

50376
1970
151

N° d'ordre : 217.

50.376
1970
151

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE I

MEMOIRE PRESENTE
A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LILLE
POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE
SPECIALITE : BIOCHIMIE

par

Madame Françoise VAILLANT-DELACROIX

LE FRACTIONNEMENT
DES GLYCOPROTIDES URINAIRES
RESULTATS PRELIMINAIRES



Présenté le 12 décembre 1970, devant la Commission d'Examen :

MM. J. MONTREUIL Président

C. LOUCHEUX

M^{lle} G. SPIK

Qu'il me soit permis de remercier ici le Professeur MONTREUIL qui, après m'avoir accueillie avec bienveillance dans son laboratoire, m'a donné la possibilité de réaliser ce travail.

C'est aussi grâce à l'attention, à la compétence et à la gentillesse de Mademoiselle Geneviève SPIK, Chargée de Recherches au C.N.R.S., que nous avons pu terminer cet ouvrage qui, sans elle, n'aurait certainement pas vu le jour.

Qu'elle trouve ici toute l'expression de ma reconnaissance.

Je n'oublie pas non plus tous mes camarades des Laboratoires de la Faculté des Sciences et de l'Institut de Recherches sur le Cancer de LILLE qui m'ont apporté leur expérience et leur chaude amitié.

Enfin, mes remerciements et ma gratitude vont à la Ligue Nationale Française de Lutte contre le Cancer qui m'a fait l'honneur de m'accepter comme Boursière pendant trois ans.

Merci à tous.

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>GENERALITES</u>	2
<u>HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR L'URINE</u>	3
1°- <u>LA FRACTION DIALYSABLE DE L'URINE</u>	4
2°- <u>LA FRACTION ADIALYSABLE DE L'URINE</u>	6
<u>CONSTITUANTS DE L'ADIALYSABLE URINAIRE</u>	17
<u>I - ASPECTS TECHNIQUES DE L'ANALYSE DES PROTEINES URINAIRES</u>	17
A - <u>METHODES DE CONCENTRATION</u>	17
1 - L'ultrafiltration	17
2 - La lyophilisation	17
B - <u>METHODES D'ENRICHISSEMENT</u>	17
C - <u>METHODES D'ANALYSE</u>	17
<u>II - LES PROTEINES DE L'URINE NORMALE</u>	18
A - <u>LES PROTEINES SERIQUES</u>	21
B - <u>LES PROTEINES URINAIRES DE FAIBLE MASSE MOLECULAIRE</u>	22
1 - <u>LES GLYCOSAMINOGLYCANNES</u>	22
a - L'acide chondroïtine sulfurique	22
b - L'héparine	29
c - L'acide hyaluronique	30
d - Le kérateane sulfate	30
2 - <u>LES GLYCOPEPTIDES URINAIRES</u>	31
3 - <u>COMPOSES INTERMEDIAIRES ENTRE LES GLYCOPEPTIDES ET LES GLYCOPROTEINES</u>	36
C - <u>LES GLYCOPROTEINES URINAIRES</u>	37

1 - <u>L'UROMUCOIDE OU GLYCOPROTEINE DE TAMM ET HORSFALL</u>	37	
a - Préparation	39	
b - Nature physico-chimique et formes moléculaires	39	
c - Composition en amino-acides et en oses	42	
d - Propriétés biologiques	42	
e - Physiologie, pathologie	42	
2 - <u>LA SUBSTANCE DE DONAGGIO</u>	45	
a - Isolement	45	
b - Identification	45	
3 - <u>LES GLYCOPROTEINES D'ANDERSON ET DE Mc LAGAN</u>	47	
4 - <u>AUTRES GLYCOPROTEINES</u>	47	
a - Les glycoprotéines à activité de groupe sanguin	47	
b - Les gonadotropines	47	
c - L'érythropoïétine	47	
III - <u>GLYCOPROTEINES ET CANCER</u>	48	
IV - <u>CONCLUSION</u>	57	
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>TRAVAUX PERSONNELS</td></tr></table>	TRAVAUX PERSONNELS	58
TRAVAUX PERSONNELS		
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>METHODES GENERALES D'ANALYSE</td></tr></table>	METHODES GENERALES D'ANALYSE	58
METHODES GENERALES D'ANALYSE		
I - <u>DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES</u>	59	
1 - Les oses "neutres"	59	
2 - Les osamines	59	
3 - L'acide sialique	59	
4 - Les acides uroniques	59	
II - <u>DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLLAIRE EN OSES</u>	60	
A - <u>LES OSES NEUTRES</u>	60	
1 - <u>HYDROLYSE ACIDE ET PURIFICATION DES HYDROLYSATS</u>	60	
2 - <u>CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE</u>	60	
a - Identification	60	
b - Dosages	60	

B - <u>LES OSAMINES</u>	60
1 - <u>HYDROLYSE ACIDE</u>	60
2 - <u>IDENTIFICATION</u>	61
a - Méthode de chromatographie sur colonne de GARDELL	61
b - Méthode de désamination de GARDELL, HEJKENSJOLD et ROCHNORLUND	61
3 - <u>DOSAGE SPECIFIQUE DE LA GALACTOSAMINE PAR LA METHODE COLORIMETRIQUE DE LUDOWIEG ET BENMAMAN</u>	61
C - <u>LES ACIDES SIALIQUES</u>	61
1 - <u>HYDROLYSE ACIDE ET PURIFICATION DES HYDROLYSATS</u>	61
2 - <u>IDENTIFICATION</u>	62
III - <u>ETUDE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE</u>	62
1 - <u>PREPARATION DES IMMUN-SERUMS</u>	62
2 - <u>REALISATION DES IMMUNO-ELECTROPHORESES</u>	63
IV - <u>ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES POLYSACCHARIDES ACIDES</u>	63
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">PREPARATION DU MATERIEL D'ETUDE</div>	64
I - <u>PREPARATION</u>	64
1 - <u>PRELEVEMENT</u>	64
2 - <u>CONCENTRATION</u>	64
3 - <u>FRACTIONNEMENT ETHANOLIQUE</u>	65
a - Choix de la concentration en éthanol	65
b - Mode opératoire	65
II - <u>COMPOSITION DE L'EXTRAIT URINAIRE"</u>	68
A - <u>RESULTATS</u>	68
1 - <u>COMPOSITION CENTESIMALE DES OSES</u>	68
a - Les oses "neutres"	68
b - Les acides uroniques	68
c - Les acides sialiques	68
d - Les osamines	68
2 - <u>IDENTIFICATION ET DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE</u>	68
a - Les oses "neutres"	70
b - Les acides uroniques	70

c - Les acides sialiques	70
d - Les hexosamines	70
3 - <u>ANALYSE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE</u>	70
4 - <u>ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES POLYSACCHARIDES ACIDES</u>	70
B - <u>DISCUSSION</u>	77
C - <u>CONCLUSIONS</u>	79
CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DOWEX 1 x 4	
I - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	81
A - <u>PREPARATION DE LA SOLUTION "D'EXTRAIT URINAIRE"</u>	81
B - <u>PREPARATION DES COLONNES DE CHROMATOGRAPHIE</u>	81
1 - <u>REGENERATION DE LA RESINE</u>	81
2 - <u>CONFECTION DES COLONNES</u>	82
II - <u>FRACTIONNEMENT DE "L'EXTRAIT URINAIRE" TOTAL</u>	82
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	82
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE</u>	82
2 - <u>ETUDE DES PROPRIETES DES FRACTIONS</u>	83
B - <u>RESULTATS</u>	83
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE</u>	83
2 - <u>COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES</u>	85
a - Fraction neutre	85
b - Les fractions P ₁ , P ₂ , P ₃	85
c - Le pic ₇	85
d - La fraction F ₃ N	85
3 - <u>COMPOSITION MOLAIRES DES OSES</u>	87
a - Les oses neutres	87
b - Les acides uroniques	87
c - L'acide sialique	87
d - Les osamines	87
4 - <u>ETUDE ELECTROPHORETIQUE</u>	87
a - La fraction neutre FN	87
b - Les fractions P ₁ , P ₂ , P ₃	87
c - La fraction P ₇	87
d - La fraction F ₃ N	91
5 - <u>ETUDE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE</u>	91
a - Les fractions neutre, P ₁ , P ₂ , P ₃	91

b - La fraction P ₇	91
c - La fraction F ₃ N	91
C - <u>DISCUSSION</u>	91
1 - La fraction neutre	91
2 - Les fractions P ₁ , P ₂ , P ₃	91
3 - La fraction P ₇	91
4 - La fraction F ₃ N	94
D - <u>CONCLUSIONS</u>	94
94	94
III - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT DU PIC</u>	7
95	95
A - <u>CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE</u>	95
95	95
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR SEPHADEX</u>	95
a - Mode opératoire	95
b - Résultats	96
c - Conclusions	96
2 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE</u>	96
a - Mode opératoire	96
b - Résultats	:97
c - Conclusions	97
3 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-SEPHADEX</u>	97
a - Mode opératoire	97
b - Résultats	98
c - Conclusions	98
4 - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR ECTEOLA-CELLULOSE</u>	101
a - Mode opératoire	101
b - Résultats	102
c - Conclusions	102
B - <u>ELECTROPHORESE PREPARATIVE</u>	102
1 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	104
2 - <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	104
C - <u>CONCLUSIONS</u>	104
IV - <u>CONCLUSIONS CONCERNANT LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DOWEX 1 x 4 DES GLYCOPROTIDES URINAIRES</u>	105

<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px 10px;">FRACTIONNEMENT PAR L'ETHANOL</div>	106
I - <u>FRACTIONNEMENT DE "L'EXTRAIT URINAIRE" PAR L'ETHANOL</u>	106
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	106
1 - <u>FRACTIONNEMENT ALCOOLIQUE</u>	106
2 - <u>ETUDE DES PROPRIETES DES FRACTIONS</u>	106
B - <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	107
C - <u>CONCLUSIONS</u>	107
II - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DE LA FRACTION P₉₀</u>	107
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	109
1 - <u>PREPARATION DES COLONNES</u>	109
2 - <u>ELUTION DES COLONNES</u>	109
3 - <u>ETUDE DES PROPRIETES DES FRACTIONS</u>	109
B - <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	110
C - <u>CONCLUSIONS</u>	110
III - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LE FRACTIONNEMENT DE "L'EXTRAIT URINAIRE" PAR L'ETHANOL</u>	110

<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px 10px;">FRACTIONNEMENT PAR LE SULFATE D'AMMONIUM</div>	112
--	-----

I - <u>FRACTIONNEMENT DE "L'EXTRAIT URINAIRE"</u>	112
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	112
1 - <u>FRACTIONNEMENT</u>	112
2 - <u>ETUDE DES PROPRIETES DES FRACTIONS</u>	113
B - <u>RESULTATS</u>	113
1 - <u>ETUDE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE</u>	113
2 - <u>COMPOSITION EN GLUCIDES DE LA FRACTION S₉</u>	117
3 - <u>ETUDE ELECTROPHORETIQUE</u>	117
C - <u>CONCLUSIONS</u>	117
II - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DE LA FRACTION S₉</u>	117
A - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DOWEX 1 x 4</u>	117
1 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	119
a - Chromatographie	119
b - Etude des propriétés des fractions	119

2 - <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	119
3 - <u>CONCLUSIONS</u>	119
B - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ECTEOLA-cellulose</u>	121
1 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	121
a - Chromatographie	121
b - Etude des propriétés des fractions	121
2 - <u>RESULTATS ET DISCUSSIONS</u>	121
a - Composition centésimale en glucides	121
b - Etude immuno-électrophorétique	123
c - Etude électrophorétique	123
3 - <u>CONCLUSIONS</u>	123
III - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LE FRACTIONNEMENT PAR LE SULFATE D'AMMONIUM DES GLYCOPROTIDES URINAIRES</u>	125
<u>FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE SEPHADEX</u>	125
A - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	125
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE</u>	125
2 - <u>ETUDE DES PROPRIETES DES FRACTIONS</u>	125
B - <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	125
1 - <u>CHROMATOGRAPHIE</u>	130
2 - <u>ETUDE DE LA COMPOSITION DES FRACTIONS</u>	130
a - Pic I et Pic A	130
b - Pic II	131
c - Pic B	130
d - Détermination de la composition molaire en oses "neutres"	130
C - <u>CONCLUSIONS</u>	131
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	133
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	135

=====

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

La sécrétion urinaire est une des voies principales que l'organisme possède pour se débarrasser des déchets de son métabolisme, des substances nuisibles ou inutiles et aussi, d'une certaine quantité d'eau. La quantité d'urine émise par l'homme pendant 24 heures varie de un litre à un litre et demi. L'urine est colorée en jaune plus ou moins foncé par les pigments urinaires (urochrome, uroérythrine, urobiline, porphyrine, etc...).

Les constituants minéraux (chlorures, phosphates) et organiques tels que l'urée, les acides aminés, l'acide urique, représentent la plus grande partie des constituants normaux de l'urine.

Depuis plus d'un demi siècle, les chercheurs se penchent sur les constituants moins connus de l'urine et la protéinurie et la glucidurie sont maintenant admises comme normales quand elles sont discrètes. Toutefois, des excrétions anormalement élevées de protéines ou de glucides révèlent des troubles pathologiques graves. Ces composés peuvent se classer en deux groupes principaux :

- les oses libres (oses + polyosides)
- les composés de grande masse moléculaire, provenant soit du sérum, par ultrafiltration sous l'influence de la pression sanguine, dans le glomérule de Malpighi, ou du tractus urinaire et génital : ce sont les protéines, les mucopolysaccharides, les glycoprotéines.

Bien que très travaillée, l'urine reste à l'heure actuelle un milieu biologique peu connu et outre les oses et osides libres et quelques glycoprotéines connues, il était intéressant d'essayer d'isoler d'autres composés. C'est le but que nous nous sommes proposés dans un premier temps, dès notre entrée au laboratoire, afin de déceler dans un second temps, des différences chimiques ou physiques de ces constituants, dans le cas de cancer.

Dans le présent mémoire, nous avons d'abord exposé rapidement l'historique des recherches effectuées sur l'urine humaine, en nous attachant surtout à la fraction adialysable qui contient le plus de constituants, puis nous avons cité tous les constituants en précisant leurs propriétés lorsque celles-ci étaient connues.

Dans la deuxième partie, nous exposerons le résultat de nos travaux personnels.

G E N E R A L I T E S

- HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR L'URINE
- CONSTITUANTS DE L'ADIALYSABLE URINAIRE

HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR L'URINE

Dès 1895, MÖRNER (1) démontrait la présence de protéines dans l'urine humaine et essayait de démontrer avec les connaissances chimiques d'alors, la présence d'acide chondroïtine sulfurique. Ce n'est que trente ans plus tard que des substances de groupes sanguins sont découvertes par YOSIYADA (2).

Il faudra attendre 1950, pour que TAMM et HORSFALL (3) isolent un uromucoïde, spécifiquement urinaire, à la propriété inhibitrice de l'hémagglutination des virus et que, sur ces résultats, de nombreux chercheurs entreprennent de fractionner, d'isoler et de caractériser les glycoprotéides présents dans les urines humaines normales et pathologiques.

Il faut signaler dès maintenant, les difficultés de recherches, si l'on sait que dans le sérum humain, il existe 70 g/l de glycoprotéides répartis entre trente à quarante constituants, tandis que dans un litre d'urine nous n'obtenons que 15 à 400 mg de colloïdes (*) répartis sur un nombre encore plus grands de constituants.

L'étude des protéides des urines normales ou "protéinurie physiologique", a été entreprise par de nombreux auteurs, en particulier par RIGAS et HELLER (4), Mc GARRY, SEHON et ROSE (5), HEREMANS (6), HAMERMAN et coll. (7).

(*) Colloïdes : les auteurs groupent sous le nom de colloïdes l'ensemble des glycopeptides, glycoprotéines et glycosaminoglycannes (ou mucopolysaccharides).

La méthode la plus employée a été l'électrophorèse sur papier, (la première a été faite par RIGAS et HELLER (8)), suivie de différents modes de révélation, pour mettre en évidence les protéines, les composés glucidiques. Mais cette méthode n'est pas assez sensible pour l'étude directe de l'urine qui doit d'abord être concentrée ou fractionnée et enrichie pour permettre l'étude de composés particuliers.

Pour des raisons de commodités, nous avons partagé ce chapitre en deux parties principales :

- . la fraction dialysable de l'urine, c'est-à-dire filtrable à travers des boudins de dialyse, comprenant les glucides libres de l'urine
- . la fraction adialysable, retenue dans les boudins de dialyse, renfermant les substances de grande masse moléculaire.

I - LA FRACTION DIALYSABLE DE L'URINE

MONTREUIL et BOULANGER (9) sont les premiers à avoir décrit une méthode d'analyse chromatographique des fractions dialysables des urines humaines préalablement purifiées sur échangeurs d'ions.

Les urines humaines contiennent 1,5 g d'oses totaux par litre, qui se répartissent de la manière suivante :

- . oses et polyosides : 1 g par litre,
- . acide glycuronique libre et conjugué : 0,5 g par litre.

Les oses urinaires ont été identifiés par MONTREUIL* ainsi que par BEVENUE et WILLIAMS (10), et les polyosides ont été isolés par chromatographie préparative sur papier et la composition de dix d'entre eux a été précisée (Tableau I - p. 5).

* Communication personnelle.

Tableau I

COMPOSITION EN OSES DES POLYOSIDES DE L'URINE NORMALE
d'après MONTREUIL et BOULANGER (23)

Polyosides		
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)
	:	:

D'autre part, plus récemment, MONTREUIL (11), puis MONTREUIL et GOUBET (12) ont signalé la présence de cétooses dont six ont été identifiés par STREKER (13), trois autres substances cétoosiques restent encore à identifier.

Enfin, de nombreux auteurs ont démontré l'augmentation des quantités de composés contenant des osamines, (47 p. 100 des osamines totales sont dialysables : BOAS (14)), en cas de maladie, de grossesse ou de choc chirurgical : BOAS (15), BJÖRNESJÖ, WERNER et ODIN (16), et une décroissance dans le cas de myxédème : WIENER et al (17), BOAS (18).

2 - LA FRACTION ADIALYSABLE DE L'URINE

Cette fraction est la plus complexe et la présence de glucides est connue depuis longtemps.

La composition en oses des colloïdes urinaires a été réalisée par MONTREUIL et BOULANGER dès 1953 (19). La chromatographie des hydrolysats de ces colloïdes a permis d'identifier le galactose, le mannose, le fucose, des osamines et l'acide glucuronique en forte proportion, le glucose et le xylose en petites quantités (voir figurés 16 et 17).

L'application des méthodes d'électrophorèse et d'immunoélectrophorèse a permis, à de nombreux auteurs, d'explorer cette fraction très complexe, et de déterminer la composition totale de l'adialysable urinaire (Tableau II - p. 7), et de la comparer à celle du sérum (Tableau III - p. 8).

RIGAS et HELLER ont soumis les protéines urinaires totales solubles à un fractionnement électrophorétique. Ils trouvèrent des fractions correspondant aux principales fractions du sérum, mais la fraction des χ -globulines urinaires était moins abondante, tandis que l'albumine était en excès.

Ces résultats furent confirmés par BOYCE, GARVEY et NORFLEET (20), Mc GARRY, SEHON et ROSE (21), WEBB, ROSE et SEHON (22), (Fig. I - p. 9).

Tableau II

ANALYSE DES COMPOSANTS NON DIALYSABLES DE L'URINE
d'après BOAS (23 bis)

Fraction	Excrétion en mg par 24 h	Références
Adialysable total	220 à 340	HAMERMAN et al (24).
"	430 + 115	KING et al (25).
"	150 à 750	BOAS (non publié).
"	133	WEBB, ROSE et SEHON (26).
Protéines	22 à 78 (a)	MORNER (27).
"	70	Mc GARRY, SEHON et ROSE (28)
"	39	RIGAS et HELLER (29).
"	139 (b)	HAMERMAN et al (30).
Azote	35,0	HAMERMAN et HATCH (31)
"	36,2 + 11,5	KING et al (32).
"	20,3 + 2,8	BOAS (non publié).
Lipides	15,6 + 8,1	KING et al (33).
Osamines totales	28,0 + 6,3	HAMERMAN, REIFE et BARTZ (34)
"	26,5 + 6,1	KING et al (35).
"	42,0 + 6,0	BOAS (36).
"	36,5	BJÖRNESJÖ, WERNER et ODIN (37)
Osamines totales (homme)	32,4 + 7,2	KING et HYDER (38).
"	37,6 + 5,0	MALLEVAIS (c)
Osamines totales (femme)	25,0 + 5,8	KING et HYDER (39).
"	31,4 + 5,0	MALLEVAIS (c)).
Acide Sialique	40,7 + 7,5	KING et al (40)
" (homme)	51,0 + 7,3	MALLEVAIS (c)
" (femme)	43,0 + 7,8	MALLEVAIS (c)
Hexoses	51,6 + 8,5	BOAS (c)
"	72,6 + 15,1	KING et al (41).
"	38,4 + 90	HAMERMAN, REIFE et BARTZ (42)
" (homme)	69,2 + 10,6	MALLEVAIS (c)
" (femme)	59,4 + 10,2	MALLEVAIS (c)
Fucose	6,2	HAMERMAN et HATCH (43).
Acide hexuronique	5,8	HAMERMAN et HATCH (44).
Glycoprotéine de TAMM et HORSFALL	25,0 (a)	TAMM et HORSFALL (45).
"	12,5 (a)	ADA et GOTTSCHEK (46).

(a) mg/litre urine

(b) calculé à partir des articles de références.

(c) communication personnelle.

T a b l e a u III

COMPOSITION DU SERUM ET DE L'ADIALYSABLE URINAIRE TOTAL DE SUJETS NORMAUX

Résultats exprimés en pourcentage de poids sec par litre

	Protéines	Hexoses	Acide Sialique	Hexosamines	Lipides	Cendres	Eau
Adialysable:							
Urinaire	47	16,6	9,7	6,2	3,3	8,5	12,2
Total							
Sérum	72	1,8	0,8	1,3	5	-	-

Résultats publiés par KING et al (47)

BIBL
LILLE

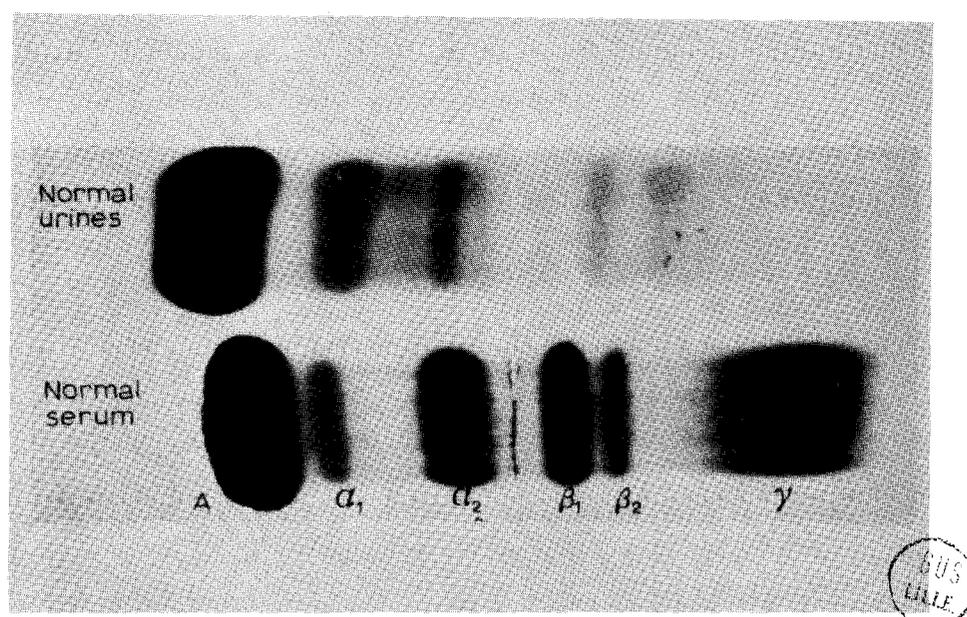


Figure 1

Electrophorèses de sérum et d'urine normale d'après la méthode de WIEME.

On note la mobilité plus grande de l'albumine urinaire et la zone des γ_1 globulines pratiquement absentes dans le sérum.

BERGGARD (49) montrait également que les protéines urinaires séparées par électrophorèse contenaient de plus grandes quantités d'oses que les fractions correspondantes du plasma.

Plus récemment, les techniques d'immuno électrophorèse se sont révélées être un outil précieux. GRANT (50), PATTE, BALSADAIRE et LORET (51), KEUTEL et al (52), BISERTE, HAVEZ et HAYEM LEVY (53), HEREMANS et al (54), et surtout BERGGARD (55, 56) les ont largement utilisées.

Actuellement, une vingtaine de protéines ont pu être identifiées à des protéines sériques.

WALDROM (57), HAMERMAN et al (58), KING et al (59) avaient d'autre part démontré la nature glycoprotéinique de l'adialysable urinaire, confirmée par les travaux de BOURRILLON, GÖT et MICHON (60).

Deux substances ont été purifiées et caractérisées par adsorption sur l'acide benzoïque et précipitation par l'acétone [ANDERSON et Mc LAGAN (61, 62)].

De même, la glycoprotéine de haut poids moléculaire de TAMM et HORSFALL (63) a été isolée de l'urine par précipitation avec le chlorure de sodium 0,58 M. Sa forme et les différentes propriétés biologiques, chimiques et physiques ont été étudiées par de nombreux auteurs parmi lesquels on peut citer TAMM et HORSFALL (64), BURNET (65), PORTER et TAMM (66) (Fig. 2 p. 11) DI FERRANTE et POPENOE (67), MAXFIELD (68, 69), (Tableau XI - p.42).

Un autre glycoprotéide a été isolé des urines de sujets fatigués ou cancéreux par la technique de TAYEAU (70) : c'est la substance de DONAGGIO dont l'étude électrophorétique a été faite par BISERTE et al en 1956 (71).

Enfin, les glycoprotéides ayant une activité de groupe sanguin [FREUDENBERG, ETCHEL (72, 73), KING, FIELDEN et BOYCE (74), KING et al (75)], les gonadotropines et l'érythropoïétine rencontrée dans les urines d'anémiés, complètent la liste des glycoprotéines actuellement isolées dans l'urine.

L'étude de ces colloïdes urinaires ne serait pas complète sans l'étude des mucopolysaccharides acides ou glycosaminoglycanes, terme introduit par BALAZS et JEANLOZ, correspondant mieux à la structure de ces complexes polysaccharide-protéine, formés d'un groupement prosthétique constitué par la répartition d'un disaccharide comprenant au moins une osamine : glucosamine ou galactosamine. Si le polysaccharide contient un acide uronique, le terme glycosaminoglycane peut être remplacé par le terme glycosaminoglycuronoglycane.

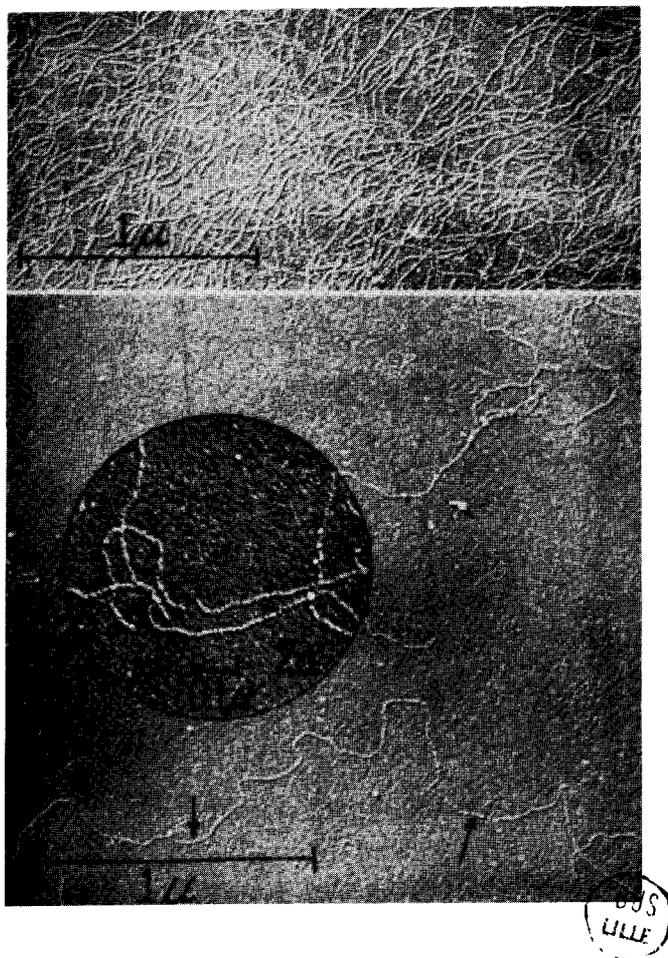


Figure 2

La glycoprotéine de TAMM et HORSFALL vue au microscope électronique d'après PORTER et TAMM.

Leur composition et leur structure sont exposées dans la figure 3 p. 13 et le tableau IV p. 14.

Déjà MÖRNER en 1895 (77) démontrait la présence d'acide chondroïtine sulfurique dans des complexes mucopolysaccharides-protéines de l'urine humaine, ce n'est que bien plus tard que différentes méthodes de préparation étaient mises au point.

Des fractions contenant des mucopolysaccharides acides sont isolées par précipitation à l'acétate de plomb : KOBAYASI (78), à la benzidine chlorhydrique : ASTRUP (79), par traitement à chaud : ANDERSON, et Mc LAGAN (80), par dialyse : HAMERMAN et al (81), KING et al (82), par précipitation alcoolique : TAMM et HORSFALL (83), par précipitation à l'acide benzoïque : ANDERSON et Mc LAGAN (84), par le procédé de "salting out" : TAMM et HORSFALL (85), ou par un détergent cationique : DI FERRANTE et RICH (86).

Plus récemment, un mélange de glycosaminoglycanes dans lequel l'acide chondroïtine sulfate était le principal constituant, a été mis en évidence dans la fraction adialysable de l'urine humaine : HEREMANS et al (87), LINKER et TERRY (88), KING, FIELDEN et BOYCE (89), KELLEY, PONCET et DI FERRANTE (90)

Ces composés normalement présents dans l'urine sont à un taux de 20 mg/24 h, et certains d'entre eux sont en augmentation très nette chez les enfants : RICH, DI FERRANTE et ARCHIBALD (91), LOEWI (92), TELLER et al (93), et dans le cas de certaines maladies : le syndrome de Morquio-Hurler, les humatisme articulaires, le cancer, la leucémie, etc... : LOEWI (94), RICH et MYERS (95), CLAUSEN et al (96).

La séparation des mucopolysaccharides d'un mélange a été un des premiers problèmes qui s'est posé.

DI FERRANTE et RICH (97), SCOTT (98), ANTONOPOULOS et al (99) les précipitaient au moyen de sels d'ammonium quaternaires tels que le cétavlon ou bromure de cetyltriméthylammonium et le chlorure de cetylpyridinium. Cependant, les résultats restaient problématiques, par exemple, le kératane sulfate restait en solution.

MATHEWS et HINDS (100) modifiaient la méthode de MEYER et al (101) pour précipiter les glycosaminoglycanes, et enfin, WHITEHOUSE et MORETTI (102) les précipitaient par le rivanol.

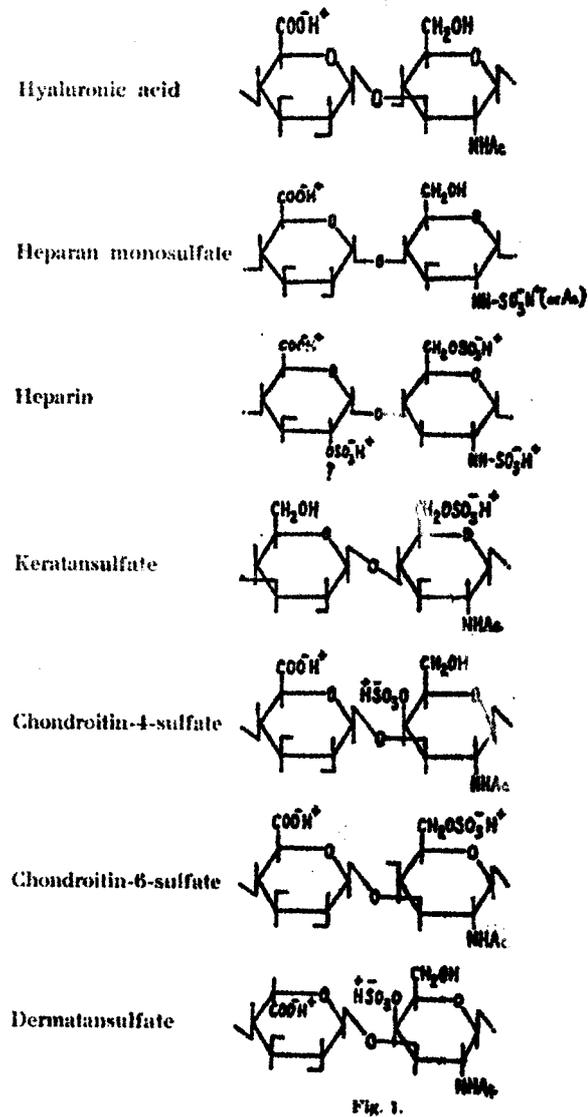


FIGURE 3

- Structure des mucopolysaccharides acides



T a b l e a u IV

COMPOSITION DES GLYCOSAMINOGLYCANES

Ancienne Dénomination	Nouvelle Dénomination	C o m p o s i t i o n
Acide hyaluronique	Acide hyaluronique	Glucosamine, Acide glucuronique, Acétate.
Héparitine monosulfate	Héparine monosulfate	Glucosamine, Acide glucuronique, Acétate, Sulfate
Héparine	Héparine	Glucosamine, Acide glucuronique, Sulfate.
Kérato sulfate	Kératane sulfate	Glu osamine Galactose, Acétate, Sulfate.
Chondroïtine Sulfate A	Chondroïtine 4-Sulfate	Gala tosamine, Acide glucuronique, Acétate, Sulfate)
Chondroïtine Sulfate C	Chondroïtine 6-Sulfate	Gala tosamine, Acide glucuronique, Acétate, Sulfate)
Chondroïtine Sulfate B ou β Héparine	Dermatane Sulfate	Galactosamine, Acide iduronique, Acétate, Sulfate)

50
1950

Les travaux plus récents ont porté plus particulièrement, sur la manière d'identifier ces composés :

- d'après leur mobilité: électrophorétique sur papier : HEREMANS et VAERMANS (103) - (Figure 4, p.16), ADAMS (104), sur gel : MATHEWS (105), sur acétate de cellulose : SZABO et ROBOZ-EINSTEIN (106), NANTO (107) et en utilisant des révélations appropriées : bleu alcian et bleu de toluidine.

- par chromatographie sur échangeurs d'anions introduite par MEYER et al (108), sur Dowex 1 x 4, Ecteola Cellulose, et D.E.A.E -Sephadex, en éluant avec des solutions de molarité ou de force ionique croissante : (chlorure de sodium seul ou additionné d'acide chlorhydrique) : ANSETH et LAURENT (109), SCHMIDT (110), KELLEY, PONCET et DI FERRANTE (111), WESSLER (112), TELLER et ZIEMAN (113), ANTONOPOULOS et al (114)

- enfin, par des méthodes enzymatiques. Elles sont nombreuses, et utilisent pour la plupart la propriété de la hyaluronidase testiculaire spécifiquement active sur l'acide chondroïtine sulfurique A ou C ainsi que sur l'acide hyaluronique, tandis que la hyaluronidase bactérienne agit seulement sur l'acide chondroïtine sulfurique B et l'héparine : LINKER et TERRY (115) LINKER et al (116), et l'action des chondroïtinases spécifiques des acides chondroïtine sulfuriques et de l'acide hyaluronique : MAYES et HANSEN (117), BOWNESS (118).

Toutefois, les mucopolysaccharides ne se présentent pas toujours sous la forme libre, mais le plus souvent, sous la forme d'un complexe protéine-polysaccharide, VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (119), qu'il faut alors dissocier par un traitement à l'alcali dans des conditions douces : ANDERSON, HOFFMAN et MEYER (120).

Il apparaît donc, après ce bref historique, que les problèmes posés par l'étude de l'adialysable urinaire sont loin d'être résolus, et que la diversité des techniques employées par les auteurs dispersent les résultats au lieu de les regrouper. Il est pourtant utile de faire le point sur les composés ou groupes de composés isolés dans l'urine. Nous nous sommes bornée dans le chapitre suivant, à énumérer ces composants de l'adialysable urinaire, en citant leurs propriétés lorsqu'elles sont connues.

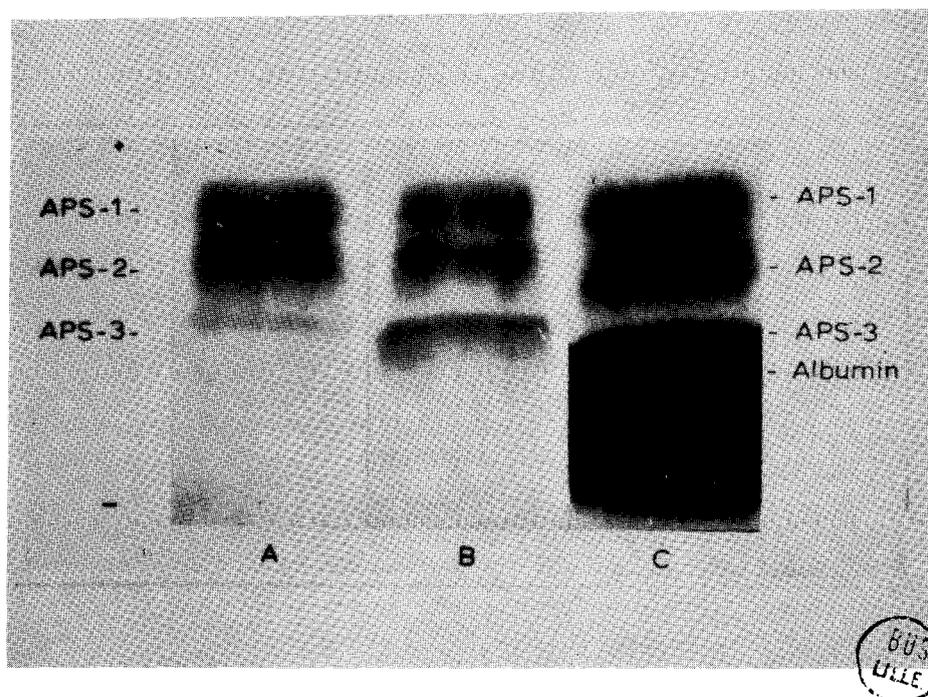


Figure 4

Electrophorèse des mucopolysaccharides acides de l'adialysable urinaire, sur papier dans un tampon véronal, pH 8,6 $\mu = 0,1$.

- Coloration au bleu alcian (a)
 Coloration au bleu alcian après extraction au phénol de l'albumine qui cachait APS 3 (b)
 Coloration au bleu alcian et à la fuschine pour révéler les protéines (c)

CONSTITUANTS DE L'ADIALYSABLE URINAIRE

I - ASPECTS TECHNIQUES DE L'ANALYSE DES PROTEINES URINAIRES

Outre la mise en évidence des oses composant les colloïdes urinaires (Fig. I6 et I7), il fallait également connaître le mieux possible les composants glycoprotéidiques de l'urine humaine. Pour le faire, il fallait ramener la quantité de protéines urinaires à une concentration voisine de celle du plasma.

A - METHODES DE CONCENTRATION

Différentes méthodes ont été proposées :

1) L'ultrafiltration utilisée par RIGAS et HELLER (I21), HEREMANS (I22), GRANT (I23), BERGARD (I24).

2) La lyophilisation ou la concentration par ventilation d'air froid sur une urine dialysée contre l'eau courante (2 jours) et contre l'eau distillée (2 jours).

C'est la lyophilisation qui s'est révélée la méthode la moins dénaturante et la plus rapide. C'est donc celle que nous utiliserons.

B - METHODES D'ENRICHISSEMENT

Nous citerons pour exemple, les méthodes de dialyse, d'ultrafiltration (déjà citée), de précipitation alcoolique : COHN et al (I25) et de précipitation au sulfate d'ammonium.

La dialyse est très couramment employée. Elle fournit, à partir de l'urine totale, deux fractions distinctes : la fraction dialysable qui contient des constituants de faible poids moléculaire, et la fraction adialysable de nature glycoprotéinique.

C - METHODES D'ANALYSE

La lyophilisation des échantillons d'urine dialysée qui présente le moins de dommage pour les protéines.

Il n'existe aucune méthode permettant la différenciation de toutes les protéines urinaires en une seule étape.

Ce sont les méthodes immunologiques qui sont le plus souvent choisies, sous forme d'immunoélectrophorèse ou de détermination immunologique d'un seul composant.

Le mode le plus général d'observation d'un spectre de protéines urinaires est obtenu au moyen d'électrophorèse sur gel d'amidon, soit seule : REVILLARD (126), SCHEURLEN (127), ou combinée avec l'électrophorèse sur papier. (Fig. 5 et 6, p.19 et 20).

Des méthodes spéciales d'identification et de détermination quantitative de constituant unique, tels que l'uromucoïde, les protéines de BENCE JONES, l'hémoglobine, etc..., seront signalées par la suite.

Parmi les méthodes préparatives, les plus employées furent la précipitation à l'acide benzoïque : ANDERSON, LOKEY et Mc LAGAN (128), ANDERSON et Mc LAGAN (129), KEUTEL et al (130), la précipitation fractionnée à l'éthanol : BOURILLON et al (131, 132, 133), BOURILLON et KAPLAN (134), la chromatographie sur colonne de cellulose échangeuse d'ions : ANDERSON et al (135), DE VAUX St CYR, CLEVE et GRABAR (136), JACKSON, FARMER, SLATER et DE WOLFE (137), l'électrophorèse préparative : BERGGARD (138, 139, 140), WEBB, ROSE et SEHON (141), et la gel filtration sur colonne de dextran : STEVENSON (142).

II - LES PROTEINES DE L'URINE NORMALE

Il est maintenant admis que les sujets normaux excrètent 40 à 80 mg de protéines par jour : Mc GARRY, SEHON, et ROSE (143), HEREMANS (144), RIGAS et HELLER (145), TIDSTRÖM (146, 147).

Comme on le voit sur les figures 1, p.9 et 6, p.20, la différence principale existant entre les protéines de l'urine normale et celles du sérum, est la diminution relative du pourcentage de protéines migrant à la vitesse de l'albumine et également le constituant migrant plus vite que l'albumine.

Par électrophorèse libre sur gelose (fig. 1, p. 9), on observe nettement la mobilité plus grande de l'albumine urinaire, ainsi que la zone sans γ_1 globulines.

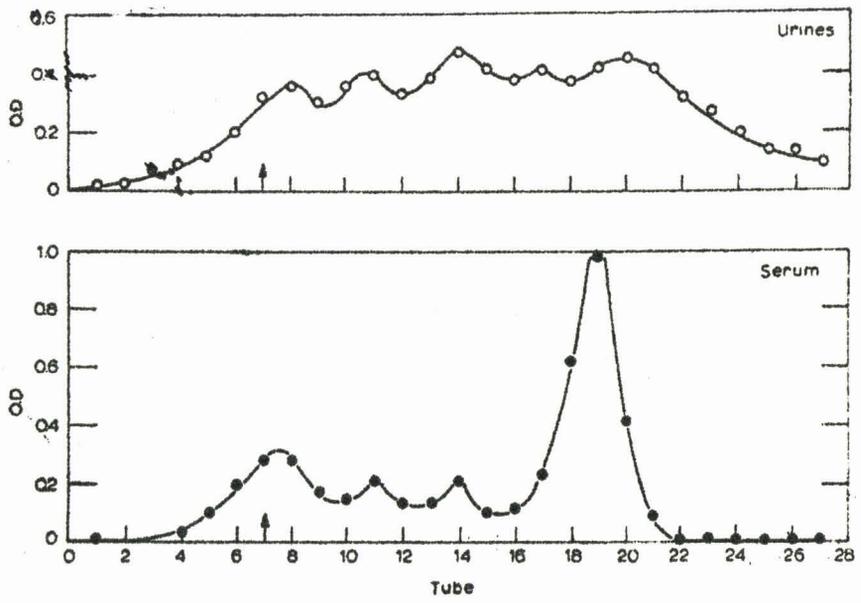


FIGURE 5

- Electrophorèses de zone du plasma et d'urine normale, en tampon véronal pH 8,6, $\mu = 0,1$. d'après BOYCE et al (148).

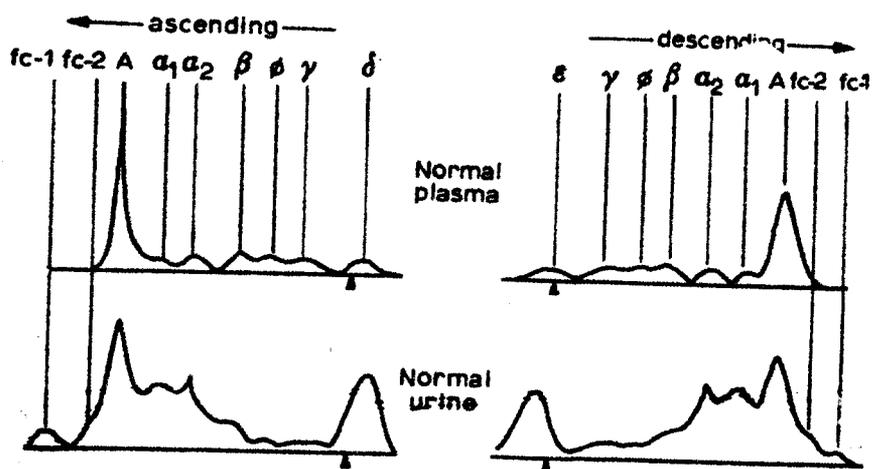


FIGURE 6

- Electrophorèses sur amidon de sérum et d'urine normale, en tampon véronal pH 8,6, $\mu = 0,05$, d'après FRANKLIN (149).



Mais l'électrophorèse libre et de zone à pH 4,5 ou 4,7, résoud mal la visualisation des protéines urinaires. Nous distinguerons trois groupes parmi les colloïdes urinaires :

- Les protéines sériques de masse moléculaire supérieure à 30 000.
- Les protéines de faible masse moléculaire.
- Les glycoprotéides urinaires.

A - LES PROTEINES SERIQUES

L'étude immunoélectrophorétique décrite en 1953 par GRABAR et WILLIAMS (150) s'est révélée une méthode de choix pour étudier les protéines urinaires et déterminer leur origine.

C'est ainsi que GRANT (151), BERGGARD (152, 153, 154) , BERGGARD et BEARN (155), DE VAUX St CYR et al (156), PATTE et al (157), HEREMANS et HERMANN (158), ont montré que les principales protéines sériques identifiées dans l'urine normale étaient :

- 1) la préalbumine de SCHULTZE (159), riche en tryptophane : PATTE et al (160), BERGGARD (161)
- 2) l'albumine : GRANT (162).
- 3) l' α_1 séromucoïde : PATTE et al (163).
- 4) l' α_1 lipoprotéide : BERGGARD (164).
- 5) l' α_1 globuline (ou α_1 antitripsine) : PATTE et al (165)
- 6) la céruloplasmine : BERGGARD (166), ROWE et al (167)
- 7) l'haptoglobine : BERGGARD (168), PATTE et al (169)
- 8) l' α_2 macroglobuline : BERGGARD (170), REVILLARD (171).
- 9) la Ba α_2 glycoprotéine : BERGGARD (172)
- 10) la Zn α_2 glycoprotéine : BERGGARD (173)
- 11) un composant de groupe spécifique : BERGGARD (174)
- 12) la transferrine : PATTE et al (175)
- 13) la β_1A globuline : BERGGARD (176)
- 14) l'hémopexine : BERGGARD (177)
- 15) la β_1E globuline : BERGGARD (178)
- 16) la β_2A globuline : PATTE et al (179)
- 17) le fribrinogène : BERGGARD (180) non présent dans toutes les urines.
- 18) les χ globulines : GRANT (181)

La distribution électrophorétique de ces protéines est donnée dans le tableau V, p.23 , et le tableau VI, p. 24

De plus, BERGGARD en 1960 (182) a montré que les fractions de protéines urinaires séparées par électrophorèse préparative, contenaient des quantités plus importantes de glucides que les fractions correspondantes du sérum sanguin.

Il apparaît donc qu'actuellement, nous connaissons une vingtaine de protéines sériques présentes dans les urines.

B - LES PROTEINES URINAIRES DE FAIBLE MASSE MOLECULAIRE

Une importante portion de l'adialysable urinaire, peut être la moitié, consiste en molécules de masse inférieures à 30 000.

1° - Les Glycosaminoglycanes

Bien que n'étant pas de nature protéinique, les polysaccharides acides ou glycosaminoglycanes entrent dans cette catégorie de composants urinaires. (Fig. 3, p.13 et Tableau IV, p.14)

Le taux n'excédant pas 5 à 20 mg/24 h dans les urines, de nombreux procédés d'isolement ont été proposés : KAC, HIZER, Mc GAVACK et DAWSON (183), (Fig. 7, p.25), BERENSON et DALFERES (184), (Fig. 8, p.26), VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (185), (Fig. 9, p.27), mais peu d'études analytiques ont été faites pour les caractériser.

La répartition dans les urines est donnée dans le tableau VII p28 d'après VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (186).

a) L'acide chondroïtine sulfurique

Dès 1916, SAHLSTEDT (187) isole de l'urine de cheval un composé présentant 30 % d'oses et fut le premier à révéler l'existence de l'acide chondroïtine sulfurique.

En 1938, KOBAYASI (188) précipitait de l'urine un mélange de polysaccharides contenant des acides hexuroniques, du sulfate, du galactose et de la glucosamine.

T a b l e a u V

DISTRIBUTION ELECTROPHORETICQUE DES PROTEINES SÉRIFIQUES DANS L'URINE NORMALE

Méthode	Albumine			Globulines			Rapport	Références
	α_1	α_2	β	α_1	α_2	β	$\frac{\text{Albumine}}{\text{Globulines}}$	
Précipitation à l'éthanol à froid (a)	39,1	40,2	12,2	8,1			0,65	Mc GARRY, SEHON et BOYD (I89)
Ultrafiltration (a)	38,6	27,3	20,8	9,0	4,5		0,63	BOYCE, GARVEY et NORFLEET (I90)
Ultrafiltration (a)	38,0		62,0				0,51	RIGAS et HELLER (I91)

a) calcul en pour cent.

BUS
SRL

T a b l e a u VI

CONCENTRATIONS RELATIVES EN PROTEINES DU SERUM NORMAL
ET DE L'ADIALYSABLE URINAIRE

N a t u r e	Rapport	$\frac{\text{Albumine}}{\text{Globulines}}$	Surface de chaque fraction déterminée par planimétrie et exprimée en % de la concentration totale						
			fc_2	fc_1	Albumine	α_1	α_2	β	γ
Sérum normal *	1,33	-	-	-	56,8	7,2	8,7	12,8	14,4
Adialysable urinaire normal **	0,64	2,2	-	-	37,9	27,3	19,5	8,8	3,3

* REINER, FENICHEL et STERN (192)

** MEHL et GOLDEN (193)

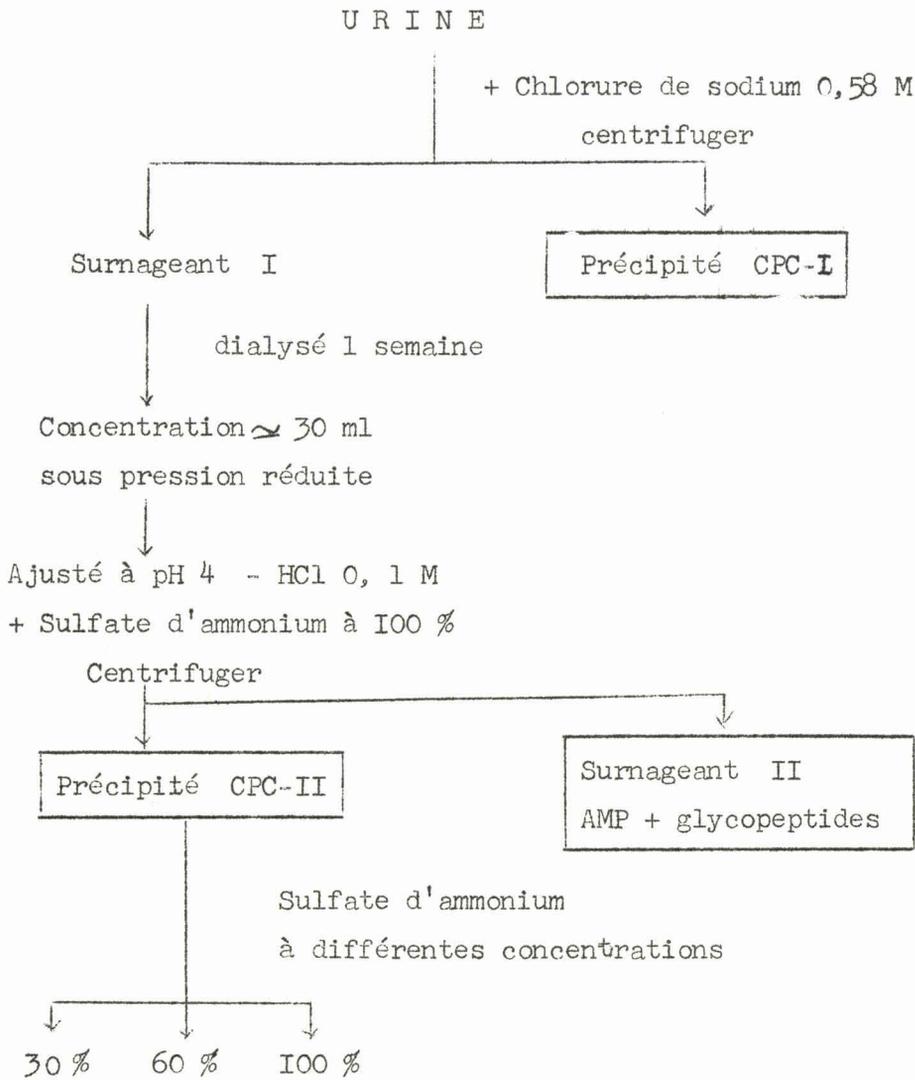


FIGURE 7

- Fractionnement de l'adialysable urinaire d'après KAO et al (194)

- 1) CPC-I = mucoprotéine de TAMM et HORSFALL et complexe carbohydate
- 2) CPC-II= complexe glucidique + mélange de protéines riches en sucre
- 3) AMP = glycosaminoglycanes

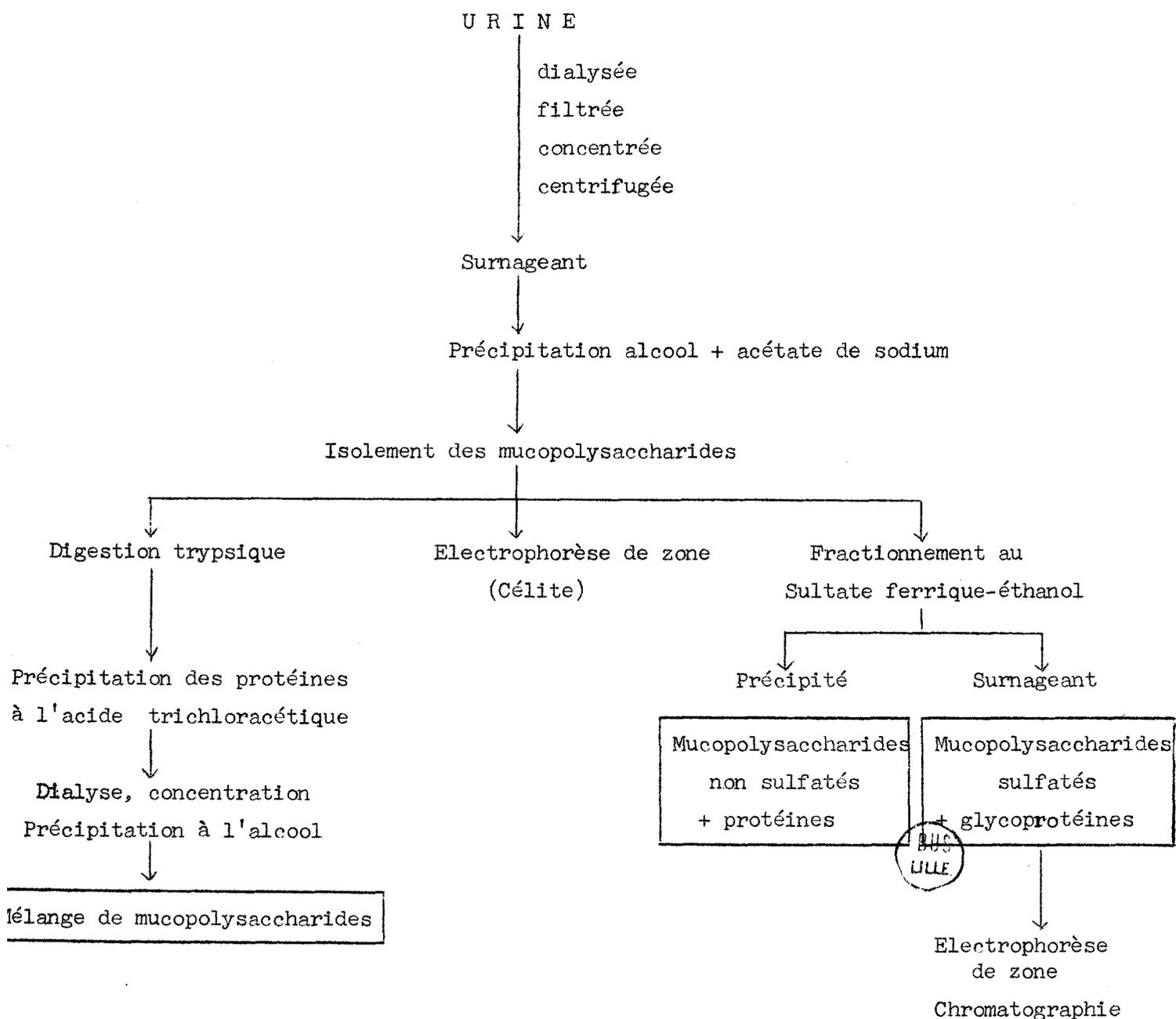


FIGURE 8

- Méthode d'isolement des glycosaminoglycanes dans les urines
d'après BERENSON et DALFERES (195)

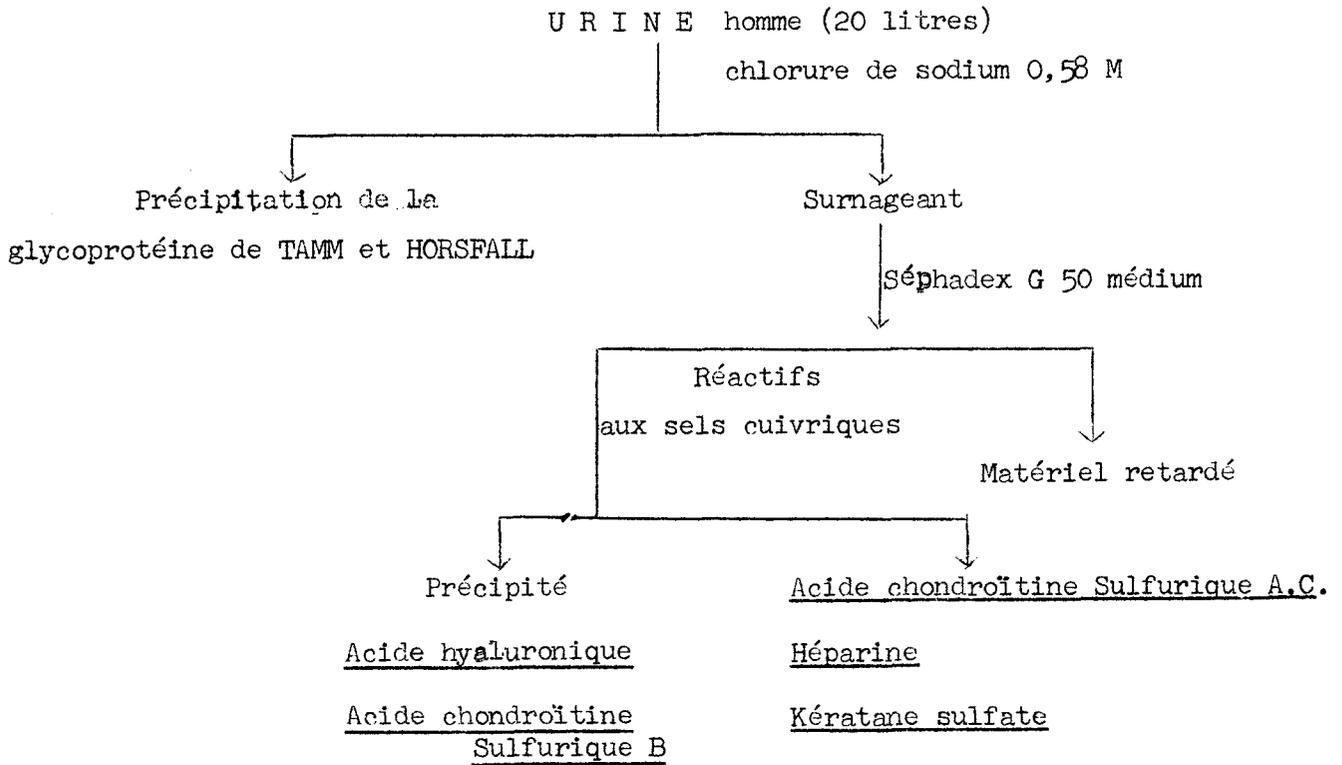


FIGURE 9

- Isolement des mucopolysaccharides acides de l'urine normale
d'après VARADI, CIFONELLI et DOREMAN (196)

T a b l e a u VII

REPARTITION DES MUPOPOLYSACCHARIDES DANS L'URINE NORMALE

Glycosaminoglycane	Pourcentage du total des glycosaminoglycane
Acide chondroïtine sulfurique C	34
Acide chondroïtine sulfurique A	31
Acide chondroïtine ж	25
Acide chondroïtine sulfurique B ж ж	8
Acide hyaluronique ж ж ж	1
Kérotane sulfate ж ж ж ж ж	1

ж L'acide chondroïtine réfère de l'acide chondroïtine sulfurique non complètement sulfaté.

ж ж L'acide chondroïtine sulfurique B urinaire a une mobilité électrophorétique plus faible que l'acide chondroïtine sulfurique B de la peau. Il est légèrement sous sulfaté.

ж ж ж Mobilité plus faible. Cela laisse penser que la taille de la molécule est plus grande.

ж ж ж ж Il est très fortement sulfaté.

ASTRUP (197), en 1947, précipite l'acide chondroïtine sulfurique dans les urines, par addition de benzidine chlorhydrique. De même, KERBY (198) utilisant la même technique, calcule le taux d'acide uronique du précipité.

HEREMANS et al (199) séparent par électrophorèse sur papier, à pH 8,6, en tampon véronal-acétate, un mélange de polysaccharides de l'urine et identifient trois composés dont l'un est probablement l'acide chondroïtine sulfurique.

DI FERRANTE et RICH, en 1956, (200), en utilisant le chlorure de cetyltriméthyl ammonium précipitaient un composé dont la chromatographie sur papier indiquait une migration identique à celle de l'acide chondroïtinesulfurique. Des travaux postérieurs, DI FERRANTE (201), DI FERRANTE et RICH (202), DI FERRANTE et POPENOE (203), MAXFIELD (204), montrèrent qu'il s'agissait d'un mélange d'acide hyaluronique, d'acide chondroïtine sulfurique et de la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL (205) sur laquelle nous reviendrons plus tard.

Le problème qui restait alors était la séparation des isomères : acide chondroïtine sulfurique A et C qui ne diffèrent que par la position de leur groupement sulfate, et qui représentent la fraction majeure des mucopolysaccharides acides de l'urine normale. C'est ce qu'ont réalisé de nombreux auteurs tels que ADAMS (206), MATHEWS (207), par électrophorèse sur papier ou sur agar.

De même, la séparation des acides chondroïtine sulfuriques A et C de l'acide chondroïtine sulfurique B, a été résolue par HARUKI et KIRK (208) par électrophorèse sur papier dans un tampon au sulfate de zinc, ainsi que par BOWNESS (209), par une méthode enzymatique employant la hyaluronidase testiculaire, active vis à vis des isomères A et C et laissant intact l'acide chondroïtine sulfurique B. MAYES et HANSEN (210) faisaient réagir les chondroitinases spécifiquement activés sur les trois acides chondroïtine sulfuriques.

Il faut citer de nombreux travaux mettant en évidence l'accroissement du taux de ces composés, par exemple, dans le cas du cancer, de leucémie : LOEWI (211), RICH et MYERS (212), la maladie de HURLER : MEYER et al (213), dans le syndrome de MARFAN : BERENSON et SERRA (214).

b) L'héparine

Sous certaines conditions, l'héparine peut apparaître dans l'urine. Bien que des substances anticoagulantes aient été décrites dans l'urine de lapin et l'urine humaine [ASTRUP (215), ROSENFELD, NEUHOF et MESTEL (216)], ce n'est

probablement pas l'héparine, en dépit des réactions métachromatiques avec le bleu de toluidine, mais certainement des esters sulfuriques de molécules de faible masse en oses : JAKES, NAPKE, et LEVY (217).

Elle a été dosée indirectement par l'activité anticoagulante de l'urine : REINERT et WINTERSTEIN (218), ou par métachromasie de l'urine avec le bleu de toluidine : COPLEY (219).

De meilleurs résultats furent obtenus par ces méthodes après précipitation préalable à la benzidine chlorhydrique.

L'héparine sulfate résiste à la hyaluronidase testiculaire (comme l'acide chondroïtine sulfurique B) : LINKER, TERRY et TELLER (220), KING, FIELDEN et BOYCE (221), et l'on note également une augmentation de son taux dans le cas du syndrome de HURLER par exemple : BROWN (222), KNECHT et DORFMAN (223).

c) L'acide hyaluronique

C'est avec l'acide chondroïtine sulfurique, un des premier mucopolysaccharides mis en évidence dans l'urine normale, après détermination des rapports molaires d'azote, de sulfate, d'acide uronique, de glucosamine, de galactosamine ainsi que par la digestion avec la hyaluronidase bactérienne DI FERRANTE (224).

La séparation électrophorétique de ce composé est d'autant plus facile qu'il ne contient pas de groupement sulfurique. C'est donc lui qui migre le moins vite sur les électrophorogrammes.

Il faut remarquer cependant que la mobilité varie avec la provenance de échantillons, et l'acide hyaluronique urinaire est le plus lent, ce qui laisse supposer une taille de molécule plus grande.

Ces résultats sont confirmés par chromatographie sur échangeurs d'anions comme l'Ecteola cellulose, la Dowex 1 x 2, la D.E.A.E -Séphadex. Il est le moins retenu et est élué avec le premier tampon d'éluion : chlorure de sodium 0,5 M. SHILLER (225), TANAKA et GORE (226), ou formiate d'ammonium 1 M, ANTONOPOULOS et al (227).

d) Le kératane sulfate

Ce fut un des derniers glycosaminoglycane à être caractérisé dans l'urine normale : VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (228), KELLEY, PONCET et DI FERRANTE (229).

Toutefois, il avait déjà été noté dans les urines de malades atteints de la maladie de MORQUIO-ULRICH : ZELLWEGGER et al (230), PEDRINI, LENZI et ZAMBOTTI (231)

En conclusion, nous constatons que tous les glycosaminoglycanes sont présents dans les urines normales.

2° - Les glycopeptides urinaires

Il existe un grand nombre de substances de masse moléculaire inférieure à 15 000, renfermant une grande quantité d'oses. De tels composés ont été appelés glycopeptides par BLIX (232), BOURILLON et al [(233, 234)], HAKOMORI et al (235), glycoprotéines, (souvent injustement à cause de leur petite taille) par ANDERSON et al (236), BERGGARD (237), BOYCE et al (238), GABRIEL et al (239), HAMERMAN et al (240), ou mucosaccharides par MIETTINEN [(241, 242)].

Des glycopeptides d'une masse moléculaire de 10 à 15 000 et d'une constante de sédimentation voisine de 0,8 - 1 ont été préparés par BOURILLON et coll [(243, 244, 245)], par précipitation fractionnée à différentes concentrations d'éthanol, variant de 50 à 90 %. (Tableau VIII, p.32). Le matériel soluble dans l'éthanol 50 % (S₅₀) contenait 50 à 80 % d'oses parmi lesquels 20 à 26 % était de l'acide sialique. Cela semble correspondre au mucosaccharide isolé par MIETTINEN [(246, 247)] au moyen de la gel filtration.

Des glycoprotéides de faible masse moléculaire et riches en oses ont été aussi isolés par BOYCE, KING, LITTLE et ARTOM (248) (Fraction UFO ; Fig. 10, p.33 et tableau IX, p. 35) et par BERGGARD (Fraction B + C) : BERGGARD (249), LUNBLAD et BERGGARD (250) (Fig. 11, p.34 et Tableau IX, p.35) qui emploient l'ultrafiltration à travers des membranes de porosité différente, et par KAO et al (251) (Fig. 7, p.25 et Tableau IX, p.35) dont la fraction AMP + glycopeptides contient 80 % d'oses.

Il apparaît que la fraction A de BERGGARD a surtout servi à l'étude des protéines sériques par les méthodes d'immunoélectrophorèse, tandis que les fractions B et C, moins étudiées par BERGGARD, ont été retrouvées d'une manière différente par BOYCE et al (UFO). La fraction RS 1 correspond à la fraction A de BERGGARD et aux fractions CPC II et AMP + glycopeptides de KAO et al. Il semble cependant que BOYCE et al obtiennent une meilleure séparation des constituants.

T a b l e a u VIII

REPARTITION DES DIFFERENTS CONSTITUANTS GLUCIDIQUES DANS LES FRACTIONS OBTENUES
PAR PRECIPITATION ALCOOLIQUE FRACTIONNEE DE L'ADIALYSABLE URINAIRE

d'après BOURRILLON et al (252)

Fractions	Hexoses	Hexosamines	6-Desoxy hexose	Acide Sialique
Urine totale	14,5 (a)	11,4	2,9	9,7
F50	8,7	6	1,25	3,4
F60	21,3	18	4,08	14
F90	28,2	24	4,7	14,9

(a) Résultats exprimés en mg/100 g de produit sec.

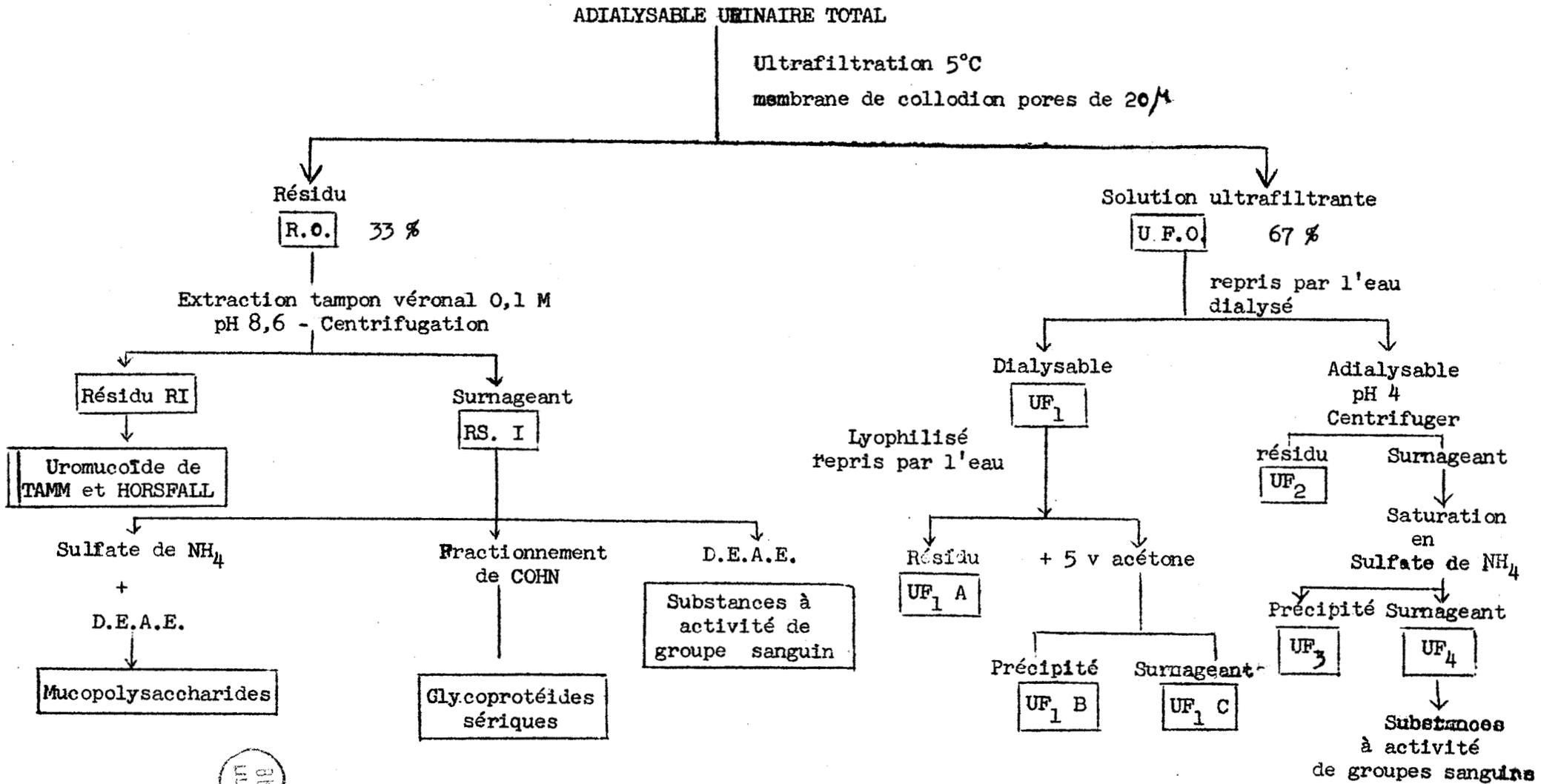


FIGURE 10

- Fractionnement de l'adialysable urinaire total proposé par KING, LITTLE, BOYCE et ARTOM (253)



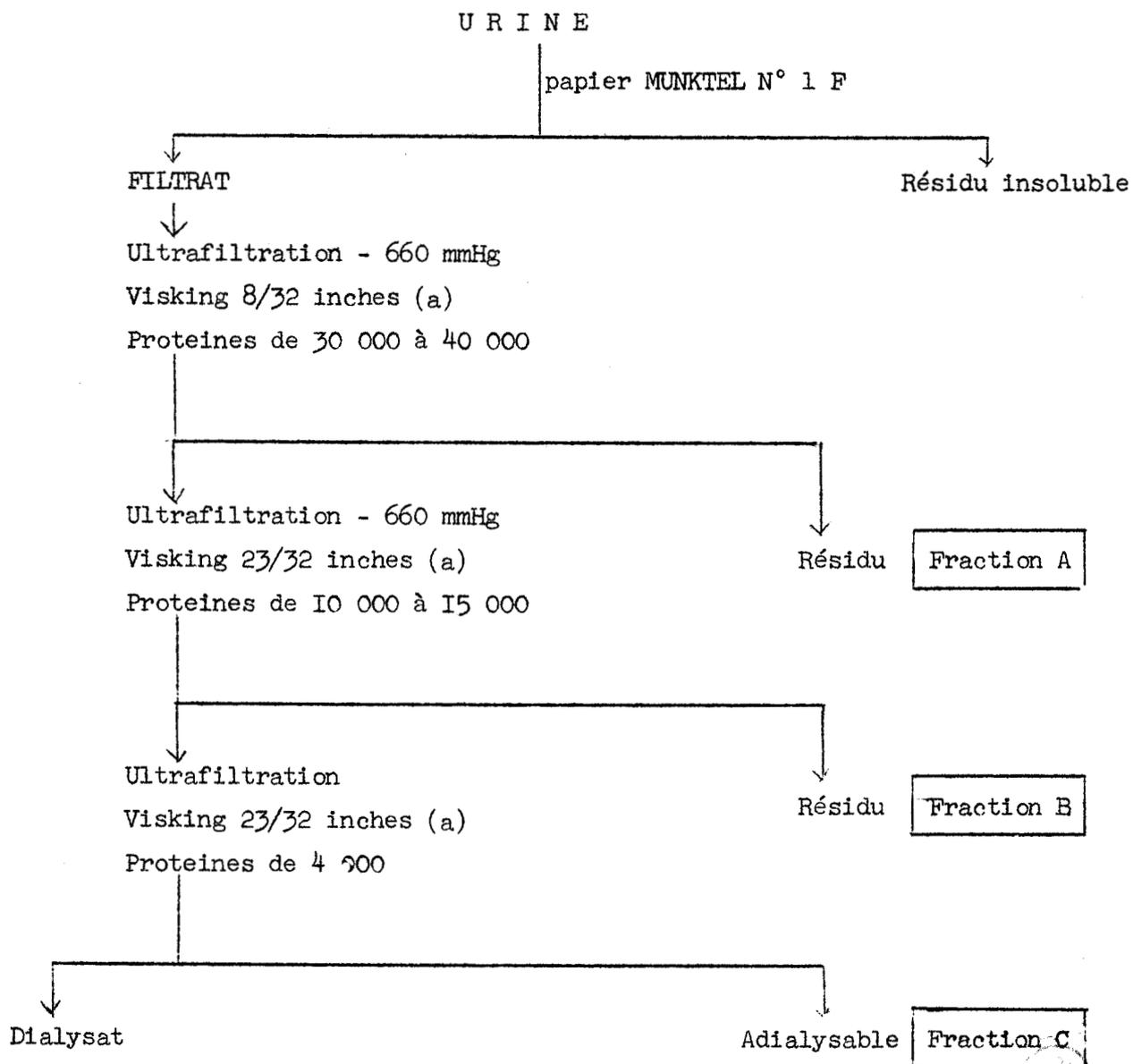


FIGURE 11

- Fractionnement de l'urine proposé par BERGGARD (254)

(a) Visking : boudins de cellophane de diamètre variable.

T a b l e a u IX

COMPOSITION DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES PAR BOYCE et al (255)
Résultats exprimés en p.100 de poids sec.

Fractions	Acides Uroniques	Hexosamines	Hexoses	Acide Sialique	Protéine	Lipides	Cendres	Eau
U F O	1,33	9,68	18,40	10,55	29,00	0,72	20,58	7,79
R S ₁	0,51	6,08	10,30	6,09	56,70	12,55	5,88	8,54
R ₁	-	5,19	10,78	3,52	61,69	8,37	4,84	6,27

COMPOSITION, en mg/litre d'urine, DES FRACTIONS OBTENUES PAR BERGGARD (256)

Fractions	Azote	Protéines	Oses totaux	Hexosamines	Hexoses	Fucose	Acide Sialique	Acides Uroniques
A	9,52	54,25	23,5	6,66	7,44	1,48	6,38	1,56
B	5,02	22,88	31,68	7,46	10,08	2,98	7,40	2,04
C	7,86	40,63	54,43	10,23	23,16	3,13	15,90	5,33

COMPOSITION (en p.100 de poids sec) DE LA FRACTION AMP + GLYCOPÉPTIDES
obtenue par KAO et al (257)

Fractions	Acides Uroniques	Hexosamines	Hexoses	Acide Sialique	Fucose	Protéines
A M P + Glyco-peptides	7,23	22,14	37,21	9,31	3,79	22,94
	+ 0,46	+ 2,22	+ 2,30	+ 0,62	+ 0,42	+ 1,07

Plus récemment, JEVONS et Mc GALE [(258 , 259)], isolaient de l'urine deux glycopeptides par chromatographie sur échangeurs d'ions, dialyse et précipitation alcoolique, dans lesquels ils notaient une forte interférence des pigments urinaires dans les dosages.

Enfin, LUNBLAD [(260 , 261 , 262)] mettait en évidence des glycopeptides riches en fucose dans le matériel ultrafiltrable et non dialysable (fraction C) de BERGGARD soumis à l'électrophorèse de zone et la gel filtration. Des fractions similaires avaient été isolées par KING, FIELDEN, GOODMAN et BOYCE (263) dont les activités de groupe sanguin A et B furent démontrées par KING et al (264) et par BERGGARD (265) après électrophorèse, à pH 8,6 et dont la position électrophorétique était similaire à la fraction A non ultrafiltrable.

Contrairement aux protéines de grande masse moléculaire, (supérieure à 30 000), les fractions de faible masse moléculaire ne donnent aucune réaction avec le sérum anti-sérum humain : BERGGARD [(266 , 267)], excepté pour une δ globuline de faible masse moléculaire.

Il apparaît, à travers ces fractionnements que 67 p 100 de la fraction adialysable de l'urine est de nature glycopeptidique.

Les glycopeptides de cette catégorie sont souvent considérés comme des produits de dégradation de molécules de glycoprotéines plus grandes, existant quelque part dans le corps, en particulier dans les substances appartenant au tissu conjonctif.

Nous montrerons également dans l'exposé de nos travaux personnels, l'importance croissante des composés glycopeptidiques dans les urines humaines, ce qui laisse penser que la quantité de glycoprotéines est en fait beaucoup plus faible que celle escomptée, et ceci explique en partie la difficulté que nous avons à séparer ces composés.

3° - Composés intermédiaires entre les glycopeptides et les glycoprotéines.

Un troisième groupe de colloïdes urinaires de faible masse moléculaire est composé de protéines dont les propriétés sont intermédiaires entre celles des glycopeptides cités ci-dessus, et celles des principales protéines sériques, et dont la constante de sédimentation est voisine de 2-2,5 s. Leur masse moléculaire varie de 10 000 à 30 000 et leur taux de glucides est supérieur à celui des protéines sériques.

Seuls, deux de ces composés ont été isolés avec une pureté satisfaisante :

- La glycoprotéine riche en acide sialique, ayant la mobilité de l'albumine, isolée en 1963 par BERGGARD (268), et certainement rencontrée par d'autres auteurs : BOURRILLON, CORNILLOT et GOT (269), EYLAR (270). Elle représente 1 mg/litre d'urine.

- Le deuxième composé, découvert aussi par BERGGARD (271) est appelé β microglobuline de masse moléculaire voisine de 9 500.

Pour donner une idée de la complexité des protéines urinaires et l'importance occupée par les composants 2 - 2,5 s, il est intéressant de consulter le tableau VIII p.32

La fraction précipitable à l'alcool à 50 p 100 est précipitée au sulfate d'ammonium 2 M et 3 M (F_I et F_{II}). La partie soluble dans le sulfate d'ammonium 3 M est appelée F_{III} . Toutes ces fractions sont passées sur D.E.A.E. cellulose et éluées par des concentrations croissantes de chlorure de sodium dans un tampon phosphate, soumises à l'électrophorèse sur papier et à l'immuno-électrophorèse. (Fig. I2, p.38).

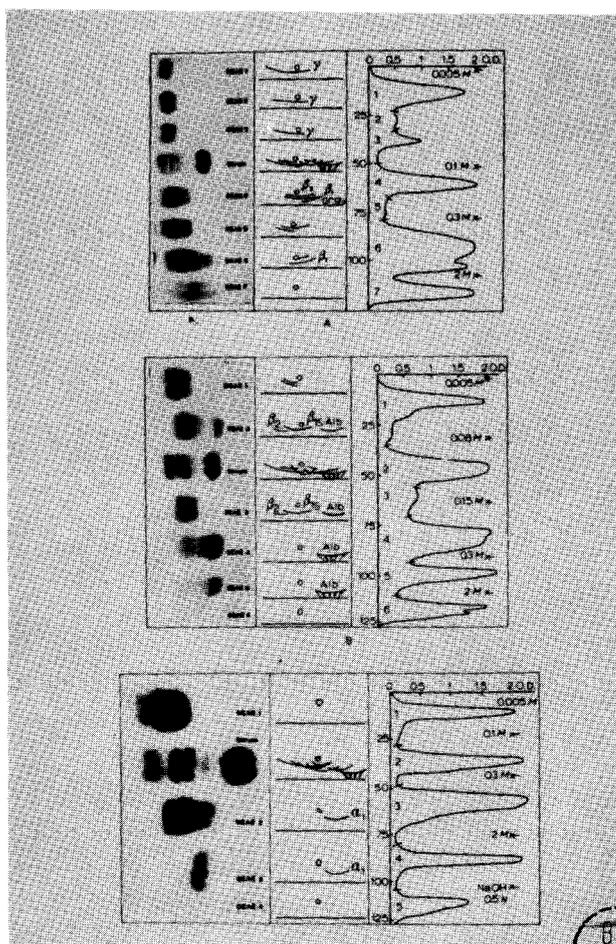
Il ressort de cet exemple une très grande complexité et un nombre très grand de composés dont certains ont été identifiés à des protéines sériques : LATERRE, HEREMANS et CARBONARA(272), à des gonadotropines : BOURRILLON, GOT et MARCY (273), DCNINI, PUZZUOLI et D'ALESSIO (274), ROOS et GEMZELL (275), à la corticotropine : BONAR et PERKINS (276); à l'érythropoïétine : GORDON (277), LANGE et al (278), WINKERT et GORDON (279); au composant lié à la vitamine B₁₂ et aux substances de groupe sanguin : ANDERSON, LEPPER et WINZLER (280), FREUDENBERG et EICHEL (281), KING, FIELDEN, GOODMAN et BOYCE (282), JORPES et NORLIN (283).

C - LES GLYCOPROTEINES URINAIRES

1) L'uromucoïde ou glycoprotéine de TAMM et HORSFALL

Elle fut isolée de l'urine humaine par TAMM et HORSFALL (284 , 285) et étudiée dans un but de recherche d'inhibiteur de l'hémagglutination des virus.

L'homme en excrète environ 25 mg par litre d'urine. Celle-ci devient nuageuse en restant au froid. Ce dépôt contient en outre beaucoup de phosphates mais aussi la plus grande partie de la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL.



BUS
LILLE

Figure 12

Fractionnement de la fraction précipitable à l'éthanol 50 p.100 d'après BOURRILLON et al. (286).

F_I précipitable au sulfate d'ammonium 2 M

F_{II} précipitable au sulfate d'ammonium 3 M

F_{III} soluble dans le sulfate d'ammonium 3 M

Passage sur DEAE-cellulose, électrophorèse sur papier à pH 8,6 et immunoelectrophorèse.

a) Préparation

La glycoprotéine de TAMM et HORSFALL a été isolée de l'urine humaine par précipitation éthanolique, précipitation isoélectrique par addition d'acide, de bromure de cétyle-triméthyle ammonium, d'acide benzoïque : ANDERSON (287), ANDERSON, Mc LAGAN [(288 , 289)] de chlorure de sodium : TAMM et HORSFALL (290) ADA et GOTTSCHALK (291), par ultracentrifugation du dépôt nuageux qui se forme dans les urines à froid.

La méthode de préparation, la plus satisfaisante est d'amener la concentration en chlorure de sodium à 0,58 M. Au froid et en agitant de temps en temps, il se forme un précipité que l'on élimine par centrifugation. Le résidu est repris par l'eau (1/100 du volume initial) et dialysé contre l'eau distillée plusieurs jours. Une deuxième précipitation avec le chlorure de sodium 0,58 M est nécessaire pour obtenir une purification suffisante.

b) Nature physicochimique et formes moléculaires

La glycoprotéine de TAMM et HORSFALL se trouve dans deux formes prédominantes, l'une étant un tétramère de l'autre. En conservant la solution au froid plusieurs mois, les formes plus grandes se dissocient en plus petites.

La composition chimique a été étudiée par GOTTSCHALK [(292 , 293 , 294 , 295)] et par ODIN [(296 , 297)] et la structure physique par CURTAIN (298), GOTTSCHALK (299) et MAXFIELD [(300 , 301 , 302 , 303)].

Ces résultats sont rassemblés dans les tableaux X et XI p.40 et 41. L'observation au microscope électronique d'après PORTER et TAMM (304) révèle plutôt un filet de fibres plutôt que des masses sphériques (Fig.2 p.11).

En fait, plus les fragments de la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL deviennent courts, plus ils deviennent droits et raides, et on peut représenter les quarts de molécules comme une tige rigide. Les solutions de glycoprotéine de TAMM et HORSFALL sont incolores. La coloration possible provient d'un reste de pigment urinaire non disparu après dialyse.

Sa mobilité électrophorétique a été étudiée en premier par PERLMANN et al (305) et par PYE (306), elle migre comme un composé unique. Le point isoélectrique n'a pas été déterminé par électrophorèse mais sa variation de solubilité en fonction du pH le situe aux alentours de pH 3,2; CURTAIN (307).

Tableau X

COMPOSITION EN GLUCIDES DE LA GLYCOPROTEINE DE TAMM ET HORSFALL

	PROPORTIONS MOLECULAIRES						Osamines	Acides Uroniques	Acide Sialique	Références
	Gal.	Glc.	Man.	Xyl.	Fuc.					
Glycoprotéine										
de TAMM	5,4	0	2,7	-	1	6,6 à 9,4	---	5 à 9	GOTTSCHALK (308)	
et HORSFALL									ODIN (309)	



- Gal. = Galactose
- Glc. = Glucose
- Man. = Mannose
- Xyl. = Xylose
- Fuc. = Fucose

T a b l e a u X I

PROPRIETES PHYSIQUES DE LA GLYCOPROTEINE DE TAMM ET HORSFALL

d'après MAXFIELD (310)

	: T et H → D F [*] :	: T et H DIFERRANTE ^{**} :	: T et H
• <u>Structure</u>	 (a) (b)	 X 	 X X O O X X (a) (b)
• Viscosité intrinsèque	100	325	800 dans l'eau
• S _{20w} ^o	19,0 x 10 ⁻¹³	22,3 x 10 ⁻¹³	29 x 10 ⁻¹³
• Frontière électrophorétique	double	simple	simple
• Masse Moléculaire			
a) Ultracentrifugation et viscosité	1,7 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁶	7,0 x 10 ⁶
b) Diffusion	1,7 x 10 ⁶	3,1 x 10 ⁶	—
• Rapport axial (viscosité)	36	70	
• Largeur de la molécule	42 Å	42 Å	42 Å
• Longueur de la molécule	1,5 x 10 ³ Å	2,9 x 10 ³ Å	5,6 x 10 ³ Å
• Spectre UV max.	277 mμ	277 mμ	277 mμ

* Solution de la glycoprotéine précipitée par le cétavlon, centrifugée et le surnageant ajusté à une concentration en chlorure de sodium de 0,58 M.

** Urine précipitée par le cétavlon, centrifugée, le surnageant est ajusté à une concentration en chlorure de sodium de 0,58 M



En électrophorèse libre, à pH 8,6, dans un tampon véronal, la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL migre un peu plus vite que la sérum albumine. BOYCE et SWANSON (311)

En immunoélectrophorèse, dans le même tampon, sur gélose, elle migre entre l'albumine et l' α_1 globuline ; GACA et KEUTEL (312), et si la préparation a été lyophilisée, elle migre entre les α_1 et α_2 globulines : HEREMANS et al (313), VAERMAN et HEREMANS (314), KEUTEL et al (315) (Fig. 13, p. 43). Il apparaît fréquemment deux arcs, et à l'heure actuelle, on ne sait pas encore s'il s'agit de deux composés distincts ou s'il s'agit simplement de formes polymères différentes de la glycoprotéine.

c) Composition en amino acides et en oses

Plus récemment, sa masse moléculaire a été calculée. Elle est voisine de 27 000 mais la masse moléculaire minimum des amino acides et sucres qui la composent est de 28 000 : MAXFIELD et STEFANYE (316) (Tableau XII, p. 44), KING et al (317).

La composition en oses figure dans les tableaux X et XII, p. 40 et 44 : GOTTSCHALK (318), ODIN (319). L'acide sialique a été identifié à l'acide N acétyl neuraminique par KLENK et al (320) et sa proportion est variable : 7,3 à 9,4 p.100 : ODIN (321)

d) Propriétés biologiques

La glycoprotéine de TAMM et HORSFALL possède la propriété d'inhiber l'hémagglutination des virus de l'influenza et sert même d'inhibiteur dans le cas d'infection virale des oreillons. En relation étroite avec son activité inhibitrice, la neuraminidase réagit sur la glycoprotéine mais plus lentement que sur les autres substrats.

e) Physiologie, pathologie

La glycoprotéine de TAMM et HORSFALL a été souvent impliquée dans la formation de calculs reinaux. BOYCE et SWANSON (322), BOYCE et al (323), KING et BOYCE (324) font ressortir les similarités existant entre l'analyse chimique de l'uromucoïde et de ces calculs.

Des anomalies dans la forme des molécules de la glycoprotéine ont été démontrées par MAXFIELD et WOLINS (325) chez des patients atteints d'affection du pancréas.

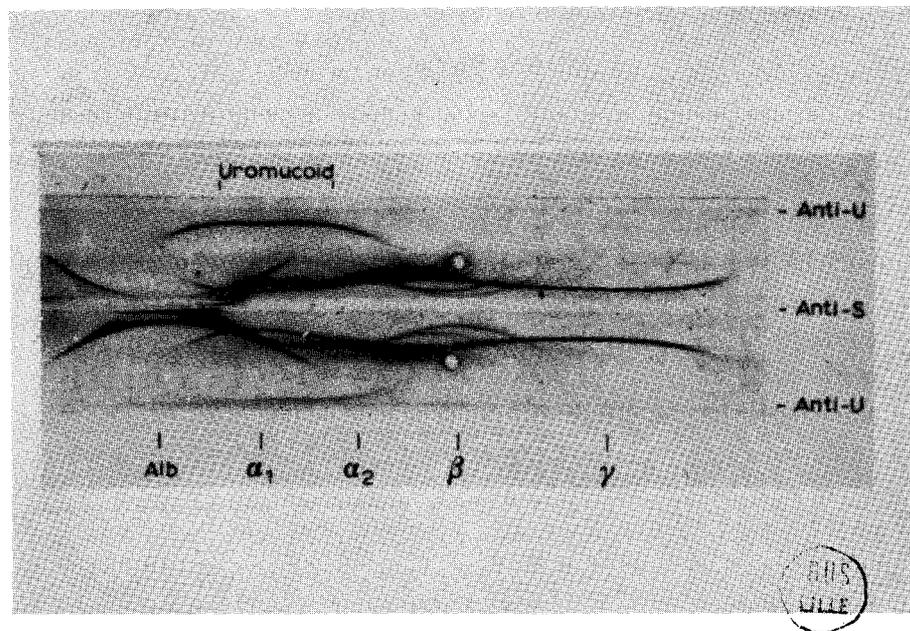


Figure 13

Analyse immunoélectrophorétique de l'uromucoïde (anode à gauche)
Anti U : sérum lapin anti uromucoïde
Anti S : sérum lapin anti sérum humain

T a b l e a u XII

COMPOSITION EN SUCRES ET EN AMINO ACIDES DE LA GLYCOPROTEINE DE TAMM ET HORSFALL
d'après MAXFIELD et STEFANYE (326)

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
Tryptophane	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 (b)	5,4	8,4
Mannose (b)	2,7	4,2
Fucose (b)	1,1	1,9
Acide N.acétyl neuraminique (c)	9,1	8,3

(b) GOTTSCHALK (327)

(c) ODIN (328)

506
1117

Une augmentation de son taux d'excrétion a été reportée dans le cas de thyrotoxicose et chez les enfants : SUDHOF, KRIEGER et SCHULTZ (329)

2) La substance de DONAGGIO

Quand on ajoute à l'urine normale une solution de thionine et de molybdate d'ammonium, il apparaît un précipité violet surmonté d'un liquide clair. Or, certaines surines inhibent cette réaction : c'est le phénomène d'obstacle décrit par DONAGGIO (330, 331), reconnu au cours de certaines maladies fébriles ou après l'effort musculaire : TAYEAU et al (332), LARREGLA (333). Ils constatent que la dialyse ne modifie pas la réaction et note l'adsorption de la substance responsable de ce phénomène sur le charbon.

a) Isolement

Les premières tentatives d'isolement reviennent à SOLLAZZO et CORTESE (334). Ils constatent que l'addition d'alcool absolu à une urine positive, (urine présentant le phénomène d'obstacle) amène la formation d'un précipité qui, lavé à l'alcool puis à l'éther, se présente sous la forme d'une poudre dont la solution aqueuse donne une réaction très intense, mais cette poudre est souillée par de nombreux sels.

D'autres méthodes ont été proposées, fondées soit sur la précipitation par les alcools, SAITO (335), YAMAZOE (336), soit sur l'adsorption chromatographique : HOUDA (337).

b) Identification

TAYEAU, BISERTE, MONTREUIL et MAPQUEVIELLE (338) ont pu montrer qu'il s'agit en réalité d'un glycoprotéide qui contient 25 p. 100 de glucides riche en glucosamine. Les constituants de ce glycoprotéide ont pu être identifiés et dosés. TAYEAU et al (339), BISERTE et al (340),

Cette mucoprotéine urinaire qui représente une masse moléculaire de 44 100 [LOCKEY et al (341)], et un pH isoélectrique de 4,3 [SHIMOKAWA (342)], se conduit en électrophorèse comme une α globuline. Dans certains cas (cancer), elle migre avec les albumines : TAYEAU et NIVET (343).

Il a été conclu que cette substance était différente des glycoprotéines de TAMM et HORSFALL et de celles que ANDERSON et Mc LAGAN que nous verrons plus loin. (Tableau XIV, p. 48)

3) Les glycoprotéines de ANDERSON et Mc LAGAN

ANDERSON et Mc LAGAN (344), par adsorption sur l'acide benzoïque, précipitent par l'acétone deux fractions glycoprotéiniques qu'ils appellent mucoprotéines A et B, chimiquement identiques (Tableau XIV, p. 48)

Les fractions étaient impures et contenaient des substances à spécificité de groupe sanguin, des gonadotropines, des inhibiteurs d'hémagglutination ainsi que des α et β globulines caractérisées par immunoélectrophorèse.

4) Autres glycoprotéines

a) Les glycoprotéines à activité de groupe sanguin

Elles sont généralement identifiées par leurs réactions sériques avec les érythrocytes. FREUDENBERG et EICHEL [(345 , 346)] étudièrent ces substances pour les groupes A, O et B dans les urines et furent suivis par KING et al (347), KING, FIELDEN et BOYCE (348).

b) Les gonadotropines

Ce sont toutes des glycoprotéines contenant des osamines : STACEY (349), KENT et WHITEHOUSE (350), RIGAS, PAULSEN et HELLER (351).

c) L'érythropoïétine

Cette substance a été identifiée dans le plasma et l'urine de sujets anémiés.

HODGSON et TOHA (352) furent les premiers à démontrer l'activité érythropoïétique de l'urine et à noter que comme dans le plasma, l'activité biologique se perd à l'ébullition à pH 9 et non à pH 5,5. HODGSON et al (353) (354), par des méthodes de précipitation alcoolique, identifiaient une activité dans une substance qui n'était pas dialysable et contenait des hexosamines, de l'acide N-acétyl neuraminique et des hexoses.

L'érythropoïétine urinaire, comme l'héparine, se colore métachromatiquement avec le bleu de toluidine : WINKERT et al (355).

III - GLYCOPROTEINES ET CANCER

De nombreuses expériences ont montré que l'apparition d'une tumeur chez l'Homme ou chez l'animal d'expérience s'accompagnait d'une modification du taux et de la structure de certaines substances présentes dans les cellules, dans le sang et dans les urines. En outre, un nombre restreint de substances spécifiques du développement d'une tumeur cancéreuse a été décelé dans les tissus tumoraux, dans le sang et dans les urines.

La recherche de substances spécifiques dans les urines a été entreprise dans notre Laboratoire dans le but d'établir un diagnostic précoce du cancer et de suivre l'évolution d'une tumeur.

Dans ce chapitre, nous décrirons brièvement les résultats qui ont été acquis jusqu'à présent, d'une part, sur les modifications quantitatives et qualitatives de certains composés glucidiques urinaires et, d'autre part, sur l'apparition de substances spécifiques de l'état cancéreux.

I°) MODIFICATIONS QUANTITATIVES ET QUALITATIVES DE CERTAINS COMPOSES

GLUCIDIQUES PRESENTS DANS LE SERUM ET DANS LES URINES DE SUJETS CANCEREUX

A - MODIFICATIONS QUANTITATIVES

Le développement d'une tissu cancéreux s'accompagne d'une modification du taux des polysaccharides, des glycoprotides et des mucopolysaccharides. Les premières expériences de mises en évidence d'une augmentation du taux des polysaccharides ont été réalisées par SHETLAR et coll. (355a), en 1941, sur du sérum humain. En électrophorèse de zone, l'augmentation du taux des polysaccharides est particulièrement visible dans la zone des α -globulines et dans la fraction albuminique. Toutefois, selon SHETLAR et coll. (355b) cette augmentation ne semble pas spécifique du cancer et elle se manifeste aussi, par exemple, dans des infections bactériennes ou virales.

Dans les urines, des expériences réalisées au Laboratoire par STRECKER et MONTREUIL (communication personnelle) ont révélé des légères variations du taux des polysaccharides.

D'autres auteurs comme PECHAN (355c) ont montré que l'apparition d'un cancer ne provoquait pas une modification du taux des substances urinaires de masse moléculaire faible, renfermant des hexosamines.

En ce qui concerne les glycoprotides sériques, les plus importantes variations quantitatives ont été signalées par WINZLER et SMYTH (355d) dans des expériences réalisées sur les sérums de sujets cancéreux. D'autres auteurs ont, par la suite, confirmé les résultats de ces auteurs et montré, en outre, que les pourcentages d'augmentation du taux des glycoprotides dépendaient dans une large mesure de l'origine du cancer. Ainsi, chez un individu présentant un cancer osseux, l'augmentation est faible alors qu'elle est très importante dans le cas d'un lymphome. L'électrophorèse d'un sérum cancéreux révèle que l'augmentation du taux des glycoprotides est particulièrement évident dans la zone des α -globulines, et principalement au niveau de l'orosomucoïde. Mais, comme dans le cas des polysaccharides, ces augmentations ne sont pas spécifiques du développement du cancer.

Dans les urines, la taux des glycoprotides subit des variations au cours du développement tumoral. Selon certains auteurs, comme LOCKEY et coll. (355e), ces variations se traduiraient par une augmentation du taux des glycoprotides, alors que selon d'autres auteurs comme LEYTON et coll. (355f) les variations se traduiraient par une diminution de la diurèse et du taux des glycoprotides. Cette diminution s'explique difficilement alors que l'augmentation du taux des glycoprotides dans le sérum et dans les urines peut s'expliquer comme l'a signalé CATCHPOLE (355g) par une dépolymérisation du tissu conjonctif au voisinage du tissu tumoral et l'apparition de glycoprotides de masse moléculaire faible qui diffusent et parviennent jusque dans le sang et dans les urines.

Devant cette dispersion des résultats, il apparaît évident qu'une étude plus poussée de la question est nécessaire, et qu'actuellement le dosage des glycoprotides n'apporte pas un élément satisfaisant dans l'élaboration du diagnostic d'un cancer.

B - MODIFICATIONS DE LA STRUCTURE DES GLYCOPROTIDES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU CANCER

Le développement d'un cancer ne s'accompagne pas seulement d'une

modification quantitative des constituants glucidiques, mais aussi de modifications de la structure des groupements glycaniques. Ces dernières ont été signalées par BISERTE et coll. (355h), dès 1957, qui ont montré que les oses/osamines dans les glycoprotides obtenus à partir d'urines de sujets cancéreux selon le procédé d'ANDERSON et Mc LAGAN (355i) est de 2,36 alors qu'il est de 4 dans le cas des glycoprotides ^{d'urine} de sujets sains. Le taux d'hexosamines conjuguées est donc nettement plus élevé dans les urines de cancéreux. Un résultat analogue a été obtenu par HAKOMORI et al. (355j). Ces auteurs ont travaillé sur les glycoprotides isolés selon la méthode d'ANDERSON et Mc LAGAN à partir d'urine d'Homme et de Rat. A partir des urines humaines, ils ont isolé une γ -glycoprotéine qui possède un taux faible d'oses et une diminution du rapport hexoses/hexosamines. D'autre part, ces auteurs ont observé que le rapport oses totaux/oses terminaux est pratiquement doublé dans le cas de cancer. Des résultats analogues ont été obtenus sur l'urine de Rat. Les variations de rapport sont l'indice d'une profonde modification de la structure branchée des groupements glycaniques.

Selon LEYTON et coll. (355k), le pourcentage d'oses neutres, d'acides sialiques et d'acides uroniques dans la fraction que les auteurs appellent "protéose urinaire" et qui renferme un mélange de polypeptides, glycopeptides, oses "neutres" et mucopolysaccharides, est diminuée de 50 p.100 environ, dans les urines de sujets humains cancéreux. Le Tableau XIV (p.51) est, à cet égard, démonstratif. Les grandes variations du taux des oses neutres, hexosamines, acides uroniques, acides sialiques mises en évidence par LEYTON et coll. (355l) sont en faveur de profonds remaniements de la structure des glycoprotides d'origine cancéreuse.

KALLEE, DEBIASI, KARYPIDIS, HEIDE et SCHWICK (355m) ont montré que dans un cas de leucémie myéloïde chronique, les glycoprotides présents dans les urines possédaient une capacité de liaison avec la vitamine B₁₂, largement supérieure à la capacité de liaison des glycoprotides d'urines de sujets normaux. Ces mêmes auteurs ont montré que l'une des uroglycoprotéines, présente dans les urines de leucémiques, qui possédait la capacité de fixer la vitamine B₁₂, était de l'orosomucoïde "immature" sans acide sialique. Dans le cas de leucémies, il semble donc que l'acide sialique soit préférentiellement détaché

Tableau XIV

Excrétion par 24 heures des "protéoses urinaires" chez les sujets normaux et cancéreux (LEYTON et coll.) (355n).

	Diurèse totale en ml	Polypeptides totaux en mg	Oses neutres totaux en mg	Hexosamines en mg
Sujets normaux	1 300	69-100	24-25	15-27
Sujets cancéreux	690	30- 78	5-18	5-21

	Acides sialiques en mg	Acides uroniques en mg
Sujets normaux	10-23	4,4-14
Sujets cancéreux	6-16	1,2- 7



des glycoprotéines ou bien que son incorporation dans les glycoprotéines soit inhibée.

Selon MONTREUIL et coll. (communication personnelle) il y aurait une augmentation du taux de fucose présent dans les glycoprotéides urinaires de cancéreux.

De ces résultats préliminaires il ressort que le phénomène de cancérisation s'accompagne d'une modification de la structure des groupements glycaniques, mais qu'actuellement nous ne pouvons apporter de grande précision car la structure d'aucun groupement glycanique de glycoprotéide d'urine normale n'a été déterminée.

II°) ISOLEMENT DE QUELQUES SUBSTANCES SPECIFIQUES DU CANCER DANS LES URINES

La mise en évidence de substances spécifiques du développement du cancer est très délicate. En effet, on peut prévoir que chaque tumeur se caractérisera par l'apparition d'un ou de plusieurs antigènes spécifiques distincts d'une espèce animale à une autre et même d'un individu à un autre, la nature chimique des substances spécifiques pouvant être variable.

A - DANS LES TISSUS

Un lipide et des sphingolipides spécifiques ont été caractérisés. Il s'agit du "malignolipide" identifié par KOSAKI et al. (355 o) et des sphingolipides de membranes isolés par HAKOMORI et JEANLOZ (355p) à partir d'un adénocarcinome gastrique et bronchique. Ces sphingolipides se caractérisent par la présence de fucose et l'absence de N-acétyl-galactosamine et d'acide N-acétylneuraminique.

B - DANS LES SERUMS

BURROWS et NEILL (355q) ont mis en évidence un polypeptide immunologiquement actif.

URIEL et BURTIN (355r) ont mis en évidence l' α -foeto-protéine ou fétuine dans le sang. Selon ces auteurs, l'apparition de cette glycoprotéine serait caractéristique du développement d'hépatomes ou de tératomes.

C - DANS LES URINES

Les substances chimiques étudiées jusqu'à présent sont les suivantes :

1 - GLYCOPROTEINE α_1 DES URINES DE SUJETS ATTEINTS DE PLASMOCYTOSE

Dans les urines de sujets atteints de plasmocytome, WEICKER, HUHNSOCK et GRÄSSLIN (355s) ont mis en évidence une glycoprotéine α_1 de masse moléculaire 19 900, renfermant 38,1 p.100 d'oses totaux (galactose, mannose, glucose, fucose, rhamnose, N-acétyl-glucosamine, galactosamine et acide N-acétylneuraminique). La présence de rhamnose est assez surprenante car ce méthyl-pentose ne se rencontre jamais dans la structure des groupements glycaniques des glycoprotides d'origine sérique ou urinaire.

Les principales caractéristiques de la glycoprotéine α_1 isolée par WEICKER et coll. (355t) sont précisées ci-dessous :

Constante de sédimentation	1,43
Masse moléculaire (sédimentation et diffusion)	19 900
Point isoélectrique	3,3
<u>Composition en oses</u> (n. de résidus p/mole)	
Galactose	10
Mannose	5
Glucose	5
Fucose	4
Rhamnose	2
N-acétyl-glucosamine	8
N-acétyl-galactosamine	2
Acide N-acétylneuraminique	5

Composition en acides aminés
(n. de résidus p/mole)

Lys	7
His	2
Arg	2
Asp	7
Thr	10
Ser	9
Glu	14
Pro	8
Gly	4
Ala	12
CysSH	6
Val	9

Met	
Ileu	3
Leu	6
Tyr	6
Phe	3

En outre, cette glycoprotéine α_1 est très stable à la chaleur, insoluble dans l'acide trichloracétique et très soluble dans l'acide perchlorique. Elle possède la propriété de se combiner avec la protéine de BENICE-JONES dans un rapport de 1 : 50 pour former un complexe thermo-stable sur lequel la neuraminidase ne possède plus d'action.

Comme jusqu'à présent aucune glycoprotéine possédant ces caractéristiques n'a été isolée d'urines de sujets sains ou de sujets atteints d'autres maladies, on peut considérer cette glycoprotéine α_1 comme spécifique de l'urine de sujets atteints de plasmocytose.

2 - POLYPEPTIDE SPECIFIQUE DES URINES DE LEUCEMIQUES

En 1958, TUNIS, WEINFELD et SANDBERG (355u) ont isolé des urines de leucémiques un polypeptide qui provoque l'inhibition de la précipitation des acides désoxyribonucléiques en présence d'acide trichloracétique. Cette étude a été reprise en 1962 par TUNIS et WEINFELD (355v) qui ont étudié les glycoprotéides de l'urine après précipitation par l'acide benzoïque. Ces auteurs ont montré que 78 p.100 des leucémiques possédaient dans les urines une "fraction II" qui est facilement précipitable par l'acide chlorhydrique 2 N après addition de benzoate de sodium. Une telle fraction n'existe pas, -ou seulement à l'état de traces-, dans les urines de sujets normaux. Cette "fraction II" possède la propriété d'augmenter la solubilité des acides désoxyribonucléiques en présence d'acide trichloracétique et d'être très stable vis-à-vis de la chaleur.

3 - MUCOPOLYPEPTIDE ACIDE DE MASAMUNE

MASAMUNE et coll. (355w) ont isolé un "mucopolypeptide kappa" des urines de sujets atteints de cancer de l'estomac, de l'oesophage, du foie et de l'utérus.

Le mode de préparation du "mucopolypeptide kappa" est schématisé dans la figure 13bis (p.55 et p.56).

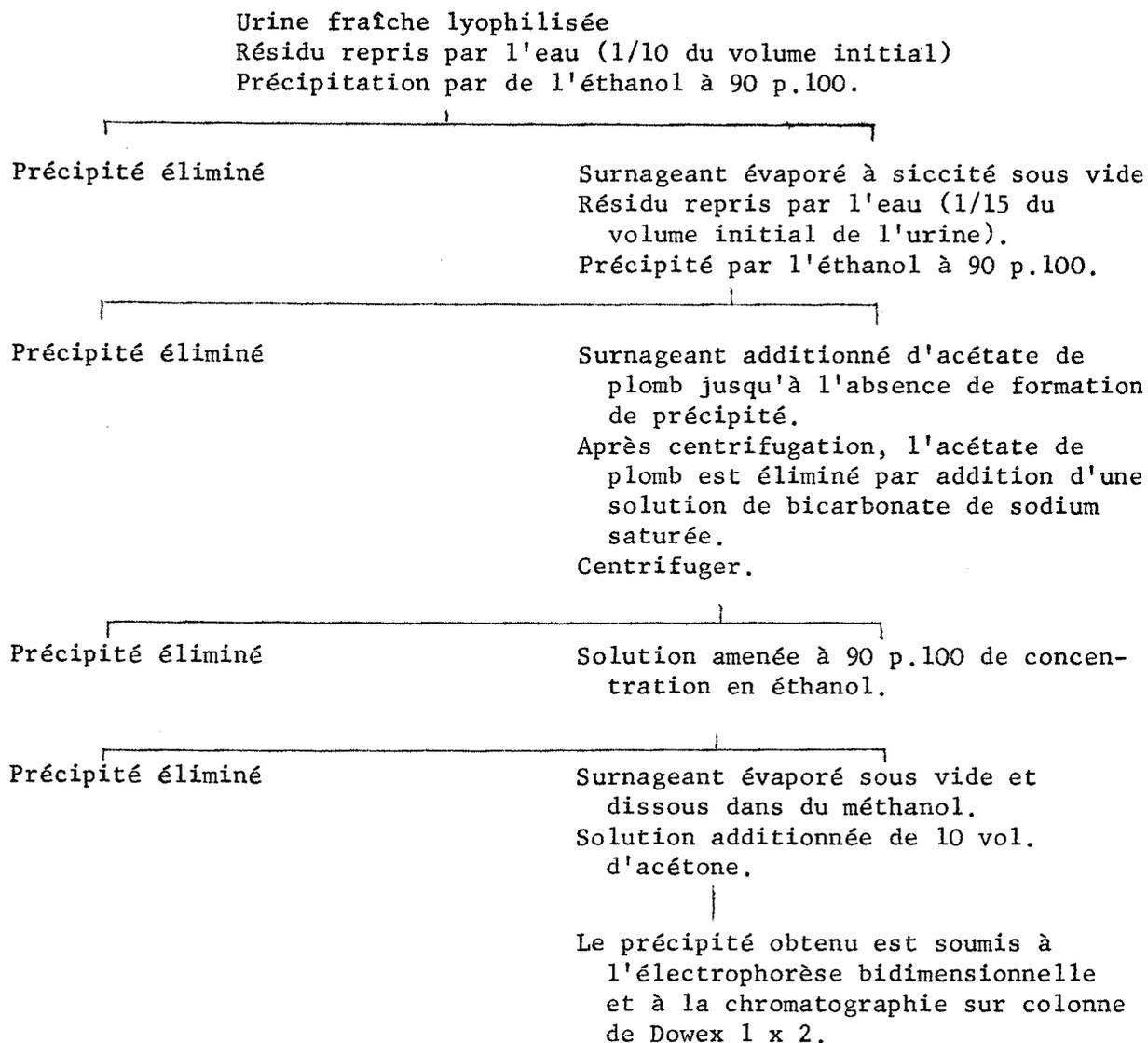


Figure 13bis

Procédé d'isolement du mucopolypeptide K à partir des urines de cancéreux selon MASAMUNE et coll. (355x)

Ce "kappa mucopolypeptide" s'est révélé être, par la suite, hétérogène puisque MASAMUNE et coll. (355y) l'ont sous-fractionné en fractions "kappa₁" et "kappa₂".

Depuis, l'étude de ces substances n'a pas été poursuivie. Récemment, nous avons repris cette étude au Laboratoire.

4 - LA TOXOHORMONE

La toxohormone est une substance qui possède la propriété d'inhiber l'action de la catalase hépatique. Elle a été mise en évidence dans les tissus et dans les urines de cancéreux. Les recherches ont été effectuées surtout par NAKAMARA et coll. (355z).

L'existence de cette substance a été longtemps controversée, en effet, selon certains auteurs, la toxohormone ne proviendrait pas de la tumeur mais de la contamination bactérienne. Actuellement il a été démontré que la perte d'activité de la catalase était d'autant plus grande que la croissance de la tumeur était importante. Il faut donc admettre que la tumeur produit une toxohormone.

Cette toxohormone n'agirait pas directement sur les molécules de catalase mais elle inhiberait la synthèse de l'enzyme.

Il est à souligner que la catalase est une enzyme qui renferme du fer, et qu'au cours du développement d'une tumeur, des modifications du métabolisme du fer ont été observées. Des recherches sont entreprises actuellement pour définir exactement l'action de la toxohormone sur le métabolisme de la catalase et sur celui du fer.

CONCLUSIONS

En conclusion, nous pouvons dire que l'apparition d'un phénomène de cancérisation s'accompagne de modifications au niveau des glycoprotéines urinaires. Ces modifications ne se manifestent pas par une élévation sensible du taux des glycoprotéides, 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, l'immuno-fluorescence trouveront une place importante.

IV - CONCLUSIONS

Il apparaît donc, après cette revue générale des constituants de l'urine, une extraordinaire diversité de composés de provenance sérique ou urinaire.

Le but de notre travail, au moment où nous l'avons entrepris, a été d'essayer d'éclaircir la composition de l'adialysable urinaire par des méthodes de fractionnement couplées à l'électrophorèse et l'immunoélectrophorèse, afin de pouvoir repérer par la suite les différences qui pourraient exister dans le cas du cancer.

TRAVAUX PERSONNELS

Avant d'exposer nos travaux sur le fractionnement des glycoprotéides urinaires, nous décrirons les procédés généraux d'étude des propriétés physico-chimiques de ces constituants.

METHODES GENERALES D'ANALYSE

I - DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE

EN GLUCIDES

La composition centésimale en oses neutres (hexoses et 6-désoxyhexoses), en osamines, en acide sialique, en acides uroniques, a été déterminée sur l'extrait sec, à l'aide des méthodes suivantes : (voir revue générale de MONTREUIL et SPIK (356)).

1°- Les oses neutres, par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (357) modifiée par RIMINGTON (358) ;

2°- Les osamines, par la méthode d'ELSON-MORGAN (359), modifiée par BELCHER et al. (360), après une hydrolyse des composés par l'acide chlorhydrique 4 N, redistillé et exempt de fer, à 100°C, pendant 4 heures, en tube scellé sous vide ;

3°- L'acide sialique, par la méthode de WERNER et ODIN (361), à la diphenylamine ;

4°- Les acides uroniques, par la méthode au carbazol sulfurique de DISCHE (362). Pour nos produits, une correction systématique sera faite en effectuant le dosage avec et sans carbazol, pour éliminer les erreurs dues à la coloration des pigments urinaires. Une formule de correction permet d'éliminer l'interférence colorimétrique des oses neutres dans le dosage des acides uroniques et l'interférence des acides uroniques dans le dosage des oses neutres.

II - DETERMINATION DE LA COMPOSITION

MOLAIRE EN OSES

A - LES OSES "NEUTRES"

Les oses "neutres" ont été identifiés et dosés par chromatographie sur papier selon les procédés décrits par MONTREUIL, SPIK, DUMAISNIL et MONSIGNY (363).

1°-HYDROLYSE ACIDE ET PURIFICATION DES HYDROLYSATS

Les osides, libres ou conjugués, sont d'abord hydrolysés par l'acide chlorhydrique 1,5 N pendant 1,5 heure à 100°C, et les hydrolysats sont purifiés par un passage sur échangeurs d'ions : échangeur d'anions seul (DUOLITE A-40, forme formiate) dans le cas d'osides libres ; échangeur de cations (DOWEX 50x8 forme acide), puis d'anions (DUOLITE A-40 ; forme formiate) dans le cas d'osides conjugués.

2° CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE

a - Identification : les oses "neutres" ont été identifiés par chromatographie sur papier, dans les systèmes-solvants suivants :

∞ - n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) de PARTRIDGE (364) qui donne une bonne séparation du xylose et du fucose ;

β - pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2) de JERMYN et ISHERWOOD (365) qui donne une bonne séparation du galactose et du glucose. **Puis ils sont révélés à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (366).**

b - Dosage : les oses "neutres" ont été dosés, soit par la méthode de MONTREUIL et SCHEPPLER (367) (réduction du ferricyanure de potassium en ferrocyanure ; passage, par addition d'un sel ferrique, au ferricyanure ferrique et dissolution du précipité au bleu de prusse par l'acide oxalique), soit par la méthode de HUGUES et JEANLOZ (368) (révélation des chromatogrammes par le phtalate d'aniline et élution des taches colorées par l'éthanol chlorhydrique).

B - LES OSAMINES

1°-HYDROLYSE ACIDE

Les osamines sont libérées par hydrolyse à l'acide chlorhydrique 4 N redistillé, pendant 4 heures à 100°C, en tube scellé sous vide.

L'élimination de l'acide chlorhydrique est réalisée par évaporation sous vide à l'évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris par l'eau distillée et est soumis aux différentes méthodes d'identification des osamines et de dosage .

2° - IDENTIFICATION

a - Méthode de chromatographie sur colonne de GARDELL (369) : les osamines sont identifiées par chromatographie sur des colonnes d'échangeur de cations (DOWEX 50 x 8 ; 200-400 "mesh"). La glucosamine et la galactosamine donnent 2 pics bien distincts repérés par dosage colorimétrique mais la mannosamine possède le même comportement que la glucosamine.

b - Méthode de désamination de GARDELL, HEJKENSJOLD et ROCHNOR-LUND (370) : la méthode consiste en la désamination à chaud, par la ninhydrine, de la glucosamine et de la galactosamine respectivement en arabinose et en lyxose, qui sont aisément identifiés par chromatographie sur papier (voir p. 60). Une cause d'erreur est introduite par la présence éventuelle de mannosamine qui donne comme la glucosamine, de l'arabinose.

3° - DOSAGE SPECIFIQUE DE LA GALACTOSAMINE PAR LA METHODE COLORIMETRIQUE DE LUDOWIEG ET BENMAMAN (371)

Dans un premier temps, les osamines totales sont dosées à l'aide de réactifs qui donnent la même absorbance molaire avec chacune des osamines.

Dans un second temps, la galactosamine, ou la mannosamine sont dosées en tirant parti de la différence des réactivités de ces deux osamines, d'une part, et de la glucosamine, d'autre part, vis-à-vis de l'acétylacétone, à 0°C. La glucosamine est transformée en une céto-imine qui ne réagit pas avec le réactif d'EHRlich. Au contraire, la galactosamine ou la mannosamine donnent des chromogènes qui fournissent une coloration rose avec ce réactif.

C - LES ACIDES SIALIQUES

1° - HYDROLYSE ACIDE ET PURIFICATION DES HYDROLYSATS

Les acides sialiques sont préalablement libérés par une hydrolyse ménagée (SO_4H_2 ; 0,1 N ; 100°C ; 1,5 heure). Les hydrolysats sont ensuite purifiés sur colonne d'échangeur de cations (DOWEX 50 x 8 ; forme acide) puis sur des colonne d'échangeur d'anions (DOWEX 1 x 8 ; forme formiate).

Après un lavage à l'eau distillée de l'échangeur d'anions, les acides sialiques sont déplacés par le passage d'une solution d'acide formique 0,33 N (SVENNERHOLM) (372).

2° - IDENTIFICATION

Les acides sialiques sont séparés par chromatographie sur papier dans le système-solvant de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (373) : n-butanol/n-propanol/HCl 0,1 N (1:2:1) et révélés par le réactif au paradiméthylamino-benzaldéhyde.

III - ETUDE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE

Les immuno-électrophorèses ont été réalisées selon les méthodes de SCHEIDEGGER (374) et de GRABAR et coll. (375).

1° - PREPARATION DES IMMUN-SERUMS

Le méthode consiste à injecter à des lapins, par voie intramusculaire, 1 ml d'une solution antigénique (renfermant de 0,5 à 2 g de protéides totaux (*)) pour 100 ml de sérum physiologique) en suspension dans 4 ml d'adjuvant de FREUD obtenu en ajoutant à 9 ml d'huile de vaseline, 1 g de lanoline et 10 mg de BCG.

Les injections sont effectuées à une semaine d'intervalle, pendant 4 semaines, en faisant croître la dose de solution antigénique (0,5 - 1 - 1,5 et 2 p.100).

Après un mois de repos, le lapin subit un deuxième cycle d'injections identiques. Cinq à six cycles sont nécessaires pour obtenir de bons anti-sérums.

Lorsque le nombre d'arcs est maximal, 40 ml de sang sont prélevés par incision d'une veine de l'oreille. Après centrifugation, le sérum anti-protéides urinaires est conservé à +2°C.

(*)) Ces protéides totaux sont présents dans "l'extrait urinaire" purifié.

2°- REALISATION DES IMMUNO-ELECTROPHORESES

La réalisation des immuno-électrophorèses s'effectue en 2 étapes. La première étape consiste en une électrophorèse en gélose du produit à analyser dans un tampon véronal de pH 8,2 et de force ionique 0,1 , sous une tension de 4 à 5 V/cm pendant 2 à 3 heures.

La deuxième étape consiste en une diffusion du sérum anti-protéides urinaires, et des substances antigéniques. Les arcs obtenus lors de la formation du complexe antigène-anticorps sont révélés à l'aide du réactif à l'amidoschwarz, après une élimination soigneuse, par le sérum physiologique, de l'excès du sérum anti-protéides urinaires.

IV - ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES POLYSACCHARIDES ACIDES

Vingt µl d'une solution à 20 p.100 de glycoprotides sont soumis à l'électrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose (4 x 17 cm) dans un tampon pyridine/acide formique/eau (1:2:46) de pH 3, sous une tension de 3 V/cm, pendant 4 heures (DALFERES et al.) (376).

Les témoins employés sont l'acide chondroïtine sulfurique A ou C, l'acide chondroïtine sulfurique B ou B héparine, l'acide hyaluronique et l'héparine (5 µl de solution à 20 mg/3ml).

Après une fixation à l'alcool absolu (30 mn), la révélation est effectuée à l'aide du réactif au bleu alcian (solution à 0,5 p.100 dans l'acide acétique à 3 p.100), un rinçage dans un bain d'acide acétique à 5 p.100 est suivi d'un rinçage dans un bain d'acide acétique à 5 p.100 additionné de di-acétona alcool. Un chauffage à l'étuve à 40°C permet d'obtenir une feuille translucide.

PREPARATION DU MATERIEL D'ETUDE

Dans ce chapitre, nous justifierons le choix du matériel d'étude et définirons ses propriétés. En effet, c'est à partir de ces données que nos travaux ont été entrepris, dans le but d'isoler des fractions plus simples, dont nous pourrions plus facilement étudier les propriétés physico-chimiques.

Le taux de glycoprotides dans les urines est très faible. Pour augmenter la concentration de ce taux de glycoprotides, nous avons lyophilisé les urines et nous avons précipité, à basse température, les protéides à l'éthanol.

Nous avons systématiquement fait l'étude de la composition en oses totaux de l'adialysable de ce précipité alcoolique et l'étude immuno-électrophorétique. De plus, à l'aide de l'électrophorèse sur acétate de cellulose, nous avons mis en évidence les mucopolysaccharides et polysaccharides acides présents dans cette fraction.

Nous exposerons successivement I) les modalités de la préparation du matériel d'étude et II) ses caractéristiques chimiques et immuno-électrophorétiques.

I - PREPARATION

1° - PRELEVEMENT

L'urine humaine mâle est collectée dans un récipient contenant quelques gouttes de toluène pour éviter la prolifération des bactéries, puis conservée 24 heures dans un frigidaire, à 4°C, afin de précipiter les sels minéraux et la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL (90 p. 100 de celle-ci sont éliminés).

2° - CONCENTRATION

L'urine est ensuite filtrée, dégazée, ajustée à pH 6 et mise en bacs de 500 ml en chambre froide à - 20°C pour être lyophilisée par quantité de 10 litres.

Le lyophilisat, représentant 200 à 300 g de poudre jaune clair, est dissous dans 300 ml d'eau, ajusté à pH 8 avec de l'ammoniaque et agité

15 minutes avec un agitateur magnétique puis centrifugé. Le surnageant 1 est recueilli, tandis que le culot est repris deux fois de suite, par 200 ml d'eau, ajusté à pH 8, agité 15 minutes, centrifugé à nouveau.

Les surnageants 1, 2 et 3 sont groupés, ajustés à pH 4 avec de l'acide chlorhydrique (*) constituent le "concentré urinaire".

3° - FRACTIONNEMENT ETHANOLIQUE

Les protéines et les glycoprotides présents dans le "concentré urinaire" sont précipités par l'éthanol absolu. Pour éviter la dénaturation, la température est maintenue à - 20°C, en utilisant d'une part, de l'éthanol à - 70°C et d'autre part, en effectuant la centrifugation dans une centrifugeuse stabilisée à - 20°C quelques heures avant la manipulation.

a - Choix de la concentration en éthanol : avant de procéder à la précipitation, nous avons déterminé la concentration en éthanol la plus favorable pour obtenir la précipitation totale des glycoprotides de l'urine. Nous avons fractionné le concentré urinaire à l'aide d'un gradient discontinu de concentration en éthanol (Fig. 14 ; p.66).

Les fractions obtenues à des concentrations comprises entre 50 et 60 p.100 en éthanol : F₅₀, 60 et 70 p.100 ; F₆₀, 70 et 80 p.100 ; F₇₀, 80 et 90 p.100 ; F₈₀ et supérieure à 90 p.100 ; F₉₀, sont dialysées, lyophilisées et soumises à une étude immuno-électrophorétique (Fig.15 ; p.59).

Toutes les fractions sont hétérogènes, et seul, le surnageant alcoolique de la solution à 90 p.100 en éthanol ne présente aucun arc.

C'est la concentration que nous avons adoptée pour précipiter les glycoprotides totaux de l'urine.

b - Mode opératoire : au "concentré urinaire" est ajouté 9 fois son volume d'éthanol absolu à - 70°C. Une centrifugation est ensuite effectuée après un repos d'une heure à - 20°C.

Le culot, repris par un minimum d'eau distillée, est ajusté à pH 8 et est mis en dialyse 5 jours contre l'eau distillée dans des boudins de

(*) Le culot est éliminé. Il contient en majeure partie des sels minéraux contenus dans l'urine.

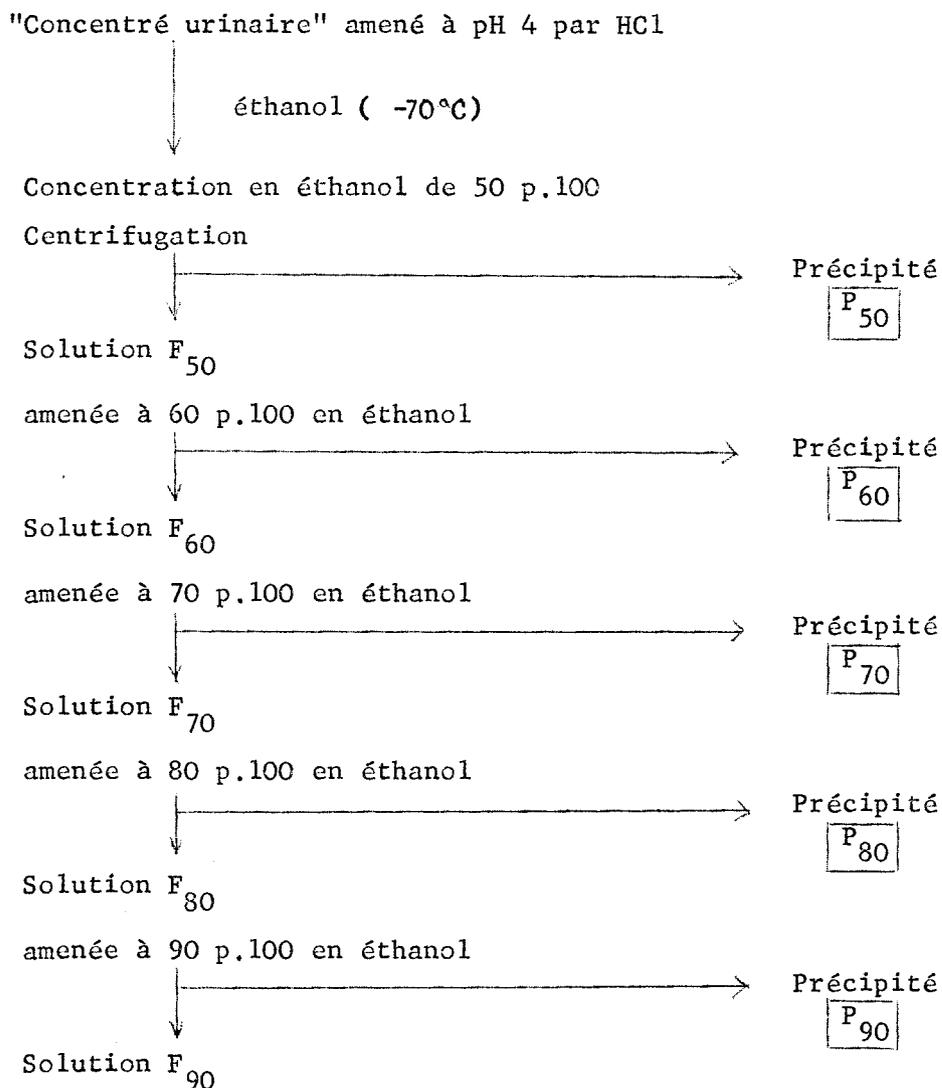


Figure 14

Schéma du fractionnement éthanolique du "concentré urinaire".

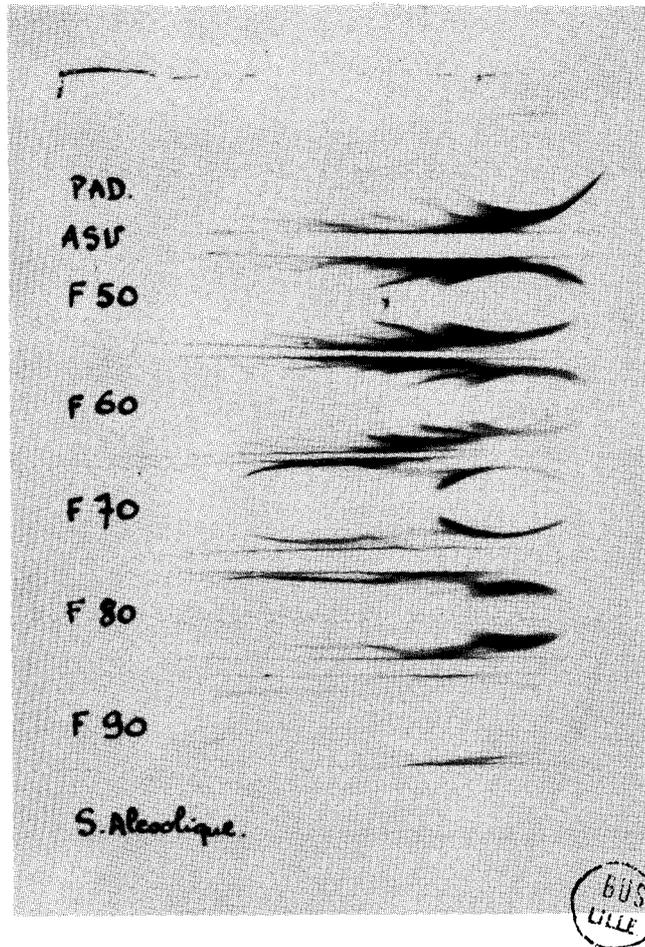


Figure 15

Immuno-électrophorèse des différentes fractions obtenues par fractionnement éthanolique du "concentré urinaire".

cellophane "Nojax 16" lavés. En effet, un lavage préalable des boudins de cellophane élimine les polyosides adialysables solubles, constitués de glucose, de xylose et de glycérol ainsi que les protides présents dans la membrane de cellophane.

La fraction adialysable du précipité alcoolique lyophilisée constitue notre matériel d'étude. Nous l'appellerons "extrait urinaire".

II - COMPOSITION DE L'EXTRAIT URINAIRE

A - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans les Tableaux XV (p. 69) et XVI (p. 73) et dans les figures 16 (p.71) ; 17 (p.72) 18 (p.79) ; 19 (p.75) et 20 (p.76). Ils peuvent être résumés ainsi:

1° - COMPOSITION CENTESIMALE DES OSES

Les résultats obtenus par l'application des méthodes de dosage colorimétrique des glucides ont été exprimés en mg par litre d'urine, ils sont rassemblés dans le Tableau XV (p.69).

a - Les oses "neutres" : après élimination de l'interférence des acides uroniques dans le dosage des oses neutres par la méthode à l'orcinoïl, le taux d'oses "neutres" est compris entre 23 et 42 mg par litre d'urine.

b - Les acides uroniques : après l'élimination de l'interférence de des oses "neutres" dans le dosage des acides uroniques par le carbazol sulfurique, le taux d'acides uroniques varie de 6 à 24 mg par litre d'urine.

c - Les acides sialiques : les valeurs données par l'application de la méthode de WERNER et ODIN sont voisines de 26 mg par litre d'urine.

d - Les osamines : le taux d'osamines totales déterminé après hydrolyse, par la méthode d'ELSON et MORGAN modifiée est de l'ordre de 20 mg par litre d'urine.

2° - IDENTIFICATION ET DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE

L'identification des oses "neutres", des acides uroniques, des acides sialiques et des osamines a été effectuée soit par chromatographie sur papier, soit par chromatographie sur colonne.

Tableau XV

Composition en mg/litre d'urine des glucides de
"l'extrait urinaire".

	Oses neutres	Acides uroniques	Acide sialique	Osamines	Oses Acides uroniques	Oses Acide sialique	Oses Osamines
"Extrait urinaire"	32	12	26	20	2,66	1,23	1,60
	23 à 42	6 à 24					



L'hydrolyse des oses "neutres" et des osamines est quantitative, celles des acides uroniques et des acides sialiques est d'une part incomplète et d'autre part s'accompagne d'une destruction partielle de ces composés. La détermination des rapports molaires concernera uniquement les oses "neutres" et les osamines.

a - Les oses "neutres" : la chromatographie dans les systèmes-solvants : butanol/acide acétique/eau et pyridine/acétate d'éthyle/eau nous a permis de mettre en évidence la présence de galactose, de glucose, de mannose, de fucose et de xylose. Les figures 16 et 17 (p. 71 et 72) illustrent ces résultats.

Les rapports molaires de ces différents oses déterminés par la méthode d'HUGHES et JEANLOZ sont rassemblés dans le Tableau XVI (p. 73).

b - Les acides uroniques : l'hydrolyse et l'identification chromatographique nous ont permis de révéler uniquement la présence d'acide glycuronique.

c - Les acides sialiques : l'analyse chromatographique (Fig. 18 ; p.74) révèle exclusivement la présence d'acide N-acétyl-neuraminique.

d - Les hexosamines : la fraction obtenue par élution chlorhydrique de l'échangeur de cations après passage d'un hydrolysate de "l'extrait urinaire" sur colonnes de résines échangeuses d'ions a été analysée par la méthode chromatographique de GARDELL. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 19 (p. 75) : seules la glucosamine et la galactosamine sont présentes. Le rapport glucosamine/galactosamine est voisin de 3.

Nous avons confirmé ces résultats par les dosages colorimétriques de LUDOWIEG et BENMAMAN.

3°- ANALYSE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE

L'analyse immuno-électrophorétique montre la très grande complexité de "l'extrait urinaire" : vingt à trente arcs ont été révélés par le réactif à l'amidoschwarz. La figure 20 (p. 76) illustre ces résultats.

4°- ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES POLYSACCHARIDES ACIDES

L'analyse électrophorétique sur acétate de cellulose sépare dans les conditions précédemment décrites, 4 bandes bien distinctes comme

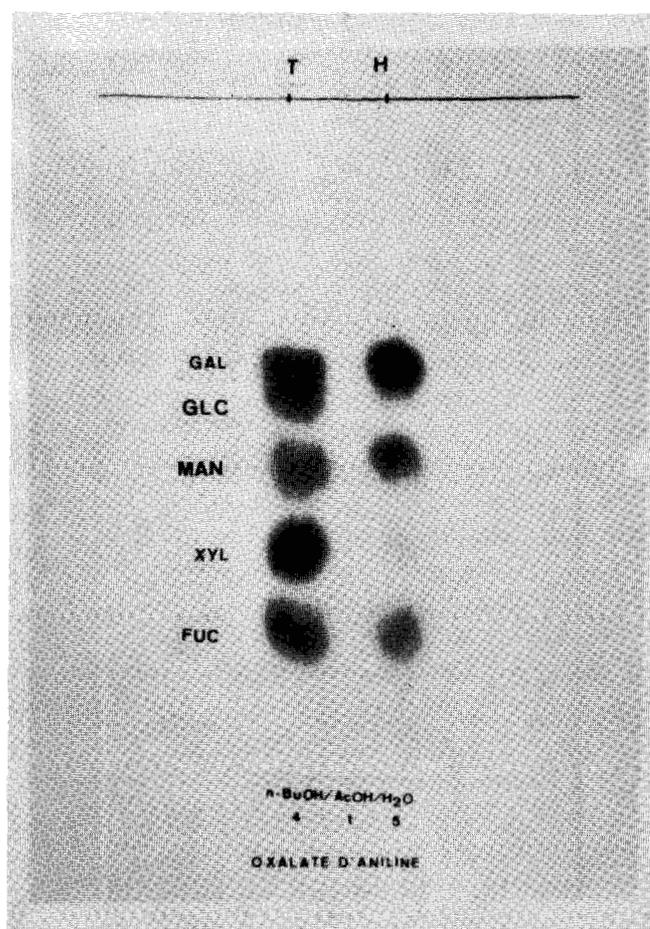


Figure 16

Chromatographie sur papier des oses neutres de l'hydrolysate de "l'extrait urinaire". Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) ; papier Whatman n°3 ; durée de la chromatographie : 72 h ; révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline ; T : témoins oses ; Gal : galactose ; Glc : glucose ; Man : mannose ; Xyl : xylose ; Fuc : fucose.

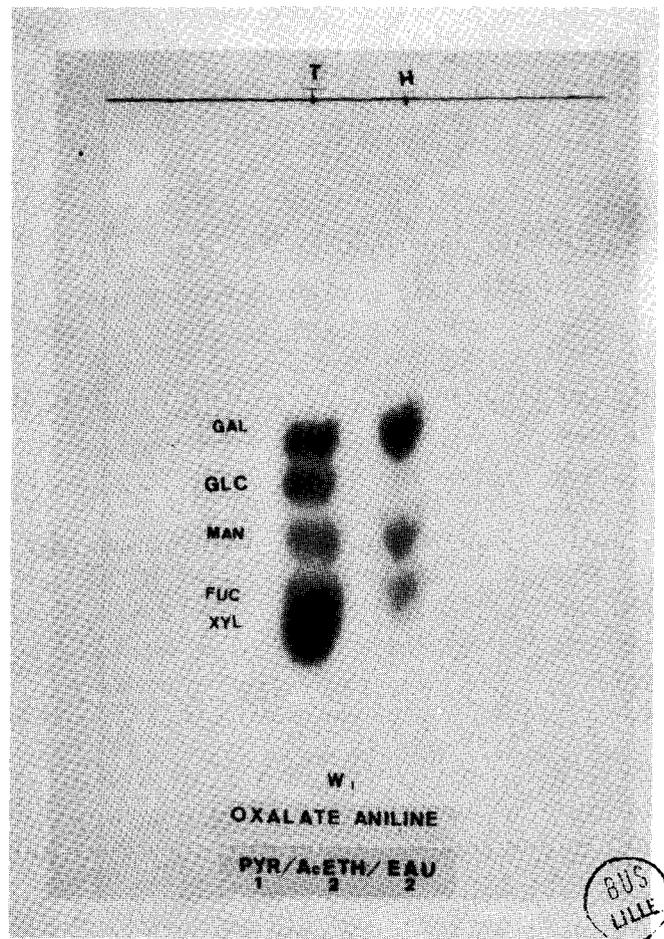


Figure 17

Chromatographie sur papier des oses neutres de l'hydrolysate de "l'extrait urinaire". Système-solvant : pyridine/acétate d'éthyle/eau (1:2:2) ; papier Whatman n°1 ; durée de la chromatographie : 24 h ; Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline ; T : témoins oses ; Gal : galactose ; Glc : glucose ; Man : mannose ; Xyl : xylose ; Fuc : fucose.

Tableau XVI

Rapports molaires des oses "neutres" figurant dans les hydrolysats de "l'extrait urinaire" (d'après MALLEVAIS-GOUBET (résultats non publiés)).

"Extrait urinaire"	Gal (a)	Glc (a)	Man (a)	Xyl (a)	Fuc (a)
Homme	10,2	2,7	5,5	0,7	4,3
Femme	10	2,55	5,7	0,77	6

(a) Gal : galactose ; Glc : glucose ; Man : mannose ; Xyl : xylose
Fuc : fucose ; Ces valeurs sont calculées sur la base de 10
résidus de galactose dans "l'extrait urinaire" obtenu à partir
de l'urine de Femme.

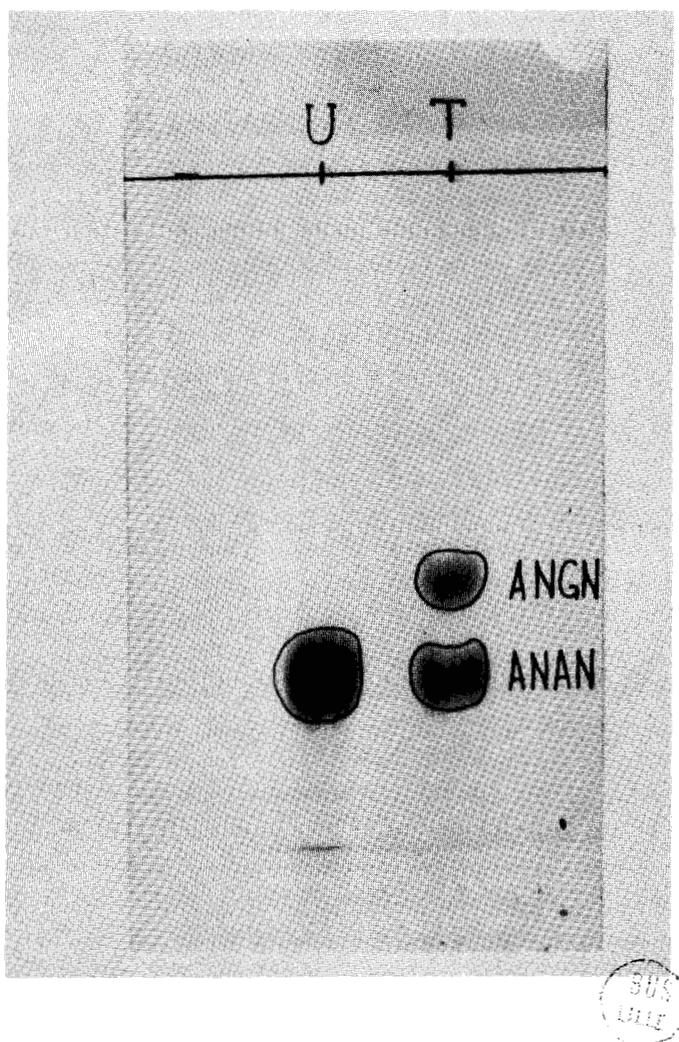


Figure 18

Chromatographie sur papier des acides sialiques de "l'extrait urinaire" ;
Système-solvant : n-butanol/n-propanol/acide chlorhydrique 0,1 N (1:2:2) ;
papier Whatman n°1 ; durée de la chromatographie : 18 h ; révélation par
le réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM.
T - : témoins ; ANAN : acide N-acétyl-neuraminique ; ANGN : acide N-glyco-
lyl-neuraminique.

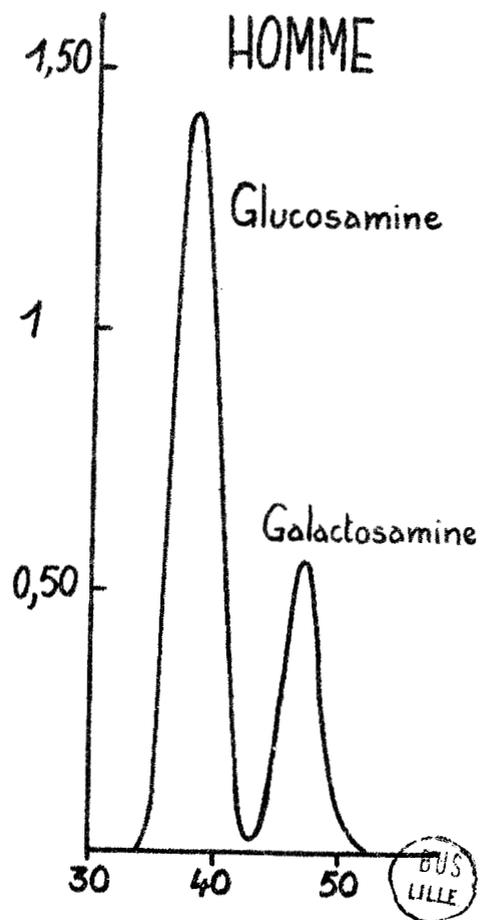


Figure 19

Chromatographie, selon GARDELL (378) sur colonne de DOWEX 50 x 8, 200-400 "mesh" des osamines présentes dans "l'extrait urinaire".
 En abscisses : nombre de tubes ; en ordonnées : absorbance à 520 m μ .

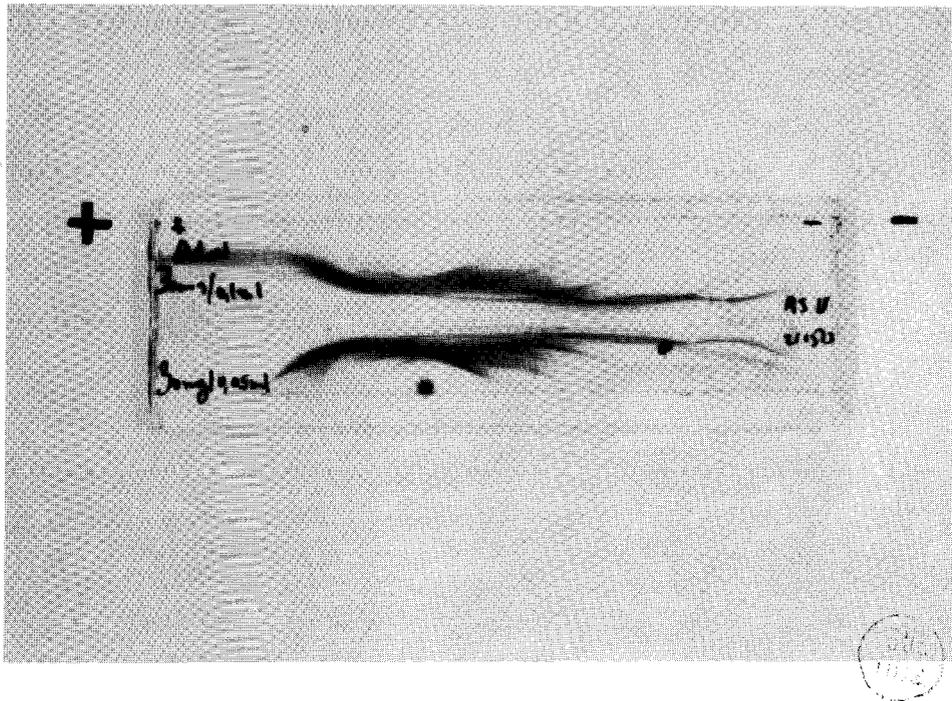


Figure 20

Immuno-électrophorèse de "l'extrait urinaire". ASU : sérum de lapin antiprotéides urinaires ; Adial : "extrait urinaire".

le montre la figure 21 (p.78). La migration électrophorétique de ces bandes ne correspond pas exactement à la migration électrophorétique des substances témoins.

B - DISCUSSION

1°- L'analyse de la composition centésimale en glucides de "l'extrait urinaire" montre que les taux d'oses "neutres", d'acides uroniques, d'osamines, d'acide sialique ne sont pas constants. Les valeurs obtenues, principalement en ce qui concerne les valeurs des oses "neutres" et des acides uroniques, sont nettement inférieures aux valeurs obtenues par GOUBET (379). Ces différences s'expliquent par les modifications apportées à la préparation du matériel de départ :

a - Le remplacement des feuilles de cellophane qui libéraient une quantité importante de glycérol et de polysides par des boudins de cellophane préalablement lavés, diminue le taux d'oses neutres.

b - La précipitation éthanolique supplémentaire élimine une partie des polysaccharides non dialysables et fait baisser également le taux d'oses.

Il nous est difficile de comparer nos résultats avec ceux d'autres auteurs car le mode d'expression est variable d'un auteur à un autre.

2°- En plus du galactose, du mannose et du fucose couramment rencontrés dans la structure des glycoprotéides, nous avons identifié du glucose et du xylose.

La présence de ces deux oses pouvaient s'expliquer par l'utilisation des feuilles de cellophane qui libèrent ces oses par hydrolyse comme l'ont montré MONTREUIL et coll. (*)

Après remplacement des feuilles par des boudins de cellophane lavés, nous avons encore constaté la présence de ces deux oses. Ces résultats

(*) Communication personnelle.

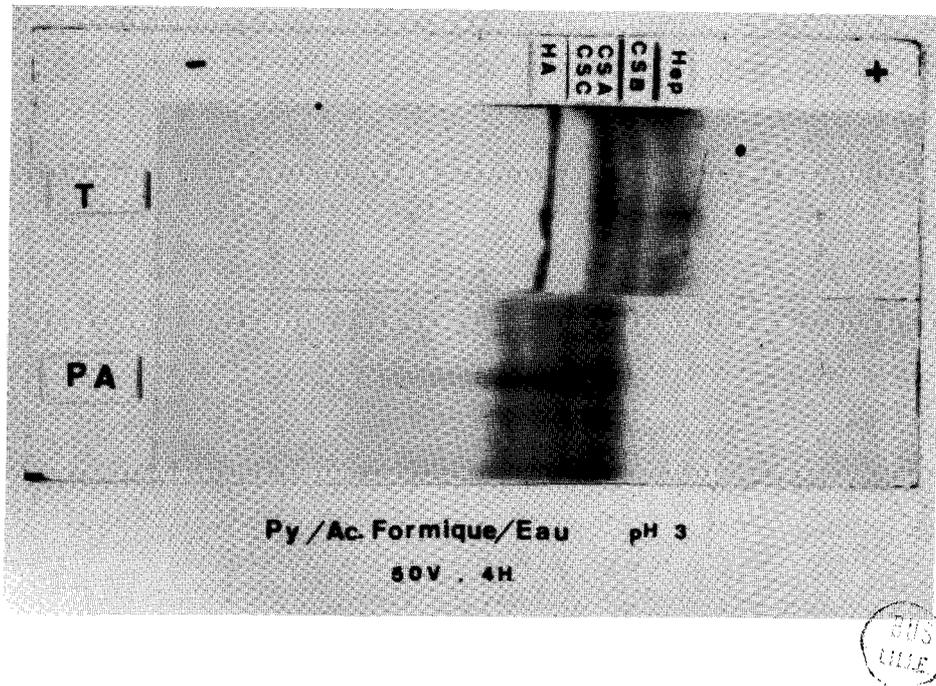


Figure 21

Electrophorèse sur acétate de cellulose de "l'extrait urinaire".
 Tampon d'électrophorèse : pyridine/acide formique/eau (1:2:46) ;
 pH 3 ; 3V/cm ; durée de l'électrophorèse : 4 h ; révélation par
 le réactif au bleu alcian ; CSA et CSC : mélange des acides chon-
 droitines sulfuriques A et C ; CSB : acide chondroïtine sulfurique
 B ; HA : acide hyaluronique ; Hép : héparine.

sont donc en faveur de la présence du glucose et du xylose dans la composition des glycoprotides urinaires. La présence du xylose a été confirmée par les travaux de RÓDEN (390).

Les rapports molaires galactose, mannose, fucose présents dans "l'extrait urinaire" sont différents de ceux des glycoprotéides sériques où le taux de fucose est nettement plus faible.

Bien que seul l'acide glycuronique ait été mis en évidence dans les hydrolysats de "l'extrait urinaire", nous verrons par la suite qu'il renferme des traces d'acide iduronique. La mise en évidence de cet acide a été réalisée dans une fraction riche en mucopolysaccharides acides.

Jusqu'à présent, seul l'acide N-acétyl-neuraminique a été mis en évidence dans les urines normales.

La présence de galactosamine dans les urines en proportion relativement importante s'explique, en partie, par la présence de mucopolysaccharide acides (Tableau IV ; p. 14), et par la présence de substance de groupes sanguins.

3°- Les glycoprotides de l'urine sont peu antigéniques. Une concentration élevée de ces glycoprotéides (supérieure à 20 p.100) est nécessaire pour obtenir le maximum d'arcs de précipitation.

C - CONCLUSIONS

Les résultats obtenus sont reproductibles grâce à une standardisation de la méthode de préparation du matériel d'étude.

Nous avons schématisé le mode opératoire dans la figure 22 (p. 80). Ce matériel d'étude contient la totalité des glycoprotides de l'urine, comme le montre la figure 15 (p. 69).

"L'extrait urinaire" étant maintenant bien défini, le but de notre travail consiste, dans un deuxième temps, à tenter de le fractionner et d'isoler des entités physico-chimiques pures.

Les procédés utilisés sont principalement des procédés de chromatographie sur résines échangeuses d'ions, de filtration sur gel de dextran et des procédés de précipitation à l'éthanol et au sulfate d'ammonium.

Nous allons, dans les chapitres suivants, analyser ces différentes méthodes de fractionnements.

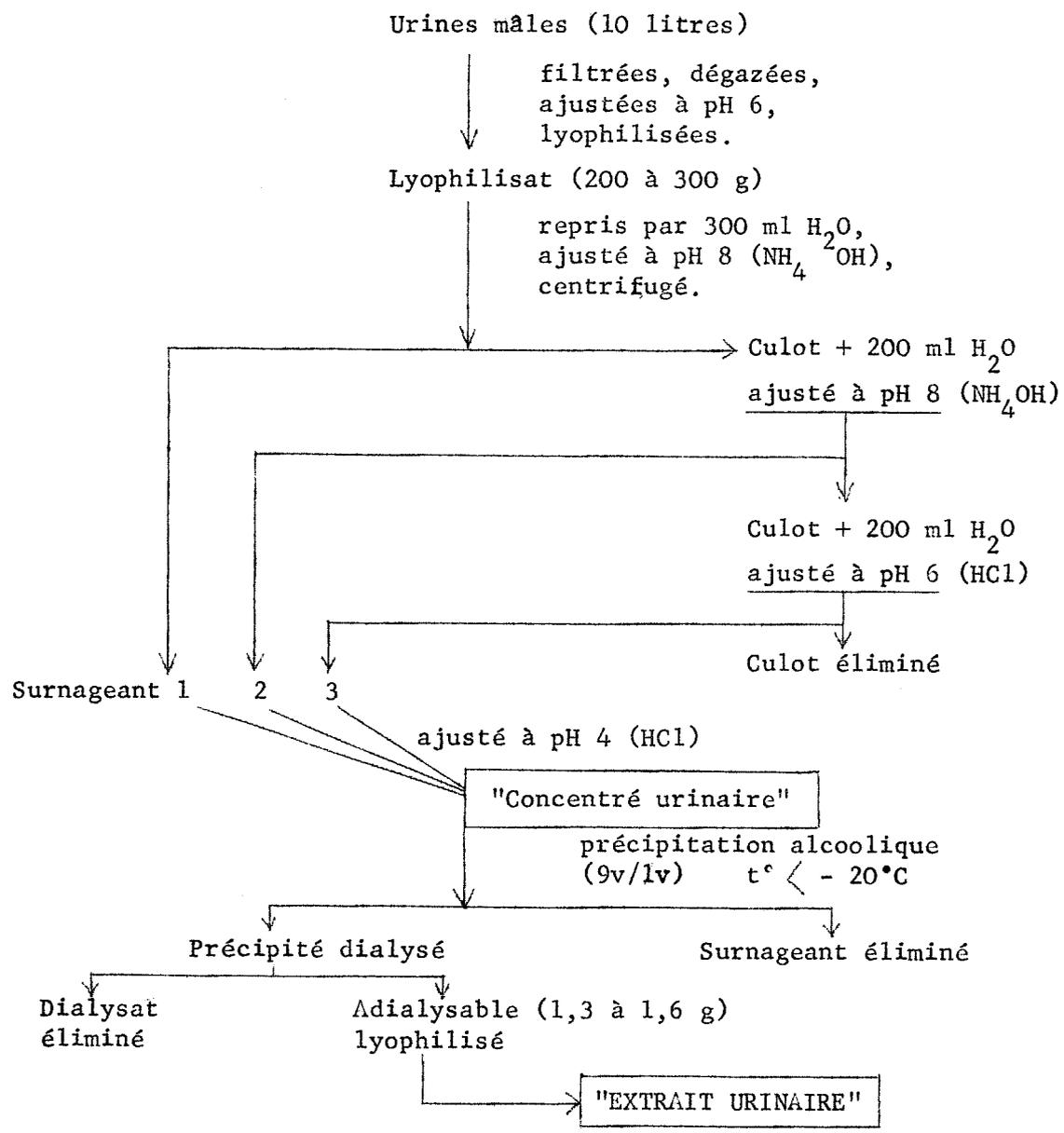


Figure 22

Préparation de "l'extrait urinaire"

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DOWEX 1 x 4
--

Le but de la manipulation est de fractionner le mélange complexe qui représente "l'extrait urinaire", en fixant plus ou moins les composés acides, sur une résine échangeuse d'anions : le DOWEX 1 x 4, 200-400 "mesh", sous la forme formiate déjà préconisée par MONTREUIL et al. en 1961 (381).

I - MATERIEL ET METHODES

A - PREPARATION DE LA SOLUTION "D'EXTRAIT URINAIRE"

"L'extrait urinaire" correspondant à 10 litres d'urine (soit 1,3 à 1,6 g de poudre brune) est repris par un minimum d'eau distillée, ajusté à pH 8,7 et centrifugé.

B - PREPARATION DES COLONNES DE CHROMATOGRAPHIE

1° - REGENERATION DE LA RESINE

La résine DOWEX 1 x 4 est une résine échangeuse d'anions, c'est à dire qu'elle fixe les composés acides (*).

(*) Dans le cas d'une résine neuve, il est nécessaire de l'activer par le procédé suivant :

- lavage à l'eau du robinet ; laisser décanter jusqu'à ce que l'on obtienne une solution claire. Les impuretés et les résines hydrosolubles sont alors éliminées.

- lavage à l'acétone qui a pour but de dissoudre les fragments faiblement hydrosolubles.

- lavage à l'éther de pétrole qui enlève les fractions non matérialisées de résine.

- puis lavage à nouveau à l'acétone, à l'éther de pétrole et à l'eau du robinet.

Elle est régénérée d'abord en bécher, puis en colonne, par 5 ou 6 cycles de régénération en utilisant successivement :

- soude 3 N
- eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre
- acide formique pur
- eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre

La résine est alors prête à servir, mais toutefois, dans un délai limité.

2° - CONFECTION DES COLONNES

Nous utilisons des colonnes de 100 x 5 cm. L'extrémité inférieure de la colonne est fermée par un tampon de laine de verre et recouvert d'une fine couche de "ballotine" (*) de telle façon que le volume mort soit le plus petit possible.

Le remplissage se fait très progressivement, sous l'action d'un agitateur mécanique qui régularise le tassage de la résine.

Un nouveau cycle de régénération est effectué en colonne, puis cette dernière est stabilisée en chambre froide à + 4°C, au moins 24 heures avant l'emploi.

II - FRACTIONNEMENT DE "L'EXTRAIT URINAIRE" TOTAL

A - MODE OPERATOIRE

1°- CHROMATOGRAPHIE

"L'extrait urinaire" repris par 20 ml d'eau distillée, est injecté au sommet de la colonne de résine, au moyen d'une seringue munie d'un d'un morceau de téflon. La densité plus élevée de la solution permet un dépôt à la surface de la résine sans qu'il soit nécessaire de vider le tampon qui se trouve au dessus de la résine.

Le dépôt doit être fait en une couche très fine, pour éviter la dispersion pendant la chromatographie.

(*)"ballotine" : petites billes de verre.

Une pompe péristaltique permet de régler le débit de la colonne à 60 ml/h.

Un collecteur automatique de fractions Technicon recueille des fractions de 20 ml par tube.

Le fractionnement a lieu en chambre froide pour éviter toute fermentation et surtout la dénaturation des glycoprotides par l'acide chlorhydrique, à température ordinaire.

L'élution est réalisée successivement par :

- l'eau distillée (1 à 2 litres)
- l'acide chlorhydrique 0,1 N (5 litres)
- l'acide chlorhydrique 3 N (1,5 litre) ; il doit décrocher tous les composés les plus acides qui peuvent être retenus sur la résine. Toutes ces fractions sont dialysées contre l'eau distillée (1 à 3 jours pour la fraction neutre et les fractions éluées par HCl 0,1 N, une semaine pour la fraction éluée par HCl 3 N), puis lyophilisées.

2°- ETUDE DES PROPRIETES DES FRACTIONS

Toutes les fractions ont été étudiées du point de vue de leur composition centésimale et molaire en glucides. L'étude immuno-électrophorétique et électrophorétique a été, en outre, effectuée systématiquement sur toutes les fractions. Les méthodes employées sont décrites aux pages 51. à 55.

B - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans les figures 23 (p. 84), 24 (p. 89), 25 (p. 90), 26 (p. 92) et 27 (p. 93) et les tableaux XVII (p. 86) et XVIII (p. 88). Ils peuvent se résumer de la manière suivante :

1°- CHROMATOGRAPHIE

Le profil de l'élution est donné par la figure 23 (p. 84). L'élution par l'eau fournit une fraction unique : F.N.

L'acide chlorhydrique 0,1 N décroche successivement sept fractions, matérialisées sur la colonne de résine par des anneaux colorés qui

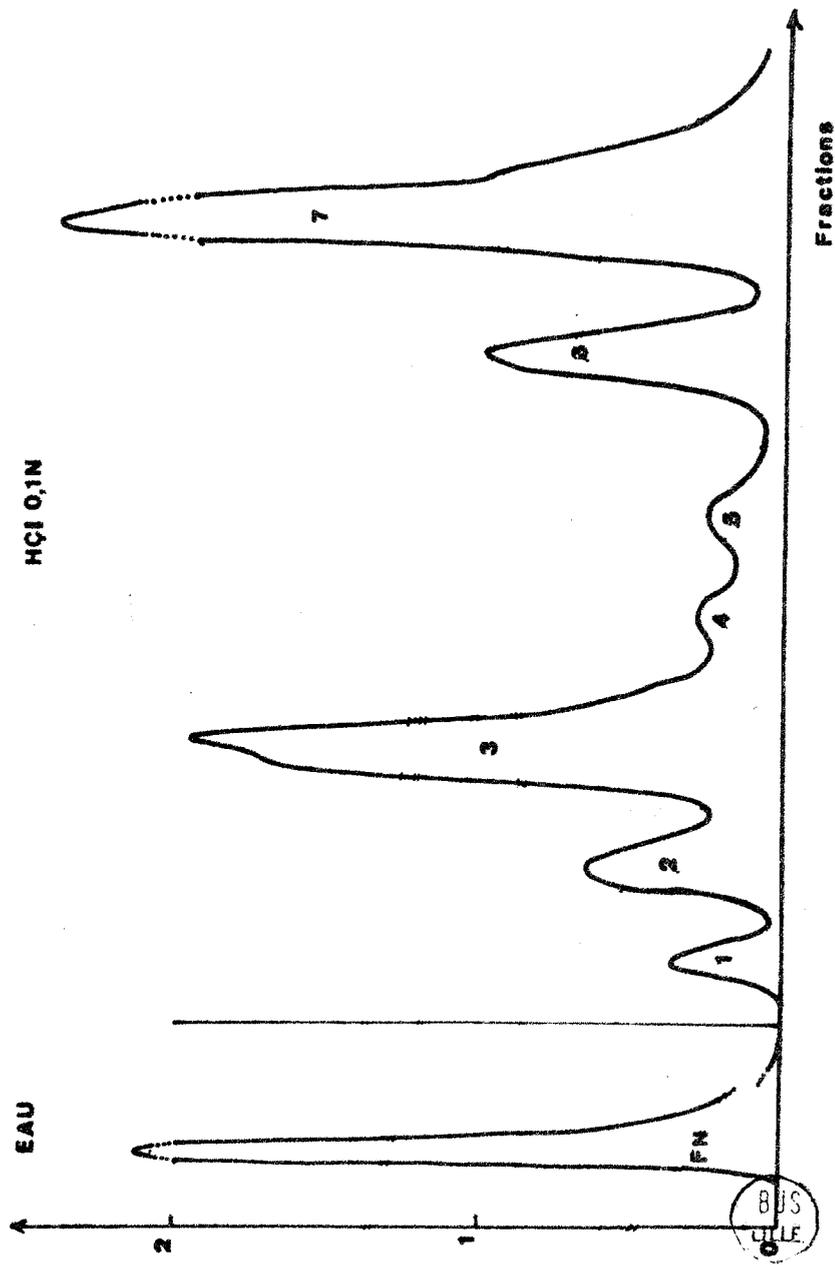


Figure 23

Chromatographie sur colonne (100 x 5 cm) de DOWEX 1 x 4 ("mesh" 200-400 ; forme formiate) de "l'extrait urinaire". Elution par l'eau, puis par HCl 0,1 N. En abscisses : nombre de tubes ; en ordonnées : absorbance à 278 m μ .

se déplacent et sont élués. Après repérage en UV, à 278 m μ , on sépare les pics : P₁, P₂, P₃, P₄ et P₅ (très peu abondants), P₆ et P₇.

L'acide chlorhydrique HCl 3 N nous fournit une fraction :
la fraction F₃N.

Il est toutefois impossible d'éluier toute la coloration brune fixée sur le dessus de la résine. Cette coloration serait due à des pigments urinaires fixés irréversiblement sur la résine. La chromatographie fournit ces fractions dans des proportions indiquées dans le tableau XVII (p. 78). Les pics 4 et 5 fournissent de très petites quantités de produits et le pic 6 a été identifié à l'acide urique. La fraction neutre, la fraction P₃, la fraction P₇ et la fraction F₃N sont pondéralement les plus abondantes.

2°- COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES DES DIFFERENTES FRACTIONS

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XVII (p. 86).

a - La fraction neutre. La présence d'une proportion importante de glucides totaux dans la fraction neutre peut s'expliquer par la présence de glucides libres provenant d'une dialyse incomplète.

b - La fraction P₁, la fraction P₂ et la fraction P₃ n'offrent pas de propriétés particulières. Leur composition en glucides n'a rien de caractéristique. Néanmoins, les fractions P₁, P₂ et P₃ possèdent des acides uroniques et des acides sialiques, ce qui explique qu'elles soient plus retenues sur la résine que la fraction neutre.

c - Le pic 7, par contre, a attiré notre attention. En effet, il représente 30 à 40 p.100 des protéides totaux : c'est le pic majeur. Il est très riche en glucides totaux (60 p.100) parmi lesquels prédomine l'acide sialique et il renferme 2,5 p.100 d'acides uroniques.

d - La fraction 3 N est riche en osamines, en acide sialique et surtout en acides uroniques. Ce qui explique qu'elle ne soit "décrochée" que par l'acide chlorhydrique 3 N.

Tableau XVII

Composition centésimale en oses des fractions obtenues par chromatographie des uromucoïdes sur DOWEX 1 x 4.

	Poids des fractions (a)	Glucides totaux p.100	Oses neutres p.100	Acides uroniques p.100 (e)	Acide sialique p.100 (c)	Osamines p.100 (d)	Oses neutres <hr/> Acide sialique	Oses neutres <hr/> Osamines	Oses neutres <hr/> Acides uroniques
FN	10 mg	43,16	22,56	traces	6,60	12,48	3,4	1,8	-
P ₁	4 mg	13,21	5,72	0,86	3,50	1,6	1,6	3,5	6,65
P ₂	8 mg	19,56	9,08	0,66	4,70	3,9	1,9	2,3	13,7
P ₃	15 mg	31,69	13,97	0,81	9,04	7,4	1,5	1,9	18,2
P ₇	20 mg	60,60	24,07	2,41	17,69	16,1	1,3	1,5	10
F _{3N}	15 mg	42,57	11,81	9,93	9,25	10,8	1,2	1,2	1,1

a) par litre d'urine

b) valeurs calculées

c) acide N-acétyl-neuraminique

d) glucosamine + galactosamine

e) acide glycuronique + acide iduronique

3°- COMPOSITION MOLAIRES DES OSES DES DIFFÉRENTES FRACTIONS

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XVIII (p. 88) et les figures 24 (p.89) et 25 (p.90).

a - Les oses "neutres".

- Toutes les fractions contiennent du galactose, du glucose, du mannose, du fucose ;

- seule la fraction $F_3 N$ contient du xylose (il existe également en traces dans la fraction P_7).

b - Les acides uroniques. La fraction 3 N contient de l'acide iduronique que nous avons identifié par chromatographie sur papier, dans les hydrolysats chlorhydriques dans le système-solvant : acétate d'éthyle/ acide acétique/eau (9:2:2) de SIDDIQUI et PURVES (382).

c - L'acide sialique. L'acide N-acétyl-neuraminique est présent dans toutes les fractions en proportion croissante à partir de la fraction FN jusqu'à la fraction $F_3 N$.

d - Les osamines. Le rapport molaire des osamines montre que la glucosamine est généralement plus abondante que la galactosamine sauf dans la fraction $F_3 N$ où le rapport n'est plus que de 1,5.

4°- ETUDE ELECTROPHORETIQUE

a - La fraction neutre FN est très hétérogène à l'électrophorèse sur papier (*).

b - Les fractions P_1, P_2, P_3 n'ont pas retenu notre attention.

c - La fraction P_7 se sépare en électrophorèse sur acétate de

(*) Electrophorèse sur papier Whatman n°1 dans un tampon véronal pH 8,2, 3 V/cm ; durée de l'électrophorèse : 18 heures ; révélation par le réactif à l'amidoschwarz.

Tableau XVIII

Rapports molaires (pour 10 résidus de galactose) des oses, osamines, acide sialique et acides uroniques dans les différentes fractions obtenues par chromatographie des uromucoïdes sur DOWEX 1 x 4.

	Oses neutres (a) (b)					Osamines (b) (c)			Acide sialique	Acides uroniques
	Gal	Glc	Man	Fuc	Xyl	GalNH ₂	GlcNH ₂	$\frac{\text{GlcNH}_2}{\text{GalNH}_2}$		
FN	10	traces	5	7,5	-	2,51	10	4	3,5	traces
P ₁	10	-	6,6	3,3	-	2	8	4	5	2
P ₂	10	-	10	5	-	3	12	4	7	traces
P ₃	10	-	6,6	3,3	traces	3,5	8	2,3	8	traces
P ₇	10	-	6	1,6	traces	2,5	10	4	7	2
F _{3N}	10	-	6	-	5	8	12	1,5	9	16

(a) Dosés par chromatographie quantitative sur papier

(b) Gal : galactose ; Glc : glucose ; Fuc : fucose ; Xyl : xylose ; Man : mannose ; GalNH₂ : galactosamine ; GlcNH₂ : glucosamine

(c) Identifiées par la méthode de désamination oxydative à la ninhydrine de GARDELL et coll. et dosées par le procédé colorimétrique de LUDOWIEG et BENMAMAN (383).

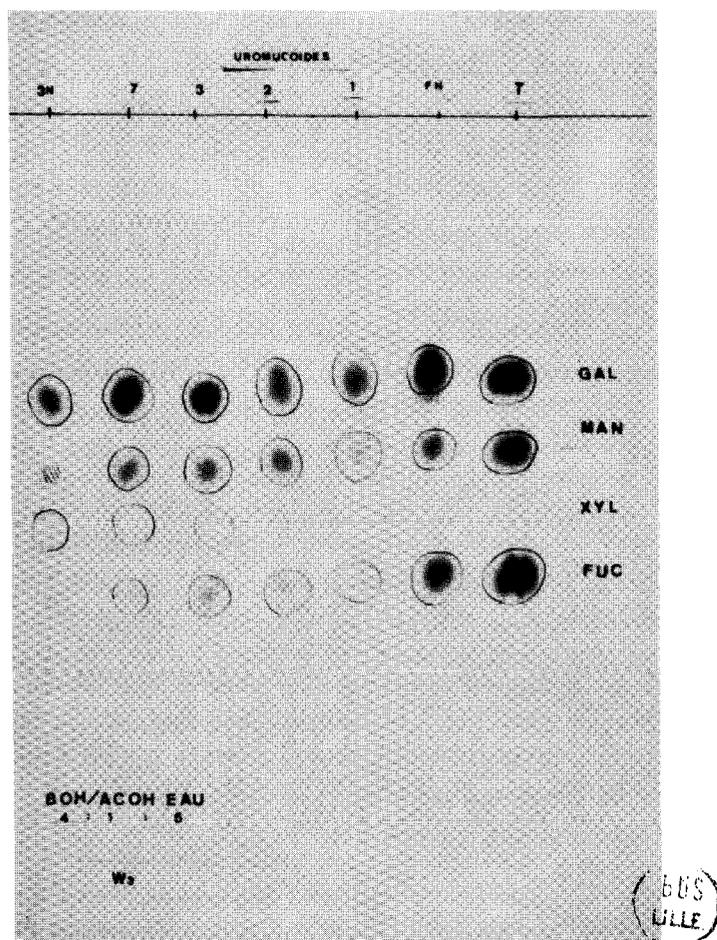


Figure 24

Chromatographie sur papier des oses neutres des hydrolysats des fractions obtenues par chromatographie sur DOWEX 1 x 4 de "l'extrait urinaire" ; système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) ; papier Whatman n°3 ; durée de la chromatographie : 72 h ; révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline ; T : témoins oses ; Gal : galactose ; Man : Mannose ; Xyl : xylose.

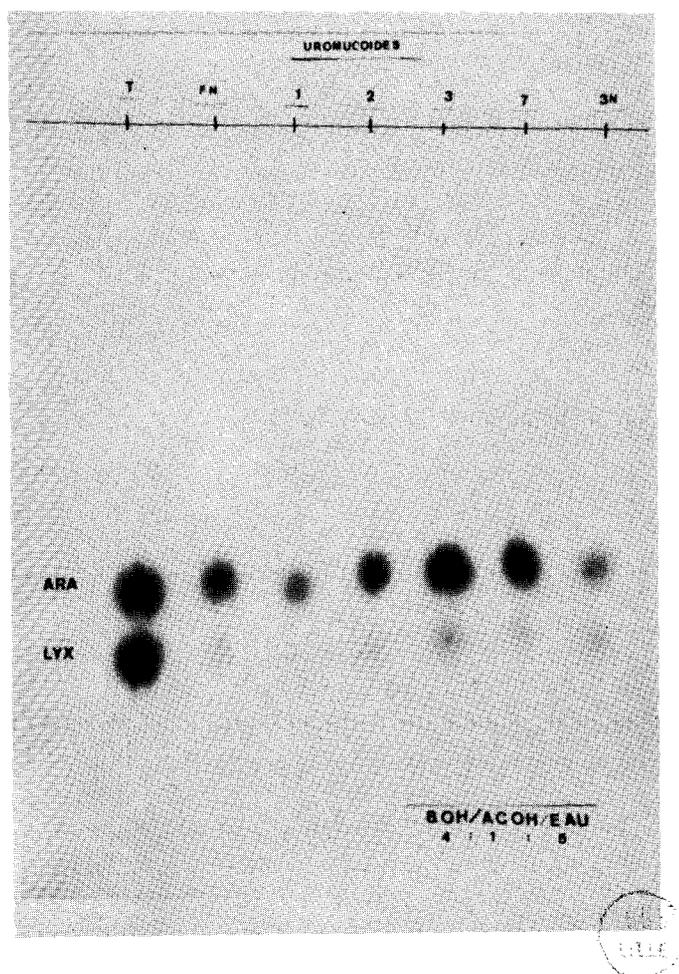


Figure 25

Identification des osamines dans les fractions obtenues par chromatographie sur DOWEX 1 x 4 de "l'extrait urinaire" par la méthode de désamination oxydative de GARDELL et al. ; système-solvant ; n-butanol/acide acétique/eau (4:1:5) ; papier Whatman n°3 ; durée de la chromatographie : 72 h ; révélation au réactif à l'oxalate d'aniline ; ARA : arabinose ; LYX : lyxose ; T : témoins oses.

cellulose en 3 constituants protéidiques révélés par le réactif à l'amidoschwarz et en 6 constituants révélés par le réactif au bleu alcian (Fig. 26 ; p. 92). Il peut s'agir autant de mucopolysaccharides acides (glycosamino-glucurono glycanes) que de glycopeptides très acides puisque le bleu alcian n'est pas un réactif spécifique des mucopolysaccharides acides mais un réactif général des composés très acides.

d - La fraction F₃N est très intéressante et révèle au bleu alcian 3 bandes ayant le comportement électrophorétique de l'acide chondroïtine sulfurique A ou C (composé majeur), de l'acide chondroïtine sulfurique B et de l'acide hyaluronique. En outre, trois bandes n'ont pas encore été identifiées (Fig. 26 ; p. 92).

5°- ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE

Les résultats sont illustrés par la figure 27 (p 93) :

a - Les fractions neutre, P₁, P₂ et P₃ sont très hétérogènes. La première est très riche en protéides sériques identiques à ceux qui ont été identifiés dans l'analyse des urines totales par BERGGARD (385).

b - La fraction P₇ révèle seulement l'existence de 5 constituants antigéniques.

c - La fraction F₃N est également assez simple du point de vue immunologique.

C - DISCUSSION

1°- La fraction neutre n'a pas été retenue à cause de sa grande hétérogénéité et de sa richesse en protéides sériques dont l'analyse est effectuée d'une manière poussée dans d'autres laboratoires.

2°- Les fractions P₁, P₂ et P₃ ne présentent pour nous aucun intérêt pour le moment.

3°- La fraction P₇ : sa forte proportion en glucides totaux et sa simplicité immuno-électrophorétique nous ont incitée à entreprendre le sous-fractionnement du pic 7.

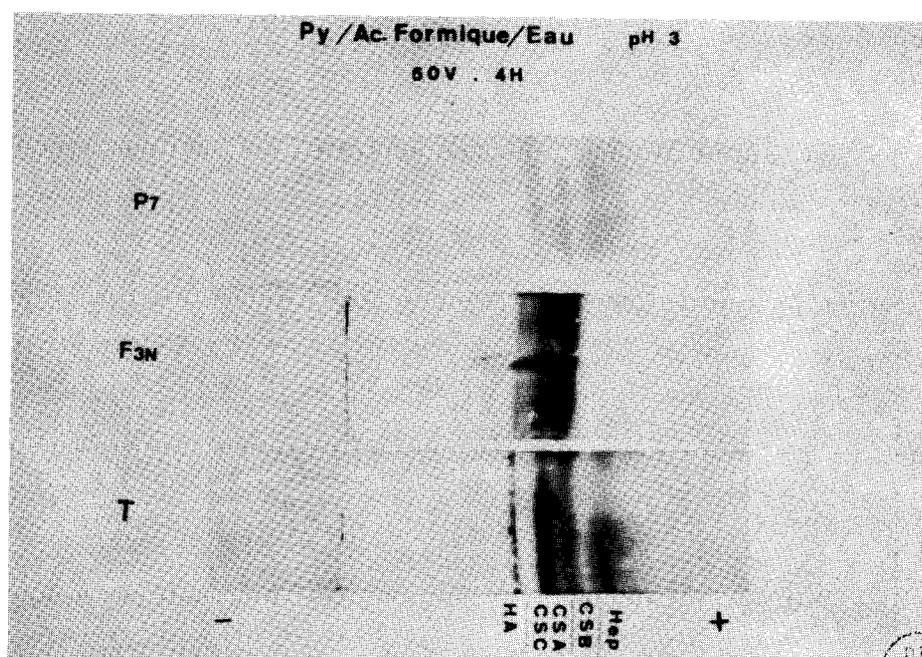


Figure 26

Electrophorèse sur acétate de cellulose des fractions P₇ et F_{3N} obtenues par chromatographie sur colonne de DOWEX 1 x 4⁷ dans un tampon pyridine/acide formique/eau (1:2:46) de pH 3 ; tension de 3 V/cm ; durée de l'électrophorèse : 4 heures ; révélation par le réactif au bleu alcian ; T : témoins mucopolysaccharides acides ; HA : acide hyaluronique ; CS A et CS C : acides chondroïtines sulfuriques A et C ; CBS : acide chondroïtine sulfurique B ; Hep : héparine.

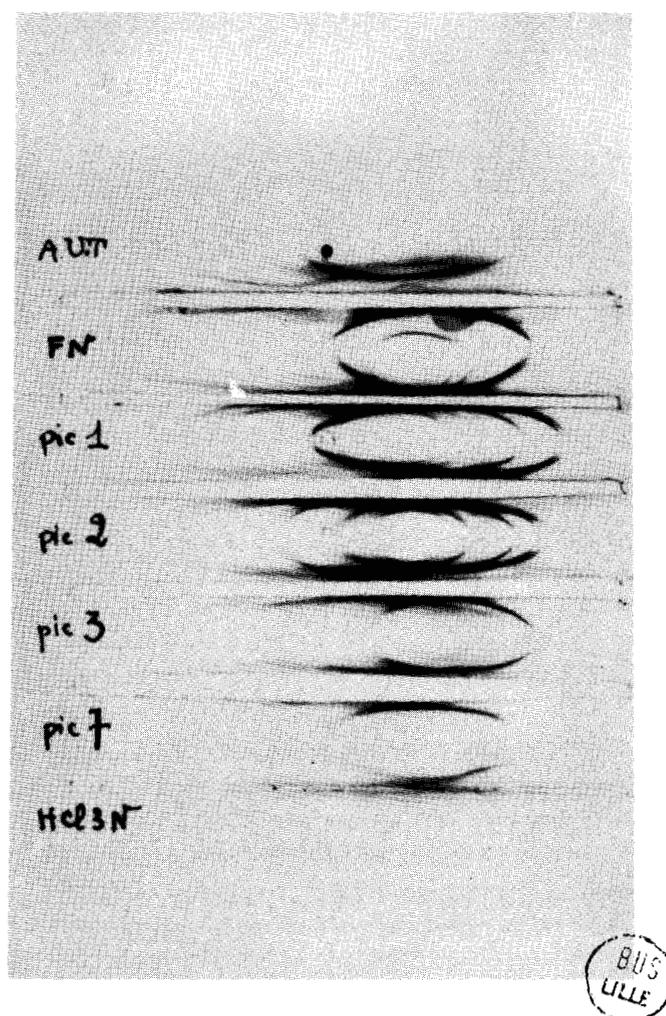


Figure 27

Immuno-électrophorèse des fractions obtenues par chromatographie de "l'extrait urinaire" sur colonnes de DOWEX 1 x 4.

4°- La fraction F₃N: Plusieurs particularités ont attiré notre attention :

a - elle contient du xylose

b - de l'acide iduronique a été mis en évidence

c - des composés acides de même comportement électrophorétique que l'acide chondroïtine sulfurique A ou C, de l'acide chondroïtine sulfurique B et de l'acide hyaluronique.

Il apparaît donc que la présence d'acide iduronique confirme l'existence de l'acide chondroïtine sulfurique B.

D'autre part, cette fraction est la plus acide et renferme une proportion élevée de mucopolysides, ce qui explique la présence de xylose conjugué. On sait, en effet, depuis les travaux de RODEN (386, 387) que la séquence terminale des oses qui rattache les mucopolysides acides aux résidus de sérine de la fraction protidique est la suivante :
galactose → galactose → xylose.

La question du xylose urinaire conjugué aux glycoprotéines urinaires se trouvent alors résolue. On avait longtemps pensé qu'il s'agissait du xylose provenant des membranes de cellophane utilisées pour la dialyse, mais des travaux entrepris au Laboratoire avaient démontré qu'il entrerait dans la composition des uromucoïdes.

Nos résultats confirment donc son origine mucopolysaccharidique.

La fraction F₃N renferme outre 20 à 30 p.100 des mucopolysides acides purs, d'autres glycoprotides.

D - CONCLUSIONS

A la suite de l'étude de ces différentes fractions, il paraît intéressant de pousser plus loin l'étude de la fraction P₇ et d'éliminer, pour le moment, l'étude plus approfondie de la fraction FN, des pics P₁, P₂, P₃ et de la fraction F₃N dont les compositions sont très complexes.

La chromatographie sur colonne de Dowex 1 x 4 de "l'extrait urinaire" nous a, en outre, permis d'élucider la question du xylose urinaire contenu en grande partie dans la F₃N.

La poursuite de nos recherches sur la fraction Pic ₇ nous a

amenée, dans un premier temps, à chercher à isoler les différents constituants présents dans cette fraction.

III - SOUS-FRACTIONNEMENT DU PIC 7

Le but du fractionnement du pic 7, de composition relativement simple est d'essayer d'obtenir des fractions représentant des entités bien définies dont il serait aisé d'entreprendre l'étude de la structure par la suite.

Nous avons essayé de nombreux procédés :

- Chromatographie préparative
 - sur gels de dextrans (Sephadex)
 - sur DEAE-cellulose
 - sur DEAE-Sephadex
 - sur ECTEOLA-cellulose
- Electrophorèse préparative en film liquide

A - CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE

1°- CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR SEPHADEX

Nous avons appliqué au Pic 7 la chromatographie de gel filtration sur différents Sephadex : Sephadex G-50, G-75, G-100 et G-200. Il s'agit d'un "tamisage moléculaire" réalisé par des gels réticulés de dextrans. Les mélanges de substances de poids moléculaires différents sont fractionnés de telle manière que les composés se présentent à la sortie de la colonne dans l'ordre des poids moléculaires décroissants.

a - Mode opératoire.

Nous avons utilisé des Sephadex fabriqués par les laboratoires "Pharmacia" UPPSALA.

Les Sephadex sont mis à gonfler dans un grand volume de tampon, sous agitation magnétique, à la température du laboratoire. Le gel est ensuite laissé au repos, le surnageant est éliminé après décantation. Plusieurs décantations sont nécessaires.

La colonne (50 x 2,5 cm) est remplie de tampon jusqu'à mi-hauteur. Le gel dégazé est versé, avec précaution, le long d'une tige de verre. On laisse sédimenter 12 heures puis on règle la colonne au débit choisi pour la chromatographie.

Le tampon utilisé est l'acétate de sodium 0,01 M de pH 4,6.

Des quantités de l'ordre de 200 mg du Pic₇, dissoutes dans le tampon d'élution ont été soumises à la gel filtration, sur différentes colonnes de Sephadex (G-50, G-75, G-100 et G-200).

b - Résultats.

Nous n'avons obtenu aucun résultat valable. En effet, chaque chromatographie fournit plusieurs fractions. Chacune de ces fractions, recyclée sur une colonne de Sephadex de même nature, redonne de nouvelles fractions.

L'étude immuno-électrophorétique de ces différentes fractions montre un nombre croissant d'arcs. Cette "dépolymérisation" provient vraisemblablement d'artefacts dus aux liaisons que contractent les glycoprotides riches en sucres avec les gels de dextrans.

c - Conclusions.

La filtration sur gel de dextrane est donc inapplicable à l'isolement des constituants du Pic₇.

2°- CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE

La présence, dans le Pic₇, de glycoprotides très acides, nous laissait espérer que la chromatographie sur échangeurs d'anions nous permettrait d'obtenir de bons fractionnements de l'ensemble des constituants du Pic₇.

a - Mode opératoire.

La DEAE-cellulose est une cellulose modifiée, échangeuse d'anions.;

Elle est régénérée en bécher par de la soude 0,5 N, lavée à l'eau distillée, puis, avec le tampon de départ, enfin dégazée. La colonne est montée, puis la DEAE-cellulose est lavée et stabilisée en chambre froide à 4°C, avec le tampon de départ.

Le fractionnement est effectué sur des quantités de l'ordre du gramme de Pic₇, en solution dans 10 ml du tampon de départ.

Les colonnes (2,5 x 45 cm) de cellulose sont éluées par un tampon phosphate de sodium 0,005 M de pH 8, puis par un gradient discontinu de carbonate d'ammonium à 0,5, 4 et 16 p.100.

Des fractions de 10 ml sont recueillies au collecteur automatique de fractions et sont passées en UV, à 278 m μ .

b - Résultats.

Nous avons rassemblé dans le Tableau XIX (p. 98) les résultats que nous a fourni l'étude en glucides des fractions obtenues. Les rendements sont peu satisfaisants et, d'autre part, le carbonate d'ammonium se révèle être un agent d'éluion dénaturant.

c - Conclusions.

Nous abandonnons définitivement le fractionnement du Pic₇ sur DEAE-cellulose car le caractère très acide de ses constituants provoque un échange irréversible sur l'échangeur d'anions.

3°- CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-SEPHADEX

Entre temps, ANDERSON (388) avait proposé un fractionnement de glycoprotéides urinaires sur DEAE-Sephadex. Nous avons appliqué cette méthode pour essayer de fractionner les constituants du Pic₇.

a - Mode opératoire.

La DEAE-Sephadex A-50 est fournie par les laboratoires "Pharmacia" (UPPSALA, Suède). Les colonnes de 25 x 2,5 cm sont entourées d'un manchon réfrigérant.

La DEAE-Sephadex, après lavage à l'eau distillée, est traitée par HCl 0,5 N, sur verre fritté, puis rincée à l'eau distillée ; enfin, elle est lavée à la soude 0,5 N puis à l'eau distillée jusqu'au retour à la neutralité.

Elle est équilibrée ensuite avec le tampon de départ.

Après tassement de la colonne, on dépose au sommet environ 1 g de Pic₇ dissous dans le tampon de départ : phosphate de sodium 0,02 M, pH 6,7.

Tableau XIX

Rendement et composition centésimale en glucides des fractions obtenues par chromatographie du pic₇ (1 g) sur colonne de DEAE-cellulose.

Fractions	Agent d'élution	Poids obtenus (en mg)	Osés neutres p.100	Osamines p.100	Acides sialiques p.100	Acides uroniques p.100
1	Phosphate 0,005 M pH 8	70,4	29,3	19,5	22,2	0,3
2	Carbonate d'ammonium 0,5 p.100	104	29,1	20,2	22	0,45
3	Carbonate d'ammonium 4 p.100	138	12,3	7,6	17,7	8

L'élution est pratiquée en gradient discontinu, de molarité croissante et de pH décroissant.

- phosphate de sodium	0,02 M	;	pH 6,7
- phosphate de sodium	0,02 M	;	pH 6,7, NaCl 0,1 M
- phosphate de sodium	0,02 M	;	pH 6,7, NaCl 0,2 M
- phosphate de sodium	0,02 M	;	pH 6,7, NaCl 0,4 M
- phosphate de sodium	0,02 M	;	pH 6,7, NaCl 0,6 M
- phosphate de sodium	0,02 M	;	pH 6,7, NaCl 1 M
- phosphate de sodium	0,02 M	;	pH 6,7, NaCl 3 M

b - Résultats.

Nos résultats sont rapportés dans le Tableau XX

(p. 100). Nous observons que :

α - chaque tampon donne une fraction différente. Les deux premières sont incolores, tandis que les autres sont colorées. Le maximum de coloration est obtenu pour la fraction 4 éluee par le tampon phosphate 0,02 M, pH 6,7, renfermant du chlorure de sodium 0,4 M.

β - chacune des fractions obtenues est hétérogène en immuno-électrophorèse.

γ - les compositions en glucides de ces fractions sont très différentes les unes des autres. Certaines, en particulier (fraction 1 et 2), ne renferment pas d'acides uroniques, d'autres, au contraire, en possèdent une proportion importante et fournissent 1 ou 2 bandes révélables par le bleu alcian, en électrophorèse sur acétate de cellulose. Elles contiennent donc des mucopolysaccharides acides.

δ - seulement 40 p.100 environ des glycoprotides sont récupérés. Une proportion importante de ceux-ci demeure donc fixée sur l'échangeur d'anions, comme dans le cas de la DEAE-cellulose.

c - Conclusions.

α - l'utilisation de la DEAE-Sephadex nous a permis de démontrer que le Pic₇ est très hétérogène, en dépit de ce que

Tableau XX

Rendement et composition centésimale et molaire des glucides des fractions obtenues par chromatographie du pic 7 (1 g sur colonne de DEAE-sephadex).

Fractions (a)	Poids en mg	Oses "neutres" p.100	Acides uroniques p.100	Acide. sialique p.100	Osamines p.100	Oses Acide sialique	Oses Osamines	Arcs (b)	B.A. (c)	Gal (d)	Man (d)	Fuc (d)
1	61	34,2	0	21,1	22,1	1,6	1,6	0	0	10	10	3
2	183	35,2	0	25	23,6	1,4	1,5	0	0	10	5	5
3	41	37,3	2,6	21	24,2	1,7	1,5	3	0	10	7	3
4	78	19,4	11,6	15,7	13,4	1,2	1,4	4	1	-	-	-
5	14	13,8	7	11,8	7,4	1,2	2	4	2	-	-	-
6	5	15,7	4,6	-	-	-	-	2	2	-	-	-
7	1	7,7	2,5	-	-	-	-	0	-	-	-	-

(a) Phosphate 0,02 M, pH 6,7 (fraction 1), additionné de NaCl 0,1 M (fraction 2) ; NaCl 0,2 M (fraction 3) ; NaCl 0,4 M (fraction 4),; NaCl 0,6 M (fraction 5) ; NaCl 1 M (fraction 6) ; NaCl 3 M (fraction 7).

(b) Nombre d'arcs en immuno-électrophorèse.

(c) Nombre de bandes obtenues après révélation par le réactif au bleu alcian, des électrophorégrammes sur acétate de cellulose.

(d) Gal : galactose ; Man : mannose ; Fuc : fucose.

nous pensions. Nous pouvons estimer à 4 ou 5 au moins, le nombre de glycoprotides qui le composent, car il convient de leur ajouter ceux qui sont fixés irréversiblement sur la colonne de DEAE-Sephadex.

De plus, des mucopolysaccharides acides accompagnent ces composés.

β - les fractions 1 et 2 sont intéressantes :

- elles représentent pondéralement 60 p.100 des glycoprotides élués ;

- elles sont dépourvues d'acides uroniques et sont incolores ;

- elles sont très riches en glucides puisque ceux-ci représentent 75 à 85 p.100 de ces fractions ; d'autre part, elles ne sont pas antigéniques ;

- elles possèdent la composition en glucides des glycoprotéines de type sérique.

L'étude clinique plus poussée de ces deux fractions, qui représentent, d'après nos calculs, 10 p.100 des glucides adialysables totaux, nous paraît intéressante à effectuer.

Il conviendrait d'étudier en particulier, leur composition en acides aminés et la nature du point d'attache glucide-protide, qui sont susceptibles de préciser leur origine de glycoprotéides sériques (liaison exclusivement asparaginyglucosamine) ou de glycoprotéides d'excrétion (présence de liaisons O-glycosidiques).

4°- CHROMATOGRAPHIE SUR ECTEOLA-CELLULOSE

Parallèlement aux fractionnements précédents, nous avons tenté d'isoler des entités définies à l'aide de la chromatographie sur ECTEOLA-cellulose, qui est un échangeur d'anions préconisé par ANSETH et LAURENT (389) et, plus récemment, par ANTONOPOULOS et al. (390).

a - Mode opératoire.

La poudre commerciale d'ECTEOLA-cellulose (SERVA) est mélangée à l'acide chlorhydrique 2 N (environ 1 litre pour 50 g de

poudre) puis elle est lavée à l'eau distillée sur Buchner jusqu'à ce que l'effluent soit neutre. L'ECTEOLA-cellulose mise en colonne est ensuite équilibrée avec le tampon de départ, puis stabilisée en chambre froide à + 4°C. 200 mg de Pic₇ dissous dans l'eau distillée sont chromatographiés sur une colonne (20 x 2 cm) d'ECTEOLA-cellulose.

Les tampons d'élution utilisés sont ceux préconisés par ANTONOPOULOS et al. (391) :

- eau distillée
- acide chlorhydrique 0,02 M
- formiate d'ammonium 1 M dans l'ammoniaque 0,1 N
- " " 1,75 M "
- " " 2 M "
- " " 2,5 M "
- chlorure de sodium 2 M

Le débit de la colonne est assez lent (30 ml/h) et des fractions de 10 ml sont recueillies sur un collecteur automatique de fractions.

b - Résultats.

L'étude immuno-électrophorétique des fractions dont les résultats sont rassemblés dans le Tableau XXI (p. 103) ainsi que l'étude électrophorétique en acétate de cellulose, en tampon pyridine/acide formique/eau de pH 3, confirme l'hétérogénéité des fractions obtenues.

c - Conclusion.

Nous n'avons pas retenu ce fractionnement en raison de l'hétérogénéité même de toutes les fractions obtenues.

B - ELECTROPHORESE PREPARATIVE

Nous avons tenté de fractionner le Pic₇ par électrophorèse préparative en film liquide effectuée avec l'appareil Elphor-Vap II.

1°- MODE OPERATOIRE

Des quantités de 100 mg de Pic₇ ont été soumises à l'électrophorèse préparative dans les conditions suivantes :

Tableau XXI

Fractionnement des constituants du Pic₇
par chromatographie sur ECTEOLA-cellulose.

Agents d'élution	Nombre d'arcs en immuno-électrophorèse
H ₂ O	2
HCl 0,02 M	2
Formiate d'ammonium 1 M	3
Formiate d'ammonium 1,75 M	2
Formiate d'ammonium 2 M	0
Formiate d'ammonium 2,5 M	6
NaCl 2 M	0

- solution tamponnée à pH 8,6 de Tris (0,08 M) acide citrique 0,008 M ;
- solution tampon : pyridine/acide acétique/eau à pH 3,9 ;
- tension 2400 volts, 100 mA ;
- température : 6°C ;
- débit : 100 ml/h
- vitesse d'injection : 2 ml/h au niveau 2. L'étude de la densité optique des 48 fractions séparées est mesurée à 278 m μ . Les oses neutres et les acides uroniques sont dosés respectivement par la méthode à l'orcinol sulfurique et au carbazol sulfurique.

2° - RESULTATS ET CONCLUSIONS

Aucun résultat intéressant n'a été obtenu car les fractions sont très mal individualisées et demeurent très hétérogènes à l'immuno-électrophorèse.

C - CONCLUSIONS

De toutes les méthodes de sous-fractionnement décrites précédemment nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1 - Toutes les fractions séparées, soit par chromatographie sur échangeurs d'ions, ou par électrophorèse préparative, sont très hétérogènes, quant à leur composition en glucides et à leur composition immuno-électrophorétique ;

2) Il apparaît que le Pic₇ est plus hétérogène que nous ne le pensions ;

3) Toutefois, le sous-fractionnement sur DEAE-Sephadex a permis d'isoler 2 fractions intéressantes, les fractions 1 et 2 qui possèdent les caractéristiques suivantes ;

a) elles sont pondéralement importantes (60 p.100 de glycoprotides élués) ;

b) elles ne possèdent pas d'acides uroniques ;

c) elles sont très riches en glucides et ne sont pas antigéniques ;

d) elles possèdent la composition en glucides des glycoprotéines sériques.

IV - CONCLUSIONS CONCERNANT LA CHROMATOGRAPHIE
SUR COLONNE DE DOWEX 1 x 4 DES GLYCOPROTIDES URINAIRES

1°- La chromatographie sur colonne de DOWEX 1 x 4 nous a permis de mettre un terme final à la question du xylose urinaire en prouvant que sa présence était de nature mucopolysaccharidique.

2°- La chromatographie sur colonne de DOWEX 1 x 4 nous semble peu satisfaisante. Elle nous fournit des fractions très hétérogènes et même le Pic₇, qui nous semblait intéressant, s'est révélé très complexe. Il renferme, outre les mucopolysaccharides acides, au moins 5 entités glycoprotidiques distinctes, [que nous ne sommes pas parvenue] à séparer, à cause de leur caractère très acide qui gêne considérablement leur fractionnement sur échangeurs d'anions.

Toutefois, nous avons pu caractériser deux fractions glycopeptidiques non antigéniques, très riches en sucres, dépourvues d'acides uroniques et qui représentent 10 p.100 environ de la "fraction glycoprotidique" des urines.

FRACTIONNEMENT PAR L'ETHANOL

Nous avons décrit dans les chapitres précédents, la préparation du matériel d'étude appelé "extrait urinaire" (voir p. 64), ainsi que son fractionnement sur une colonne de résine échangeuse d'anions : le DOWEX 1 x 4 (voir p. 81).

Nous avons également entrepris de fractionner les uromucoïdes de cet "extrait urinaire" par l'éthanol, dans le but d'isoler des fractions intéressantes.

Dans ce chapitre, nous traiterons successivement :

- 1) Fractionnement de "l'extrait urinaire"
- 2) Sous-fractionnement du précipité obtenu en passant de la concentration 80 à 90 p.100 en alcool : P₉₀.

I - FRACTIONNEMENT DE "L'EXTRAIT URINAIRE" PAR L'ETHANOL

"L'extrait urinaire" a été soumis à l'action d'un gradient discontinu de concentration en éthanol, préconisé par BOURRILLON et al. (392, 393) et Mc GALE et JEVONS (394).

A - MODE OPERATOIRE

1°- FRACTIONNEMENT ALCOOLIQUE

Le "concentré urinaire" correspondant à 10 litres d'urine mâle lyophilisée est soumis à l'action d'un gradient de concentration en éthanol, à -20°C et à pH 4. Ce fractionnement est schématisé dans la figure 14 (p. 66).

Chaque fraction obtenue est dialysée trois jours contre de l'eau distillée et lyophilisée.

2°- ETUDE DES PROPRIETES DES FRACTIONS

Ces préparations sont soumises à l'analyse immuno-électrophorétique et leur composition en glucides a été établie par les méthodes

décrites précédemment p. 51 à 55.

B - RESULTATS ET DISCUSSION

1°- Toutes les préparations obtenues par précipitation alcoolique sont plus ou moins hétérogènes en immuno-électrophorèse (Fig.15 ; p.67). Seule, la fraction P₉₀ est de composition plus simple, puisqu'elle ne présente que 2 à 3 arcs de précipitation pour une solution concentrée à 20 p.100.

2°- La fraction non précipitable à l'éthanol ne renferme plus de composés antigéniques (Fig.15 ; p.67) donc tous les protéides urinaires sont précipités à pH 4, par l'éthanol à 90 p.100. La concentration de 90 p.100 en éthanol a d'ailleurs été retenue (voir p.65) pour la préparation de "l'extrait urinaire" concentré.

3°- Les résultats concernant la composition en glucides sont rassemblés dans le tableau XXII (p.108).

On constate que les fractions P₅₀ à P₈₀ ne présentent pas de propriétés particulières. Au contraire, la fraction P₉₀ est caractérisée par une teneur élevée en acides uroniques et en acide sialique.

C - CONCLUSIONS

L'éthanol à 90 p.100 précipite, à pH 4, la totalité des protéides urinaires. Ce procédé est donc une méthode de choix pour obtenir un bon matériel de départ, en vue d'effectuer le fractionnement ultérieur des glycoprotéides urinaires.

D'autre part, la fraction P₉₀ se révèle la plus intéressante du point de vue de sa composition en protéides et en glucides. Il était donc normal que nous poursuivions son étude.

II - SOUS-FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DE LA FRACTION P₉₀

L'investigation plus poussée de cette fraction a été faite grâce à la chromatographie sur colonne de DOWEX 1 x 4, dans les conditions

Tableau XXII

Composition centésimale en oses des fractions obtenues par précipitation éthanolique du "concentré urinaire".

Fractions	Poids obtenus en mg (a)	Osés "neutres" p.100	Acides uroniques p.100	Acide sialique p.100	Osamines p.100	Osés "neutres"	
						Acide sialique	Osamines
						Osés "neutres"	Acides uroniques
P ₅₀	181	11,62	4,80	9	9,85	1,29	2,42
P ₇₀	120	19,91	2,58	11,44	12,63	1,74	7,7
P ₈₀	121,5	17,25	3,01	12,18	11,86	1,41	5,73
P ₉₀	77,4	12,30	7,73	12,56	6,52	1	1,6

(a) à partir de "l'extrait urinaire" correspondant à 4 litres d'urine

(b) P₆₀ est obtenu en faible quantité

décrites dans le chapitre relatif au fractionnement de "l'extrait urinaire" par chromatographie sur cette résine.

A - MODE OPERATOIRE

1°- PREPARATION DES COLONNES

La résine DOWEX 1 x 4 est préparée dans les mêmes conditions que précédemment, c'est-à-dire régénérée par la soude 3 N et l'acide formique pur (voir p. 81).

Les colonnes sont toutefois plus petites (40 x 2 cm) car le fractionnement ne concerne qu'une quantité de 300 mg de la fraction P₉₀.

2°- ELUTION DES COLONNES

Les solvants d'éluion employés sont :

- eau distillée qui donne une fraction neutre FN
- acide chlorhydrique 0,1 N
- acide chlorhydrique 1 N
- acide chlorhydrique 3 N qui donne la fraction F₃N

Le débit de la colonne est régularisé au moyen d'une pompe péristaltique et des fractions de 15 ml sont recueillies au collecteur automatique de fractions (45 ml/h) puis passées en lumière ultra-violette à 278 m μ . Les fractions FN et F₃N ainsi que celles repérées aux UV dans la fraction acide chlorhydrique 0,1 N et 1 N, sont dialysées contre l'eau distillée (3 jours), puis lyophilisées.

3°- ETUDE DES PROPRIETES DES FRACTIONS

Leur composition centésimale en glucides est déterminée par les méthodes habituellement utilisées : orcinol sulfurique pour les oses neutres, carbazol sulfurique pour les acides uroniques, méthode d'ELSON et MORGAN pour les osamines, méthode de WERNER et ODIN pour les acides sialiques. L'étude immuno-électrophorétique est réalisée sur chacune des fractions obtenues.

B - RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats que nous avons obtenus sont résumés dans le tableau XXIII (p. 111). Ceux-ci ont été très décevants, car la fraction P₉₀ s'est révélée très hétérogène à la chromatographie sur DOWEX 1 x 4.

En effet, chaque fraction contient au moins 2 pics révélés en UV sauf la fraction neutre qui n'en contient qu'une.

L'immuno-électrophorèse des différentes fractions montre, en général, plus de 2 composés antigéniques. De plus, d'autres expériences immuno-électrophorétiques sur la fraction P₉₀, à des concentrations supérieures à 20 p.100 ont révélés l'existence de nouveaux arcs correspondant à des composés faiblement antigéniques.

C - CONCLUSIONS

Contrairement à ce que nous pensions, la fraction P₉₀ est hétérogène, elle contient au moins 6 constituants glycoprotidiques. Malgré la complexité des résultats obtenus, nous nous proposons de poursuivre ultérieurement l'analyse des fractions séparées, à partir de la fraction P₉₀ sur colonne de DOWEX 1 x 4.

III - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LE FRACTIONNEMENT DE "L'EXTRAIT URINAIRE" PAR L'ETHANOL

Le fractionnement éthanolique des glycoprotides urinaires s'est révélé décevant et nous ne retiendrons pas ce mode de fractionnement. Les fractions obtenues sont trop hétérogènes et même la fraction P₉₀, qui nous semblait la plus intéressante, nous est apparue très complexe.

Tableau XXIII

Résultats du fractionnement chromatographique sur colonne de DOWEX 1 x 4 du précipité éthanolique P₉₀.

Solvants	Nombre de pics repérés en U.V.	Nombre d'arcs en immuno-électrophorèse
Eau	fraction unique	2
Acide chlorhydrique 0,1 N	2	0
Acide chlorhydrique 1 N	2	nombreux arcs
Acide chlorhydrique 3 N	2	0

FRACTIONNEMENT PAR LE SULFATE D'AMMONIUM
--

De même que nous avons fractionné "l'extrait urinaire" par un gradient de concentration en éthanol, nous avons essayé de fractionner les protéides urinaires, en associant un gradient de concentration en sulfate d'ammonium à un gradient de pH (MONTREUIL) (395).

Ce mode de fractionnement avait été utilisé principalement par KAO et al. (396) pour séparer les composants non dialysables de l'urine.

Comme dans les chapitres précédents, nous étudierons successivement :

I - Le fractionnement de "l'extrait urinaire" par le sulfate d'ammonium ;

II - Le sous-fractionnement chromatographique de la fraction S₉.

I - FRACTIONNEMENT DE "L'EXTRAIT URINAIRE"

Le relargage au sulfate d'ammonium permet l'isolement de fractions glycoprotidiques différentes grâce à un gradient discontinu de pH et de concentration en sulfate d'ammonium.

A-MODE OPERATOIRE

1°- FRACTIONNEMENT

Un à deux grammes "d'extrait urinaire" sont dissous dans 100 ml d'une solution de chlorure de sodium 0,15 M. La solution est ajustée à pH 7 avec de l'acide chlorhydrique.

La solution ainsi obtenue est amenée au tiers de saturation en sulfate d'ammonium, en ajoutant 50 ml d'une solution d'ammonium saturée de pH 7 (solution à 780 g de sulfate d'ammonium par litre d'eau) puis elle est laissée une nuit à +4°C sous agitation. Il se forme un précipité P₁ qui est centrifugé, dialysé contre l'eau distillée pendant 3 jours, puis lyophilisé.

Le surnageant S₁ est alors ajusté à pH 4,6 avec de l'acide chlorhydrique et est soumis à l'agitation pendant une nuit à +4°C.

Le précipité P_2 est recueilli après centrifugation, puis dialysé et lyophilisé. Le surnageant S_2 est ajusté à pH 3,8. Le précipité P_3 ainsi formé, est traité de la même manière que les précipités précédents. Le surnageant S_3 est ajusté à pH 7, avec de l'ammoniaque et ensuite, amené à la demi-saturation en sulfate d'ammonium par addition d'un volume égal d'une solution de sulfate d'ammonium saturée à pH 7. Les précipités P_4 , obtenu à pH 7, P_5 obtenu à pH 4,6 et P_6 , obtenu à pH 3,8 sont recueillis.

Le surnageant S_6 est ajusté à pH 7 et amené à saturation complète en sulfate d'ammonium en ajoutant du sulfate d'ammonium cristallisé. Il se forme successivement un précipité P_7 très abondant, puis un précipité P_8 après ajustement à pH 4,6 et un précipité P_9 après ajustement à pH 3,8.

Le surnageant final S_9 est également recueilli, dialysé une semaine contre l'eau distillée et lyophilisé. Le fractionnement est schématisé dans la figure 28 (p.114).

2°- ETUDE DES PROPRIETES DES FRACTIONS

a - chaque fraction obtenue (P_1 à P_9 et S_9) est soumise à l'étude immuno-électrophorétique.

b - la fraction la plus intéressante sera soumise aux analyses classiques, c'est à dire à la détermination centésimale en glucides et à l'électrophorèse sur acétate de cellulose dans les procédés décrits précédemment aux pages 59 à 66.

B - RESULTATS

1°- ETUDE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE

A l'étude immuno-électrophorétique, toutes les fractions P_1 à P_9 sont très hétérogènes. Elles présentent de nombreux arcs de précipitation, au contraire, le dernier surnageant S_9 dialysé ne donne qu'un seul arc de précipitation de comportement α_2 avec le sérum de lapin anti-protéides urinaires (Fig. 29 ; p.115 et 30 ; p.116).

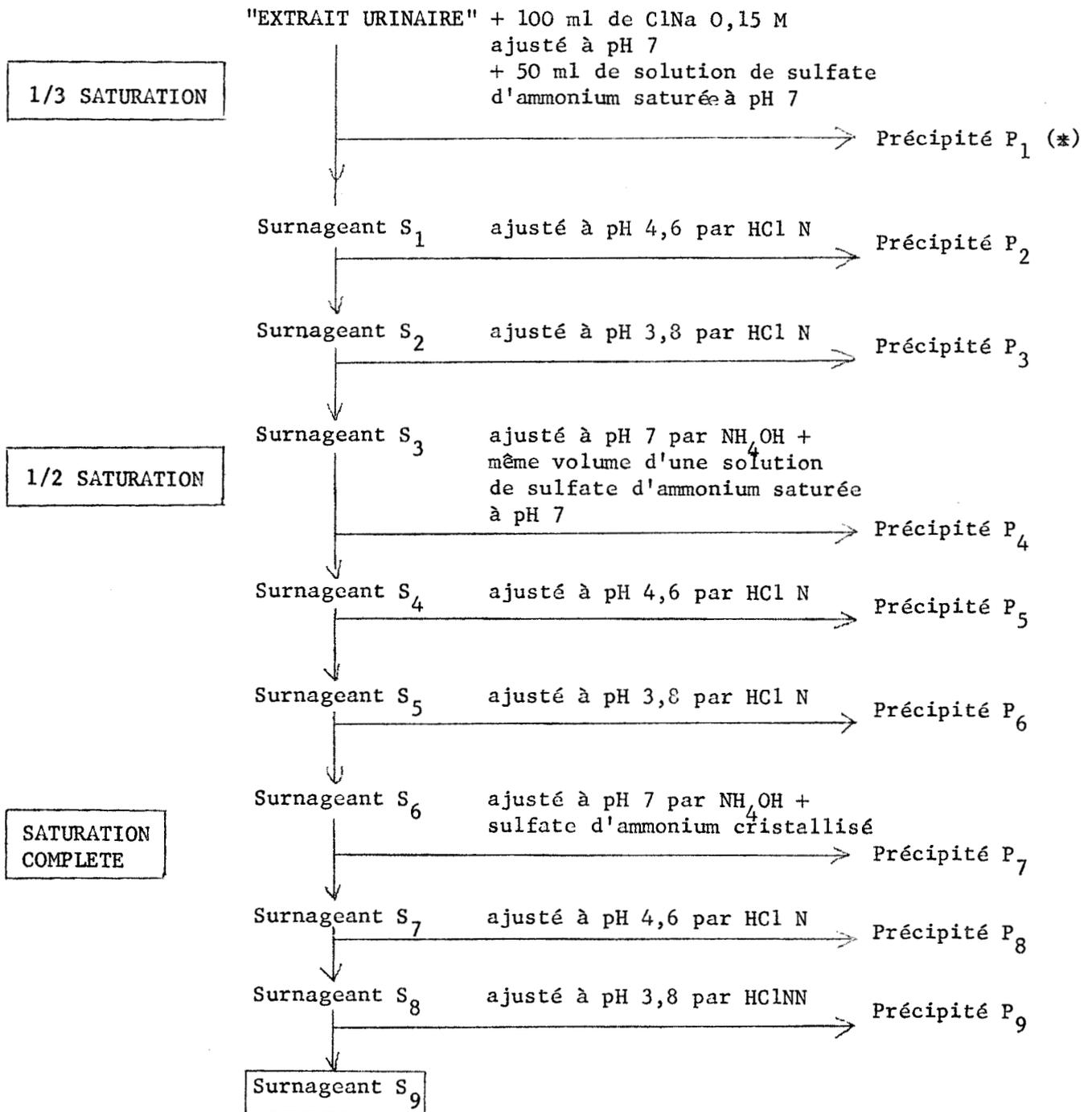


Figure 28

Schéma de fractionnement des protéides urinaires par le sulfate d'ammonium.

(*) Tous les précipités sont recueillis par centrifugation après un repos d'une nuit à 4°C.

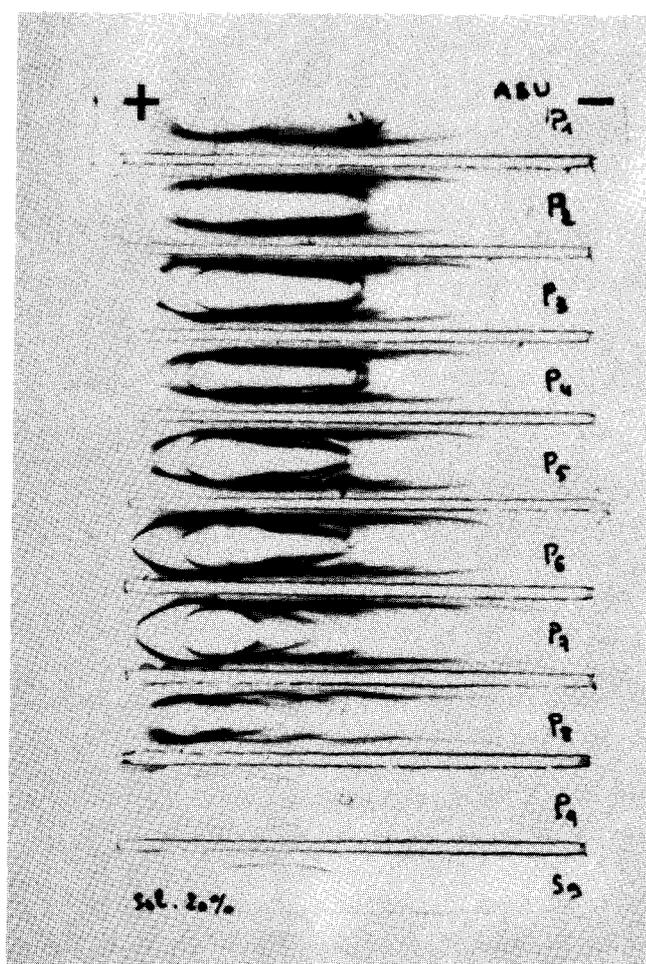


Figure 29

Immuno-électrophorèse des différentes fractions obtenues par relargage au sulfate d'ammonium de "l'extrait urinaire".

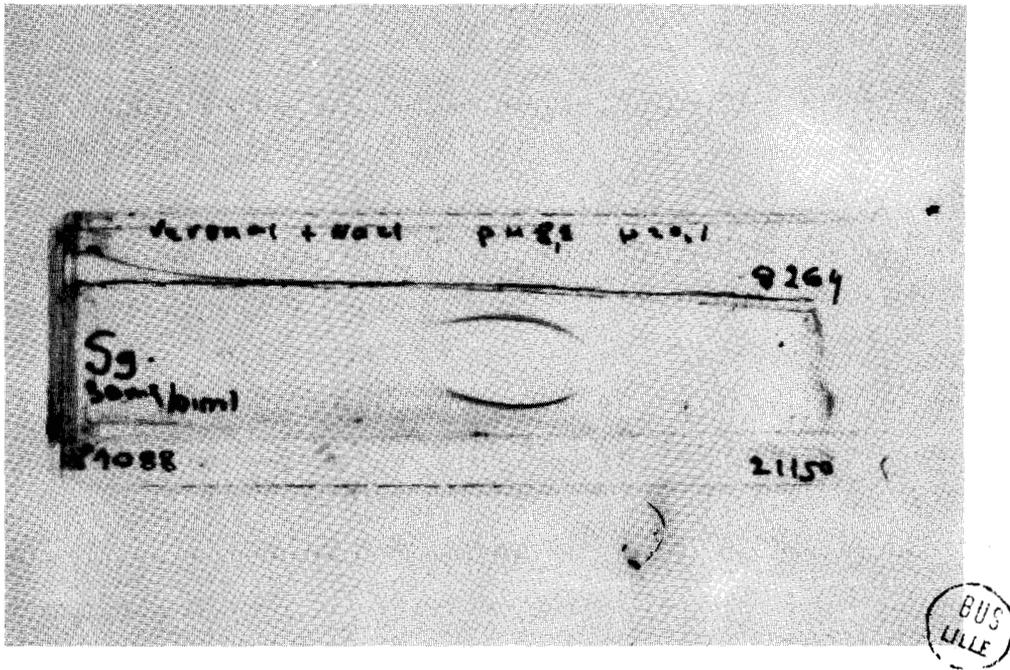


Figure 30

Immuno-électrophorèse de la fraction S₉ obtenue par relargage de "l'extrait urinaire" par le sulfate d'ammonium.

2°- COMPOSITION EN GLUCIDES DE LA FRACTION S₉

La composition centésimale en glucides de la fraction S₉ a été effectuée . Les résultats ont été rassemblés dans le tableau XXIV (p.118).

3°- ETUDE ELECTROPHORETIQUE

L'électrophorèse en acétate de cellulose à pH 3 en tampon pyridine/acide formique/eau (1:2:46) révèle la présence de trois bandes qui migrent aux mêmes vitesses électrophorétiques que les témoins acide hyaluronique, acides chondroïtines A et C et acide chondroïtine sulfurique B, après révélation par le réactif au bleu alcian.

C - CONCLUSIONS

Le fractionnement des protéides urinaires par le sulfate d'ammonium fournit de nombreuses préparations hétérogènes que nous n'avons pas encore analysées. Ce fractionnement nous a permis cependant d'isoler une fraction très intéressante du point de vue de sa composition en glucides et de son étude immuno-électrophorétique : la fraction S₉.

Nous avons poursuivi l'étude de cette fraction en essayant d'isoler par des méthodes chromatographiques sur colonnes d'échangeurs d'anions (DOWEX 1 x 4 ; ECTEOLA-cellulose) des entités physico-chimiques bien définies.

II - SOUS-FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DE LA FRACTION S₉

La fraction S₉ a été soumise à des méthodes chromatographiques sur colonnes de résine : DOWEX 1 x 4 ou sur cellulose modifiée.

A - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DOWEX 1 x 4

Comme pour la fraction P₉₀, nous avons soumis la fraction S₉ à une chromatographie sur colonne de DOWEX 1 x 4, pour préciser à quel pic d'élution correspondait la fraction S₉.

Tableau XXIV

Composition centésimale en glucides de la fraction S₉ obtenue par relargage de "l'extrait urinaire" par le sulfate d'ammonium.

	Glucides totaux	Oses "neutres"	Acides uroniques	Acide sialique	Osamines	Oses "neutres" acides uroniques	Oses "neutres" acide sialique	Oses "neutres" Osamines
S ₉	67,7	32,0	3,7	14,0	18,0	9	2,3	1,72

1°- MODE OPERATOIRE

a - Chromatographie.

- 300 mg de la fraction S_9 sont dissous dans un minimum d'eau distillée ;
- Les colonnes de DOWEX 1 x 4 (50 cm x 2,5 cm) sont régénérées sous forme formiate et le débit est régularisé par une pompe péristaltique (30 ml/heure) ;
- Les fractions sont éluées successivement par
 - l'eau, qui donne la fraction neutre FN
 - l'acide chlorhydrique 0,1 N
 - l'acide chlorhydrique 3 N qui donne la fraction F_3N
- Chaque tube est soumis aux UV, à 278 m μ pour repérer les fractions protéidiques. Chacune de ces fractions est ensuite dialysée contre l'eau distillée et lyophilisée.

b - Etude des propriétés des fractions.

Chaque fraction obtenue est soumise à l'étude systématique de sa composition centésimale en glucides, de sa composition glycoprotidique par les méthodes immuno-électrophorétiques et de sa composition en polysaccharides acides. Les méthodes employées sont décrites aux pages 59 à 66.

2°- RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXV (p. 120). Ces résultats montrent que la fraction S_9 est hétérogène, elle fournit 4 fractions glucidiques différentes.

Seule la fraction HCl 3 N renferme des acides uroniques en forte quantité. Elle révèle d'ailleurs, en électrophorèse sur acétate de cellulose, 3 bandes très colorées après révélation au bleu alcian. Ceci semble confirmer la présence de mucopolysaccharides acides dans la fraction F_3N .

3°- CONCLUSIONS

La fraction S_9 ne renferme pas qu'une seule entité comme nous l'avions espéré, mais au moins 4 constituants différents.

Tableau XXV

Composition centésimale en glucides des fractions obtenues par chromatographie de la fraction S₉ sur colonne de DOWEX 1 x 4.

Fractions	Agents d'élution	Oses "neutres"	Acides uroniques	Acide sialique	Osamines	Oses Acide sialique	Oses Osamines
1	Eau	31,5	0	6,2	31,5	5	1
2	Acide chlorhydrique 0,1 N	30,6	0	19,7	17,1	1,58	1,60
3	Acide chlorhydrique 0,1 N	42,4	0	28,6	18,2	1,48	2,39
4	Acide chlorhydrique 3 N	13,6	20,4	3,3	22,9	4	0,61

La chromatographie sur colonne de DOWEX 1 x 4 nous a cependant permis d'éliminer les mucopolysaccharides acides qui sont élués par l'HCl 3 N.

En outre, elle nous permet d'obtenir une fraction eau ou fraction neutre sans acides uroniques et "pauvre" en acide sialique.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ECTEOLA-CELLULOSE

Nous avons appliqué à la fraction S₉ la chromatographie sur ECTEOLA-cellulose préconisée par ANTONOPOULOS et al. (397).

1°- MODE OPERATOIRE

a - Chromatographie.

Le procédé utilisé est identique à celui décrit page 93 à propos du sous-fractionnement du Pic₇.

Des quantités de l'ordre de 200 mg de la fraction S₉ sont chromatographiées. Les tampons d'éluion utilisés sont :

- l'eau
- l'acide chlorhydrique 0,02 M
- le formiate d'ammonium 1 M - 1,75 M - 2 M - 2,5 M - dans l'ammoniaque N/10
- le chlorure de sodium 2 M

Ces tampons ont pour but de "décrocher" de la cellulose modifiée des fractions acides contenant des glycosaminoglycannes.

Chaque fraction obtenue est dialysée et lyophilisée.

b - Etude des propriétés des fractions obtenues.

Les fractions obtenues sont soumises aux méthodes générales d'investigation décrites aux pages 59 à 66 pour déterminer leur teneur en glucides, en glycoprotides et pour mettre en évidence les mucopolysaccharides acides.

2°- RESULTATS ET DISCUSSION

a- Composition centésimale en glucides.

Le tableau XXVI (p. 122) résume les résultats obtenus. Les fractions éluées par l'eau et l'acide chlorhydrique 0,02 M sont

Tableau XXVI

Composition en glucides des fractions obtenues par chromatographie sur colonne d'ECTEOLA-cellulose de la fraction S₉.

Agents d'élution	Oses "neutres" p.100	Acides uroniques p.100	Acide sialique p.100	Osamines p.100	Oses	Oses	Arcs (a)	B.A. (b)
					Acide sialique	Osamines		
Eau	28,9	0	4,12	32	7	0,90	0	0
HCl 0,02 M	28	0	14,5	17,1	1,9	1,60	1	0
Formiate d'ammonium 1 M	18,3	5,3	16,5	13,6	1,1	1,30	0	3
1,75 M	-	-	-	-	-	-	0	2
2 M (c)	-	-	-	-	-	-	1	2

(a) Nombre d'arcs en immuno-électrophorèse

(b) Nombre de bandes de constituants acides révélés par le bleu alcian sur acétate de cellulose

(c) Les fractions éluées avec le formiate d'ammonium 1,75 M, 2 M, 2,50 M et NaCl 2 M sont obtenues en très petites quantités.

dépourvues d'acides uroniques. D'autre part, elles représentent à elles seules 60 p.100 de la fraction totale.

La composition en glucides de la fraction "eau" et HCl 0,02 M se rapproche, respectivement, de celle des fractions "eau" et HCl 0,1 N obtenues par chromatographie de la fraction S₉ sur colonne de DOWEX 1 x 4 (Tableau XXVII; p.12A). L'étude de ces deux séries de fractions doit être entreprise, de manière à confirmer, s'il y a lieu, leur identité et leur homogénéité.

b - Etude immuno-électrophorétique.

Les fractions "eau" et HCl 0,02 M ne révèlent aucun arc en immuno-électrophorèse tandis que les autres fractions sont hétérogènes.

c - Etude électrophorétique sur acétate de cellulose.

Les fractions obtenues par élution au formiate d'ammonium 1 M et 1,75 M sont les plus colorées, elles sont révélées fortement par le réactif au bleu alcian, sur acétate de cellulose. Comme elles contiennent une teneur relativement forte en acides uroniques, la présence de mucopolysaccharides acides semble être confirmée.

3°- CONCLUSIONS

La chromatographie sur colonne d'ECTEOLA-cellulose permet d'éliminer les mucopolysaccharides acides présents dans la fraction S₉ et fournit 2 fractions intéressantes (la fraction "eau" et la fraction HCl 0,02 M). Ces fractions semblent identiques à deux autres fractions obtenues par chromatographie sur colonne de DOWEX 1 x 4 (fraction "eau" et fraction 0,1 N). D'autre part, l'hétérogénéité de la fraction S₉ est confirmée.

Le couplage de deux systèmes de chromatographie sur colonne de DOWEX 1 x 4 et d'ECTEOLA-cellulose devrait nous permettre l'isolement d'entités physico-chimiques bien définies.

Tableau XXVII

Comparaison de la composition centésimale en glucides entre les fractions "eau" et "HCl 0,02 M" obtenues par chromatographie sur colonne d'ECTEOLA-cellulose et les fractions "eau" et "HCl 0,1 N" obtenues par chromatographie sur colonne de DOWEX 1 x 4 de la fraction S₉.

	ECTEOLA-cellulose		DOWEX 1 x 4	
	Fraction eau	Fraction HCl 0,02 M	Fraction eau	Fraction HCl 0,1 N
Oses neutres p.100	28,16	28	31,5	30,6
Acides uroniques p.100	0	0,2	0	0
Acide sialique p.100	4,12	14,5	6,2	19,7
Osamines p.100	16,4	17,1	31,5	17,1
<u>Oses</u> Osamines	0,90	1,60	1	1,60
<u>Oses</u> Acide sialique	7	1,90	5	1,58

III - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LE
FRACTIONNEMENT AU SULFATE D'AMMONIUM DES GLYCOPROTIDES URINAIRES

1°- Le fractionnement au sulfate d'ammonium de "l'extrait urinaire" nous a permis d'obtenir d'obtenir une fraction particulièrement intéressante : la fraction S₉.

2°- L'application à la fraction S₉ de la chromatographie sur colonne de DOWEX 1 x 4 et sur colonne d'ECTEOIA-cellulose nous a montré que :

- cette fraction est hétérogène
- elle contient, outre des mucopolysaccharides acides, au moins trois constituants glycopeptidiques
- ces différents procédés chromatographiques employés séparément permettent d'éliminer les mucopolysaccharides acides et d'obtenir deux fractions intéressantes dans chacun des cas, l'une, pauvre en acide sialique (5 p.100), l'autre, riche (15 p.100).

3°- Nous espérons pouvoir mettre en évidence, par le couplement de ces méthodes chromatographiques, une identité entre ces fractions intéressantes isolées et dans ce cas, poursuivre l'étude physico-chimique de ces entités.

FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE SEPHADEX

A la suite d'un article publié par VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (398) concernant les mucopolysaccharides acides dans l'urine humaine normale, nous avons repris les fractionnements sur Sephadex des glycoprotéides de l'urine, en appliquant, à titre comparatif, le mode opératoire de ces auteurs, non pas à l'urine totale, mais à "l'extrait urinaire" purifié.

Notre but était de simplifier le matériel d'étude en le séparant en plusieurs fractions de compositions connues, par la gel filtration.

A - MATERIEL ET METHODES

1°- CHROMATOGRAPHIE

300 à 600 mg "d'extrait urinaire" dissous dans le tampon de départ (20 ml de chlorure de sodium 0,08 M), sont chromatographiés sur une colonne de Sephadex G-50 medium (3 x 100 cm), dégazé et stabilisé en chambre froide à +4°C.

Le déplacement des composés est effectué par passage d'une solution de chlorure de sodium 0,08 M.

Le débit est réglé par une pompe péristaltique et des fractions de 10 ml sont recueillies automatiquement sur un collecteur de fractions, puis analysées en UV à 278 m μ , du point de vue de leur composition en protéides. Chaque fraction est isolée, dialysée contre l'eau distillée et lyophilisée.

2°- ETUDE DES PROPRIETES DES FRACTIONS

La composition centésimale en glucides des pics élués est déterminée ainsi que leur composition molaire en oses neutres par les méthodes décrites aux pages 59 à 66.

D'autre part, nous avons effectué leur étude électrophorétique en acétate de cellulose pour déceler la présence de mucopolyosides acides.

B - RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 31 (p. 127) et 32 (p.128) et par le tableau XXVIII (p.129).

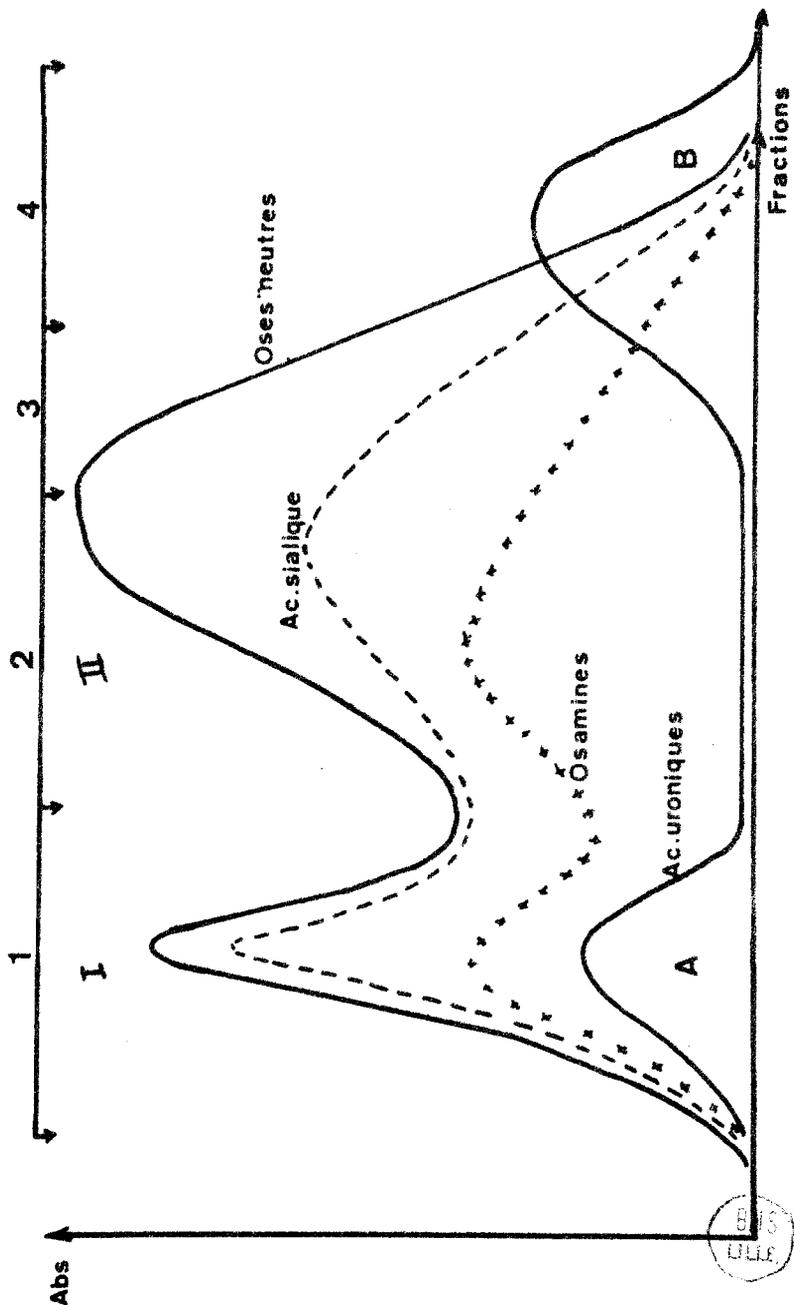


Figure 31

Courbes d'élution des glycoprotéides 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.

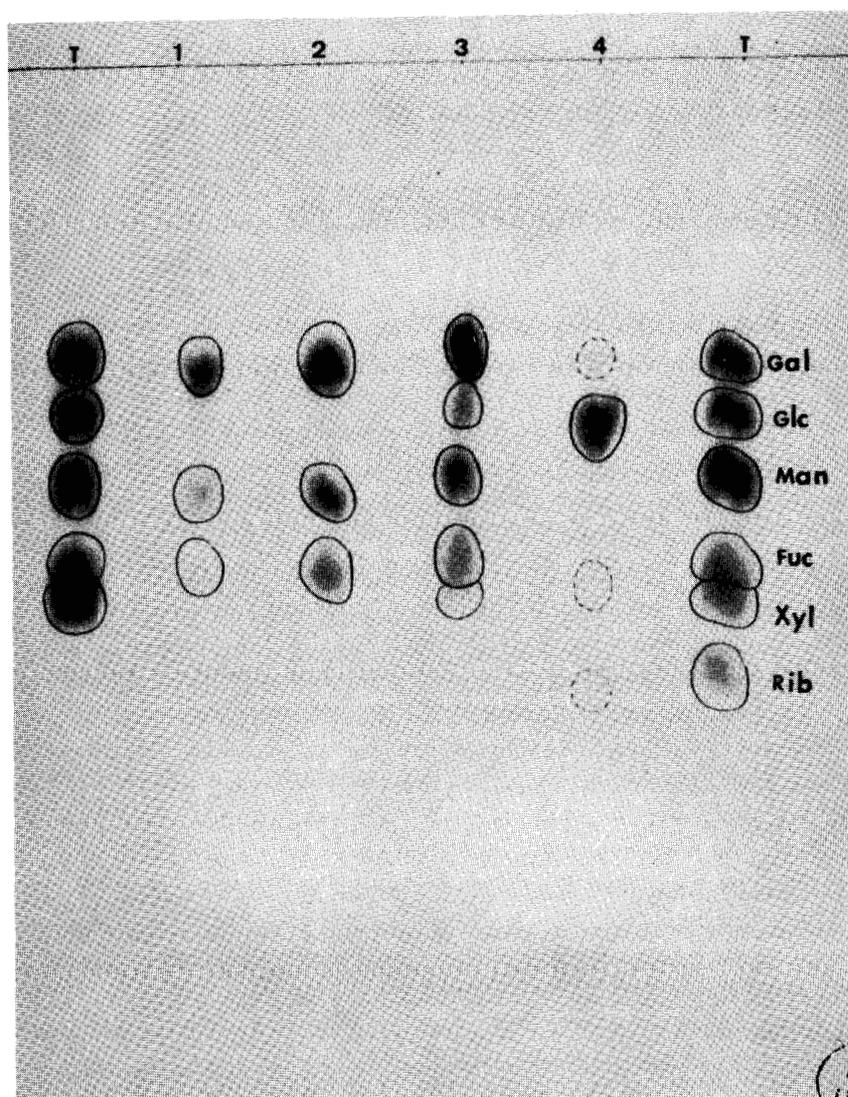


Figure 32

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

Tableau XXVIII

A - Composition centésimale en glucides des fractions obtenues par chromatographie sur colonne de Sephadex G-50 de "l'extrait urinaire".

Fractions (a)	Oses neutres p.100	Acides uroniques p.100	Acide sialique p.100	Osamines p.100	Oses "neutres" acides uroniques	Oses "neutres" acide sialique	Oses "neutres" Osamines
1	10,1	2,8	13,1	3,6	3,6	0,77	2,8
2	16,4	1	13,7	12,9	16,4	1,2	1,3
3	18,4	1	14,9	9,8	18,4	1,2	1,9
4	4,6	2,6	0	traces	1,7	-	-

(a) Voir Figure 31 ; p. 127.

RECEIVED
MAY 1964

Tableau XXVIII

Composition centésimale et molaire en glucides des fractions obtenues par chromatographie sur colonne de Sephadex G-50 de "l'extrait urinaire".

Fractions (a)	Oses "neutres" p. 100	Acides uroniques p. 100	Acide sialique p. 100	Osamines p. 100	Gal (b)	Man	Fuc	Glc
1	10	3	9,1	7	10	3	1	0
2	21	traces	15,6	16	10	7	3	0
3	22,4	traces	21,1	13,2	10	7	3	1
4	11	6	0	traces	0	0	0	+

(a) Voir Figure 31 ; p. 127.

(b) Résidus de mannose, de fucose, de glucose pour 10 résidus de galactose

1°- CHROMATOGRAPHIE

Le dosage, dans chaque fraction éluée, des oses neutres, des osamines et de l'acide sialique, a permis de repérer 2 pics (pic I et pic II). Le dosage des acides uroniques fournit également deux pics dont l'un (pic A) coïncide avec le pic I et dont l'autre (pic B) se dissocie du pic II (Fig.31 ; p.127).

2°- ETUDE DE LA COMPOSITION DES FRACTIONS OBTENUES

a - Pic I et pic A.

Les résultats figurent dans le tableau XXVIII (p.129). et la figure 32 (p.128).

- L'étude de la composition du pic I montre qu'il renferme une quantité relativement faible de glucides totaux (30 p.100). Comme ce pic se déplace avec le "front" du solvant, nous pouvons penser qu'il est de nature glycoprotéinique.

- L'analyse électrophorétique sur acétate de cellulose montre la présence de mucopolysaccharides acides révélés par le réactif au bleu alcian. Ce résultat explique la présence d'acides uroniques et le fait que ceux-ci se retrouvent dans le précipité du pic I par le cétavlon (ou bromure de cétyle-triméthyl-ammonium).

b - Pic II.

Il renferme une proportion plus élevée de glucides totaux (50 p.100), il est de nature glycopeptidique et ne renferme pas de mucopolysaccharides acides.

c - Pic B.

Il ne contient que des oses neutres et des acides uroniques. Il ne s'agit donc pas de mucopolysaccharides acides, d'autant plus qu'aucun constituant n'est révélé par le réactif au bleu alcian.

Il renferme probablement de l'acide glycuronique libre ou des glycurono-conjugués de faible masse moléculaire.

d - Détermination de la composition molaire en oses neutres.

La détermination de la composition molaire en oses neutres des pics I et II montre bien qu'il s'agit de composés de nature glycoprotéinique, puisque ces derniers sont constitués de galactose, de

mannose et de fucose.

Dans le pic B se trouve un glycoside du glucose que nous n'avons pas encore identifié.

C-- CONCLUSIONS

Les conclusions que nous pouvons tirer de cette étude sont les suivantes :

a - "l'extrait urinaire" purifié que nous utilisons dans nos fractionnements est le même que celui qui sert à doser les glycoprotides de l'urine. En effet, dans les laboratoires de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences et de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, a été mise au point une méthode de dosage des glycoprotéides urinaires totaux qui associe la précipitation alcoolique de l'urine à une dialyse du précipité. Les résultats que nous avons obtenus ont apporté, à ce sujet, les précisions suivantes :

- le substrat de dosage est en fait un mélange de glycoprotéines et de glycopeptides ;

- il s'agit vraisemblablement de composés dérivant les uns des autres. Il suffit alors de préciser qu'il s'agit d'un procédé de dosage des glycoprotides totaux de l'urine et non pas des glycoprotéines totales ;

- les glucides conjugués qui sont dosés, sont essentiellement de nature glycoprotidique puisque l'on trouve, à côté de proportions très importantes de galactose, de mannose et de fucose, des quantités très faibles de glucose ;

- les acides uroniques que nous dosons ne sont pas quantitativement des acides uroniques mucopolysaccharidiques puisqu'une fraction importante (plus de 50 p.100) est de nature micromoléculaire (pic B).

b - Une chromatographie préalable de notre "extrait urinaire" sur colonne de Sephadex G-50 va fournir, à présent, un excellent fractionnement de base des glycoprotides urinaires en glycoprotéines et en glycopeptides.

En soumettant, dans un second temps, chacune des deux fractions obtenues, à la chromatographie couplée sur colonne de DEAE-Sephadex et sur

colonne d'ECTEOLA-cellulose, et en associant, en outre, ces procédés chromatographiques à des fractionnements par le sulfate d'ammonium et par l'éthanol, nous espérons bien parvenir à isoler enfin des entités glycoprotidiques bien définies à partir des urines humaines.

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'ensemble des résultats que nous avons obtenus au cours de l'étude critique systématique des méthodes de préparation et de fractionnement de "l'extrait urinaire" d'une part, et des procédés de fractionnement des composés les plus intéressants obtenus, du point de vue de leur composition en glucides et leur étude immuno-électrophorétique et électrophorétique d'autre part, sont les suivantes :

1°- La précipitation alcoolique s'est révélée la méthode de choix pour la préparation du matériel de départ : "l'extrait urinaire". En effet, à la concentration de 90 p.100 en éthanol, la précipitation des glycoprotides de l'urine est totale.

Cet "extrait urinaire" sera donc à la base de tous nos fractionnements.

2°- La chromatographie sur colonne de DOWEX 1 x 4 de "l'extrait urinaire" nous a permis d'isoler une fraction moins hétérogène que les autres et riche en glucides : la fraction P₇.

Elle nous a permis également de régler le problème du xylose urinaire. En effet, la chromatographie des oses neutres de l'hydrolysat de la fraction F₃N montrait une tache de xylose très nette et l'électrophorèse sur acétate de cellulose de cette même fraction révélait la présence de mucopolysaccharides acides pour lesquels la conclusion des travaux de RODEN (399,400) est : galactose → galactose → xylose. Il est donc ainsi prouvé que ce xylose est bien d'origine mucopolysaccharidique.

3°- Les autres procédés auxquels nous nous sommes livrés pour fractionner "l'extrait urinaire", soit par l'éthanol soit par le sulfate d'ammonium, ont permis également de sélectionner respectivement les fractions P₉₀ et S₉, particulièrement riches en glucides.

Toutefois, toutes ces fractions se sont révélées très hétérogènes dès que nous avons poussé plus loin les investigations et chacune d'elles contient plusieurs constituants : 5 entités glycoprotidiques pour la fraction P₇, 6 pour la fraction P₉₀, 4 pour la fraction S₉, outre les mucopolysaccharides.

4°- Cependant, nous sommes parvenue à isoler par chromatographie du pic₇ sur colonne de DEAE-sephadex, deux fractions dépourvues d'acide uronique et pour la fraction S₉, deux fractions également sans acide uronique, isolées par chromatographie sur colonne de DOWEX 1 x 4 et sur colonne d'ECTEOLA-cellulose. Ces fractions se ressemblent beaucoup, l'une est pauvre en acide sialique, l'autre en est riche.

Il nous semble possible, a priori, que l'emploi combiné des procédés de fractionnement chromatographique et électrophorétique nous permettra de venir à bout de l'identification d'entités glycoprotidiques bien définies dans les urines humaines.

5°- Enfin, une chromatographie préalable de "l'extrait urinaire" sur sephadex G-50 semble résoudre le problème de la complexité de notre matériel d'étude. Nous pouvons, dès à présent, partir uniquement d'une fraction glycopeptidique ou d'une fraction glycoprotéinique, ce qui simplifiera beaucoup nos fractionnements.

D'autre part, nos travaux confirment ceux de BOURRILLON et al. et de LUNBLAD, qui trouvaient également une grande quantité de composés glycopeptidiques dans l'urine.

Ce n'est donc pas faire preuve d'un optimisme exagéré de dire que nous entrevoyons la solution de l'énigme posée par l'hétérogénéité des glycoprotides de l'urine humaine.

BIBLIOGRAPHIE

137

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

- ADA G.L. et GOTTSCHALK A., Austr. J. Sci., 1952, 14, 160 (46,291)
- ADAMS J.B., Nature, 1960, 186, 585 (104,206)
- ANDERSON A.J., Biochem. J., 1954, 56, 24 (287)
- ANDERSON A.J., Biochem., J., 1967, 102, 719 (388)
- ANDERSON A.J., HOFFMAN P. et MEYER K., Biochem. Biophys. Acta, 1963, 74, 309 (120)
- ANDERSON A.J., LEPPER M.H. et WINZLER R.J., Amer. J. Med. Sci., 1960, 240, 3 (280)
- ANDERSON A.J., LEPPER M.H. et WINZLER R.J., Biochem. J., 1960, 77, 581 (135, 236)
- ANDERSON A.J., LOCKEY E. et Mc LAGAN N.F., Biochem. J., 1955, 59, 638 (128)
- ANDERSON A.J. et Mc LAGAN N.F., J. Physiol., 1954, 125, 44 P (61,80,129,288)
- ANDERSON A.J. et Mc LAGAN N.F., Biochem. J., 1955, 59, 638 (62,84,289,344,355)
- ANSETH A. et LAURENT T.C., Exptl. Eye Res., 1961, 1, 1 (109)
- ANSETH A. et LAURENT T.C., Exptl. Eye Res., 1961, 1, 25 (389)
- ANTONOPOULOS C.A., FRANSSON L.A., HEINEGARD D. et GARDELL S., Biochem. Biophys. Acta, 1967, 148, 158 (114,227,390,391,397)
- ANTONOPOULOS C.A., GARDELL S. et HAMNSTRÖM B., J. Atheroscl. Res. Netherl., 1965, 5, 9 (99)
- ASTRUP P., Acta Pharmacol. Toxicol., 1947, 3, 165 (79,197,217)
- BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.N., Analyst, 1954, 79, 201 (360)
- BERENSON G.S. et DALFERES E.R., Biochem. Biophys. Acta, 1965, 101, 183 (184, 195)
- BERENSON G.S. et SERRA M.T., Fed. Proc., 1959, 18, 190 (214)
- BERGGARD I., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1959, 64, 156 (49)

- BERGGARD I., Nature, 1960, 187, 776 (152, 182,254,257)
- BERGGARD I., Clin. Chim.Acta, 1961, 6, 413 (55,124,153,161,168,266)
- BERGGARD I., Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 546 (56,140,166,180,237,249,267,385)
- BERGGARD I., Arkiv. Kemi, 1961, 18, 291 (138)
- BERGGARD I., Arkiv. Kemi, 1961, 18, 315 (139)
- BERGGARD I., Arkiv. Kemi, 1962, 18, 291 (271)
- BERGGARD I., Nature, 1963, 199, 174 (164,170,265)
- BERGGARD I., in Protides of the Biological Fluids, 12ème Colloque, Bruges, H. PEETERS éd., 1964, p.285 (263)
- BERGGARD I. et BEARN A.G., Nature, 1962, 195, 1311 (155)
- BERGGARD I., CLEVE H. et BEARN A.G., Clin. Chim. Acta, 1964, 10, 1 (154,170,172,173,174,176,177,178)
- BJÖRNESJÖ K.B., WERNER I. et ODIN L., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1959, 11, 238 (16,37)
- BEVENUE A. et WILLIAMS K.T., Arch. Biochem. Biophys., 1951, 34, 225 (10)
- BISERTE G., HAVEZ R. et HAYEM-LEVY A., Path. Biol., 1959, 7, 123 (53)
- BISERTE G., LEVY A. et HAVEZ R., Cancérologie, 1957, 3, 7 (355h)
- BISERTE G., TAYEAU F., MONTREUIL J., HOLLEMAN J. et DAUTREVAUX M., Clin. Chim. Acta, 1956, 1, 115 (71,340)
- BLIX G., Protides of the Biological Fluids, 11ème Colloque, Bruges, H. PEETERS éd., 1964, 303 (232)
- BOAS N.F., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1956, 92, 122 (14)
- BOAS N.F., Arch. Internat. Med., 1956, 98, 631 (15,18,36)
- BOAS N.F., in The amino-sugars, BALAZS.E.A. et JEANLOZ R.W. éd., 1965, II A, 95 (23 bis)
- BONAR J.R. et PERKINS W.H., J. Clin. Endocrinol. Metab., 1962, 22, 38 (276)
- BOURRILLON R., CORNILLOT P. et GOT R., Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 506 (131,245,269)
- BOURRILLON R., CORNILLOT P., MICHON J. et GOT R., Clin. Chim. Acta, 1963, 8, 513 (132)
- BOURRILLON R., GOT R. et MICHON J., in Protides of the Biological Fluids, 8ème Colloque, Bruges, H. PEETERS éd., 1960, 202 (60,244)

- BOURRILLON R., GOT R. et CORNILLOT P., Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 730 (133, 233, 243,252,286,393)
- BOURRILLON R., GOT R. et MICHON J., Anal. Chem., 1961, 6, 91 (234,392)
- BOURRILLON R., GOT R. et MARCY R., Nature, 1959, 184, 983 (273)
- BOURRILLON R. et KAPLAN J.C., Clin. Chim. Acta, 1960, 5, 732 (134)
- BOWNESS J.M., Biochem. Biophys. Acta, 1965, 101, 27 (118,209)
- BOYCE W.H., GARVEY F.K. et NORFLEET C.M., J. Clin. Invest., 1954, 33, 1287 (20,148,238)
- BOYCE W.H., GARVEY F.K. et NORFLEET C.M., J. Urol., 1954, 72, 1019 (190)
- BOYCE W.H., POOL C.S., MESCHAN I. et KING J.S., Acta Radiologica, 1958, 50, 543 (323)
- BOYCE W.H. et SWANSON M., J. Clin. Invest. 1955, 34, 1581 (311,322)
- BROWN D.H., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1957, 43, 783 (222)
- BURROWS D. et NEILL D.W., Brit. Med. J., 1958, 1, 370 (355q)
- BURNET F.M., Physiol. Rev., 1951, 31, 131 (65)
- CATCHPOLE H.R., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1950, 75,221 (355g)
- CLAUSEN J., DYGGVE H.V. et MELCHIOR J.C., Arch. Dis. Childh., 1963, 38, 364 (96)
- COHN E.J., GURD F.R.N., SORGENOR D.M., BARNES B.A., BROWN R.K., HEROUAUX G., GILLESPIE J.M., KAHNT F.W., LEUER W.F., LIU C.H., MITTELMAN D., MOUTON R.F., SCHMID K. et UROMA E., J. Amer. Chem. Soc., 1950, 72, 465 (125)
- COPLEY A.L., Science, 1941, 93, 478 (219)
- CURTAIN C.C., Austr. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 1953, 31, 255 (307)
- CURTAIN C.C., Austr. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 1953, 31, 623 (298)
- DALFERES E.R., RADHAKRISNAMURTHY B. et BERENSON G.S., Arch. Biochem. Biophys., 1967, 118, 224 (376)
- DE VAUX St CYR C., CLEVE H. et GRABAR P., Rev. Franç. Etudes Clin. Biol., 1963, 8, 485 (136,156)
- DI FERRANTE N., J. Clin. Invest., 1957, 36, 1516 (201,224)
- DI FERRANTE N. et POPENOE E.A., Scand. J. Lab. Invest., 1958, 10, 279 (67,203)
- DI FERRANTE N. et RICH C., J. Lab. Clin. Med., 1956, 48, 491 (86,97,200)

- DI FERRANTE N. et RICH C., *Clin. Chim. Acta*, 1956, 1, 519 (202)
- DISCHE Z., *J. Biol. Chem.*, 1947, 167, 189 (362)
- DONAGGIO A., *Atti. R. Acad. Sci. Modena*, 1931, 3, série 3 (330)
- DONAGGIO A., *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1933, 8, 1456 (331)
- DONINI P., PUZZUOLLI D. et D'ALESSIO I., *Acta Endocrinol.*, 1964, 45, 329 (274)
- ELSON H. et MORGAN W.T., *Biochem. J.*, 1933, 27, 1824 (359)
- EYLAR E.H., *Fed. Proc.*, 1963, 22, 538 (270)
- FRANKLIN E.C., *Clin. Chim. Acta*, 1959, 4, 259 (149)
- FREUDENBERG K. et EICHEL H., *Ann. Chem.*, 1934, 510, 240 (72,281,345)
- FREUDENBERG K. et EICHEL H., *Ann. Chem.*, 1935, 518, 97, (73,346)
- GABRIEL O., DAIN J., ZINSSER H. et DISCHE Z., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, 36, 155 (239)
- GACA A. et KEUTEL H.J., *Z. Urol.*, 1960, 53, 353 (312)
- GARDELL S., *Acta Chem. Scand.*, 1953, 7, 207 (369,378)
- GARDELL S., HEJKENSJOLD F. et ROCHNORLUND A., *Acta Chem. Scand.*, 1950, 4, 970 (370,384)
- GORDON A.S., *Physiol. Rev.*, 1959, 39, 1 (277)
- GOTTSCHALK A., *Nature*, 1952, 170, 662 (292,308,318,327)
- GOTTSCHALK A., *Nature*, 1953, 172, 808 (293,299)
- GOTTSCHALK A., *Biochem. J.*, 1955, 61, 298 (294)
- GOTTSCHALK A., *Ciba Foundation Symposium, Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*, 1958, 287 (295)
- GOUBET B., D.E.S., *Faculté des Sciences de Lille*, 1961 (379)
- GRABAR P. et WILLIAMS C.A., *Biochem. Biophys. Acta*, 1953, 10, 193 (150)
- GRABAR P. et WILLIAMS C.A., *Biochem. Biophys. Acta*, 1955, 17, 65 (375)
- GRANT G.H., *J. Clin. Path.*, 1957, 10, 360 (50,123,151,162,181)
- HAKOMORI S.I. et JEANLOZ R.W., *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, PC 3806 (355p)
- HAKOMORI S.I., KAWAUCHI H. et ISHIMODA T., *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 65, 546 (235)
- HAKOMORI S.I., KAWAUCHI H. et ISHIMODA T., *Nature*, 1961, 190, 265 (355j)

- HAMERMAN D., HATCH F.T., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1955, 89, 279 (31, 43,44,58,81,240)
- HAMERMAN D., HATCH F.T., REIFE A. et BARTZ K.W., J. Lab. Clin. Med., 1955, 46, 848 (7)
- HAMERMAN D., REIFE A. et BARTZ K.W., J. Lab. Clin. Med., 1956, 48, 729 (24,30,34,42)
- HARUKI F. et KIRK J.E., Biochem. Biophys. Acta, 1967, 136, 391 (208)
- HEREMANS J.F., Clin. Chim. Acta, 1958, 3, 34 (6,37,122,144)
- HEREMANS J.F. et VAERMAN J.P., Clin. Chim. Acta, 1958, 3, 430 (103,158)
- HEREMANS M.Th., VAERMAN J.P. et HEREMANS J.F., in Protides of the Biological Fluids, 7ème Colloque, Bruges, H. PEETERS éd., 1960, 396 (54,199, 313)
- HOGSON G., PERRETA M., YUDILEVICH D. et ESKUCHE I., Proc. Soc. Exptl. Biol., 1958, 99, 137 (353)
- HOGSON G. et TOHA J., Blood, 1954, 9, 299 (352)
- HOUDA, Tairyoku Kugaku, 1951, 1, 61 (337)
- HUGUES R.C. et JEANLOZ R.W., Biochem. J., 1964, 3, 1535 (368)
- JACKSON S.H., FARMER A.W., SLATER R.J. et DE WOLFE M.S., Can. J. Biochem. Biophys., 1961, 39, 881 (137)
- JACQUES L.B., NAPKE E. et LEVY S.W., Circul. Res., 1953, 1, 321 (217)
- JERMYN M.A. et ISHERWOOD F.A., Biochem. J., 1949, 44, 402 (365)
- JORPES E. et NORLIN G., Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 1934, 11, 91 (283) (x)
- KAO K.Y.T., HIZER C.A., DAWSON R.L. et Mc GAVACK T.H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1965, 119, 193 (183,194,251,256,396)
- KELLEY W.R., PONCET I.B. et DI FERRANTE N., Nature, 1963, 197, 1204 (90,111, 229)
- KENT P.W. et WHITEHOUSE M.W., in Biochemistry of the Amino-sugars, Butterworth éd., London 1955 (350)
- KERBY G.P., J. Clin. Invest., 1954, 33, 103 (198)
- KEUTEL H.J., HERMANN G. et LICHT W., Clin. Chim. Acta, 1959, 4, 665 (52, 130)
- KEUTEL H.J., HEREMANS J.F. et VAERMAN J.P., in Protides of the Biological Fluids, 8ème Colloque, Bruges, H. PEETERS éd., 1961, 324 (315)
- (x) KALLEE E., DEBIASI S., KARYPIDIS C., HEIDE K. et SCHWICK H.G., Acta Isotopica, 1964, 4, 103 (355m)

- KING J.S. et BOYCE W.H., Arch. Biochem. Biophys., 1959, 82, 455 (324)
- KING J.S. et BOYCE W.H., in High Molecular Weight Substances in Human Urine, C. THOMAS éd., Springfield 111, U.S.A., 1963, 119 (264)
- KING J.S., BOYCE W.H., LITTLE J.M. et ARTOM C., J. Clin. Invest., 1958, 37, 315 (25,32,33,35,40,41,47,59,248,253,255)
- KING J.S., FIELDEN M.L. et BOYCE W.H., Arch. Biochem. Biophys., 1960, 90, 12 (74,82,347)
- KING J.S., FIELDEN M.L. et BOYCE W.H., Arch. Biochem. Biophys. 1961, 95, 424 (89,317,348)
- KING J.S., FIELDEN M.L. et BOYCE W.H., Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 316 (221)
- KING J.S., FIELDEN M.L., GOODMAN H.O. et BOYCE W.H., Arch. Biochem. Biophys., 1961, 95, 310 (75,263,282)
- KING J.S. et HYDER N., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1955, 89, 42 (38,39)
- KLENK E., FAILLARD H. et LEMPFRID H., Zeit. Physiol. Chem., 1955, 301,235 (320)
- KNECHT J. et DORFMAN A., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1965, 21, 509 (223)
- KOBAYASI T., J. Biochem. Tokyo, 1938, 28, 31 (78,188)
(*)
- LANGE K., WACHSTEIN M. et Mc PHERSON S.E., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1961, 106, 13 (278)
- LARREGLA S., Anal. Acad. Nac. Med. Madrid, 1956, 73, 154 (333)
- LATERRE E.C., HEREMANS J.F. et CARBONORA A., Clin. Chim. Acta, 1964, 10, 197 (272)
(**)
- LINKER A. et TERRY K.D., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1963, 113, 743 (88, 115)
- LINKER A., TERRY K.D. et TELLER W.H., Fed. Proc. 1962, 21, 170 (116,220)
- LOCKEY E., ANDERSON A.J. et Mc LAGAN N.F., Brit. J. Cancer, 1956, 10, 209 (341)(355e)
- LOEWI G., Ann. Rheumatic Diseases, 1959, 18, 239 (92,94,211)
- LUDOWIEG J. et BENMAMAN J.D., Anal. Biochem., 1967, 19, 80 (371,383)
- LUNBLAD A., Biochem. Biophys. Acta, 1965, 101, 46 (260)
- LUNBLAD A., Biochem. Biophys. Acta, 1966, 101, 177 (261)
- (*) KOSAKI T., IKODA T., KOTANI Y., NAKAGAWA S. et SAKA T., Science , 1958, 127, 1176 (355 c)
- (**) LEYTON G.R., CONTRERAS E.G., BARRIGA R.B. et SCHLOTTFELD H.S., Clin.Chim. Acta, 1964, 9, 214 (355 f,k,l,n)

- LUNBLAD A. et BERGGARD I., *Biochem. Biophys. Acta*, 1962, 57, 129 (250)
- Mc GALE E.H.F. et JEVONS F.R., *Biochem. J.*, 1966, 98, 112 (258)
- Mc GALE E.H.F. et JEVONS F.R., *Clin. Chim. Acta*, 1966, 14, 528 (259,394)
- Mc GARRY E., SEHON A.H. et ROSE B., *J. Clin. Invest.*, 1955, 34, 832 (5,21, 28,143,189)
- MASAMUNE H. et HAKOMORI S.I., *Gann*, 1959, 50, suppl.100 (355y)
- MATHEWS M.B., *Biochem. Biophys. Acta*, 1961, 48, 402 (105,207)
- MASAMUNE H., HAKOMORI S.I. et SUGO T., *Tohoku J.Exp.Med.*, 1959, 69, 383 (355x,w)
- MATHEWS M.B. et HINDS L.de C., *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, 74, 198 (100)
- MAXFIELD M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 85, 382 (69)
- MAXFIELD M., *Science*, 1958, 128, 1087 (204,300)
- MAXFIELD M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 85, 382 (301)
- MAXFIELD M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, 89, 281 (68,302,310)
- MAXFIELD M., *Biochem. Biophys. Acta*, 1961, 49, 548 (303)
- MAXFIELD M. et STEFANYE D., *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 2522 (316)
- MAXFIELD M. et WOLINS W., *J. Clin. Invest.*, 1962, 41, 455 (325)
- MAYES J. et HANSEN R.G., *Anal. Biochem.*, 1965, 10, 15 (117,210)
- MEHL J.W. et GOLDEN F., *J. Clin. Invest.*, 1950, 29, 1214 (193)
- MEYER K., DAVIDSON E., LINKER A. et HOFFMAN P., *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 21, 506 (101,103)
- MEYER K., GRUMBACH M.H., LINKER A. et HOFFMAN P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1958, 97, 275 (213)
- MIETTINEN T.A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1962, 14, 380 (241,246)
- MIETTINEN T.A., *Clin. Chim. Acta*, 1963, 8, 693 (242,247)
- MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, 395 (11)
- MONTREUIL J. et BOULANGER P., *C.R.Acad. Sci.*, 1953, 236, 337 (9,19,23)
- MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R. et MULLET G., *C.R.Soc. Biol.*, 1960, 154, 732 (395)
- MONTREUIL J. et GOUBET B., *Soc. Bel. Sci. Pharmaceutiques*, 1963, 299 (12)
- MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, 41, 13 (367)

- MONTREUIL J., SPIK G., DUMAISNIL J. et MONSIGNY M., Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 239 (363)
- MONTREUIL J. et SPIK G., in *Microdosage des Glucides*, Fasc. 1, Laboratoire de Chimie Biologique, Fac. Sci. Lille éd., 1963 (356)
- MONTREUIL J., SPIK G. et PIQUET C., Séances de la Soc. Chim. Biol., Gand, 28-29 avril 1961, (384)
- MÖRNER K.A.H., Skand. Arch. Physiol., 1895, 6, 332 (1,27,77)
- NAKAHARA W. et FUKUOKA F., *Chemistry of Cancer Toxin*, Thomas Pub. 1960 (355z)
- NANTO V., Acta Chem. Scand., 1963, 17, 856 (107)
- ODIN L., Nature, 1952, 170, 663 (296,309,319,321,328)
- ODIN L., in "Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides 1957" Ciba Foundation Symposium, 1958, 234 (297)
- PARTRIDGE S.M., Biochem. J., 1948, 42, 238 (364)
- PARTRIDGE S.M., Biochem. Soc. Symp., 1950, 3, 52 (366)
- PATTE J.C., BALDASSAIRE G. et LORET J., J. Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol., 1950, 1, 960 (51,157,160,163,165,169,175)
- PECHAN Z., *Neoplasma*, 1964, 11, 279 (355c)
- PEDRINI V., LENNZI L. et ZAMBOTTI V., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1962, 110, 847 (231)
- PERLMANN G.E., TAMM I. et HORSFALL F.L., J. Exptl. Med., 1952, 95, 88 (305)
- PORTER K.R. et TAMM I., J. Biol. Chem., 1955, 212, 135 (66,76,304)
- PYE J., J. Exptl. Biol., 1955, 212, 135 (306)
- REINERT M., FENICHEL R.L. et STERN K.G., Acta Haematologica, 1950, 3, 202 (192)
- REINERT M. et WINTERSTEIN A., Arch. Internat. Pharmacodyn., 1939, 62, 47 (218)
- REVILLARD J.P., in *Les protéinuries au cours des maladies rénales*, Gathéron, Pont de Veyle, France, 1964 (126,171)
- RICH C., DI FERRANTE N. et ARCHIBALD R.M., J. Lab. Clin. Méd., 1957, 50, 686 (91)
- RICH C. et MYERS W.P.L., J. Lab. Clin. Med., 1959, 54, 223, (95,212)
- RIGAS D.A. et HELLER C.G., J. Clin. Invest., 1951, 30, 853 (4,3,29,121,145, 191)

- RIGAS D.A., PAULSEN G.A. et HELLER C.G., *Endocrinology*, 1958, 62, 730 (351)
- RIMINGTON C., *Biochem. J.*, 1931, 25, 1062 (358)
- RODEN L., *Fed. Proc.*, 1964, 23, 484 (380,386,399)
- RODEN L., *Fed. Proc.*, 1966, 25, 409 (387,400)
- ROOS P. et GEMZELL C.A., *Biochem. Biophys. Acta*, 1964, 93, 217 (275)
- ROSENFELD L., NEUROF H. et MESTEL A.L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1961, 107, 317 (218)
- ROWE D.S. et SOOTHILL J.F., *Clin., Sci.*, 1961, 21, 75 (167)
- SAHLSTEDT A.V., *Scand. Arch. Physiol.*, 1916, 33, 183 (187)
- SAITO Y., *Igaku to Seibutsugaku*, 1952, 22, 139 (335)
- SCHEIDEGGER J.J., *Inter. Arch. Allergy. Appl. Immunol.*, 1955, 7, 103 (374)
- SCHEURLEN P.G., *Verhandl. Deut. Ges. Inn. Med.*, 1961, 67, 329 (127)
- SCHILLER S., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1966, 124, 215 (225)
- SCHMIDT M., *Biochem. Biophys. Acta*, 1962, 63, 346 (110)
- SCHULTZE H.E., SCHONENBERGER M. et SCHWICK G., *Biochem. z.*, 1956, 328, 267 (159)
- SCOTT J.E., in *Methods of Biochemical analysis*, D. GLICK éd., 1960, 8, 145, (98)
- SHETLAR M.R., ERWIN C.P. et EVERETT M.R., *Cancer Res.*, 1950, 10, 445 (355a,b)
- SHIMOKAWA M., *J. Physiol. Japan*, 1953, 15, 636 (342)
- SIDDIQUI R. et PURVES C.B., *Can. J. Chem.*, 1963, 41, 382 (382)
- SOLLAZO G. et CORTEZE V., *Bull. Chim. Farm.*, 1935, 74, 625 (334)
- STACEY M., *Advan. in Carbohydrate*, 1946, 2, 161 (349)
- STRECKER G., *D.E.A. de Biochimie*, 1968, Lille (13)
- STRECKER G., GOUBET B. et MONFREUIL J., *C.R.Acad. Sci.*, 1965, 260, 999 (13)
- SUDHOF H., KRIEGER D. et SCHULTZ E., *Deut. Arch. Klin. Med.*, 1958, 205, 285 (329)
- SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L., *Nature*, 1958, 181, 1154 (373,377)
- SVENNERHOLM L., *Acta Soc. Med. Upsaliensis*, 1956, 61, 75 (372)

- SZABO M.M. et ROBOZ-EINSTEIN E., Arch. Biochem. Biophys., 1962, 98, 406 (106)
- TAMM I. et HORSFALL F.L., Proc. Soc. Exptl. Biol., N.Y., 1950, 74, 108 (3,45,83,205,234,290)
- TAMM I. et HORSFALL F.L., J. Exptl Med., 1952, 95, 71 (63,64,85, 285)
- TANAKA Y. et GORE I., J. Chromatog., 1966, 23, 254 (226)
- TAYEAU F., Tunisie Méd., 1951, 29, 664 (70)
- TAYEAU F., BISERTE G., MONTREUIL J. et MARQUEVIELLE S., C.R.Acad. Sci., 1953, 237, 208 (330,339)
- TAYEAU F. et NIVET R., J. Méd. Bordeaux, 1957, 134, 813 (343)
- TAYEAU F., NEUZIL E., NIVET R. et GROUILLE J., J. Physiol., 1954, 46, 536 (332)
- TELLER W.M., BURKE E.C., ROSEVEAR J.W. et Mc KENZIE B.F., J. Lab. Clin. Med., 1962, 59, 95 (93)
- TELLER W.M. et ZIEMANN A., Klin. Wochschr., 1966, 44, 1142 (113)
- TIDSTRØM B., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1963, 15, 167 (146)
- TIDSTRØM B., Thesis, Arhus, 1961 (147)
- TUNIS M., WEINFELD H. et SANDBERG A., Cancer Res., 1958, 18, 911 (355u)
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1928, 215, 36 (357)
- TUNIS M., WEINFELD H., Cancer Res., 1962, 22, ~~764~~ (355v)
- VAERMAN J.P. et HEREMANS J.F., Experientia, 1959, 15, 226 (314)
- VARADI D.P., CIFONELLI J.A. et DORFMAN A., Fed. Proc., 1963, 22, 412 (228)
- VARADI D.P., CIFONELLI J.A. et DORFMAN A., Biochem. Biophys. Acta, 1967, 141, 103 (119,135,186,196,398)
- WALDROM D.M., Nature, 1952, 170, 461 (57)
- WEBB T., ROSE B. et SEHON A.H., Can. J. Biochem. Physiol., 1958, 36, 1159 (22,26)
- WEBB T., ROSE B. et SEHON A.H., Can. J. Biochem. Physiol., 1958, 36, 1167 (141)
- WEICKER H., HUHNSTOCK K. et GRASSLIN D., Clin.Chim.Acta, 1964, 9, 19 (355s,t)
- WERNER J. et ODIN L. Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230 (361)
- WESSLER E., Clin. Chin. Acta, 1967, 16, 235 (112)
- WHITEHOUSE M.W. et MORETTI A., Biochem. J., 1963, 87, 396 (102)

- WIEME R.J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 235 (48)
- WIENER R., IANNACCONE A., EISENBERG J., GRIBOFF S., LUDWIG A.W. et SOFFER L.J.,
J. Clin. Endocrinol., Metab., 1955, 15, 1131 (17)
- WINKERT J.W. et GORDON A.S., Biochem. Biophys. Acta, 1960, 42, 170 (279)
- WINKERT J.W., GORDON A.S., PILIERO S.J. et MEDICI P.I., Proc. Soc. Exptl.
Biol. Med., 1958, 98, 351 (355)
- WINZLER R.J. et SMYTH I.M., J. Clin. Invest., 1948, 27, 717 (355d)
- YAMAZOE S., Gunna. J. Med. Sc., 1952, 1, 23 (336)
- YOSIYADA K., Z. Ges. Exptl. Med., 1928, 63, 331 (2)
- ZELLWEGER H., PONSETI I.V., PEDRINI V., STAMLER F.S. et VON NORDEN G.K.,
J. Pediatrics, 1961, 59, 549 (230)

=====

