc GAVACK T.H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1965, 119, 193 (99)
- KAPLAN M., GOROUBEN J.C. et BEDU-SAAD A. J., *Revue du Praticien*, 1965, 15, 1 859 (18)
- KERBY G.P., *J. Clin. Invest.*, 1954, 33, 1 168 (131)
- KING J.S., BOYCE W.H., LITTLE J.M. et ARTOM C., *J. Clin. Invest.*, 1958, 37, 315 (57)

- KING J.S., BOYCE W.H., LITTLE J.M. et ARTOM C., *J. Clin. Invest.*, 1958, 37, 315 (124, 139)
- KING J.S., FIELDEN M.L. et BOYCE W.H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, 90, 12 (93)
- KING J.S., FIELDEN M.L. et BOYCE W.H., *Clin. Chim. Acta*, 1962, 7, 316 (136)
- KING J.S., FIELDEN M.L. et BOYCE W.H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 95, 310 (110)
- KING J.S., FIELDEN M.L., GOODMAN H.O. et BOYCE W.H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 95, 310 (94)
- KLENK E. et UHLENBRUCK G., *Z. Physiol. Chem.*, 1957, 307, 266 (283)
- KUHN R., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, 40, 297 (43, 47, 296)
- KUHN R. et WIEGANDT H., *Chem. Ber.*, 1963, 96, 866 (299)
- KLEVSTRAND R. et NORDAL A., *Acta Chem. Scand.*, 1950, 4, 1320 (180, 184, 214, 309)
- LATO M., BRUNELLI B. et CIUFFINI G., *J. Chromatog.*, 1968, 36, 191 (6)
- LAFORGE F.B., *J. Biol. Chem.*, 1917, 28, 511 (262)
- LEYTON G.R., CONTRERAS E.G., BARRIGA R.B. et SCHLOTFELDT H.S., *Clin. Chim. Acta*, 1964, 9, 214 (148)
- LOBRY DE BRUYN C.A. et VAN EKENSTEIN W.A., *Rec. Trav. Chim.*, 1895, 14, 195 (206, 240, 242)
- LOIEZ-HENNETTE A., MALLEVAIS-GOUBET B., MONTREUIL J., SPIK G., STRECKER G. et VAILLANT-DELACROIX F., *Clin. Chim. Acta* (à paraître) (3)
- LUDOWIEG J. et BENMAMAN J.D., *Anal. Biochem.*, 1967, 19, 80 (351)
- LUNDBLAD A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 148, 151 (41)
- LUNDBLAD A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 165, 202 (42, 294, 301)
- LUNDBLAD A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 101, 177 (112)
- LUNDBLAD A. et BERGGARD I., *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 57, 129 (118)
- Mac COMB E.A. et RENDING V.V., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 95, 316 (176)
- MALLEVAIS-GOUBET B., Thèse Doct., Lille, 19 (142)
- MALLEVAIS-GOUBET B., D.E.A. de Biochimie, Lille, 1969 (63)
- MALLEVAIS-GOUBET B., SPIK G., LOIEZ-HENNETTE A., STRECKER G., VAILLANT-DELACROIX F., et MONTREUIL J., *Clin. Chim. Acta*. (à paraître) (143, 144, 162)
- MASAMUNE H. et HAKOMORI S.I., *Gann*, 1959, 50, Suppl. 108 (157)

- MASAMUNE H., HAKOMORI S.I. et SUGO T., *Tchoku J. Exp. Med.*, 1959, 69, 383 (156)
- MASAMUNE H., TSUIKI S., KAMIYAMA S., KAKETA H., ABE S.I., HAGA M., KAWASAKI H. et ABE S., *Tohoku J. Exp. Med.*, 1957, 6 (152)
- MAXFIELD M. et STEFANYE D., *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 2 522 (104)
- MEYER K., GRUMBACH M., LINKER A. et HOFFMAN P., *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1958, 39, 664 (134)
- MICHL H., *Monatsh. Chem.*, 1951, 82, 489 (221, 288, 289)
- MIETTINEN T.A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1962, 14, 380 (37)
- MIETTINEN T.A. et HUTTUNEN J.K., *Acta Chem. Scand.*, 1964, 18, 579 (38)
- MONTREUIL J., *3e Coll. Hôp. SAINT-JEAN, Bruges*, 1955, 209 (22, 25)
- MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, 395 (44, 48, 297)
- MONTREUIL J., *Communication personnelle* (347)
- MONTREUIL J. et BOULANGER P., *C.R. Acad. Sci.*, 1953, 236, 337 (1, 4, 21, 24, 54, 225, 233, 246, 269, 292, 293)
- MONTREUIL J. et GOUBET B., *Chromatographie Symposium II, Bruxelles, Société Belge des Sciences Pharmaceutiques éd.*, 1963, 299 (235)
- MONTREUIL J. et SPIK G., *Microdosage des glucides Monographies Lab. Chim. Biol. Fac. Sci. Lille*, 1968, 1 (165, 320, 324)
- MÖRNER K.A.H., *Skand. Arch. Physiol.*, 1895, 6, 332 (53)
- NORDAL A. et OISETH D., *Acta Chem. Scand.*, 1952, 6, 446 (266, 305)
- PARTRIDGE S.M., *Biochem. J.*, 1948, 42, 238 (174, 177, 187, 189, 191, 198, 199, 201, 352)
- PARTRIDGE S.M., *Biochem. Soc. Symp.*, 1950, 3, 52 (178, 183, 185, 209, 216, 343, 360)
- PATTE J.C., BALDASSAIRE G. et LORET J., *J. Rev. Franc. Etudes Clin et Biol.*, 1958, 1, 960 (67, 70, 72, 76, 81, 85)
- PECHAN Z., *Neoplasma*, 1964, 11, 279 (34, 40, 147, 194, 264)
- PETEK F. et EBERHARD R., *Clin. Chim. Acta*, 1968, 21, 293 (5)
- POLONOVSKI M. dans *Chimie Pathol. Masson éd. Paris*, 1952, 833 (8)
- RADHAKRISHNAMURTHY B., FISHKIN A.F. et BERENSON G.S., *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 101, 129 (117)
- PHILIPPART M. dans *Mucopolysaccharidoses et Sphingolipidoses, Expansion Scientifique Française, éd. 1969*

- RELYVELD P., Ned. Tijdschr. Geneesk., 1961, 105, 1 525 (19)
- RIBADEAU-DUMAS B. et ALLAIS C., Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 377 (331)
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1931, 25, 1 092 (154)
- RINK M. et HERRMAN S., J. Chromatog., 1963, 12, 415 (229)
- RODEN L., Fed. Proc., 1966, 25, 409 (96, 97)
- ROSEMAN S. et LUDOWIEG J., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 300 (278)
- ROSENFELD E.L., Clin. Chim. Acta, 1969, 24, 469 (17)
- ROWE D.S. et SOOTHILL J.F., Clin. Sci, 1961, 21, 75 (74)
- SCHULTZE H.E., SCHONENBERGER M. et SCHWICK G., Biochem. Z., 1956, 328, 267 (66)
- SIDBURY J.B. Jr., Adv. Clin. Chim., 1961, 4, 29 (14)
- SPECK J.C., In Adv. Carb. Chem., Acad. Press. éd., 1958, 13, 63 (207)
- SPIK G., Thèse Doct., Lille, 1968 (220, 276)
- SPIK G. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 50 (2, 127, 166, 168)
- SPIK G., STRECKER G. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 51, 1 287
(274)
- STEIGER M. et REICHSTEIN T., Helv. Chim. Acta, 1936, 19, 184 (237)
- SVENNERHOLM L., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1956, 61, 75 (203, 312, 319, 326,
328, 329, 336)
- SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L., Nature, 1958, 181, 1 154 (182, 192, 205, 208,
217, 219, 267, 282, 304, 308, 315, 316)
- TAMM I. et HORSFALL F.L., Proc. Soc. Exptl. Biol., (N.Y.) 1950, 74, 108 (103)
- TELLER W., Monatsschr. Kinderheilk, 1964, 112, 538 (135)
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1928, 215, 36 (163)
- TOUSTER O., Amer. J. Med., 1957, 22, 671 (20)
- TREVELYAN W.E., PROTOR D.P. et HARRISON J.S., Nature, 1950, 444, 166 (210)
- TUNIS M. et WEINFELD H., Cancer Res., 1962, 22, 764 (159)

- VAILLANT-DELACROIX F., D.E.A. Biochimie, Lille, 1969 (64)
- VARADI D.P., CIFONELLI J.A. et DORFMAN A., Biochem. Biophys. Acta, 1967, 141, 103 (98)
- WALDRON D.M., Nature, 1952, 170, 461 (55)
- WARREN L., Nature, 1960, 186, 237 (218, 310, 314)
- WEICKER H., GRASSLIN D. et ADELMANN B., Clin. Chim. Acta, 1965, 11, 92 (158, 161)
- WERNER J. et ODIN L., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230 (172, 186, 195, 204, 224, 284, 311, 317, 318, 321, 323, 325, 335, 346)
- WHISTLER R.L. et DURSO D.F., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 677 (200)
- WHITE A.A. et HESS W.C., Arch. Biochem. Biophys., 1956, 64, 57 (23, 26, 32, 226, 228, 234, 241, 247, 250, 261, 271)
- WOOLF L.I., Adv. in Clin. Chem. Acad. Press. éd., 1962, 1 (12, 15, 16)
- ZERBAN F.W. et SATTLER L., J. Assoc. Official Agr. Chem., 1941, 24, 657 (236)
- ZERBAN F.W., SATTLER L., ROSENTHAL G. et GLAUBACK A., Sugar, 1952, 33 (273)

