50376 1970 Nº d'ordre : 219. 161

50.376 1970 161

MEMOIRE PRESENTE

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LILLE POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR EN TROISIEME CYCLE SPECIALITE : BIOCHIMIE

par

Monsieur Bernard BAYARD

ACETOLYSE DES GLYCOPEPTIDES

- 1°- FRACTIONNEMENT DES ACETOLYSATS
- 2°- DETERMINATION DE LA STRUCTURE DE QUELQUES OLIGOSACCHARIDES ISOLES DES ACETOLYSATS D'OVOMUCOIDE



Présenté le 5 décembre 1970, devant la commission d'examen

M. Z. GLACET Président

M. J. MONTREUIL Rapporteur

M^{11e} G. SPIK

M. G. STRECKER

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur J. MONTREUIL, chef du Service de Biochimie Cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Directeur: Professeur J. DRIESSENS). Il a bénéficié d'une subvention de l'I.N.S.E.R.N. (Action Concertée "Cancer et Leucémie" convention CR-66-228).

Nous remercions Messieurs B. FOURNET, G. STRECKER et

S. BOUQUELET pour leur amicale collaboration scientifique ainsi que Madame

D. ROUX et Mademoiselle A. POITAU pour leur précieuse collaboration technique.

TABLE des MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
GENERALITES	3
STRUCTURE DES GLYCANNES	4
I - n-GLYCANNES	5
A - MUCINES SOUS-MAXILLAIRES	5
B - MUCOPOLYOSIDES ACIDES DE LA SUBSTANCE FON- DAMENTALE	5
II - Iso-GLYCANNES	7
A - GLYCOPROTEINES SERIQUES	7
1 - Structure des glycannes de l'orosomucoïde	9
2 - Structure des glycannes de la transferrine	9
B - GLYCOPROTEINES DE L'OEUF	12
1 - Structure du glycanne de l'ovalbumine	12
2 - <u>Structure du glycopeptide</u> β <u>de l'ovomucoïde</u>	12

PROCEDES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE	Pages
	15
DES GLYCANNES	
I - PROBLEMES POSES PAR LA STRUCTURE DES	
ISO-GLYCANNES	15
A - LA COMPLEXITE STRUCTURALE DES ISO-	
GLYCANNES	16
B - L'INTERFERENCE DU PROTIDE	. 17
C - L'IMPERFECTION DES METHODES	18
1 - L'hydrolyse enzymatique	, -
2 - Méthode de perméthylation	, -
3 - Méthode d'oxydation periodique	
4 - Procédés d'hydrolyse acide partielle	. 19
II - LES PROCEDES D'EXPLORATION DE STRUCTURE	
<u>DES GLYCANNES</u>	• 19
A - DEGRADATION ENZYMATIQUE	. 19
1 - Action d'osidases spécifiques	. 19
2 - <u>Dégradation enzymatique récurrente</u>	. 29
B - OXYDATION PERIODIQUE	
1 - <u>Principe</u>	
2 - Applications	. 21
C - PERMETHYLATION	
1 - Principe	·
2 - Applications	. 22

3 - Limites de la méthode	22
D - HYDROLYSE ACIDE PARTIELLE	22
1 - Stabilité des liaisons glycosidiques vis-à-vis des agents	
d'hydrolyse	23
2 - Divers procédés d'hydrolyse partielle	25
a - Hydrolyse par les résines échangeuses de cations	25
b - Hydrolyse par les acides minéraux dilués	26
3 - Facteurs de modification des glucides au cours de l'hydro-	
lyse acide partielle	26
a - Epimérisations	26
b - Condensation par transosylation	26
L'ACETOLYSE	28
I - HISTORIQUE	28
A - ACETOLYSE DES MONOPOLYOSIDES	29
- <u>La cellulose</u>	29
2 - <u>La chitine</u>	29
3 - Les mannanes	30
B - ACETOLYSE D'HETEROPOLYOSIDES	30
II - PRINCIPES	31
A - PRINCIPES DE L'ACETOLYSE	31

T 8	~ -	
ν_{Λ}		110
1. 11.	T	111

	B- SPECIFICITE DE LA COUPURE DES LIAISONS	20
	OSIDIQUES AU COURS DE L'ACETOLYSE	32
Ţ	- Labilité des liaisons . I -> 6	34
2	- Stabilité des liaisons glucosyl et mannosyl	34
3	- Stabilité de la fonction acétamido des N - acétylosamines	34
4	- Stabilité des liaisons sialosyl	34
	C -MODIFICATION DES GLUCIDES AU COURS DE L'ACETOLYSE	36
1.	- Anomérisation	36
2	- Epimérisation	37
	D - PRINCIPE DE L'ISOLEMENT DES OSIDES	37
1	- La séparation des osides peracétylés	37
2	- La séparation des osides O-désacétylés	38
+/2::	TRAVAUX PERSONNELS	
	I ^{ère} PARTIE :MISE AU POINT DU PROCEDE D'ACETOLYSE	
	ETUDE DES DIVERS PROCEDES DE DESACETYLATION	
	I - MATERIEL ET METHODES	
	A-ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES OSE	S
1	- Dosage colorimétrique des oses	12
2	- Chromatographie des oses	-
3	- Electrophorèse des oses	

B- DESACETYLATION DES OSES PERACETYLES

	Pages
	les acides
I	I -RESULTATS EXPERIMENTAUX
A	- PROCEDES DE DESACETYLATION APPLIQUES AU PERACETYLGALACTOSE ET PERACETYLGLUCOSAMINE
	ntaacétyl- D -galactose49 tra-O-acétyl N-acétylD-glucosamine5I
I	II - CONCLUSIONS
STABILITE DES	LIAISONS GLYCOSIDIQUES VIS-A-VIS DE L'ACETOLYSE
	I - MATERIEL ET METHODES
	A - CHOIX DU MATERIEL
	II - RESULTATS EXPERIMENTAUX
	A - LIAISONS OSIDIQUES DU TYPE Z ET 362 B -LIAISONS DU TYPE GLUCOSYL ET GALACTOSYL 63 C -LIAISONS DU TYPE N-ACETYLGLUCOSAMINYL ET GLUCOSYL
	D -LIAISON GALACTOSYL DES TYPES I> 4

III - CONCLUSIONS

MISE AU POINT D'UN PROCEDE DE FRACTIONNEMENT DES ACETOLYSATS GLYCOPEPTIDIQUES

I - MATERIEL ET METHODES
A - PROPRIETES DE L'ACETOLYSE70
1 - Stabilité des liaisons sialosyl
2 - Absence de N-acétylation des amino-acides
B-FRACTONNEMENT DES ACETILYSATS GLYCOPEPTIDIQUES
1 -Solubilité différentible des hétérosides peracétylés dans le
mélange chloroforme-eau
2 - Fractionnement sur résines échangeuses d'ions
II- RESULTATS EXPERIMENTAUX
A - ETUDE DU FRACTION MEMET DE L'ACETOLYSAT DES
ASIALOGLYCOPEPTIDES β DE L'OVOMUCOIDE77
1- Etude de la fraction "neutre"
2-Etude de la fraction glycopeptidique aqueuse
3-Etude de la fraction glycopeptidique chloroformique78
B - ETUDE DU FRACTIONNEMENT DE L'ACETOLYSAT DES
SIALOGLYCOPEPTIDES & DE L'OVOMUCOIDE81
Zème PARTIE

APPLICATION DE L'ACETOLYSE A L'EXPLORATION DE LA STRUCTURE DES OSIDES LIBRES ET CONJUGUES

ACETOLYSE D'UN SIALYL-OLIGOSACCHARIDE ISOLE DU LAIT DE FEMME

1		
	I- MATERIEL ET METHODES	
	A- ORIGINE ET COMPOSITION	85
	B- ACETOLYSE DE L'HEXASACCHARIDE	85
	C- ISOLEMENT DES OSIDES	 .85
	D- ETUDE DE LA STRUCTURE DES OSIDES	86
1 - Compositio	on des osides	86
a - Compos	sition centésimale.,	86
b - Identi	ification et dosage des oses	87
2- Rupture sp	pécifique des liaisons sialyl	87
	II - RESULTATS EXPERIMENTAUX A - ISOLEMENT DE 8 OSIDES B - COMPOSITION ET STRUCTURE DES OSIDES III - CONCLUSIONS	
	ACETOLYSE DES GLYCOPEPTIDES & DE L'OVOMUCOIDE	
	I - MATERIEL ET METHODES	
	A - ORIGINE ET COMPOSITION	98
1 - Préparatio	on et isolement des glycannes	98
2 - Compositio	on centésimale et molaire des glycopeptides	IOI

B - ACETOLYSE DES GLYCANNES
1 - Etude quantitative comparée de l'acétolyse et de l'hydrolyse
acide par les résines échangeuses de cations
2 - Etude quantitative de l'acétolyse des glycopeptides10
3 - Cinétique de libération des oses au cours de l'acétolyse103
C- ISOLEMENT DES OLIGOSIDES DE LA FRACTION NEUTRE
1 - Chromatographie sur colonne de charbon-Celite
2 - Chromatographie et électrophorèse sur papier
3 - Mise au point d'un procédé sensible et reproductible de
"finger-printing" des oligosaccharides
D- ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES
1 - Composition des oligosaccharides
2 - Etude de la structure des osides
a - Identification de l'ose réducteur
b - Détermination de le masse moléculaire des osides104
c - Acétolyse des tri- tétra- et penta-saccharides105
d - Acétolyse des tri- tétra- et penta-saccharides réduits105
e - Perméthylation des osides
f - Hydrolyse enzymatique
II - RESULTATS EXPERIMENTAUX
A - ACETOLYSE DES GLYCANNES
1 - Etude comparée de l'hydrolyse ménagée et de l'acétolyse
2 - Etude quantitative de l'acétolyse des glycopeptides
= Hange daming and ac I goodell no good grade and all oobel at good
BISOLEMENT DES OLIGOSIDES DE LA FRACTION HEUTRE
1 - Chromatographie sur colonne de charbon-Celite
2 - Mise au point d'un procédé de carte chromatographique
des oligosaccharides neutres

В		ETUDE	DE	$L\Lambda$	STI	RU	CT	UR	E	DI	<u> </u>	C	S.	ID	ES	₫•	, ,		• (•	0 0	•	o o	. e	II7
		OSIDE	Λ.		, , ,	o 2	3 3	3 3	5 9	• (•	•					• •			່ນ	6	۰ ۰		o 6	3 11	II8
		OSIDE	В.	, o o (, , ,	6 9	3 O	٥	e 0			3 0	۰	е.	o	, ·	0 0			• •	•	• •	.,	٥ ٥	, ,	I25
		OSIDE	C • •			0 0	s :	0 2	5 .		0 0	n 3	, s	o 0	•	۰ ،	•	, ,	0 6				g	• •	. 0	I26
		OSIDE	D.			o	0 0	ŭ s	6 0	• 1	• •	, 0	9		0 1	0 3			o (, ,	•	• •	۰	• •	. e	127
		OSIDE	F		0 0		0 9	0 0	• 0	۰		0 4		o o			. o		•	, 3	٠					I28
		OSIDE	G.,			o 0	3 0	۰ .				5 9		υ 0	• (3 0					•			• •		128
		OSIDE	Η			o o	a 2	0 0	o a		, ,		ь			, ,					0	p 9	o	0 0		I 3 0
		OSIDE	Ι.,			c •	5 0		•	• •			ь	0 0		2	۰ •		0 0	•			•		• •	I32
		OSIDE	J.,			0 0	• •	• •	o G	0 0		o o	0	0 9	υ «	2 0	၁၂		٠	۰				• •		I34
		OSIDE	K		• • •	a o			o •	e a						• •	• 0			•			٥.	• •		I36
		OSIDE	L		• • •			• •	6 0			• •	9	e 9		•		0	• •	۰	• •			• •		I38
		OSIDE	М	000		3 0	۰ ۰		• •	0 0		• •		• •	•		• •	•				•	0	o 6	3 6	I40
	C	CONCLUS	SION	S C	ENI	ER/	lΠ	ES											•	v	0 6		3 6	3 0	• 0	I48
	I	BIBLIO	FRAF	HIE) i														٠		00	o	0 =			I5I

INTRODUCTION

Sans citer la totalité des résultats acquis jusqu'à présent sur la structure des glycannes, nous examinerons quelques exemples qui nous permettront de montrer qu'il existe des analogies de constitution.

Aucun des schémas actuellement proposés n'est en fait définitif car les procédés d'exploration, si divers soient-ils ne donnent que des résultats partiels et fragmentaires. L'application d'un seul type de procédé ne permet pas de résoudre tous les problèmes d'analyse structurale, c'est pour cette raison que généralement les auteurs font appel à l'originalité et à la complémentarité de chacun des procédés généraux d'exploration tels que l'hydrolyse enzymatique, l'oxydation periodique, la perméthylation et l'hydrolyse acide partielle.

Ce dernier procédé a retenu plus particulièrement notre attention, car bien que couramment utilisée, cette méthode présente divers inconvénients. Les rendements en osides sont faibles et les réactions de transosidation sont possibles. C'est pour cette raison que nos travaux se sont orientés vers l'application d'une autre méthode, vieille de 90 ans : l'acétolyse.

Si cette technique a connu de nombreuses applications dans une première période, elle semble actuellement de moins en moins utilisée, les raisons sont les suivantes :

- 1º Le pouvoir de résolution en chromatographie sur colonne ou sur papier d'osides péracétylés contenus dans l'acétolysat est faible.
- 2º Les osides 0-désacétylés ont un pouvoir de résolution élevé, cependant les procédés de désacétylation des osides ne sont pas quantitatifs.

3º Les modalités de rupture des liaisons osidiques vis-à-vis des agents acétolysants sont très mal connues.

Nos travaux se proposent donc de résoudre ces problèmes. Nous étudions tout d'abord les conditions favorables à une 0-désacétylation quantitative des glucides peracétylés contenus dans les acétolysats et sur les bases de ces résultats nous précisons le comportement des différents types de liaisons osidiques. Nous tirons parti de ces propriétés pour mettre au point un procédé de fractionnement des acétolysats glycopeptidiques sur échangeurs de cations et d'anions, qui nous permet d'obtenir trois fractions. La première non retenue par les résines, contient des osides neutres qui proviennent de la partie centrale des glycannes. La seconde, acide, déplacée de l'échangeur d'anions, est constituée de sialyl-oligosides qui appartiennent à la fraction la plus externe des glycannes. La troisième, éluée de l'échangeur de cations, renferme des glycannes et correspond aux séquences glucidiques au voisinage du point d'attache avec la chaîne peptidique.

Finalement nous appliquons cette technique à l'exploration de la structure d'un hexasaccharide isolé du lait de femme ainsi qu'à l'étude de la séquence des monosaccharides des glycopeptides de l'ovomucoide.

Nous ferons précéder l'exposé de nos travaux par une courte revue générale consacrée aux problèmes que posent l'étude de la structure des glycannes.

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

- 1 BAYARD B., MONTREUIL J.: Hydrolyse et acétolyse des osides libres et conjugués, Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie, 1969, 77, 3
- 2 MONTREUIL J., MONSIGNY H., SPIK G., BAYARD B.: Solution de quelques problèmes concernant la structure des glycannes. Hoppe Seyler's Zeitschrift für Chemie 1969, 350,667
- 3 GRIMMONPREZ L., BOUQUELET S., BAYARD B., SPIK G., MONSIGNY M., MONTREUIL J.

 Rétermination de la structure d'un hexaose isolé du lait de ferme, le

 dilactaminyl lacto-N-tétraose. Eur. J. Biochem. 1970, 13 384
- 4 BAYARD B., STRECKER G., MONTREUIL J.: Analyse chromatographique des acétolysats de glycopeptides et description d'un procédé reproductible de chromatographie comparative des oligosaccharides "neutres". International
 Symposium VI. Chromatographie-Electrophorèse, BRUXELLES 1970, Presses
 Académiques Européennes, édition 1970.
- 5 BAYARD B. MONTREUIL J. Description d'un procédé d'acétolyse appliqué à l'étude de la structure des glycannes. Eur. J. Biochem. (sous presse).
- 6 BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G., MONTREUIL J. Isolement et étude de la structure de 16 oligosaccharides présents dans les acétolysats des glycopeptides & de l'ovomucoïde. Eur. J. Biochem. (sous presse).

GENERALITES

- I STRUCTURE DES GLYCANNES
- II PROCEDES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES

Nos connaissances concernant la structure des glycoprotides sont encore très fragmentaires et les résultats les plus importants n'ont été acquis que dans les trois dernières années. Deux raisons peuvent être évoquées pour expliquer cette lente évolution. En premier lieu, peu de glycoprotides ont été isolés à l'état pur et en quantités suffisantes pour permettre une exploration poussée de leur constitution. En second lieu, la dualité de composition des glycoprotides complique singulièrement la question car elle pose trois problèmes : le premier concerne le groupement glycannique, le second, la fraction polypeptidique et le troisième les modalités d'attache du ou des glycannes sur la chaîne protidique. Nous limiterons notre étude à l'exploration de la structure des glycannes appartenant à des glycoprotides animaux.

STRUCTURE DES GLYCANNES

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

Nous pouvons distinguer deux groupes fondamentaux de glycannes. Les uns de composition simple sont constitutés d'un ou de deux oses seulement. Dans ce dernier cas, les oses peuvent être associés en unités diholosidiques liées directement à la chaîne polypeptidique (mucines sous-maxil-laires par exemple) ou unis les uns aux autres en longues chaînes polyosidiques

non ramifiées (mucopolyosides acides par exemple). Nous les appellerons <u>n-gly-cannes</u>. Les autres de composition plus complexe, renferment de nombreux types d'oses associés en molécules ramifiées. Ce sont les <u>iso-glycannes</u>.

Dans chacun de ces groupes, existent des analogies de structure des glycannes et il est possible de ramener celles-ci à quelques schémas fondamentaux.

I - n-GLYCANNES

A - MUCINES SOUS-MAXILLAIRES

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

La mucine sous-maxillaire du Boeuf possède une structure très voisine, illustrée par la figure 1 (p. 6).

B - MUCOPOLYOSIDES ACIDES DE LA SUBSTANCE FONDA-MENTALE

Le tissu conjonctif est essentiellement constitué par un réseau de fibres protidiques noyées dans une substance amorphe, riche en glucides, appelée <u>substance</u> fondamentale.

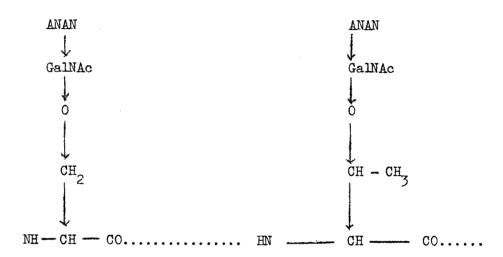


Figure 1

Liaison glycanne-protide dans les mucines sous-maxillaires de Mouton, d'après GOTTSCHALK, MURPMY, GRAHAM (1, 2).

La structure de ces constituants glucidiques a été déterminée grâce aux travaux de JEANLOZ et de MEYER. Tous possèdent en commun la particularité d'être constitués par des lenchaîrements réguliers, non ramifiés, d'unités dihelòsidiques composées de N-acyl-hexosamine sulfurylée (*) et d'acide uranique (**). La structure d'un type de ces glycannes est illustrée par la figure 2 (p. 8).

II - Iso-GLYCANNES

De nombreux glycoprotides, isclés des milieux biologiques les plus divers, comme les tissus, le sang, le lait, l'urine, sont constitués par l'association d'une fonction protidique avec plusieurs unités polyosidiques dont le prids moléculaire est relativement faible (2 000 à 3 000 environ)
et dont la composition et la structure sont complexes. Ils sont en effet constitués par la conjugaison de plusieurs oses différents formant un édifice moléculaire ramifié. On conçoit aisément que la structure compliquée de ces "iso-glycannes" ne soit pas encore connue.

A - GLYCOPROTEINES SERIQUES

Le sérum est constitué d'un grand nombre de glycoprotéines ; la structure glycannique de 3 ou 4 seulement a fait l'objet de travaux assez poussés. Il s'agit en particulier de l'orosomucoïde et de la transferrine.

^(*) A l'exception de l'acide hyaluronique

^(**) A l'exception de l'acide kératosulfurique.

$$\begin{bmatrix} Gal & NAc \longrightarrow Glc & AU \\ & & & \\ & &$$

Figure 2

Liaison xylosidique de la protéine et de la chaine glycannique dans l'acide chondroïtine sulfurique B.

1 - Structure des glycannes de l'orosomucoïde

Afin d'avoir des connaissances précises sur la structure de la copule glucidique, il est nécessaire de connaître les relations entre les parties glucidiques et protidiques. Deux possibilités de structure entrent en considération : soit que cette glycoprotéine possède un seul glycanne branché en un seul ou plusieurs sites de la protéine, soit qu'elle possède plusieurs glycannes branchés en divers endroits sur la protéine. Actuellement la seconde hypothèse semble réunir le plus de suffrages, néanmoins ces chaînes glycanniques n'ont pu être isolées et l'ensemble des travaux accomplis jusqu'à présent concernent la totalité des glycannes.

Les résultats obtenus par les auteurs sont fragmentaires. EYLAR et JEANLOZ (3) ont proposé un schéma hypothétique de structure (Fig. 3; p. 10); cependant récemment FOURNET, TAKERKART, BROHON et MONTREUIL (4) ont isolé d'un hydrolysat de glycopeptides de l'orosomucoïde deux mannobioses isomères. Ce résultat remet en cause le schéma de EYLAR et JEANLOZ et permet de penser qu'ilpeut exister un noyau oligomannosidique interne. Cette caractéristique ne serait d'ailleurs pas spécifique de l'orosomucoïde puisqu'on le rencontre également dans d'autres iso-glycannes: ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (5).

2 - Structure des glycannes de la transferrine

Les travaux entrepris au laboratoire ont pu mettre en évidence la présence de deux chaînes glycanniques d'un poids moléculaire voisin de 2 200. L'exploration structurale de l'ensemble des deux chaînes laisse apparaître des chaînons cligosidiques tels que la N-acétyl-lactosamine, deux mannobioses isomères et un mannotriose. D'autres résultats complémentaires à ceux précédemment cités, ont permis à SPIK de proposer un schéma de structure, illustré par la figure 4 (p. 11).

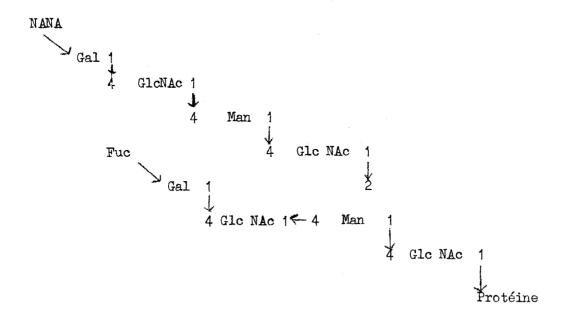


Figure 3

Schéma de structure hypothétique de l'iso-glycanne de l'orosomucoïde (EYLAR et JEANLOZ) (6).

Figure 4

Schéma de structure du glycanne de la transferrine selon SPIK (7)

B - GLYCOPROTEINES DE L'OEUF

Ces glycoprotéines représentent un matériel de choix pour l'étude de leur structure, leur préparation est aisée, les rendements sont élevés, la simplicité de leur composition en oses facilite l'étude des groupements glycanniques. Ceci explique que l'ovalbumine et l'ovomucoïde sont actuellement les deux glycoprotéines de l'oeuf les mieux connues.

1 - Structure du glycanne de l'ovalbumine

Les travaux de MONTGOMERY, WU et LEE (8) semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle il n'existerait qu'une chaîne glycannique liée à l'acide aspartique. L'ensemble des travaux ont conduit les auteurs (CLAMP et HOUGH (9); KAUFMAN et MARSHALL (10); LEE et MONTGOMERY (11)) à admettre le schéma incomplet illustré par la figure 5 a et 5 b (p. 13).

2 - Structure du glycopeptide β de l'ovomucoïde

Ce glycanne d'un paids moléculaire de 3 200 est composé de 16 unités osidiques dans le rapport molaire suivant 1 Galactose; 5 Mannose; 10 Glucosamine. Les résultats obtenus par oxydation periodique laissent prévoir sans ambiguité que cette molécule est du type ramifié. L'application d'autres procédés d'exploration, en particulier la perméthylation, précise que le point de branchement est constitué par une molécule de mannose. L'ensemble de ces résultats, ainsi que l'analyse structurale de 15 oligosaccharides obtenus par hydrolyse acide partielle par CHOSSON, MONTREUIL et SCHEPPLER (12) ont permis de réaliser une ébauche de schéma de structure (Fig. 6 : p. 14).

Figure 5 a

Séquence peptidique et point d'attache du glycanne dans l'ovalbumine selen LEE et MONTGOMERY (13).

GlcNAc
$$\xrightarrow{1-2}$$
 Man $\xrightarrow{1-4}$ GlcNAc $\xrightarrow{1-}$ GlcNAc $\xrightarrow{}$ Asn $\xrightarrow{}$ 1 - 3

Man $\xrightarrow{1-4}$ Man $\xrightarrow{}$ 1 - 2

Figure 5 b

Schéma de structure du glycopeptide de l'ovalbumine selon MONTGOMERY, WU et LEE (14).

GlcNAc : N-acétyl Glucosamine ; Man : Mannose ; Asn : Asparagme.

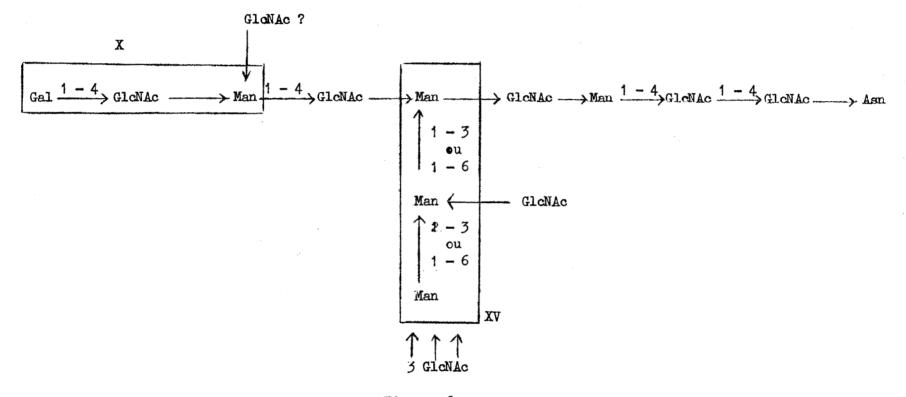


Figure 6

Schéma fragmentaire de structure du 3lycopeptide β de l'ovomucoïde : DUPONT (15).

X et XV : esides isolés par ADAM-CFOSSON (1 ϵ)

GlcNAc : N-acétyl-glucosamine ; Man : Mannose ; Gal : Galactose ; Asn : asparagine.

L'ensemble de ces exemples est en faveur de schémas de structures voisines. En effet les études cinétiques des hydrolysats acides de la fraction glucidique donnent toujours les mêmes résultats : les acides sialiques et le fucese apparaissent dès le début d'hydrolyse et se trouvent donc en position "externe" par rapport à l'ensemble de la molécule. Le mannose et les osamines font partie de la fraction résistante de la molécule osidique et se trouvent en position "interne".

Cependant, les schémas proposés par les auteurs restent incomplets et parfois hypothétiques. Deux raisons peuvent être invoquées, d'une part l'imperfection des procédés d'exploration et d'autre part la complexité structurale de ces types de molécules.

PROCEDES D'EXPLORATION DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES

I - PROBLEMES POSES PAR LA STRUCTURE DES ISO-GLYCANNES

La structure des iso-glycannes n'a été jusqu'à présent que très partiellement élucidée en raison :

- de sa complexité
- de l'interférence du protide
- du manque de méthodes.

A - LA COMPLEXITE STRUCTURALE DES ISC-GLYCANNES

L'ensemble des résultats acquis pendant ces dernières années laisse prévoir que les glycannes sont constitués d'un nombre relativement peu élevé d'unités osidiques. L'application de différents procédés à la détermination des masses moléculaires des glycopeptides conduit à des valeurs voisines de 2 000 à 3 250 ; ce qui correspond à des glycannes renfermant 12 à 20 unités osidiques, parmi lesquelles on rencontre constamment une osamine liée à la protéine.

Le problème de la détermination de la structure du glycanne peut se résoudre en trois étapes successives :

- identification des oses.
- détermination des rapports centésimaux et molaires des òses
- détermination de la séquence des cses.

Le problème de la détermination de la séquence des oses reste actuellement que très partiellement élucidé car la nature variée des oses composant le glycanne crée une stabilité toute relative de la liaison glycosidique vis-à-vis des agents d'hydrolyse; de ce fait, il est impossible de prévoir le point de rupture des liaisons glycosidiques dans les chaînes glycanniques.

Les procédés d'hydrolyse partielle (p.22) fournissent des monosaccharides et quelques oligosaccharides que l'on peut isoler à l'état pur afin d'en élucider la structure par les procédés classiques de méthylation, d'oxydation periodique ainsi que par l'action d'enzymes spécifiques. Mais le problème reste entier quant à la reconstitution du "puzzle".

B - L'INTERFERENCE DU PROTIDE

- 1 La présence du protide ne permet pas d'obtenir de résultats satisfaisants avec l'application des procédés d'exploration tels que la méthylation et l'oxydation périodique. En effet, la fonction alcool secondaire des hydroxyamino-acides de la sérine et de la thréonine peut être soit méthylée soit oxydée par l'acide periodique et introduire de ce fait des difficultés supplémentaires et des causes d'erreur dans les études quantitatives.
- 2 Par ailleurs, les oses sont susceptibles de se condenser dans certaines conditions, par leur fonction semi-aldéhydique avec des amines pour former des complexes aminés stables. La réaction de condensation ou réaction de MAILLARD concerne plus précisément la condensation des oses ou des osides avec des fonctions amines des protides : acides aminés, peptides et protéines. La condensation des glucides et des protides se manifeste par l'apparition d'une coloration jaunâtre ou d'un précipité noirâtre dans les milieux réactionnels. Ce mécanisme conduit à des causes d'erreur par défaut dans la détermination de la composition en oses des glycoprotides.
- 5 Il convient donc d'effectuer l'analyse structurale sur le glyco-aminoacide ou sur le glycopeptide. La séparation du glycanne de la protéine (LEVENE et MORI) (17) par la baryte à 10 p. 100 à 100°C présente quelques désavantages (MEYER, 1945) (18). Dans de telles conditions les groupements N-acétyls étaient libérés et le pH alcalin favorisait la destruction des sucres réducteurs. Cette difficulté a été résolue grâce à l'utilisation d'enzymes protéolytiques tels que la pronase, la papaïne, la trypsine ou la pepsine. Toutefois au cours de cette hydrolyse enzymatique, il convient de vérifier que la composition du glycanne n'a guère varié au cours de l'opération. Après plusieurs cycles d'action de l'enzyme, les amino-acides, les peptides et le ou les glycoaminoacides sont fractionnés suivant leurs propriétés physico-chimiques. L'isolement des glycoaminoacides met en oeuvre des méthodes de gel filtration, de précipitation, de fractionnement sur échangeurs d'ions et d'électrophorèse.

C - L'IMPERFECTION DES METHODES

1 - L'hydrolyse enzymatique

La cristallisation de nombreux enzymes protéolytiques ainsi que la détermination de leur spécificité a permis d'établir une abondante information sur la structure des peptides et des protéines. Malheureusement, peu d'osidases ont été isolées jusqu'à présent à l'état pur. Par ailleurs, la spécificité de substrat de chaque enzyme n'est pas défini. En outre de nombreuses osidases possèdent une activité transférasique.

2 - Méthode de perméthylation

Ces méthodes rendent de grands services à la chimie structurale des glucides, cependant l'identification des oses méthylés d'un glycanne ne peut se faire qu'en comparaison de leur mobilité chromatographique avec celle de témoins de synthèse. Or les dérivés méthylés des oses sont nombreux d'une part (14 pour un hexose) et d'autre part, leur synthèse est délicate.

3 - Méthode d'oxydation periodique

Les procédés d'oxydation par l'acide periodique permettent de garder intacte deux types de structure : d'une part, les N-acétyl-hexosamines dont le carbone 4 ou 3 est substitué et, d'autre part, les hexoses dont le carbone 3 ou dont les carbones 2 et 4, 2 et 3 ou 3 et 4 sont substitués auquel cas nous sommes en présence d'une structure dite "branchée". Cette méthode est donc limitée puisqu'elle ne fournit que des renseignements fragmentaires concernant essentiellement les points de branchements des glycannes ramifiés.

4 - Procédés d'hydrolyse acide partielle

Connue de longue date, ces procédés fournissent de faibles quantités d'osides et des quantités importantes d'oses "neutres" et d'osamines. D'autre part dans des conditions de pH et de concentration les phénomènes de transosidation peuvent introduire des causes d'erreur. Il est, de ce fait, impossible de distinguer les osides d'origine glycannique des osides formés par recombinaison d'hexoses libres.

II - LES PROCEDES D'EXPLORATION DE STRUCTURE DES GLYCAN-NES

A - DEGRADATION ENZYMATIQUE

Dans de nombreux cas leur action est facilitée par l'utilisation d'un substrat glycopeptidique plutôt que glycoprotidique (SPIRO, 1962) (19). Deux types de procédés sont mis en oeuvre :

1 - Action d'osidases spécifiques

Ces enzymes possèdent une action hydrolysante limitée uniquement à la périphérie des glycannes. Toutefois, peu d'osidases ont été isolées jusqu'à présent à l'état pur, on peut citer la <u>neuraminidase</u> extraite du Vibrio Cholerae (ADA et FRENCH, 1959 (20); SCHRAMM et MOHR, 1959 (21); GOTTSCHALK, 1960 (22)) la β-galactosidase isolée d'un mutant d'Escherichia Coli

(WALLENFELS, ZARNITZ, LAULE, BENDER et KESER, 1959 (23); WALLENFELS et MALMOTRA, 1960 (24)); la N-acétyl-β-D-glucosaminidase mise en évidence tout d'abord dans l'épididyme de porc par FINDLAY et LEVY (25) puis dans les cultures de Diplococus pneumoniae par HUGHES et JEANLOZ (26). Cependant la plupart des enzymes utilisés jusqu'à présent ne sont pas suffisamment purifiés, en outre leur spécificité de substrat est mal définie.

2 - Dégradation enzymatique récurrente

Dans ce type de dégradation, il convient de classer la méthode de STACEY, BARKER, PARDOE et HOPTON fondée sur l'hydrolyse récurrente du glycanne par des enzymes adaptatifs excrétés par des microorganismes au fur et à mesure que se présentent de nouveaux types de liaisons osidiques. Aussi l'incubation d'orosomucoïde urinaire par exemple dans un milieu contenant une suspension cellulaire de <u>Klebsiella aerogenes</u> (NCIB 9479) conduit à la synthèse d'un bon nombre d'enzymes (BARKER, 1963 et 1964) (27, 28). On voit se libérer successivement en fonction de leur position dans la molécule l'acide N-acétylneuraminique, le fucose, le galactose et la N-acétylglucosamine.

Dans ce même type de dégradation on peut citer par exemple la dégradation par une neuraminidase des unités diholosidiques de glycopeptides de la mucine sous-maxillaire ovine qui conduit à la libération d'acide N-acétylneuraminique.

B - OXYDATION PERIODIQUE

1 - Principe

GOLDSTEIN, MAY, LEWIS et SMITH (29) ont décrit un procédé de dégradation récurrente de la fraction glycannique des glycoprotides dont le principe est le suivant : La fraction glucidique est d'abord oxydée par l'acide periodique qui transforme les oses conjugués porteurs de fonctions α-glycoliques en dialdéhydes; dans un second temps, les fonctions aldéhydiques sont réduites en fonctions alcooliques par le borohydrure de potassium; dans un troisième temps, la solution glycoprotidique modifiée est amenée à pH 1 avec l'acide sulfurique qui hydrolyse les liaisons glycosidiques labilisées par la transformation des oses en acétals linéaires.

L'identification et le dosage des oses non oxydés ainsi que les produits résultant de l'oxydation fournissent des renseignements sur la structure du glycanne.

2 - Applications

Ce procédé a été appliqué aux glycopeptides obtenus par dégradation protéasique des glycoprotéines suivantes : globulines Y_G humaines (ROTHFUS (30); ROTHFUS et SMITH (31)); l'evomucoïde (CHATTERJEE et MONTGOMERY (32)); l'evalbumine (MONTGOMERY, WU et LEE (33)); l'erosomucoïde (JEANLOZ (34)) et la féturine (SPIRO (35)).

C - PERMETHYLATION

1 - Principe

Cette méthode est la plus utilisée en matière de chimie structurale des glucides, elle s'applique aux cligosaccharides et par extension aux glycopeptides; son principe est le suivant : le glycanne d'abord 0-perméthylé au cours de plusieurs cycles de méthylation est ensuite hydrolysé. L'hydrolysat renfermant des oses neutres, des osamines et des oses méthylés est ensuite soumis à différentes techniques de fractionnement telles que la chromatographie en phase gazeuse.

2 - Applications

Ces procédés furent appliqués aux glycopeptides obtenus par dégradation enzymatique des glycoprotéines suivantes : l'ovomucoïde (STACEY et WOOLEY (36)) et l'orosomucoïde (JEANLOZ et CLOSSE (37)).

3 - Limites de la méthode

- a Les fonctions amines libres ainsi que les liaisons peptidiques des glycoprotéines réagissent au même titre que les fonctions α glycol des oses, afin d'éliminer cette interférence la copule protidique et dégradée par l'action des enzymes; la perméthylation s'effectue donc sur le glyco-amino-acide.
- b La méthylation des fonctions "hydroxylées" libres des oses doit être totale; en fait, les agents de méthylation ne réalisent que des méthylations partielles de la molécule d'ose, ainsi on est souvent amené à effectuer plusieurs cycles de méthylation.
- c L'hydrolyse du glycopeptide perméthylé pose les mêmes problèmes que l'hydrolyse des glycopeptides; en outre les cuteurs CROON, HERRSTRÖM, KULL et LINDBERG (38); BOUVENG et LINDBERG (39) observent une partielle O-déméthylation avec l'acide sulfurique (N 2N) à 100°C

D - HYDROLYSE ACIDE PARTIELLE

Dans un glycanne les unités osidiques sont liées les unes aux autres par une liaison glycosidique. Elle résulte de la conjugaison de la fonction semi-aldéhydique cu semi-cétonique avec l'une des fonctions alcools d'une autre molécule d'ose. De ce fait, deux types de liaisons sont à considérer : les liaisons de type cétosyl et celles de type aldosyl. Chaque aldose possède deux anomères : α et β , ce qui implique des liaisons glycosidiques de type α et β . Les procédés d'hydrolyse acide partielle reposent sur le clivage d'un

petit nombre de ces liaisons afin d'obtenir des osides. Cependant, il est difficile de prévoir le comportement de chacun de ces types de liaison glyccsidique vis-à-vis des agents d'hydrolyse acide car la nature variée des oses ainsi que leur position au sein du glycanne crée une stabilité toute relative.

1 - Stabilité des liaisons glycosidiques vis-à-vis des agents d'hydrolyse.

De nombreux travaux (WOLFROM et THOMPSON (40)) ont démontré que le comportement des liaisons osidiques était en relation étroite avec les groupements "hydroxyles" et que la stabilité d'une liaison glycosidique était essentiellement liée au nombre et à la position des fonctions "hydroxyle" alcoolique et semi-acétalique.

- a Les liaisons α -D-osidiques sont plus stables que les liaisons β -D-osidiques (HASSEL et OTTAR (41)).
- b Les liaisons "cétosyl" (fructosyl et sialyl, par exemple) sont beaucoup plus labiles que les liaisons "aldosyl".

HEIDT et PURVES (42) montrent que les fructopyranosides sont hydrolysés 10 000 fois plus rapidement que leur correspondant aldopyrannosides. Ces liaisons sont hydrolysées par l'acide chlorhydrique et sulfurique très dilué: 0,01N à 100°C cu 0,1N à 80°C pendant une heure.

- c La substitution du carbone 5 d'un ose stabilise sa liaison glycosidique Les liaisons "furannosyl" sont beaucoup plus labiles que les liaisons "pyrannosyl", HAWORTH (43) montre que les aldofurannosides sont hydrolysés 50 à 200 fois plus rapidement que leurs isomères aldopyrannosides. Les liaisons "furannosyl" sont généralement rompues par l'acide sulfurique à 1 p. 100 à 80-100°C pendant quelques minutes.
- d La nature du substituant au carbone 5 intervient dans la stabilisation de la liaison osidique. L'ordre croissant de stabilité des liaisons aldopyrannosidiques est le suivant : pentosyl, méthyl-pentosyl, hexosyl, uranosidyl.

e - La position axiale ou équatoriale des substituants des cycles pyrannosiques, autre que l'hydrogène, possèdent une grande influence sur l'hydrolyse des liaisons osidiques et REEVES (44) a démontré que les substituants équatoriaux stabilisaient les liaisons aldopyrannosides, principalement quand le groupement en 2 est axial.

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

- f La substitution des fonctions "hydroxyl" du cycle pyrannosique augmente la stabilité des liaisons glycosidiques (PAUL) (45). Ainsi s'explique la stabilité des liaisons osidiques des oses 0-méthylés et des osamines. Dans le cas de ces dernières, la stabilisation des liaisons "osaminidyl" est réalisée par un double mécanisme : substitution d'un hydroxyle du cycle pyrannosique et apparition d'un proton provenant de l'ionisation de la fonction α -amine au voisinage de la liaison. L'absence de proton explique la plus grande fragilité des liaisons N-acétyl-osaminidiques par rapport aux liaisons osaminidiques.
- g La substitution du carbone 5 d'un ose stabilise sa liaison glycosidique.

C'est pourquoi, les liaisons "furannosyl" sont beaucoup plus labiles que les liaisons "pyrannosyl". Par exemple, les aldofurannosides sont hydrolysés 50 à 200 fois plus rapidement que les aldopyrannosides isomères (HAWORTH) (46). Les liaisons glycosidiques de l'arabinose et du fructose sont donc aisément rompues et en utilise généralement de l'acide sulfurique dilué (solution d'acide à 1 p. 100), à 80-100°C pendant un temps relativement court, n'excédant pas, en général, quelques minutes.

En outre, la nature du substituant du carbone 5, intervient dans la stabilisation de la liaison osidique dans l'ordre suivant (WOLFROM et THOMPSON) (47).

L'ordre croissant de stabilité des liaisons aldopyrannosidiques est donc : pentosyl, méthylpentosyl, hexosyl, heptosyl, mannosidyl. La stabilité des liaisons "uranósidyl" est bien connue, il est parfois nécessaire, pour les hydrolyser totalement, d'opérer dans des conditions telles (acide à 4 p. 100 à 120°C, pendant 10 à 24 h) que l'on ne peut éviter une destruction importante des acides uroniques.

2 - Divers procédés d'hydrolyse partielle

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

a - Hydrolyse par les résines échangeuses de cations

L'hydrolyse par les résines polystyrène-sulfonées a été appliqué par différents auteurs pour déterminer la composition en oses neutres de glycoprotides divers. On sait, à présent que le procédé conduit à la formation de nombreux osides possédant, en général, une N-acétylosamine en position terminale. Cette méthode préconisée par DIXON (48) puis par BRAGG et HOUGH, GLEGG et al. (49), SCHMID (50), TOLBERT et ZILL (51) est à priori très séduisante car l'échangeur de cations joue à la fois le rôle d'agent d'hydrolyse et d'agent de purification en fixant les produits de dégradation protidique.

Ce procédé a reçu de nombreuses applications, les uns utilisent des <u>résines solubles</u> (PAINTER et MORGAN(52) hydrolysent des substances spécifiques de groupes sanguins) PAINTER, WATKINS et MORGAN (53) et PAINTER, REGE et MORGAN (54)), les autres des <u>résines insolubles</u> (hydrolyse de l'ovomucoïde par MONTREUIL et CHOSSON (55), CHOSSON, MONTREUIL et SCHEPPLER (56), ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (57) ou des globulines χ_{G} humaines par CLAMP et PUTNAM (58).

Pour chaque substrat, il est indispensable de préciser les conditions expérimentales (facteur temps et température) afin d'obtenir le meilleur rendement en oside. Ainsi les cinétiques d'hydrolyse ainsi que la chromatographie sur papier des hydrolysats permettent de préciser d'une part la nature des oses en position externe dans la molécule de glycannes, car ces oses apparaissent dans les premières minutes sur le chromatogramme, et d'autre part la durée favorable à l'obtention d'un bon rendement en oside.

b - Hydrolyse par les acides minéraux dilués

L'acide sulfurique et chlorhydrique ont été jusqu'à présent largement utilisé à des concentrations et pendant des temps très variables pour hydrolyser les glycoprotides. WHISTER et SMART 1935 hydrolysent les glycoprotides par l'acide sulfurique 1N à 100°C pendant des temps variant de quelques minutes à plusieurs heures.

3 - Facteurs de modification des glucides au cours de l'hydrolyse acide partielle.

Les glucides sont susceptibles de subir des modifications de deux ordres : a) épimérisation, b) condensation.

a - Epimérisations

L'épimérisation s'effectue généralement en milieu alcalin, cependant elle peut se produire en milieu acide (OST) (59) et introduire une cause d'erreur due à la conversion des oses.

b - Condensation par transosylation

La transosylation chimique, condensation des ases entre eux est l'une des principales causes d'erreur de l'hydrolyse, signalée par FISCHER dès 1890 (60).

Ce mécanisme a été étudié depuis, et l'on sait que les processus de transosylation obéissent aux règles générales suivantes :

- 1º) La transosylation en milieu acide conduit à la formation préférentielle de glycosides 1—56. Toutefois, ceux-ci sont accompagnés d'une faible proportion de glycosides 1—53 et 1—54.
- 2º) Les processus de transosylation ont lieu avec n'importe quel type d'acide (TAUFEL, IWAINSKY et RUTTLOFF) (61) et quelque soit sa concentration.
- 3º) La transosylation est favorisée par les concentrations élevées en oses ; on obtient par exemple d'excellents rendements en isomaltose avec une solution de glucose à 18 p. 100 dans l'acide sulfurique 1N (BACON et BACON) (62).

En conséquence, le procédé d'hydrolyse acide partielle présente deux inconvénients; d'une part, il nécessite une quantité appréciable de glycopeptide car les rendements en osides sont faibles, d'autre part, les conditions dans lequelles s'effectue l'hydrolyse acide ne sont pas satisfaisantes car elles peuvent donner naissance à des recombinaisons d'oses libres entre eux. De ce fait, nos travaux se sont orientés vers l'application d'une autre technique, l'acétolyse.

L'ACETOLYSE

I - HISTORIQUE

L'action de l'anhydride acétique en présence d'un catalyseur acide est connue depuis 90 ans. En effet, en 1879, FRANCHIMONT (63) découvre ce procédé au cours de tentatives d'acétylation de la cellulose; à l'époque les auteurs étaient à la recherche de procédés d'acétylation. Dès 1879,
FRANCHIMONT signale la présence de cellobiose octaacétate dans les produits d'acétylation de la cellulose, de ce fait l'acétylation se trouve couplée à des réactions de rupture des liaisons osidiques, le nom d'acétolyse a été donné à ce mécanisme.

La chimie des polysaccharides était dotée d'une nouvelle méthode de dégradation qui fournit dans des conditions peu drastiques des oligosaccharides peracétylés; toutefois, des conditions plus drastiques offrent la
possibilité d'obtenir des mono et disaccharides peracétylés. Les applications sont
nombreuses et les oligosaccharides obtenus par acétolyse partielle de polysaccharides extraits de milieux variés sont très bien exposés dans l'ouvrage de BAILEY
(64). L'évolution de l'application de cette technique peut être divisée en deux
grandes étapes. En effet, dans une première période (1879-1956) les auteurs ont
appliqué cette méthode à des quantités importantes de glucides composés essentiellement de polymères de glucose, de mannose, de fucose et de N-acétyl-glucosamine. Dans une seconde période (1956-1963), l'acétolyse partielle a été appliquée à des glucides renfermant des proportions variables d'oses "neutres", d'osamines et d'acides sialiques.

A - ACETOLYSE DES MONOPOLYOSIDES

1 - La cellulose

La dégradation de la cellulose par la technique d'acétolyse dans le milieu anhydride acétique - acide acétique - acide sulfurique en un
composé maintenant identifié au β -cellobiose octaacétate, a été l'une des premières
applications de cette technique, réalisée tout d'abord par FRANCHIMONT (65) puis
par SKRAUP (66) et SPENCER (67). La structure des composés isolés par les auteurs
était cependant sujette à de nombreuses controverses avant que la structure de la
cellulose ne fût définitivement établie. Les résultats acquis par la suite par
DICKEY et WOLFROM (68) puis par WOLFROM et DACONS (69) ont levé l'ambiguité de ce
problème. En effet, ces auteurs ont isolé, par acétolyse partielle de la cellulose,
une série homologue de cinq polymères identifiés à l' α -D-cellotriose, au β -D-cellotétraose, au β -D-cellopentaose ainsi qu'aux cellohexaose et celloheptaose.

2 - La Chitine

En 1931, parallèlement aux travaux effectués sur la cellulose. BERGMAN. ZERVAS. SILBERKWEITE (70) et ZECHMEISTER (71) ont également appliqué l'acétolyse partielle à la chitine en modifiant toutefois le réactif acétolysant ; le mélange anhydride acétique - acide acétique - acide sulfurique était remplacé par le mélange anhydride acétique - acide sulfurique. Les auteurs ont isolé le di N-acétyl-hexa-O-acétyl-chitobiose ("octaacétylchtiobiose") avec un faible rendement, ainsi que le tri N-acétyl-octa-O-acétylchitotriose ("hendécaacétylchitotriose"). Cependant, en 1955, ZILLIKEN, BRAUN, ROSE et GYÖRGY (72) ont fractionné sur charbon-Célite un mélange de cinq composés obtenus par une 0désacétylation alcaline de l'"octaacétylchitobiose". Les auteurs ont obtenu sous la forme cristalline le di-N-acétylchitobiose, les quatre autres composés étant des artefacts introduits au cours de la O-désacétylation. D'autre part. BARKER (73) et HOROWITZ (74) ont signalé la formation de semblables artefacts au cours de la 0-désacétylation du penta-0-acétyl-D-glucose et de la chitine acétolysée. Finalement c'est en 1956 et 1957 que KUHN et KRÜGER (75) ont identifié ces artefacts à des chromogènes formés au cours du traitement alcalin de la N-acétyl-hexosamine. L'application de l'acétolyse à des polysaccharides renfermant des N-acétylhexosamines se trouve donc limitée par la formation de chromogènes au cours de leur 0-désacétylation par des agents alcalins.

3 - Les mannanes

ASPINALL, RASEBROOK et KESSLER (76) ont isolé d'un acétolysat de mannane provenant du corozo (Phytelephas macrocarpa) une série homologue d'oligosaccharides. La plupart de ces osides (du mannobiose au mannopentaose) renferment des liaisons osidiques du type $\beta1$ — \rightarrow 4.

La structure d'autres mannanes, extraits du saccharomyces cerevisiae, a été explorée au moyen de deux techniques différentes : d'une part, l'acétolyse et d'autre part l'hydrolyse acide partielle. Les résultats, obtenus par acétolyse : GORIN et PERLIN (77) LEE et BALLOU (78) ainsi que par hydrolyse acide partielle : PEAT, WHELAN et EDWARDS (79) permettent de penser que ce mannane possède une structure branchée, composée des liaisons : 1,2 - 1,3 et 1,6. En 1961, PEAT, WHELAN et EDWARDS ont proposé un schéma de structure selon lequel une chaîne formée de liaison α 1-6, constituait le squelette du polysaccharide ; les liaisons α 1-2 se localisent au point de branchement. Cependant, en 1965, LEE et BALLOU (80) ont isolé un tétrasaccharide (0- α -D-mannopyrannosyl-(1,3)-O- α -D-mannopyrannosyl-(1,2)-D-mannopyrannose) qui infirme le schéma de structure.

B - ACETOLYSE D'HETEROPOLYOSIDES

Dans une seconde période (1956-1963) les auteurs ont appliqué l'acétolyse à l'étude de la structure d'hétéropolyosides, en particulier aux mucines et aux gangliosides. Ainsi, YOSIZAWA (81) puis MASAMUNE et YOSIKAWA ont isolé d'un acétolysat de mucine stomacale du Porc deux osides, identifiés au N-acétylglucosaminido-galactose et au N-acétylglucosaminido-(1,4)-galactosido-(1,4)-N-acétylgalactosamine. Plus récemment, KUHN et WIEGANDT (82) ont déterminé à l'aide de cette technique, la structure du ganglioside G,, isolé du cerveau.

II - PRINCIPES

A - PRINCIPE DE L'ACETOLYSE

L'action de l'anhydride acétique en présence d'un catalyseur acide, sur les glycannes donne des quantités variables d'oses et d'oligosides 0-acétylés. De ce fait, cette technique met en jeu des réactions d'estérification des groupements hydroxyls libres, couplées à des réactions d'hydrolyse des liaisons glycosidiques.

Le système acétolysant couramment utilisé se compose d'anhydride acétique - acide acétique - acide sulfurique. D'autres systèmes ont été moins fréquemment utilisés: anhydride acétique - acide perchlorique; anhydride acétique - acide trifluoro acétique. Tous ces systèmes libèrent des radicaux ions acétylium qui estérifient les fonctions alcools primaires secondaires ainsi que les fonctions semi-aldéhydiques libres des oses. La fonction semi-aldéhydique est plus rapidement acétylée que les fonctions alcools; de ce fait, dès qu'une liaison csidique est hydrolysée, la fonction réductrice semi-acétalique est bloquée par un radical acétyl et les phénomènes de transosidation sont ainsi empêchés. La vitesse d'acétylation est plus rapide dans les limites de pH inférieure à 1 et supérieure à 3 dans le mélange acide acétique - anhydride acétique. (PIGMAN) (84)

La figure 7 (p. 33) illustre le principe de l'acétolyse appliqué à un oside quelconque.

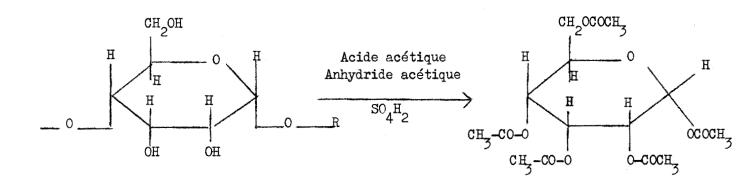
L'hydrolyse des liaisons osidiques est catalysée par l'acide sulfurique concentré qui joue également le rôle d'agent déshydratant dans le mélange anhydride acétique - acide acétique - acide sulfurique (10 : 10 : 1) (v:v:v). La vitesse d'acétolyse dépend de la concentration en acide sulfurique. On ne peut toutefois dépasser une concentration supérieure à 5 p. 100 sans risquer de détruire des glucides (PIGMAN) (85).

B - SPECIFICITE DE LA COUPURE DES LIAISONS OSIDIQUES AU COURS DE L'ACETOLYSE

1 - Labilité des liaisons osidiques 1 -- 6

WOLFROM et DACONS (86) ont isolé après <u>hydrolyse acide</u>
partielle de l'iso-amylose, 1 p. 100 d'isomaltose (a-glucosido-1,6-glucose) et
démontré que cet oside n'était pas le produit d'une réaction de transosidation
bien que ce même disaccharide n'ait pu être isolé par <u>acétolyse</u> de l'amylopectine.
Ces résultats en apparence contradictoires, s'expliquent à présent par la grande
labilité des liaisons 1 - 6 vis-à-vis de l'acétolyse. La démonstration de cette
labilité particulière a été effectuée sur la base des expérimentations suivantes.

a - GORIN et PERLIN (87) puis LEE et BALLOU (88) ont isolé par <u>acétolyse</u> de mannanes dont les liaisons osidiques étaient du type α 1 - 3 et α 1 - 6, le 3-0-α-D mannopyrannosyl-D-mannose ainsi qu'un mannotriose. Au contraire, PEAT, WHELAN et EDWARDS (89) ont obtenu par <u>hydrolyse partielle</u> du même substrat un oside identifié au 6-0-α-D- mannopyrannosyl-D-mannose. L'acétolyse avait donc coupé les liaisons α 1 - 36 plus facilement que les liaisons α 1 - 3; l'in-verse était réalisé par hydrolyse acide partielle. Ces résultats sont illustrés par



2, 3, 4, 6-tétra-acétyle- α -O-acétyl-glycoside.

Figure 7

Résultat de l'acétolyse d'un oside.

les figures 8 a et 8 b (p. 35).

b - MATSUDA, WATANABE, FUSIMOTO et ASO (90) ont étudié les conditions d'acétolyse de l'isomaltose (6-0-α-D-glucopyrannosyl-D-glucose) et du nigérose (3-0-α-D-glucopyrannosyl-D-glucose). Après 5 heures d'acétolyse la liaison osidique du nigérose était intacte alors que celle de l'isomaltose était totalement coupée. Cette observation fut mise à profit par les auteurs afin d'isoler, par acétolyse des dextranes, le nigérose ainsi que le kojiobiose.

2 - La Stabilité des liaisons glucosyl et mannosyl

Un autre type de spécificité a été suggéré par SMITH et SRIVASTAVA (91) à la suite de leurs travaux sur les glucomannanes. En effet, ces auteurs ont pu démontrer que la liaison mannose-mannose était coupée plus rapidement que les liaisons glucose-mannose. Depuis, aucune autre recherche n'est venue confirmer ce résultat.

3 - Stabilité de la fonction acétamido des N-acétylhexosamines

L'acétolyse préserve les groupements N-acétyl présents dans les mucopolysaccharides; de ce fait, elle fournit des digosaccharides N-acétylés. Rappelons que le phénomène inverses observe au cours de l'hydrolyse acide partielle par les acides minéraux dilués, que la fonction amine des osamines est libérée et que le proton qu'elle porte stabilise la liaison osidique. Cette propriété remarquable de l'acétolyse a reçu peu d'applications. YOSIZAWA (92, 93), puis MASAMUNE et YOSIKAWA (94) ont mis à profit cette caractéristique et ont isolé de la mucine stomacale du Porc un N-acétylglucosaminido-galactose, et une N-acétylglucosaminido-(1,4)-galactosido-(1,4)-N-acétylgalactosamine.

4 - La Stabilité de la liaison sialosyl

L'aspect certainement le plus intéressant de cette technique réside dans la possibilité d'obtenir des csides renfermant de l'acide sialique. Les liaisons sialosyl sont très labiles vis-à-vis des acides minéraux dilués. Elles sont, en effet, coupées en 1 h, par H₂SO₄ 0,01 N, à 100°C.

$$\frac{1}{1} \xrightarrow{\text{Man}} \frac{1}{1} \xrightarrow{\alpha} \frac{1}{1} \xrightarrow{\alpha$$

Figure 8 a

Acétolyse d'un mannose (*), formation préférentielle du $3-\alpha-D$ -mannopyrannosyl-D-mannose. GORIN et PERLIN (95); LEE et BALLOU (96).

Figure 8 b

Hydrolyse acide partielle d'un mannane (*), formation préférentielle du 6-α-D-mannopyrannosyl-D-mannose. PEAT, WHELAN et EDWARDS (97).

(*) mannane isolé du Saccharomyces cerevisiae

De ce fait l'hydrolyse partielle par les acides minéraux dilués n'est pas une technique favorable à l'obtention d'oligosaccharides renfermant de l'acide sialique. Au contraire, les liaisons sialosyl sont beaucoup plus stables dans les solvants utilisés en cours d'acétolyse. Cependant cet aspect avantageux de la technique d'acétolyse a reçu jusqu'à présent très peu d'applications. L'unique exemple de la littérature date de 1963 : KUHN et WIEGANDT (98) acétolysèrent le ganglioside G₁ avec le mélange anhydride acétique - acide acétique - acide sulfurique concentré (10 : 10 : 1) à température ambiante pendant 3 jours ; Après désacétylation par le méthanol ammoniacal, deux oligosaccharides acides furent isolés

C - MODIFICATION DES GLUCIDES AU COURS DE L'ACETOLYSE

1 - L'Anomérisation

L'anomérisation des aldoses péracétylés dans le milieu anhydride acétique-acide acétique en présence d'acide sulfurique est connue depuis longtemps. Dans la série D des glucides, le composé préférentiellement formé est l'anomère 0-acétylé α .

En effet, dès 1934 HANN et HUDSON ont observé que l'acétolyse des méthyl D-aldohexopyrannoside tétraacétates donnait l'anomère α -D-aldohexopyrannose pentaacétate. Cette observation fut ensuite confirmée par de nombreux travaux. FREUDENBERG et SOFF (9) obtiennent par acétolyse du D-glucopyrannose pentaacétate un mélange de 88 p. 100 de l'anomère α -D et 12 p. 100 de l'anomère β -D. Les études concernant le mécanisme de cette anomérisation, ont été entreprises par LEMIEUX et son école puis par LINDBERG; toutefois l'état actuel de nos connaissances ne nous permet pas d'élaborer de conclusions définitives au sujet de ce mécanisme.

2 - Epimérisation

La possibilité d'épimérisation des glucides durant le processus d'acétolyse ne doit pas être négligée. JERKEMAN (100) en préparant le D-mannofurannose pentaacétate par acétolyse du 2,3 : 5,6 di-O-isopropylidène-D-mannofurannose, a obtenu, après désacétylation par la triméthylamine, le D-glucose et le D-mannose dans le rapport 8 : 2. De la même façon il est montré que le méthyl β-D-mannofurannoside se trouve transformé en D-glucose après désacétylation. Cependant, on n'observe aucune modification de structure au cours de l'acétolyse du méthyl α-D-mannopyrannoside ou du méthyl β-D-glucopyrannoside.

D'autres travaux semblent toutefois nécessaires afin de définir plus précisément les conditions d'épimérisation décrites par JERKEMAN. Il serait utile, en particulier de savoir si ces modifications de structure s'effectuent réellement au cours de l'acétolyse comme le prétend l'auteur, ou bien pendant la 0-désacétylation.

D - PRINCIPE DE L'ISOLEMENT DES OSIDES

L'acétolysat renferme en mélange des oses et des osides peracétylés qu'il convient d'isoler à l'état pur afin d'en déterminer la structure. Deux possibilités sont à considérer : d'une part l'isolement des osides peracétylés, et d'autre part, l'isolement des osides après désacétylation. Ce qui pose le problème de la O-désacétylation quantitative des osides.

1 - La séparation des osides peracétylés a reçu assez peu d'application. Mc NEELY, BINKLEY et WOLFROM (101) effectuent une chromatographie sur colonne de Magnésol-Célite ou de Silène-EF-Célite (GEORGES, BOWER et WOLFROM) (102) avec élution des osides par un solvant organique tel que le benzène-alcool butylique (100 : 1 v/v) ou le benzène-éthanol (100 : 1 v/v). La colonne séchée, débarassée de son enveloppe est révélée avec une solution basique de permangamate de potassium (1 p. 100

dans 2,5N KOH). Le réactif est appliqué en un mince filet sur toute la longueur de la colonne ; chaque zone est sectionnée et éluée par l'acétone.

WOLFROM et DACONS (103) utilisent le procédé de GEORGES, BOWER et WOLFROM (104) pour isoler l'α-D cellopentaose heptadécaacétate ainsi que l'α-Dœlloheptaose tricosaacétate obtenus par acétolyse de la cellulose, par ailleurs 0'NEILL (105) utilise le procédé de Mc NEELY, BINKLEY et WOLFROM pour isoler le L-fucitol pentaacétate obtenu par acétolyse de la fucoïdine.

Les applications sont assez peu nombreuses car le pouvoir de résolution des osides peracétylés est faible.

2 - La séparation des osides 0-désacétylés est aisée, cependant elle pose le problème de la 0-désacétylation quantitative des osides. En effet, il s'agit de G-désacétyler les osides sans toutefois modifier leurs propriétés physico-chimiques. Les méthodes sont nombreuses (Tableau I; p. 39), cependant les rendements en osides sont faibles, ce qui explique que les travaux d'acétolyse s'appliquèrent essentiellement à des substrats issus du milieu végétal donc facilement isolés en grande quantité.

TABLEAU I
Procédés de O-désacétylation des polyosides et des oses.

(Substrat d'acétolyse	Agents de O-désacétylation	: Références	
Fucoldine Cellulose Dextranes	Méthoxyde de sodium en solution dans le méthanol	O'NEILL (106) WOLFROM et DACONS (107) MATSUDA et al. (108) GOLDTEIN et WHELAN (109)	
Galactomannanes Mannanes Mannanes Mannanes	: Méthoxyde de baryum en solution dans le méthanol	ASPINALL et WHYTE (110) ASPINALL, RAMBROOK et KESSLER (111) LEE et BALLOU (112)	
Glycopeptides du colostrum de vache Mucopolysaccharides de mu- cine gastique de Porc Ganglioside G	Méthanol ammoníacal	KUHN et EKONG (113)) MASAMUNE et al. (114)) KUHN et WIEGANDT (115)	
Acétolysat de mucine gastrique de Porc	Potasse 1,5N	1,5N : YOSIZAWA (116, 117)	
Le L-Sorbose pentaacétate	Baryte 6 N	OLIN, EVANS et WOLFROM (118)	
Pentaacétyl-α-D-glucose	Acide sulfurique 0,1 N	- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
(2,3:5,6 D-0-isopropylidè- ne D-mannofurannose	Triméthylamine WHELAN (120) JERKEMAN (121)		

TRAVAUX PERSONNELS

1ère PARTIE

MISE AU POINT DU PROCEDE D'ACETOLYSE , APPLICATION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCOPROTEINES

- I ETUDE DES DIVERS PROCEDES DE DESACETYLATION
- 2 STABILITE DES LIAISONS GLYCOSIDIQUES VIS-A-VIS DE L'ACETOLYSE
- 3 MISE AU POINT D'UN PROCEDE DE FRACTIONNEMENT DES ACETOLYSATS
 GLYCOPEPTIDIQUES

ETUDE DES DIVERS PROCEDES DE DESACETYLATION

La mauvaise séparation chromatographique des osides peracétylés, contenus dans les acétolysats, nous pose le problème de leur 0-désacétylation quantitative. Les bases utilisées comme réactifs de désacétylation modifient la structure des oses; cette caractéristique fut observée par BARKER et al.(I22) et WHITAKER et al.(I23), au cours de la désacétylation d'un acétolysat de chitine et de peracétylglucosamine. De ce fait, nous avons entrepris une étude critique des différents procédés de désacétylation des oses "neutres" et des osamines, afin de préparer quantitativement des oligosaccharides à partir d'acétolysats de glycannes.

I- MATERIEL ET METHODES.

A- ATALYSE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES OSES.

1-- Dosage colorimétrique des oses

a- Dosage des oses "neutres".

Nous utilisons la méthode à l'orcinol de TILIMANS et PHILIPPI (124) modifiée par RIMINGTON (125). Le principe de cette méthode repose sur la condensation des produits de dégradation des oses en milieu acide sulfurique avec l'orcinol ou orcine pour donner une coloration brun orangée. Les oses "neutres" peracétylés se comportent de la même façon que leurs homologues non acétylés. Ceci laisse supposer que l'acide sulfurique chaud coupe les liaisons esters puis transforme les oses en dérivés du furfural.

b- Dosage des N-acétylosamines et des chromogènes.

Les N-acétylosamines sont dosées par la méthode de REISSIC.
STROMINGER et LELOIR (I26) modifiée par LEVY Mac ALLAN (I27); le principe est le suivant: la dégradation en milieu alcalin chaud des N-acétylhexosamines donne trois chromogènes identifiés par STANLEY (I28) KUHN et KRUGER (I29). Ces chromogènes se condensent avec le p-diméthylamino-

benzaldéhyde pour donner une coloration rose présentant un maxima d'absorption à 546 et à 585 mu. Nous dosons les chromogènes en remplaçant la solution de tétraborate de sodium par de l'eau distillée et en introduisant un témoin eau de même composition.

c - Dosage des osamines.

Les osamines sont dosées par la méthode d'ELSON MORGAN (I30) modifiée par BELCHER, NUTTUN et SAMBROOK (I3I) après hydrolyse des osides ou glycoprotides par l'acide chlorhydrique 4N redistillé, exempt de fer, à I00°C pendant 4 heures en tubes scellés sous vide.

d- Dosage des acides sialiques.

L'acide N-acétyl-neuraminique est dosé par la méthode à la diphénylamine de WERNER et ODIN (I32).

2- Chromatographie des oses.

a- Chromatographie qualitative.

La chromatographie qualitative sur papier s'effectue sur les papiers Whatman n°I et Schleicher et Schüll 2040 b, en utilisant dans la plupart des cas la technique de chromatographie descendante. Les papiers sont saturés avec la phase inférieure du solvant pendant I à 2 heures avant le commencement de la migration. L'identification des glucides est: réalisée par l'utilisation simultanée d'un certain nombre de solvants et de révélateurs spécifiques, ainsi que par la comparaison de leur comportement chromatographique avec celui de substances de référence.

- Systèmes solvants.

Solvant A: n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5).

Ce système solvant de PARTRIDGE (I33) fournit une résolution satisfaisante des oses et des oligosaccharides. La durée de chromatographie sur papier Whatman n°3 est de 48 heures pour la séparation des pentoses et des hexoses, de 4 à 6 jours pour la séparation des oligosaccharides.

Solvant B:Acétate d'éthyle-pyridine-eau (2:1:2)

Ce système solvant de JORMYN et ISERWOOD (134) donne en 18 h. de migration une très bonne résolution du galactose et du glucose.

Solvant C : Acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau(5:5:1:3)

Ce système solvant donne une bonne séparation des oligosaccharides, en particulier des sialyl dérivés, en 20 heures de migration ; nous avons obtenu une bonne résolution de la glucosamine et de la galactosamine ainsi que de la glucosamine et du glucosaminitol.

Solvant D: n-butanol secondaire saturé en eau

Solvant utilisé pour la séparation des chromogènes formés à partir des H-acétyl hexosamines.

-Révélateurs spécifiques.

- -Le réactif au nitrate d'argent alcalin de TREVELYAN (135) colore les oses réducteurs et les polyols en brun.
- -Le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE(136) plus spécifique que le précédent donne des colorations qui varient avec la nature de l'ose.
- -Le réactif au phtalate d'aniline est couramment utilisé pour la chromatographie quantitative des oses.
- Le réactif d'ELSON MORGAN (PARTRIDCE) (137) révèle les hexosamines en rouge, et les N-acétyl-hexosamines en pour pre violet.

Le réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde (SVEEN RHOLM et SVENNERWOLM) (I38) met en évidence les acides sialiques en violet.

-Le réactif à l'hydroxamate ferrique de TATE et DISHOP (139) révêle les esters en brun violacé.

b- Chromatographie quantitative.

- L'étude de la structure des osides nécessite deux étapes :
- I°) La détermination de la composition en oses, en appliquant les méthodes de dosages colorimétriques précédemment décrites.
- 2°) La détermination du rapport molaire des oses , en appliquant la chromatographie quantitative sur papier.

Les osides sont d'abord hydrolysés par l'acide chlorhydrique 1,5 N pendant 1,5 h. à 100°C; les hydrolysats sont purifiés sur colonne de résines échangeuses de cations et d'anions; l'éluat neutre est ensuite lyophilisé et chromatographié.

Les oses "neutres" sont dosés par la méthode de HUGHES et JEANLOZ (140) au phtalate d'aniline et l'élution des spots colorés s'effectue par l'éthanol chlorhydrique. Cette méthode donne des résultats très reproductibles pour des quantités d'oses comprises entre 10 et 200 ug.

Le dosage de l'ose réducteur est réalisé dans les mêues conditions après réduction de l'oside par le borohydrure de potassium à 20°C pendant 12h.

3 - Electrophorèse des oses

a - Electrophorèse sur papier des N-acétyl-hexosanines

La séparation électrophorétique des N-acétyl glucosamines -galactosamines et -mannosamines est satifaisante dans le tampon boraté de pH 9,2 (tétraborate de sodium à 1p100) de FOSTER et STACEY (141); les conditions d'électrophorèse sont les suivantes : les dépots sont effectués à 12 cm. du bord cathodique d'une feuille de papier d'Arches 304 (30 cm X 20 cm.) sous une tension de 12 v/cm pendant 4 heures.

b - Electrophorèse des sialyl-oligosaccharides

La séparation électrophorétique des osides neutres et acides est effectuée dans le système tampon de MICHL (142). Nous utilisons le papier d'Arches 304 (50 cm % 30 cm.) sous une tension de 7 v/cm. pendant 6 heures.

B - DESACETYLATION DES OSES PERACETYLES

Nombreux sont les procédés de désacétylation des oses. La recherche d'un procédé de désacétylation quantitatif des oses a orienté nos travaux vers une étude critique de l'ensemble des différentes méthodes.

1 - Désacétylation par les acides

a - Principe

Les liaisons esters formées par les fonctions alcools primaires et secondaires des oses et l'acide acétique sont coupées par l'acide sulfurique Les hydrolysats sont purifiés sur échangeurs d'ions, les oses et les osamines sont identifiés et dosés par chromatographie sur papier.

b - Mode opératoire

Nous avons utilisé le procédé décrit par ABRAHAM, CHAIKOFF et HASSID (143). L'ose ou l'oside peracétylé (50 mg.) est hydrolysé à 100°C à reflux pendant 4 h. par 10 ml. d'acide sulfurique 0,1n. Les hydrolysats sont dilués à 100 ml. et amenés à pH 6 par addition de eau de baryte. Le précipité de sulfate de baryum est éliminé par filtration et le filtrat est purifié par les résines échangeuses de cations (Duolite A 40; "mesh" 25-50, forme formiate). Le liquide effluent auquel on joint les eaux de lavage des colonnes (500ml) est concentré à 35°C, sous vide, à un faible volume (5-10 ml.), l'évaporation à siccité est ensuite effectuée en dessicateur en présence de soude. Le résidu sec est repris par 1 ml. d'eau et soumis à l'analyse chromatographique sur papier dans les systèmes solvants:

- n-butanol-acide acétique -eau (4:1:5)
- -pyridine-acérate d'éthyle-eau (1:2:2)

La révélation des oses neutres est effectuée à l'oxalate d'aniline. La révélation des esters est réalisée avec le réactif à l'hydroxamate ferrique. Les oses "neutres" sont dosés colorimétriquement (méthode à l'orcinol sulfurique) ainsi que les N-acétylhexosamines (méthode de RESSIG, STROHNGER et LELOIR) (144).

La résine échangeuse de cation (DOWEX 50 X 8) est éluée par l'acide chlorhydrique 0,4N (200ml.). Le liquide effluent est concentré dans les conditions décrites précédemment et le résidu sec est repris par 500 ml. d'eau puis soumis au dosage colorimétrique (méthode d'ELSON et NORGAN).

2- Désacétylation par des bases

a- Procédé au méthanol ammoniacal de FISCHER et BERGIAN (145)

L'agent de désacétylation est l'ammoniac dissous dans le méthanol anhydre. Les oses peracétylés (250 mg) sont dissous à 0°C dans 20 ml d'une solution méthanolique saturée en ammoniac et maintenus à 20-22°C pendant 6 h sous vide. Le résidu sec est repris par 25 ml d'eau et soumis à l'analyse chromatographique et électrophorétique, ainsi qu'aux dosages colorimétriques.

- Analyse chromatographique

La chromatographie qualitative et quantitative (procédé de DATE (146) modifié) est effectuée à l'aide des systèmes solvants suivants :

- n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5)
- butanol secondaire saturé en eau

Les oses "neutres" sont révélés à l'aide du réactif à l'oxalate d'aniline de PAR-TRIDGE; les N-acétyl-hexosamines sont révélées au réactif d'EHRLICH "indirect"; les chromogènes formés à partir des N-acétyl-hexosamines sont mis en évidence avec "EHRLICH" direct.

- Analyse électrophorétique

L'électrophorèse sur papier des N-acétyl-hexosamines est réalissée avec une solution de borate de sodium à 1 p. 100 dans une cuve d'électrophorèse en "toit" sous une tension de 10 v/cm pendant 4 h. Les électrophorégrammes sont immédiatement séchés à 105-110°C pendant 15 mm. Les chromogènes apparaissent en violet après pulvérisation d'une solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde.

- Desage colorimétrique

Le dosage colorimétrique des oses "neutres" est réalisé avec la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLIANS et PHILIPPI (147). Le dosage colorimétrique des osamines et de leurs dérivés est effectué avec la méthode de RIISSIG STROMINGER et LELCIR (148); pour doser les chromogènes nous remplaçons la solution de tétraborate de potassium par de l'eau et nous introduisons un ténoin eau de nême composition.

b- Procédé au méthoxyde de sodium de ZEIPLEN et KUNZ (149)

Ce procédé utilise comme agent de désacétylation le méthoxyde sodium dans le méthanol. La réaction s'effectue à + 4° C en milieu anhydre.

Les oses peracétylés (50 mg) sont dissous dans 2 ml de méthanol redistillé contenant 0,2 ml de méthoxyde de sodium 0,1 N; la solution est maintenue à +4°C pendant des temps variant de 10 mn à 16 h. Le méthoxyde de sodium est éliminé par
passage sur une colonne échangeuse de cations (Dower 50 x 8; mesh 25-50; forme
acido); la solution effluente et les caux de lavage de la colonne sont concentrés
à 5 ml, et soumis à l'analyse chromatographique qualitative et quantitative.

c- Frocédé à la soude de KUNZ et HUDSON (150)

Ce procédé fut décrit par KUNZ et MUDSON afin de doser l'acide acétique lié aux oses par des fonctions esters, selon les auteurs la désaccétylation est totale cependant aucun résultat ne précise le comportement des oses durant cette opération.

En conséquence, nous avons, dans une première série d'expériences, vérifié le comportement des oses durant la 0-désacétylation, et dans une seconde série d'expérience, nous avons été amené à modifier les conditions expérimentales afin que les propriétés physico-chimiques des oses soient respectées.

L'agent de désacétylation est la soude diluée. A 200 ml de soude 0,1 N, on ajoute 50 ml d'une solution acétonique du composé acétylé. (100 mg d'oses peracétylés dans 50 ml d'acétone). La solution est abandonnée à la température du laboratoire et des prélèvements de 20ml sont effectués à des temps variant de 5 à 75 mm. L'excès de soude est dosé à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N, ceci nous permet de suivre la désacétylation. Chaque fraction neutralisée par l'acide chlorhydrique est déminéralisée par passage sur résines échangeuses de cations (Dowex 50; forme acide) et d'anions (Duolite A 40; forme formiate); l'effluent neutre ainsi que les eaux de lavage des colonnes

sont concentrés à 10 ml. L'analyse chromatographique quantitative (procédé de DATE) (150) et les dosages colorimétriques nous permettent de suivre le comportement des oses au cours de la cfinétique de désacétylation.

Nous appliquons ce protocole expérimental à 20-24°C puis à + 4°C.

II- RESULTATS EXPERIMENTAUX

A- PROCEDES DE DESACETYLATION APPLIQUES AUX PERACETYL-GALACTOSE ET PERACETYLGLUCOSAMINE.

Nous avons appliqué les différents procédés de désacétylation aux peracetylgalactose et peracétylglucosamine car ces deux composés sont facilement synthétisés. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau III; p.58 et illustrés par les figures II et I2 p.57 et 59. Ils se résument de la manière suivante:

1 - Désacetylation du pentaacétyl- D-galactose

a - Procédé à l'acide sulfurique. Les dosages chromatographiques du galactose libéré montrent que la désacétylation atteint 84,5 p.100. Ce résultat n' est pas dû à une destruction du glucide, puisque les dosages colorimétriques par l' orcinol du galactose total(libre et acétylé) permettent de retrouver ce sucre à 98,5 p.100. La 0-désacétylation est donc incomplète et ce résultat est confirmé par la caractérisation de dérivés partiellement acétylés par chromatographie sur couche mince (révelation à l'hydroxamate ferrique). D'autre part, ce procédé est inapplicable à la désacétylation des osides car l'acide sulfurique 0,1 N hydrolyse partiellement les liaisons 0-glycosidiques.

b -Procédé au méthanol amoniacal de FISCHER et B.RGIAH (152)
Il nous a fourni les résultats suivants:

- La chromatographie quantitative des oses "neutres" nous permet de doser le galactose avec un rendement de 44 p. 100
- La chromatographie qualitativo révèle la présence de galactose, ainsi que doux composés A et B (Fig. 9; p. 53) migrant au-dela du fucose:

-R Galactose de A : 1,83

-R Galactose de B : 2,01

Ce résultat est en accord avec les travaux réalisés par C.REZO et DEULOFEU (153). Ces auteurs ont identifié les composés A et B à la D-glycopyrannosylamine ainsi qu'à la D-glycofurannosylamine. La formation de glycosylamine explique le déficit en galactose et montre l'affinité des fonctions aldéhydes pour les fonctions amines. De ce fait, ce procédé ne représente guère une méthode de choix pour désacétyler des osides.

c- Procédé au méthoxyde de sodium (ZaPLEN et kUNZ) (154)

L'application de ce procédé permet une désacétylation quantitative du peracétylgalactose. Le galactose, identifié et dosé par chromatographie quantitative est obtenu avec un rendement de 100 p. 100; d'autre part, aucun composé n'a pu être décelé par chromatographie sur papier.

- d-Procédé à la soude diluée. Les oses sont labiles en milieu alcalin, nous avons effectué une cinétique d'action de la soude sur le peracétylgalactose à \div 24°C ainsi qu'à \div 4°C.
- -La désacétylation des oses "neutres" à 24°C aux temps 5, I5, 30, 45 et 75 mn, (Fig. 10 p. 55) est totale en 45 mm (courbe en pointillé), mais elle s'accompagne d'une destruction partielle des oses (courbe en trait continu).
- La désacétylation des oses "neutres" à 4°C selon le nême protocole expérimental donne une vitesse de désacétylation des oses "neutres" identique à colle obtenu à + 24°C. Cependant la destruction des oses est nulle (Tableau II).

2- Désacétylation du tétra-O-acétyl N-acétyl - D-glucosamine

a- La O-désacétylation par l'acide sulfurique O,1 N selon le procédé d'ABRAHAN (155) O et N désacétyle la peracétyl-glucosamine. Les desages colorimétriques des N-acétyl-hexosamines et des hexosamines libres nous ont fourni:

- 35,2 p. 100 de glucosamine
- 56,9 p. 100 de N-acétyl-glucosamine.

b- Le procédé de 0-désacétylation de FISCHER et BERGIAN (156) au méthanol amioniaeal nous a conduit aux résultats suivants :

- La chromatographic qualitative dans le système solvant butanol secondaire saturé en eau (Fig. 11 A; p. 57) met en évidence la présence d'un composé ayant la même vitesse de migration que la N-acétylglucesamine, ainsi que deux composés de migration beaucoup plus rapide que nous avons interprétés comme étant deux chromogènes.
- L'électrophorèse sur papier du composé migrant au niveau de la N-acétyl-glucosamine nous confirme qu'il s'agit uniquement de la N-acétyl-glucosamine; nous en déduisons qu'aucune réaction d'épimérisation n'a eu lieu. Ces résultats sont illustrés par la figure 11 B. p.57.
- Les dosages colorimétriques des M-acétyl-hexosamines ainsi que des chromogènes nous ont conduit aux résultats suivants :

-76,8 p. 100 de N-acétyl-glucosamine -28,5 p. 100 de chromogènes

c-Procédé de ZERPLEN et KUNZ (157) au méthoxyde de sodium

BARKER et al. (158) puis MHITAKER et al. (159) ont signalé que l'action du méthoxyde de sodium 0,5 H à 20°C sur la peracétyl-glucosamine

fournissait de la N-acétylglucosamine ainsi que des artefacts, identifiés par KUHN et KRUGER (160) à des chromogènes.

Nous avons donc recherché des conditions expérimentales favorables à une O-désacétylation quantitative de la peracétylglucosamine.

Dans une première série de travaux nous avons démontré que la formation des chromogènes était fonction de la concentration en méthoxyde de sodium. (Fig.13 B p. 60). Nul pour une concentration de 0,01 N, le pourcentage de chromogènes passe rapidement à 16 pour une concentration de 0,1 N puis à 21 pour une concentration de 0,5 N en méthoxyde de sodium. Parallèlement nous avons suivi la désacétylation en dosant sur papier la N-acétyl-glucosamine en fonction du temps pour des concentrations de 0,01 N; 0,1 N et 0,5 N en méthoxyde de sodium. Nous observons que la vitesse de la réaction est étroitement liée à la concentration en méthoxyde de sodium; ainsi pour une concentration de 0,5 N; 0,1 N et 0,01 N la réaction est totale au bout de 20,30 et 60 mm.

La réaction est d'autant plus lonte que le méthoxyde de sodium est faiblement concentré . (Fig 13 A p. 60).

Pour une température de $+4^{\circ}\text{C}$ et une concentration de 0,01 N en méthoxyde de sodium nous obtenons au bout **de 30** nm. un rendement de 94,5 p. 100 en N-acétylglucosamine.

III - CONCLUSIONS

L'ensemble des résultats est représenté dans le tableau III. Les conclusions se résument de la façon suivante :

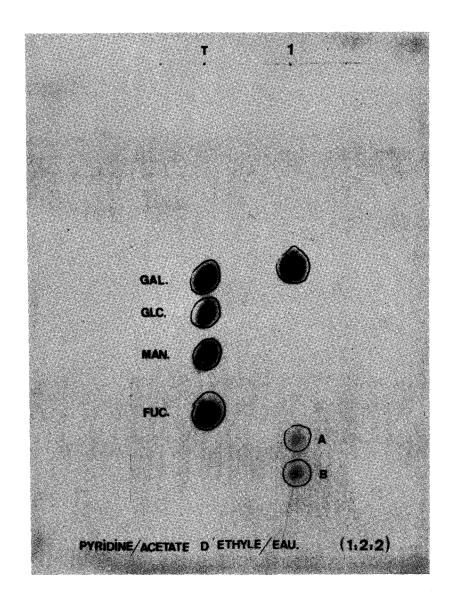
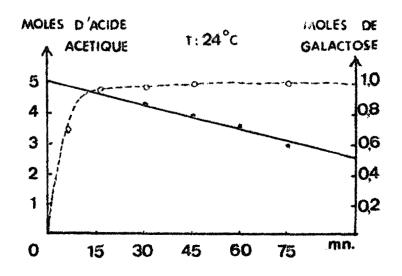


Figure 9

Chromatographie sur papier des composés résultant de la désacétylation du pentaacétyl-D-(+) galactose par le méthanol ammoniacal (1). Système-solvant: pyridine-acétate d'éthyle-eau
(1:2:2); papier Schleicher et Schüll nº 2 040 b; durée de
la chromatographie: 18 h; révélation à l'oxalate d'aniline.
T: mélange de glucides purs; Gal: Galactose; Glc: Glucose;
Man: Mannose; Fuc: Fucose; A et B: glycosylamines.

- I- Nous démontrons au cours de notre étude, que les procédés de O-désacétylation au méthoxyde de sodium et à la soude, représentent deux méthodes de choix pour la O-désacétylation quantitative des osides ne renfermant que des oses "neutres".
- 2- La désacétylation de la peracétylglucosamine est de réalisation plus délicate, elle s'accompagne de la formation de chromogènes (Fig. II p. 57). Ceci est caractéristique avec l'utilisation des procédés à la soude et au méthanol ammoniacal.
- 3- Seul le procédé au méthoxyde de sodium anhydre (0,0I N à +4°C) désacétyle quantitativement la peracétylglucosamine, sans que celle-ci se transforme en chromogènes. De ce fait nous utiliserons ce procédé pour la désacétylation des oses et des osides des acétolysats polysaccharidiques et glycopeptidiques.



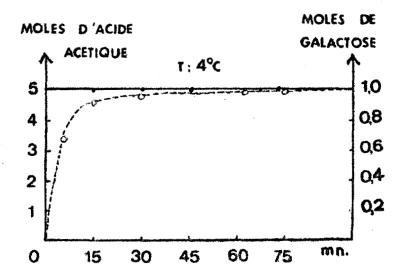


Figure 10

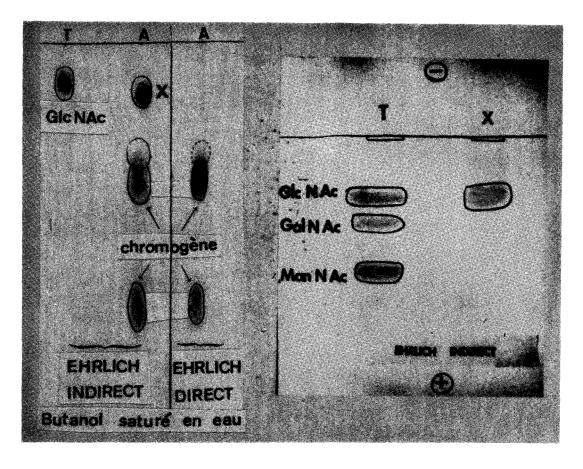
Cinétique de O-désacétylation du pentaacétyl-D-(+)-galactose par la soude 0,08 N à 24°C et à 4°C, le dosage de l'excès de soude par l'acide chlorhydrique 0,1 N nous permet de suivre la libération de l'acide acétique en fonction du temps (courbe en pointillé). Le dosage chromatographique du galactose est représenté par la courbe en trait continu.

TABLEAU II

Cinétique de désacétylation du 0-pentaacétyl-α-D-galactose
à + 24°C et à + 4°C

Procédé à la soude

((: Désacétylation du peracétyl galactose)					
Temps en mn	+ 24ºC	+ 4ºC				
((15 (:				
(30	: 84,7 p. 100): 101,1 p. 100)				
((45 (: 74,1 p. 100): 100,5 p. 100)				
(75	54,7 p. 100) 103,2 p. 100)				



A B

Figure 11

- A Chromatographie des composés résultant de la 0-désacétylation du tétra-0-acétyl N-acétyl-D-(+)-glucosamine selon le procédé FISCHER et BERGMAN (158). Système-solvant: butanol secondaire saturé en eau; papier Whatman nº 1; durée de la chromatographie: 16 heures; révélations à l'Ehrlich "direct" (partie de droite) et à l'Ehrlich "indirect" (partie de gauche). T: témoin composé de la N-acétylglucosamine.
- B Electrophorèse sur papier du composé X isolé par chromatographie préparative. Electrophorèse sur papier Arches 304 dans le tampon boraté à 1 p. 100 de pH 9,2; tension 12 V/cm pendant 4 h, (FOSTER) (159); révélation à l'Ehrlich indirect; T: solution de témoins purs; GlcNAc: N-acétylglucosamine; GalNAc: N-acétylgalactosamine; Man N-Ac: N-acétylmannosamine.

TABLEAU III

Divers procédés de désacétylation appliqués au peracétylgalactose et à la peracétyl-glucosamine .

Résultats donnés en pourcentage.

Méthodes de désacétylation	Oses "neutres"	N-acétylosamine	Chromogènes
Méthoxyde de sodium 0,011	I00	94,5	О
Soude à +4°C pH I3	IOI	76,8	28,5
Méthanol ammoniacal	44	85 , I	16,1
Baryte	66	200	/
Acide sulfurique	84,7	56 , 9	0

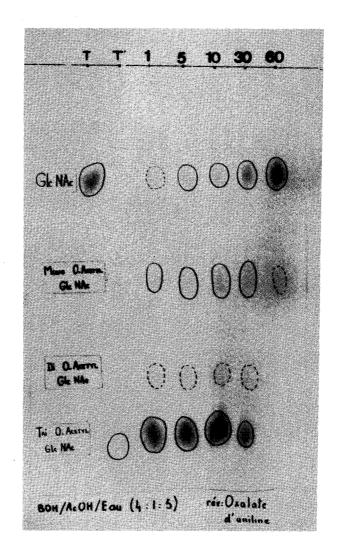


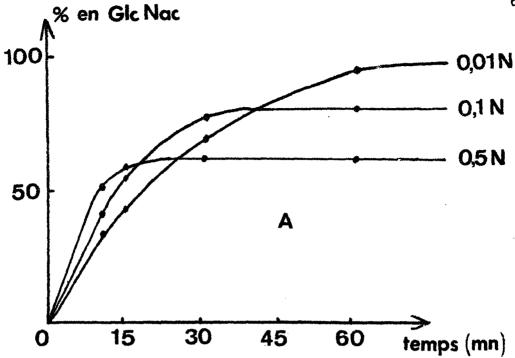
Figure 12

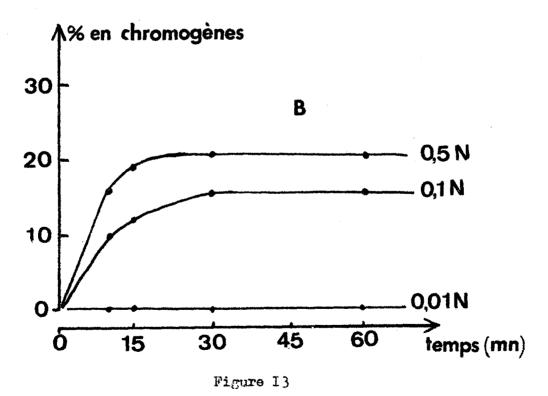
Cinétique de désacétylation par le méthoxyde de sodium de la peracétylglucosamine. Chromatographie sur papier des produits de la désacétylation aux temps 1, 5, 10, 30 et 60 mn.

T: témoin glucosamine

T': témoin peracétylglucosamine







Cinétique de 0 - désacétylation de la peracétylglucosamine par le méthoxyde de sodium 0,0IN; 0,TN; 0,5 N. Dosage de la N - acétyl - glucosamine (graphique A) et des chromogènes (graphique B) aux temps I0,15,30 et 60 mn.

STABILITE DES LIAISONS GLYCOSIDIQUES VIS-A-VIS DE L'ACETOLYSE

La rupture préférentielle d'un nombre restreint de liaisons osidiques d'un glycanne, nous pose le problème de leur stabilité vis-à-vis de l'acétolyse. La complexité structurale des glycannes ne nous permet guère d'énoncer de lois à ce sujet car la stabilité des liaisons osidiques est étroitement à l'enchainement et à la position des oses les uns par rapport aux autres. Nous avons de ce fait étudié le comportement de différents types de liaisons osidiques appartenant à des structures simples et connues.

I- MATERIEL ET METHODES

A- CHOIX DU MATERIEL

Nous avons utilisé les disaccharides commercialisés suivants : le lactose et le cellobiose, fourni par SIGMA; le maltose et le mélibiose commandé chez Nutritional Biochemicals Corporation.

Mous avons isolé le chitobiose par chromatographie préparative sur papier d'un acétolysat de chitine. Les impuretés en provenance du papier, ont été éliminées sur une colonne de charbon-Celite.

B- ACETOLYSE DES DISACCHARIDES

Les disaccharides sont dissous dans une solution acétolysante et les prélèvements d'échantillons, (aux temps I,2,4,5 jours sont 0-désacétylés par la soude et soumis aux analyses chromatographiques qualitatives et quantitatives ainsi qu'aux dosages colori-

motriques des oses. (voir à ce sujet page 42.)

A IOO mg de glucides sont ajoutés très lentement 2,5 ml de solution acétolysante, composée d'acide acétique, d'anhydride acétique et d'acide sulfurique concentré dans les proportions (IO:IO:I) (v/v/v). La solution est maintenue pendant quelques jours à la température du laboratoire (20-22°C) sous agitation magnétique; des échantillons sont prélevés aux temps I, 2, 4 et 5 jours puis versés goutte à goutte dans 2,5 ml de glace pilée ; après décongélation totale, la solution est amenée à pH 4,5 avec du bicarbonate de sodium en poudre, il apparait alors une gelée transparente très visqueuse, correspondant aux oses et aux osides peracétylés. Ces composés peracétylés sont solubles dans le chloroforme et insolubles dans l'eau. La gelée est dissoute le chloroforme et la solution surnageante est lavée 3 fois avec IO ml de chloroforme. Les 3 fractions chloroformiques sont rassemblées puis lavéés avec 15 ml d'eau bicarbonatée et la solution chloroformique finale est séchée sur chlorure de calcium. Le chloroforme concentré à 2 ml à l'évaporateur rotatif et les oses et osides peracétylés sont précipités par addition de 200 ml d'éther de pétrole; le précipité blanc formé est recueilli par centrifugation avoir séjourné 20 heures à +4°C.

Le précipité, repris par de l'acétone, est désacétylé par de la soude diluée selon le mode opératoire décrit page 48.

II- RESULTATS EXPERIMENTEAUX

A- LIAI DIS OSIDIQUES DU TYPE & ET 6

La structure du maltose et du cellobiose ne diffèrent que par l'anomère pprox et β de leur liaison osidique.

L'acétolyse d'une durée de cinq jours de ces deux osides conduit, après désacétylation par la soude 0,08 N, 30 mn à +4°C, et dosage chromatographique du glucose et du cellobiose aux résultats suivants:

- Cellobiose : Glcp ₹ I--->4 glc : 6,87 p.100 de rupture - Maltose : Glcp ⊀ I--->4 Glc : I2,0 p.100 de rupture

Les liaisons & -D-osidiques sont plus labiles que les liaisons & -D-osidiques vis-à-vis de l'acétolyse; on observe l'inverse dans le cas de l'hydrolyse partielle par les acides minéraux dilués. (MASSEL et OTTAR) (161).

B- LIAISONS OSIDIQUES DU TYPE GALACTOSYLET GLUCOSYL

L'acétolyse comparée du lactose et du cellobiose nous renseigne sur le comportement des deux types de liaisons.

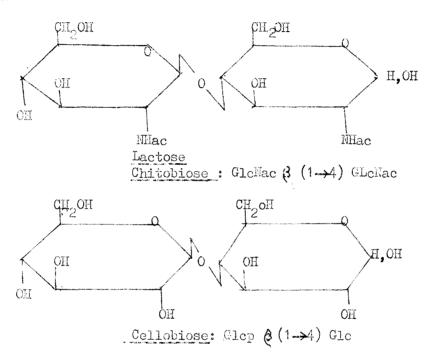
Des cinétiques d'acétolyse effectuées sur IOO mg de chacun de ces deux osides nous ont permis de tracer les courbes de stabilité des deux types de liaisons; les résultats sont résumés dans le tableau IV p. 66 et illustrés par les courbes de la figure I5 p. 68

Nous observons que pour une acétolyse d'une durée de 5 jours à 20-22°C le pourcentage de liaisons coupées est de 73 p. 100 pour le lactose et de 6,9p.100 pour le cellobiose.

Mous en déduisons que la stabilité de la liaison osidique est étroitement liée à la position des fonctions "hydroxyle". La liaison β -D-glucosidique est beaucoup plus stable que la liaison λ -D-galactosidique.

C- LIAISONS OSIDIQUES DU TYPE GLUCOSYL ET N-ACETYLGLUCOSAMINYL.

Nous avons comparé au cours de notre étude la stabilité des liaisons glucosyl 1->4 du cellobiose et N-acétylglucosaminyl 1->4 du chitobiose. Ces deux osides ne diffèrent que par la nature du substituant du carbone 2.



L'acétolyse d'une durée de 5 jours, avec prélèvements d'échantillons au temps 2, 4, 5 jours, conduit après désacétylation et dosage colorimétrique de la N-acétylglucosamine (selon le procédé de RESSIG, STROMINGER et LELOIR)(162) et dosage chromatographique du glucose (procédé de HUGHES et JELUIC) (163) aux résultats suivants :

Les liaisons N-acétylglucosaminyl β 1-34 sont plus labiles que les liaisons glucosyl β 1-4. Ces dernières sont trois fois plus résistantes que les précédentes. (Tabloau IV p.66).

D- LIAISON GALACTOSYL DES TYPES $1 \longrightarrow 4$ et $1 \longrightarrow 6$.

Nous acétolysons les deux disaccharides suivants : le mélibiose (Gal≪1-6 Glc) et le lactose (Gal¾ 1-4 Glc). Ces deux osides diffèrent par deux facteurs ; d'une part une anomérie de liaison × et (et d'autre part une liaison 0-glycosidique de type 1-4 et 1-6.

Nous avons vu précédemment que la liaison de type & était préférentiellement coupée par rapport à son anomère 3, cette différence faible pour une durée de cinq jours d'acétolyse peut être considérée comme négligeable pour une durée inférieure à trois jours. Nos résultats sont résumés dans le tableau IV ainsi que par les figures 14 et 15.

L'isomère de position 1-6 est moins stable que l'isomère 1-4. Nos résultats sont en accord avec ceux de MATSUDA, WATANABE, FUJINOTO et ASO (164) ainsi que ceux de CÔTE (165).

III- CONCLUSIONS

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude sur le comportement de quelques types de liaisons 0-glycosidiques vis-à-vis de cette technique d'acétolyse sont les suivantes :

1°- La stabilité des liaisons osidiques est fonction de l'anomérie $\not \sim$ ou $\not \sim$. Les résultats concernant l'étude comparée des stabilités des liaisons $\not \sim$ (1-4) du cellobiose et $\not \sim$ (1-4) du maltose sont à cet égard significatifs La liaison $\not \sim$ est plus stable que la liaison $\not \sim$; cependant cet écart de stabilité est trop faible pour envisager l'application de cette propriété à la détermination de la nature $\not \sim$ ou $\not \sim$ d'une liaison osidique.

TABLEAU IV

Cinétique d'acétolyse des disaccharides suivants : lactose, mélibiose et chitobiose

(N ₂	: oside	structure	Acétolyse à 20-22º C Pourcentage d'oses libérés				
(•		1 jour	2 jours	4 jours	5 jours	
(1 (Lactose	$\frac{\beta 1 - 4}{3}$ Glc	18,5	34,1	59,4	; 73)	
((2 (Mélibiose	$Gal \xrightarrow{\alpha_1-6} Glc$	35,9	78,6	100	100	
((3 (Chitobiose	GlcNAc $\stackrel{\beta_1-4}{\longrightarrow}$ GlcNAc		14,0	18,8	19 , 0)	

2°-Il existe des différences de stabilité entre les liaisons du type galactosyl, N-acétylglucosaminyl et glucosyl. Les précédents résultats démontrent :

- que la stabilité des liaisons osidiques est fonction de la nature du substituant du carbone 2 de l'ose non réducteur. Ainsi la liaison M-acétylglucosaninyl est plus labile que la liaison glucosyl.
- que la stabilité des liaisons osidiques est fonction de la position de l'hydroxyle du carbone 4 de l'ose non réducteur. Ainsi la liaison galactosyl est plus labile que la liaison glucosyl.
 L'ordre des stabilités croissantes est donc :
 Liaison glucosyl > liaison N-acétylglucosaminyl > liaison galactosyl.

3°- Nous avons finalement démontré que la liaison de type 1-4 était plus stable que la liaison du type 1-6. Ce dernier résultat est à rapproché de celui de WOLFROM et DACONS (166) qui démontrent que la liaison 1-6 est plus facilement coupée que la liaison 1-3.

L'ensemble de cette étude préliminaire nous permet désormais de prévoir des ruptures préférentielles au sein des glycennes.

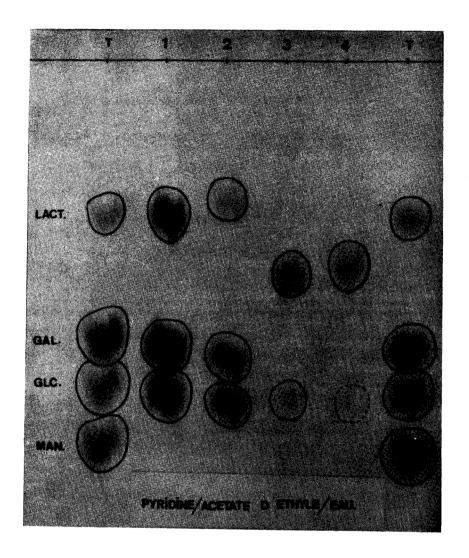


Figure I4

Chromatographie sur papier des acétolysats (2 jours + 20°C)
0-désacétylés du lactose (I) mélibiose (2), maltose (3) et
cellobiose (4). Système-solvant: pyridine-acétate d'éthyleeau (I:2:2); papier Whatman N°I; durée: I8heures; révélation
à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (A45); T: mélange de glu-cides; Lac: lactose; Gal:galactose; Glc:glucose; Man:
mannose.

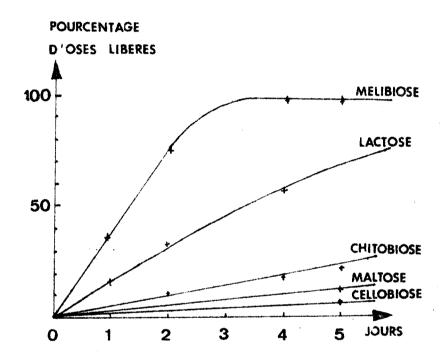


Figure I5
Cinétique d'acétolyse des disaccharides suivants : mélibiose, lactose, chitobiose, maltose et cellobiose.

MISE AU POINT D'UN PROCEDE DE FRACTIONNEMENT DES ACETOLYSATS GLYCOPEPTIDIQUES

Ce procédé de rupture séquentielle utilisé antérieurement par les auteurs pour l'exploration de la structure des glucides, tels que la cellulose et la chitine ne faisait guère appel à d'autres méthodes de fractionnement que celles de la chromatographie d'adsorption sur charbon-Celite ou de partage sur papier.

Dans la mesure ou nous désirons appliquer ce procédé d'exploration à la détermination de la structure des glycopeptides, nous avons tiré parti des trois propriétés suivantes :

- a- La grande stabilité des liaisons aspartyl-M-acétylglucosa-minylamine.
- b- La stabilité moindre des liaisons sialosyl
- c- L'absence de N-acétylation des amino-acides pour mettre au point un procédé original de fractionnement des acétolysats glycopeptidiques.

I— MATERIEL ET METHODES

A. PROPRIETES DE L'ACETOLYSE

- 1-Stabilité dos liaisons sialosyl (voir pages 34 et 36)
- 2- Absence de M-acétylation des amino-acides

- Principe

Nous voulons vérifier le comportement de la fonction amine de la

thrécnine, en présence du mélange acétolysant : anhydride acétique, acide acétique et acide sulfurique. Le fractionnement de l'acétolysat sur résines échangeuses d'ions nous renseigne sur la présence ou l'absence d'une fonction acétamide au sein de la molécule.

Deux possibilités sont donc à envisager :

a-La fonction amine n'est pas acétylée, la 0-acétyl thréonine est retenue . sur la résine cationique.

b-La fonction amine est acétylée, la 0-acétyl N-acétyl thréonine est retemue sur la résine anionique.

- llode opératoire

réfrigéré d'anhydride acétique, acide acétique et acide sulfurique concentré et gardés 100 heures à 20-22°C. L'acétolysat est versé ensuite goutte à goutte sur 10 ml de glace pilée. La solution est fractionnée sur résine cationique du type Dowex 50 x 6 ("mesh" 25-50; forme acide; 1x 24 cm) et sur résine anionique du type Duolite A 102 D (forme formiate). Après lavage des résines avec 500 ml d'eau distillée, la résine cationique est éluée avec une solution d'ammoniaque à 5 p.100; la résine anionique est éluée avec une solution a d'acide formique à 2p.100. Après avoir Sliminé l'ammoniaque et l'acide formique sous vide à l'évaporateur rotatif les solutions sont soumises à l'analyse chromatographique ainsi qu'aux dosages colorimétriques.

- Résultats

L'éluat de la résine cationique renferme 88 p.100 d'amino-acide. L'analyse chromatographique de cette solution confirme la présence exclusive de thréonine. L'ammeniaque, tampon d'élution de la résine cationique a pour effet de déplacer la thréonine fixée sur la résine Dowex 50 x 8 et de la 0-désacétyler selon le schéna suivant :

Aucun composé n'a pu être mis en évidence dans l'éluat de la résine anionique. La fonction amine de la thréonine n'est donc pas N-acétylée en présence du réactif acétolysant. (Fig. 16 p. 73).

- Conclusions

A la lumière des résultats précédemment décrits neus observons qu'un acétolysat glycopeptidique renferme :

- des osides "neutres" correspondant à la partie centrale du glycanne.
- des esides "acides" dont les séquences glucidiques correspondent à la partie la plus "externe" du glycanne.
- des hétérosides ou glycopeptides qui correspondent aux séquences glucidiques situdes au voisinage du point d'attache avec la chaîne peptidique.

B- FRACTICHERIAT DES ACETOLYSATS GLYCOPEPTIDIQUES

Nous avons tiré parti de cette hétérogéneïté pour mettre au point un fractionnement fondé sur :

- la solubilité différentielle dans le chloroforme et l'eau des hétérosides peracétylés.
- sur l'ionisation des fonctions carboxyliques des acides sialiques et amines des acides aminés.

1- Sclubilité différentielle des hétérosides peracétyles dans le mélange chloroforme-eau.

La rupture des liaisons osidiques en divers points de la molécule glycopeptidique, libère en mélange des glycopeptides de faible poids moléculaire, issus de la molécule mère, différant les uns des autres par la longueur de leur chaîne glucidique et ayant en commun un amino acide engagé dans la

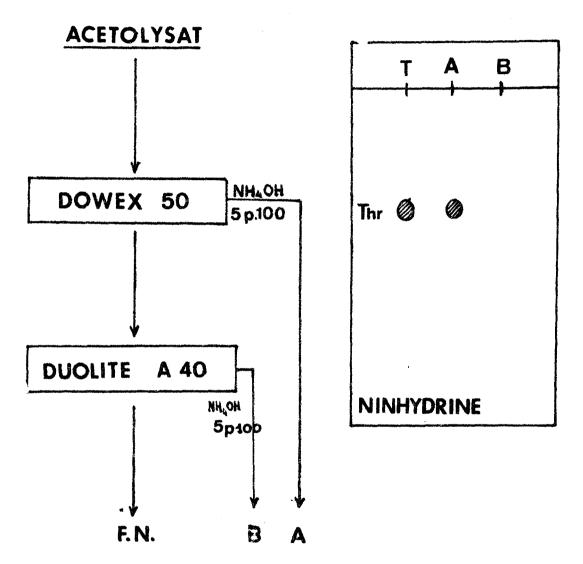


Figure 16

Absence de N-acétylation de la thréonine par les agents acétoly-sants. Schéma de fractionnement de l'acétolysat et chromatogra-phie sur papier des fractions A et B, en présence du témoin lateral: Thr: thréonine. Papier Whatman n°3. Système solvant: n-butanol - acide acétique - eau (4:I:5). Révélation au réactif à la ninhydrine.

liaison glycame-peptide. Le mélange acétolysant peracétyle les oses sans toutefois N-acétyler les amino-acides, de ce fait la molécule glycopeptidique possède deux pôles : un pôle hydrophobe comprenant la copule glucidique peracétylée, et un pôle hydrophile peptidique composé d'un ou deux amino-acides . Seule la longueur de la partie hydrophobe glucidique détermine la propriété de solubilité du glycopeptide peracétylé dans l'eau ou le chloroforme.

Les Slycopeptides ne renfermant que 2 ou 3 oses peracétylés sont solubles dans l'eau et constituent les glycopeptides de la phase aqueuse.

Les glycopeptides de plus haut poids moléculaire, contenant plus de 3 oses peracétylés sont solubles dans le chloroforme et constituent les glycopeptides de la phase chloroformique. Signalons que cette phase renferme en outre des osides "neutres" peracétylés.

2- Fractionnement sur résines échanges d'ions

Les phases chloroformiques et aqueuses sont fractionnées sur résincs échangeuses d'ions selon le mode opératoire suivant :

a- Fractionnement de la phase aqueuse

Les phases aqueuses sont collectées et déposées au sommet d'une colonne de résine cationique du type Dowex 50 x 2 ("mesh" 100-200; forme acide) (25 cm de haut, 2cm de diamètre pour IOO mg d'acétolysat). Après un rinçage abondant à l'eau distillée, une solution d'ammoniaque à 5 p. 100 déplace et 0-désacétyle les glycopeptides quantitativement. L'ammoniaque est ensuite éliminé à température embiante à l'évaporateur rotatif. Nous obtenons une famille de glycopeptides de faible poids moléculaire que nous appellons : la fraction glycopeptidique aqueuse.

b-Fractionnement de la phase chloroformique

Les osides et glycopeptides de la phase chloroformique sont fractionnés sur résines échangeuses d'ions après 0-désacétylation. On obtient de cette manière :

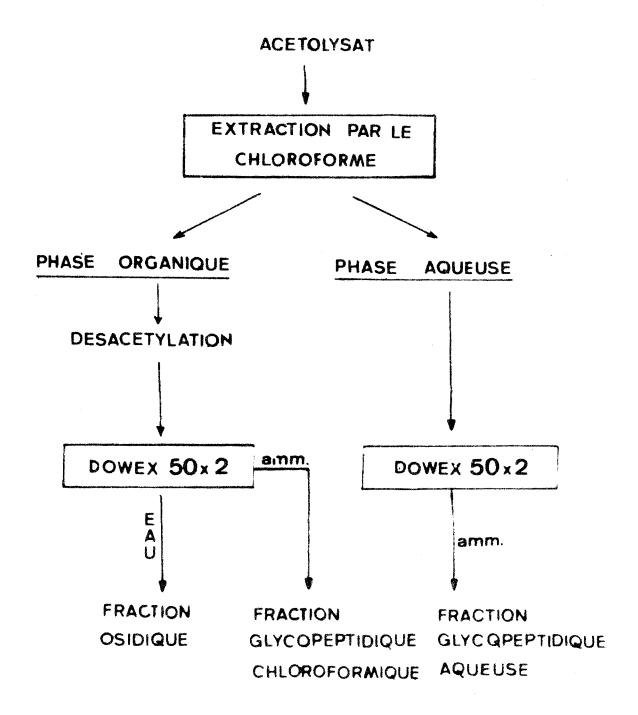


Figure 17

Schéma de fractionnement d'un acétolysat asialoglycopeptidique.

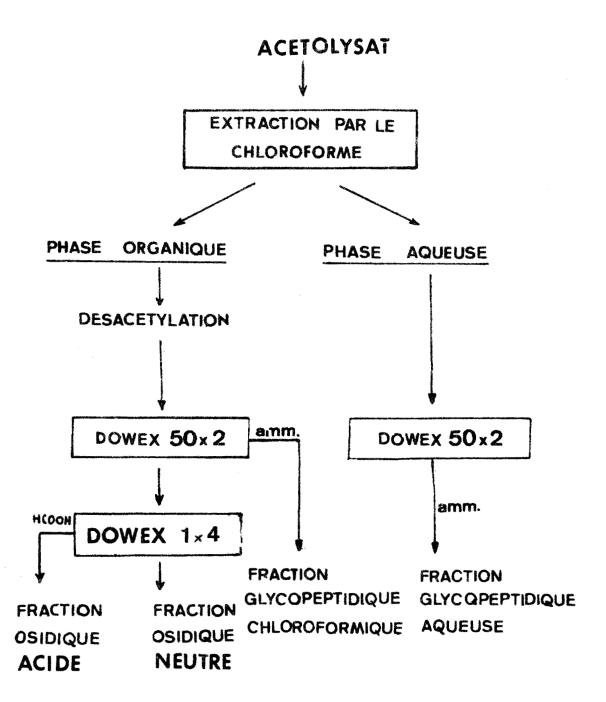


Figure 18
Schéma de fractionnement d'un acétolysat sialoglycopeptidique.

-Dans le cas d'un acétolysat sialoglycopeptidique

une fraction effluente "neutre" qui contient des osides neutres une fraction "acide", déplacéé de l'échangeur d'anions; contenant des sialyl-oligosides,

une fraction basique, éluée de l'échangeur de cations, contenant des glycopeptides qui correspondent aux séquences glucidiques situées au voisinage du point d'attache avec la chaîne peptidique.

- Dans le cas d'un acétolysat asialoglycopeptidique, la fraction "acide" fait défaut.

Nous avons illustré dans les figures 17 p. 75 et 18 p. 76 le principe de ce fractionnement.

II- RESULTATS EXPERIMENTAUX

Mous avons appliqué le procédé de fractionnement précédement décrit, aux sialo- et asialoglycopeptides de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de poule. L'ovomucoïde a été préraré selon le procédé de FREDERICQ et DEUTSCH (167) et les glycopeptides ont été isolés selon le procédé décrit par YAMASHIM et MAKIMO 168) modifié par MONSIGNY, ADAM -CHOSSON et MONTREUIL (169). (Voir à ce sujet page 98.)

A- ETUDE DU FRACTIONNETENT D: . ACETOLYSAT DES ASIALOGLYCOPEPTIDES (3 DE L'OVOIUCOIDE.

L'application du procédé de fractionnement, illustré par la figure 17, nous a permis d'isoler trois familles de glucides, dont nous avons précisé le rendement (Tableau V p.80) et la composition molaire en ose. Les résultats (Fig.19 p.79) peuvent se résumer de la façon suivante :

1 - Etude de la fraction "neutre"

Cette fraction représente 80,4 p.100 en ose du glycopeptide initial. Elle renferme des oses libres et des osides "neutres", dont l'isolement et la structure ont fait l'objet d'une étude détaillée (voir page 110 et suivantes)

2- Etude de la fraction glycopeptidique aqueuso

Cette fraction représente 11,16 p.100 en ose du glycopeptide initial. Elle est hétérogène en chromatographie sur papier Whatman n°3 dans le système solvant n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5).
L'utilisation des réactifs à la ninhydrine ainsi qu'à l'acide periodiquebenzidine permet de caractériser trois glycopeptides dont les comportements chromatographiques ont été définis par rapport à celui de l'acide
aspartique:

composé I R asp : 0,18

composé 2 R asp : 0,27

composé 3 R asp : 0,43

3- Etude de la fraction glycopeptidique chloroformique

Soluble dans le chloroforme, cette fraction représente 4,8 p.100 en ose du glycopeptide initial. Elle est également hétérogène en chromatographie sur papier, nous avons caractérisé deux glycopeptides dont les comportements chromatographiques par rapport à celui de l'acide aspartique sont les suivants:

composé I R asp : 0,10

composé 2 R asp : 0,18

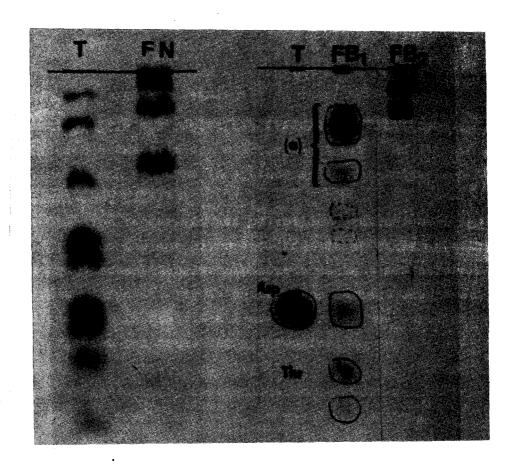


Figure 19

Chromatographie sur papier des différentes fractions de l'acé-tolysat 0-désacétylé des glycopeptides ${\bf S}$ de l'ovomucoïde.

Papier Whatman n°3 dans le système solvant n-butanol- acide
acétique- eau (4/I/5).

FN : fraction renfermant des polyosides neutres.

FB_T: fraction basique glycopeptidique de la phase aqueuse.

FB2: fractionbasique glycopeptidique de la phase chloroformique.

T: témoin d'osides purs. (a) composés donnant une réaction positive avec le réactif à l'acide periodique-benzidine.

Asp : acide aspartique. Thr : thréonine.

TABLEAU V

Etude de la composition molaire en galactose (Gal.), mannose (Man.), glucosamine (GlcW), acide aspartique (Asp.) des différentes fractions d'un acétolysat asialoglycopeptidique (Glycopeptides & de l'ovomucoïde).

Fractions	Gal.	Han.	GleNAc.	Asp.	Rendement
Fraction neutre	1	5,8	11	0	80,4
Fraction glyco- peptidique aqueuse	/	1 , 5	1,8	1	11,2
Fraction glyco- peptidique chloro- formique.	0,6	3,2	3,2	1	4 , 8
Glycopeptides & de l'ovomucoIde	1	5	10	1	

B-ETUDE DU FRACTIONNEMENT D' ACETOLYSAT DES SIALOGLYCOPEPTIDES L'OVOMUCOIDE

L'application du procédé de fractionnement, illustré par la figure I8 p. 76, nous a permis d'isoler quatre familles de glucides, (Fig. 20 p. 82) dont nous avons précisé le rendement ainsi que la composition molaire en ose, (Tableau VI p. 83).

III- CONCLUSIONS

Nous avons démontré que :

- L'acétolyse respectait les liaisons sialosyl et asparaginyl \mathbb{N} -acétyl glucosamine sans \mathbb{N} acétyler les amino-acides.
- 2- Nous avons tiré parti de ces propriétés pour mettre au point un procédé de fractionnement des acétolysats glycopeptidiques sur résines échangeuses de cations et d'anions, couplé au procédé de solubilité différentielle des glycopeptides peracétylés dans l'eau et le chloroforme.
- a- ceci nous permet d'obtenir pour un asialoglycopeptide trois fractions: la première, non retenue sur résines contient des osides "neutres"; la seconde, soluble dans le chloroforme, est désacétylée puis éluée de l'échangeur de cation, elle constitue les glycopeptides de la phase chloroformique, renfermant plus de trois oses situés au voi sinage du point d'attache sur la chaîne peptidique; la troisième, soluble dans l'eau est éluée de l'échangeur de cations, elle constitue les glycopeptides de la phase aqueuse, elle renferme un à deux oses liés au point d'attache sur la chaîne peptidique.

b- dans un acétolysat sialoglycopeptidique il faut signaler la présence d'une famille de sialosyloligosides élués de l'échangeur d'anions, ces composés correspondent aux séquences glucidiques localisés à la partie la plus externe du glycanne.

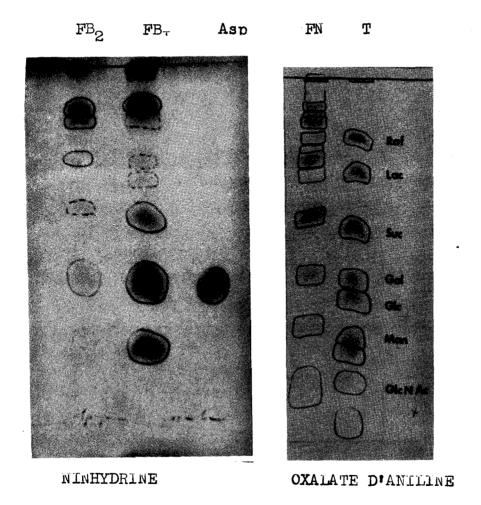


Figure 20

FN: fraction renfermant des polyosides neutres.

FB_T: fraction glycopeptidique de la phase aqueuse.

FB2: fraction glycopeptidique de la phase chloroformique.

TABLEAU VI

Etude des rapports molaires en galactose (Gal.), mannose (Man.), glucosamine (GlcNac) et acide aspartique (Asp.) des différentes fractions d'un acétolysat sialoglycopeptidique (glycopeptides & de l'ovomucoïde).

Fraction neutre	Gal.	Han.	GlcNAç	ANAN	Asp.	Rendement
Fraction neutre	1	2,8	3, 8	/	/	6 5 , 5
Fraction acide	1	1,2	0,5	0,8	/	15 , 5
Fraction glycopepti- dique aqueuse	/	0,9	1,5	/	1	7,0
Fraction glycopepti- dique chloroformique	/ 21	5,7 4,6	2,5 6,8	/ 1,2	1	9 , 0 /

2^{ème} PARTIE

APPLICATION DE L'ACETOLYSE A L'EXPLORATION
DE LA STRUCTURE DES OSIDES LIBRES ET
CONJUGUES.

- 1- ACETOLYSE D'UN SIALYL-OLIGOSACCHARIDE ISOLE DU LAIT DE FERRE.
- 2- ACETOLYSE DES GLYCOPEPTIDES β DE L'OVOLUCOIDE.

ACETOLYSE D'UN WEXASACCHARIDE ISOLE DU LAIT DE FEHIE.

I - MATERIEL ET METHODES

A - ORIGINE ET COMPOSITION

L'application au lait de femme d'un procédé do fractionnement des protéines qui associe un gradient de concentration en sulfate d'ammonium et un gradient de pH (MONTREUIL et al.) (167) a conduit les auteurs, à
isoler par électrophorèse préparative sur papier de l'adialysat de la fraction
non précipitable par le sulfate d'ammonium à saturation et à pH 3,7, six nouveaux
oligosides (GRIMMONPREZ et MONTREUIL) (168) numérotés de 1 à 6. L'oside n° 6
a fait l'objet d'une étude de structure.

La composition molaire en oses de l'oside n° 6 est la suivante: D- (+)-galactose, D- (+)-glucose, N-acétyl- D -(+)-glucosamine et l'acide N -acétyl - D -(-) neuraminique dans les proportions 2:1:1:2. Cet oside possède un résidu de glucose, placé en position terminale réductrice.

B- ACETOLYSE DE 1'HEXASACCHARIDE.

L'acétolyse; d'une durée de 48 heures, est éffectuée sur 10 mg. du polysaccharide selon les conditions expérimentales décrites page 61. L'acétolysat est ensuite désacétylé par de la soude diluée, il renferme des oses, des osides "neutres et des sialyl-oligosides.

C- ISOLEMENT DES OSIDES

L'électrophorégramme préparatif est effectué de la manière suivante: 10 mg. de l'acétolysat, en solution dans l'eau, sont déposés en un trait continu à 12 cm. du bord "anodique" d'une feuille de papier Arches 304 de 35 cm de longueur. L'électrophorèse est effectuée, dans une cuve "en toit" dans

le tampon de MICHL (169) de pH >,5, sous une tension de 7 v/cm pendant 6 heures. Après un séchage de l'électrophorégramme à la température ambiante, des bandes latérales sont découpées dans ce dernier et révélées par le réactif à l'oxalate d'aniline pour repérer l'emplacement des composés glucidiques. Ceux-ci sont ensuite élués pendant 18 houres avec de l'eau distillée suivant le procédé de DENT (170). Les solutions correspondant à chaque composé sont rassemblées et lyophilisées.

Chacune des préparations ainsi obtenues est ensuite fractionnée de la même manière, par chromatographie préparative sur papier Whatman n° 3, dans le système solvant n-butanol - acide acétique - eau (4:1:5) pendant 4 jours. Chacun des osides ainsi obtenusest chromatographié séparément dans les deux systèmes solvants suivants :

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

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

en présence d'un témoin interne composé de galactose, afin de définir le Rgal
pour chacun d'entreux.

D - EXTUDE DE STRUCTURE DES OSIDES

1- COMPOSITION DES OSIDES

a- Composition centésimale en glucides

La composition centésimale des osides en chacun des trois types de glucides (oses "neutres", osamines et acide sialique) a été déterminée à l'aide des procédés colorimétriques classiques: les oses "neutres" par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLIANS et PHILIPPI (171 modifiée par RIFILIGION (172) en introduisant dans chaque série de dosages des "témoins internes" représentés par une solution des oses constituant chacun des osides dans les proportions molaires où ils existent dans ces derniers (MONTREUIL et SPIK) (173); (SPIK et HONTREUIL) (174); les osamines par le procédé d'ELSON et MORGAN (175) modifié par BELCHER et al. (176), après une hydrolyse chlorhydrique. (Hel 4N), à 100°C pendant 4h,

effectuée en tubes scellés sous vide; les acides sialiques par la méthode à la diphénylamine de WERNER et ODIN (177).

b- Identification et dosage des oses

Les oses "neutres" ont été identifié par chromatographie sur papier suivant les procédés décrits par MONTREUIL et al. (178) et dosés par la méthode de HUCHES et JEANLOZ (179).

2 -RUPTURE SPECIDIQUE DES LIAISONS SIALYL

Les liaisons sialyl ont été spécifiquement coupées par une hydrolyse sulfurique ménagée (H_2 sO₄ 0,05N ; à 80°C pendant 1h.) et les hydrolysats ont été purifiés par un passage sur colonne (1x10 cm) d'ochangeurs d'ions (Dowex 1 X 8; "mesh" 200-400 ; forme formiate). La solution effluente est évaporée à siccité sous pression réduite, puis chromatographiée sur papier Whatman n° 3 dans le système solvant pyridine - acétate d'éthyle - acide acétique - eau (5:5:1:3).

II - RESULTATS EXPERIMENTAUX

A - ISOLEMENT DE 8 OSIDES DE L'ACETOLYSAT

- 1 L'électrophorèse préparative sur papier de l'acétolysat de l'hexasaccharide du lait de femme, permet d'isoler trois classes d'osides (Fig. 22 p. 92) dont la migration électrophorétique est fonction de leur charge. Nous pouvons distinguer:
 - Une fraction "neutre" (F.N.), renfermant des osides "neutres"
 - Une fraction "acide" (F.A.), renfermant des osides possédant un résidu d'acide sialique.
 - -Une fraction plus "acide" ($F.\Lambda_2$), renfermant des osides possédant deux résidus d'acide sialique.

Ces composés donnent une réaction positive avec les réactifs des glucides.

2- La chromatographie préparative (Fig. 23 p.93) de la fraction "neutre" dans le système solvant n-butanol - acide acétique - eau (4:1:5) pendant 5 j. permet d'isoler 5 constituants, homogènes en chromatographie sur papier (Fig. 24 p. 94), dans les proportions relatives suivantes:

Le comportement chromatographique sur papier Whatman n°3 de ces osides, défini par rapport à celui d'un témoin interne composé de galactose est le suivant:

constituant 1 :
$$R_{GaI} = 0,59$$

" 2 : $R_{GaI} = 0,47$

" 5 : $R_{GaI} = 0,22$

" 4 : $R_{GaI} = 0,22$

" 5 : $R_{GaI} = 0,10$

3 - L'hydrolyse acide ménagée des sialyl oligosides (F.A₁ et F.A₂) fournit des osides "neutres" dont le comportement chromatographique est identique aux constituants 4 et 5 de la fraction "neutre" (F.N.); (Fig. 25 p. 95)

B - COMPOSITION ET STRUCTURE DES OSIDES

Ils sont constitués, en proportion variable, de D- (+)-galactose, de D-(+)-glucose, de D-(+)-glucosamine et d'acide N-acétyl - D-(-) neuraminique qui ont été identifiés par leur comportement chromatographique. La composition en glucide ainsi que les rapports molaires des oses sont rassemblés dans le tableau VII p.96 et illustré par la figure 25 p.95 Ils peuvent se résumer de la manière suivante:

Constituant nº1

Il s'agit d'un disaccharide renfermant un résidu de galactose pour un résidu de de N -acétyl glucosamine.

Constituant nº2

C'est un disaccharide composé de galactose et de glucose dans le rapport 1:1; le glucose est en position terminale réductrice. Il possède le même comportement chromatographique que le lactose.

Constituant nº3

C'est un trisaccharide renfermant dans les proportions équimoléculaires du galectose, du glucose et de la N-acétyl glucosamine.

Constituent nº4

C'est un trisaccharide renfermant du galactose et de la N-acétyl glucosamine dans les proportions 2:1. Un résidu de galactose se trouve en position réductrice. Constituant n°5

Il s'agit d'un tétrasaccharide composé de galactose, glucose, N-acétyl glucosamine dans les proportions 2:1:1. Un résidu de glucose se trouve en position terminale réductrice.

III - CONCLUSIONS

Les résultats précédemment énoncés confirment les propriétés de l'acétolyse, en effet :

1 - Contrairement à l'hydrolyse acide ménagée, l'acétolyse libère quantitativement des osides; les oses sont présents dans l'acétolysat à l'état de traces. (Fig. 21 p.91)

Parmi les composés isolés, nous avons déterminé la structure des osides suivants:

 La combinaison de ces 5 structures nous permet de reconstituer un fragment de la molécule initiale, soit:

2 - L'acétolyse respecte en partie les liaisons sialyl. Nous avons isolé trois sialyl oligosides dont la structure peut se schématiser de le façon suivante:

3 - Dans le cadre d'un travail d'équipe des études complémentaires de structure de cet hexasaccharide ont été entreprises ; il s'agit de l'hydrolyse enzymatique effectuée par BOUQUELET (180), de la perméthylation effectuée par MONSIGNY et .GRIMIONEREZ (181).

Les résultat que nous avons obtenus sont en parfait accord avec ceux de GRIMMONPREZet MONTREUIL (182),(183), ils confirment leur schéma de structure (Fig. 26 p 97). Ces auteurs inspirés de la terminologie de KUHN, l'appellent le dilactaminyl-lacto-N-tétraose.

T s

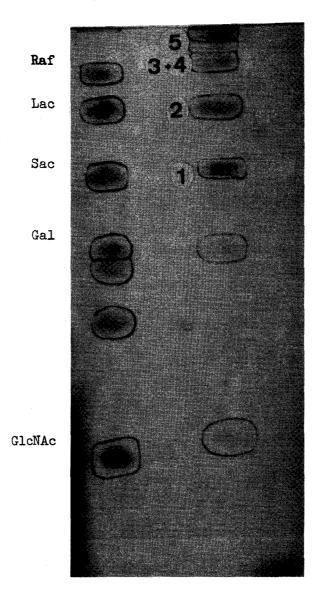


Figure 2I

Chromatographie sur papier de l'acétolysat O-désacétylé par la soude de l'oside Nº 6 du lait de Femme. Système-solvant : buta-nol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) ; durée : 3 jours ; papier Whatman nº 3 ; révélation oxalate d'aniline. Les osides sont numérotés de 1 à 5. T : témoin d'osides purs. Raf : raffinose, Lac : lactose ; Sac : Saccharose ; Gal : galactose ; Glc : glucose.

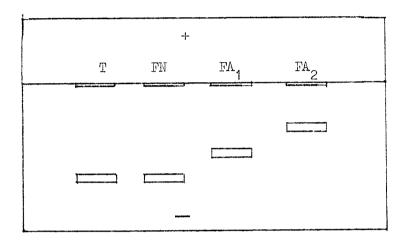


Figure 22

Electrophorèse des différentes fractions de l'acétolysat de l'oside 6 du lait de femme isolées par électrophorèse préparative; réalisée sur papier Arches 304, dimension 54 cm x 30 cm; tampon pyridine de pH 3,5; tension de 7 V/cm; durée : 6 h.; cuve en "toit". T: solution témoin d'osides neutres purs. F.N.:fraction "neutre"; FA1: fraction acide n°1 et FA2: fraction acide n°2.

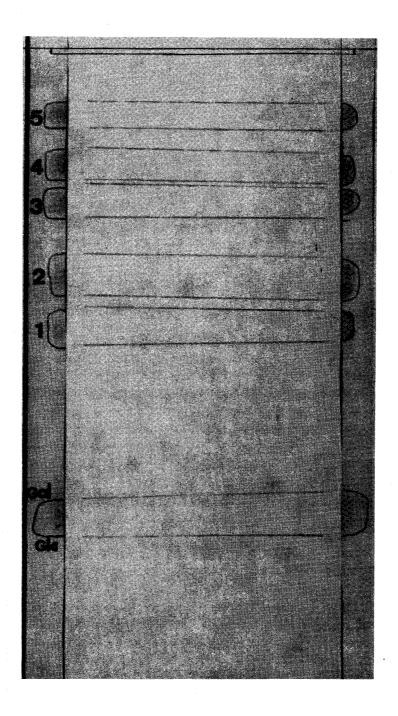


Figure 23

Chromatographie préparative de la fraction "neutre" isolée par électrophorèse préparative. Système-solvant : butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) ; durée : 4 jours ; papier Whatman nº 3 ; les bandes latérales sont révélées avec le réactif à l'oxalate d'aniline. Les bandes centrales sont découpées puis éluées par la méthode de DENT (166).

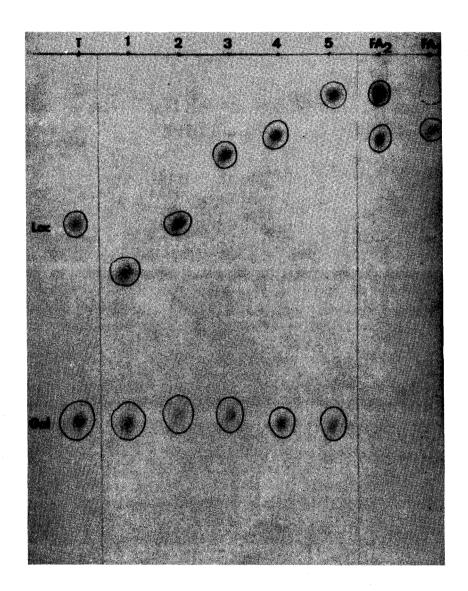


Figure 24

Chromatographie sur papier des osides 1 à 5 isolés de l'acétolysat désacétylé de l'oside nº 6 du lait de Femme par chromatographie préparative. Chromatographie de l'hydrolysat partiel des osides acides FA, et FA, par l'acide sulfurique 0,05 N, à 80°C, pendant 1 h. Système-solvant : butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) ; papier Whatman nº 3 ; durée de la chromatographie : 4 jours ; révélation à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE

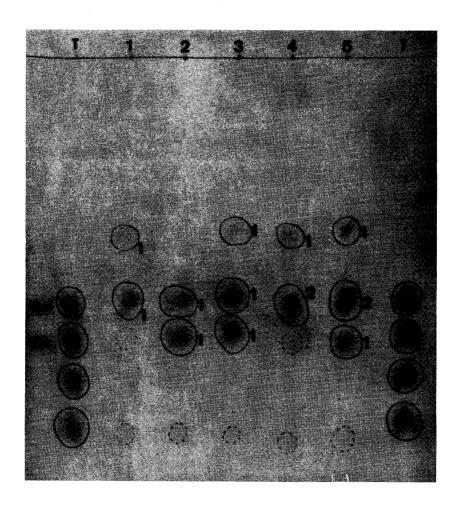


Figure 25

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques (HCl I,5N; à IOO°C; pendant I,5 h), purifiés sur échangeurs de cations et d'anions des osides I à 5 de l'acétolysat de l'oside 6 du lait de femme. Système solvant : pyridine-acétate d'éthyle-eau (I:2:2); papier Whatman n°I; durée I6 h; révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

Composition des osides 1 à 5 isolés par électrophorèse et chromatographie préparative d'un acétolysat désacétylé sde l'oside 6 du lait de forme.

TABLEAU VII

i manamanangan ang anaman dan sa sa sa sa sa pagaman na nahanan na na kalaman na sa sa sa sa sa sa sa sa sa sa I	Désignation de l'oside						
Composition centésimale	1	2	3	4	5		
Oses "neutros" totaux	56 , 17	115,7	74,71	73,6	117,9		
Osamines	48 ,1 0	0	35,30	31,2	3 8 , 1		
oses "neutres"/osamine	1,16		2,11	2 , 55	3,0		
	The Lordon Hills. Library Street. 1994/17 Street	gerate date community, and again paper paper some	6 6 8 8 Santananga nga Labou sebalahan (Marian) 140 150	Jagoshacoaka, sakah Manishacakka Minish	comproses and rates with relevant months of		
Composition molaire	v 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0				•		
D-(+)-Galactose		1	1	2	2		
D-(+)-Glucose	· C	1	1	0	1		
N_Acétyl-glucosamine	0 0 0 0 0	0	1	1	r i		
				B B B Compression December (procedure)	# 0		
Poids moléculaire calculé	384	342	546	546	708		

D Galp
$$\frac{\beta 1-3}{\Delta}$$
 D GleNAcp $\frac{\beta 1-3}{\Delta}$ D Galp $\frac{\beta 1-4}{\Delta}$ D Gle $\frac{\Delta}{\Delta}$ 2-3 $\frac{\Delta}{\Delta}$ D - ANAN

Figure 26

Schéna de structure de l'oside 6 du lait de femme

Gal. = galactose ; GlcNAc = N-acétyl glucosamine ; Glc = glucose Δ HANI = Acide N-acétyl neuraminique.

ACETOLYSE DES GLYCOPEPTIDES β DE L'OVOHUCOIDE

L - MATERIEL ET HETHODES

A - ORIGINE ET COMPOSITION

L'evenuceïde du blanc d'œuf de poule est préparé selon le procédé de FREDERCQ et DEUTSCH (184). Il contient suivant les préparations 8 à 9 p. 100 d'oses "neutres"; de 13 à 14,7 p. 100 de N -acétyl glucosamine et de 0,85 à 0,9 p. 100 d'acide N-acétyl neuraminique. Sa composition molaire est la suivante (pour une masse moléculaire de 27000): galactose 2, mannose 9, N -acétyl glucosamine 20, acide N -acétyl neuraminique 1. Toutes les préparations sont hétérogènes en immunoélectrophorèse et comportent 4 arcs de précipitation. (NOMPREUIL et al.) (185).

1 -Préparation et isolement des glycannes

Nous appliquent le procédé décrit par YANASHIMA et NAKINO (186) modifié par MGNISIGNY, ADIN-CHOSSON et MONTREUIL (187), pour obtenir des glycopeptides à partir de l'ovomucoïde. L'ensemble des opérations d'isolement et de purification des glycopeptides peut se résumer de la façon suivante: les hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde sont purifiés par un passage sur colonnes d'échangeurs de cations, puis d'anions après une élimination de la pronase par l'acide trichloracétique. La fraction glycopeptidique est ensuite débarassée des poptides qui n'ont pas été retenus sur l'échangeur d'ions, par une chromatographie sur colonne de gel de séphadex G-25. La fraction séphadex est soumise à la chromatographie sur colonne de Dowex 50 x 2 (mesh 200-400; forme acide); l'élution de la colonne à l'eau fournit une prenière fraction (fraction α), et le déplacement des glycopeptides fixés sur la colonne est ensuito réalisé à l'aide d'un gradient de concentration en formiate de pyridine. On obtient de cette manière, les fractions β et γ (Fig. 27 p. 99). La fraction

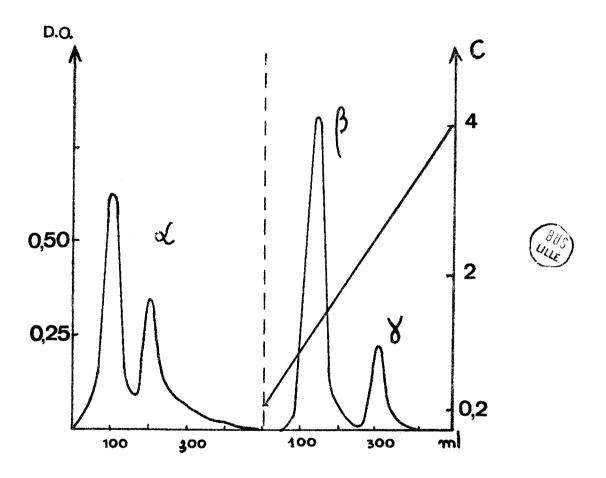


Figure 27

Diagramme de fractionnement des glycopeptides de l'ovomucoïde (350 mg) préalablement purifiés par chromatographie sur Sephadex G-25 et sur colonne de Dowex 50 x2 ("mesh" 200-400: forme acide) selon MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (169). Repérage des composés glycopeptidiques par le phénol sulfurique. En ordonnée: D.O: densité optique; C ; concentration en formiate de pyridine; en abscisse : volume d'élution.

TABLEAU VIII $\begin{tabular}{lll} \textbf{Composition molaire en glucides et en amino-acides des} \\ \textbf{glycopeptides} & \bowtie & \beta & & \forall \\ \end{tabular}$

minorphic charges and proceduring control mediums, and the standard propagation of the control o		om, ulado, jelikuloski jelikuloski robio o povezane kaji kaji i ili u T	sample on the resolution of the Control of the Cont
	⋖	β	8
Galactose	1	1	1
Mannose	3	5	5
N-acétyl glucosamine	4	10	10
Acide N-acétyl neuraminique	1	O	O
Acide aspartique	1,14	1,15	1,4
^T hréonine	0,66	0,85	0,6
Sérine	0,29	0	0
Cystéine	0	0	1,4
Masse moléculaire (calculée d'après la composition molaire)	1958	3220	3543

est homogène en électrophorèse dans divers systèmes tampons, elle n'a jamais pu être sous fractionnée, cependant les récents travaux de JAKUBCZAK et MOMPREUIL (188) montrent que ces glycopeptides appartiennent à deux asialoglycoproteines.

2- Composition centésimale et molaire des glycopeptides

La composition centésimale des glycopeptides & en glucides est déterminée par MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (189) en appliquant les procédés de dosage colorimétrique des glucides.

La composition molaire des glycopeptides en oses "neutres" est déterminée par chromatographie quantitative sur papier en appliquant le mode opératoire décrit par MONTREUIL et al. (190). Les résultats sont résumés dans le tableau VIII p. 100.

B - ACETOLYSE DES GLYCANNES

1 - Etude qualitative comparative de l'acételyse et de l'hydrolyse acide ménagée

L'hydrolyse acide de 100 mg. de glycopeptide (3 par les résines échangeuses de cations (Dowex 50 x 8; "mesh" 25 - 50; forme acide) est effectuée selon le procédé de MONTREVIL et ADAM - CHOSSON (191). Nous réalisons une cinétique de l'action de la résine en fonction du temps, et les hydrolysats, évaporés à siccité, sont chromatographiés sur papier Whatman n°3 dans le système solvant n-butanol - acide acétique - eau (4:1:5).

L'acétolyse de 100 mg. de glycopeptide est effectuée en appliquant le mode opératoire décrit précédemment p. 61. Nous réalisons une cinétique d'action du réactif acétolysant en fonction du temps, les acétolysats 0-désacétylés de la fraction "neutre" sont lyophilisés et chronatographiés.

2 - Etude quantitative de l'acétolyse des glycopeptides

Nous appliquon les procédés généraux de dosages colorimétriques des glucides, résumés et décrits par MONTREUIL et SPIK (192).

3 - Cinétique de libération des oses au cours de l'acétolyse

Une étude systématique de la stabilité relative des différentes liaisons osidiques a été réalisé antérieurement (voir page 6I) sur des disaccharides; nous avons complété ces résultats préliminaires en étudiant la vitesse de libération des oses au sein d'un glycanne.

Les fractions "neutres" des acctolysats glycopeptidiques correspondant à une durée de 1, 2 et 4 jours sont chromatographiées sur des colonnes de charbon-Celite (1X12 cm) selon WISTLER et DURSO (193). Les colonnes sont éluées successivement par des solutions de 250 ml d'eau distillée puis d'éthanol à 1,5 p 100 et à 50 p 100. La fraction eau, renferme les oses "neutres", elle est soumise à l'analyse colorimétrique ainsi qu'à l'étude chromatographique. Les solutions éthanolique à 1,5 et 50 p 100, concentrées à 20 ml est soumise au dosage colorime trique des N-acétyl hexosamines. (procédé de REISSIG, STROMINGER et LELOIR.)

C - ISOLEMENT DES OLIGOSIDES DE LA FRACTION "NEUTRE"

1 - Chromatographie sur colonne de charbon-Celite

Nous appliquons le procédé de chromatographie d'adsorption des oses et des osides sur colonne de charbon-Celite selon WISTLER et DURSO. L'élution des glucides est réalisée par le passage successif d'eau (élution des monosaccharides) et de solutions aqueuses d'éthanol de concentration croissante de 1.5 à 20 p 100.

Le charbon (ACTIVIT 50 KL) est lavé plusieurs fois à l'eau distillée par décantation pour éliminer les particules trop fines. Il est traité par l'acide chlorhydrique concentré puis par l'eau distillée jusqu'à neutralité il est ensuite séché à l'air libre. La Celite (N° 535) est lavée plusieurs fois par décantation avec de l'eau distillée et séchée à l'air libre. Le mélange à poids poids égaux de charbon et de Celite est introduit sous forme de suspension dans une colonne (80 x 5 cm) puis lavé deux à trois jours avec de l'eau de manière à bien tasser le support chromatographique.

Une solution aqueuse (1 L) de glucides à 1 p 100 de la fraction "neutre" de l'acétolysat désacétylé des glycopeptides & est appliquée au sommet de la colonne. Les glucides sont alors déplacés par des solutions

aqueuses d'éthanol à raison de 15 ml./h. Le liquide effluent (5 l. pour chacune des solutions de désorption) est recueilli par fractions de 720 ml. qui sont évaporées à siccité et étudiées par chromatographie sur papier dans divers systèmes solvants.

2 - Chromatographie et électrophorèse préparative sur papier

Chacune des fractions obtenues, est chromatographiée sur papier Whatman n°3, dans les deux systèmes tampons suivants : n-butanol - acide acétique - eau (4:1:5) et pyridine - acétate d'ethyle - acide acétique - eau (5:5:1:3). Après repérage des osides et leur élution à l'eau distillée, les solutions d'élution correspondant à chaque composé sont rassemblées et soumises à l'analyse électrophorétique.

Les oses "neutres" forment en milieu alcalin des complexes avec l'acide borique et ses sels ; ils se comportent alors comme des anions . Cette propriété est ensuite mise à profit dans l'électrophorèse préparative des disaccharides. L'électrophorèse est réalisée en tampon borate de potassium à 1 p. 100 de pH 9,2 ; sous une tension de 15 v/cm. Les solutions d'élution sont acidifiées et purifiées sur une micro colonne de charbon-Celite. Le tampon borate est élué par l'eau et les disaccharides sont déplacés par une solution aqueuse d'éthanol à 15 p.100

3 - Hise au point d'un procédé sensible et reproductible de "finger printing"

La chromatographie d'adsorption sur mitrocolonne de charbon, couplée à la chromatographie de partage sur papier fournit une carte polysaccharidique caractéristique de la partie glucidique de ces glycoproteines. Les empreintes de cette carte ressemblent aux "finger-prints des oligopeptides obtenus par hydrolyse enzymatique des protéines

10 mg. de la fraction "neutre" de l'acétolysat des glycopeptides sont appliqués au sommet d'une colonne de charbon (12 x 1 cm.). Le liquide effluent (250 ml. pour chacune des solutions de désorption) est lyophilisé,

puis chromatographié sur papier Whatman n°3 dans le système solvant pyridineacétate d'éthyle - acide acétique - eau (5:5:1:3). Les osides sont révélés au réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE.

D -ETUDE DES OSIDES

- 1 Composition des osides (voir à ce sujet p. 86)
- 2 Etude de la structure des osides

a - Identification de l'ose réducteur

Les osides sont réduits et l'ose réducteur terminal est identifié en chromatographie sur papier après une hydrd yse chlorhydrique du composé. 2 mg. d'oside en solution dans 1 ml. d'eau distillé, sont réduits par 2 mg. de borohydrure de potassium à 22°C pendant 18 h. L'excès de borohydrure est décomposé par l'addition de quelques gouttes d'acide acétique glacial et les solutions obtenues sont débarassées—des ions potassium par un passage sur une petite colonne de Dowex 50 x 8 (forme acide; "mesh" 25-50; 1 x 12cm.). Le liquide effluent est évaporé à siccité et le résidu est repris plusieurs fois par quelques millilitres de méthanol que l'on évapore par ventilation. On élimine ainsi l'acide borique et l'on obtient, à l'état pur, l'oside réduit dont la composition molaire en ose est déterminée selon le mode opératoire procédemment décrit.

L'oside réduit est hydrolysé (Mcl 2N à 100°C, 2 h.) et les ions chloresont éliminés par un passage survune petite colonne de Duolite A102D. La sclution effluente, évaporée à siccité est soumise à l'analyse chromatographique en présence des témoins latéraux purs.

b - Détermination de la masse moléculaire des osides

Nous adoptons le procédé de détermination de masse moléculaire des glycopeptides par gel filtration décrit par BHITTI et CHIR (195).

Nous utilisons une colonne de 150 cm. de hauteur et 1,8 cm.

de diamètre, siliconée avec du Rhodorsil hydrofuge, afin d'évitor les effets de

bord. Le séphadex G-25 fine est mis à gonfler trois jours dans l'eau distillée, après plusieurs lavages à l'eau distillée, un dernier lavage est effectué avec le tampon chlorure de sodium 0,15 H qui servira de tampon d'élution. Le gel est ensuite dégazé sous vide puis versé dans la colonne. Mous déposons à la surface du gel un échantillon de 0,2 ml. de solution correspondant à 0,4 mg. d'oside et de bleu Dextran 2000. L'éluat recueilli par fraction de 2 ml. toutes les 10 mm. au collecteur, est soumis au dosage colorimétrique de DUBOIS et al. (196) au phénol-sulfurique. Mous appliquons ce procédé de détermination approximative de la masse moléculaire aux tri- tétra- et pentasaccharides.

c - Acétolyse des tri- tétra- et penta-saccharides

10 mg. d'oside sont acétolysés par 0,210 ml. du mélange acétolysant pendant 3 jours 20°C, la durée de l'acétolyse ayant été préalablement déterminée par une étude cinétique de l'action du réactif en fonction du temps. Les composés ainsi obtenus sont isolés à l'état pur par chronatographie préparative, puis réduits et hydrolysés (Hcl 2n à 100°C pendant 2 h.). Les hydrolysats sont purifiés et chromatographiés sur papier Thatman n°3 en présence de témoins latéraux purs.

d - Acétolyse des tri- tétra- et penta-saccharides réduits

Le mode opératoire décrit en c est appliqué aux mêmes osides préalablement réduits. Mous obtenons ainsi par acétolyse d'un polyoside réduit, (representé ci-dessous, et renfermant les oses A, B, C et D réduit)

Seuls les osides réducteurs donnent une réaction positive avec le réactif à l'oxalate d'aniline. L'acétolyse des polyosides réduits et non réduits nous permet de déterminer avec certitude la disposition des oses les uns par rapport aux autres au sein du polysaccharide.

e - Perméthylation des osides(*)

Nous utilisons le procédé de KUHN et coll. (197). 10 ng d'oside sont dissous dans 3 ml de diméthylformamide (DIFA) auquel on ajoute par petites quantités 1 ml de iodure de méthyle et 1g d'oxyde d'argent; après agitation du mélange pendant 24 h on procède à une nouvelle addition de 25 ml de iodure de méthyle- oxyde d'argent. Après 8 h d'agitation la solution est filtrée et le filtre est lavé par le chloroforme. La solution obtenue est abandonnée à 4°C pendant 18 à 24 h afin de laisser cristalliser les sels d'argent colloïdaux et les formyl-dérivés qui seront éliminés par filtration. La solution est ensuite séchée sur sulfate de sodium puis évaporée; le résidu, repris par 1 ml de iodure de méthyle, 0,250 g d'oxyde d'argent et 0,150 g de sulfate de calcium anhydre est chauffé pendant 4 h à reflux. Cette opération est répétée 4 fois. Après extraction de l'oside par le chloroforme, on procéde à l'hydrolyse des liaisons osidiques (HCL 4N à 100°C pendant 4 h)

f - Hydrolyse enzymatique (* *)

— Action des β N-acétyl glucosaminidases .

Nous avons utilisé des préparations de & M-acétyl glucosaminidase isolées de la rate de Boeuf et d'Aspergillus niger dans les conditions suivantes : 1,5 mg d'enzyme pour 0,500mg d'oside en solòtion dans 5 ml de tampon citrate de pH 4,4 maintenu à 37° pendant 48 h, en présence d'une goutte de toluène. Après hydrolyse, les protéines enzymatiques sont précipités à 60° pendant 5 mm puis centrifugées. Le surnageant purifié sur résines échangeuses d'ions est concentré puis soumis aux dosages colorimétriques ainsi qu'à l'analyse chromatographique.

— Action des 3 -D -galactosidase.

Nous avons utilisé des préparations de β D- galactosidase isolées de Funugrec de la rate de Boeuf et d'Aspergillus niger dans les mêmes conditions à pH 4,2.

^(*) les méthylations ont été effectuées par Honsieur B. FOURNET

^(**) les hydrolyses ont été effectuées par Monsieur S. BOUQUELET

II - RESULTATS EXPERIMENTAUX

A - ACETOLYSE DES GLYCANNES

1 - Etude comparée de l'hydrolyse ménagée et de l'acétolyse

Les travaux antérieurs, effectués par ADMI-CHOSSON et MONTREUIL (198) sur l'hydrolyse ménagée par le Dowex, des glycopeptides de l'ovo-mucoïde nous permettent de tracer une étude comparée de l'acétolyse et de l'hydrolyse ménagée. Nous avons illustré par la figure 28 les résultats que nous avons obtenus et qui se résument de la manière suivante :

- a Contrairement à l'hydrolyse ménagée par les acides dilués ou par les résines polystyrène sulfoné, , l'acétolyse libère des quantités très faibles d'oses et une proportion élevée d'oligosides.
- b La durée de l'acétolyse doit être déterminée pour chaque type de molécule au cours d'une étude cinétique de l'action du réactif acétolysant en fonction du temps.
- c L'hydrolyse ménagée coupe préférentiellement les liaisons M-acétyl osaminidiques, tandis que l'acétolyse parte essentiellement sur les liaisons glycosidiques des oses "neutres".

2 - Etude quantitative de l'acétolyse des glycopeptides \hat{h}

- a La quantitativité de la méthode est liée au choix du procédé de désacétylation. Une étude critique des divers procédés de C-désacétylation nous a permis de retenir le procédé au méthoxyde de sodium. Nous avons confirmé les résultats obtenus au cours de notre étude préliminaire dans le tableau IX
- b Etude de la stabilité relative des différents types de liaisons osidiques (mannosyl, galactosyl, N-acétyl glucosaminyl) des glycopeptides bes oses libres, contenus dans la fraction "neutre" de l'acételysat glycopeptidique sont présents en trop faible quantité par rapport aux osides pour être dosé avec précision. Pour cette raison, nous appliquons le procédé de fractionnement des oses et des osides sur colonne de charbon (Fig. 29a) afin de dosor dans les éluats le galactose, le mannose et la N-acétyl glucosamine. Une cinétique de

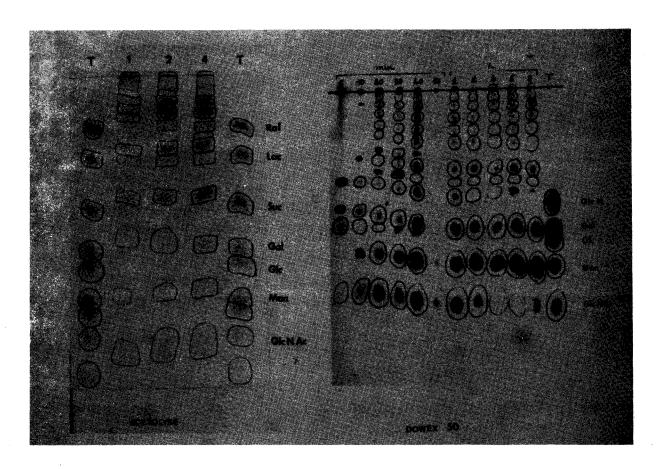


Figure 28

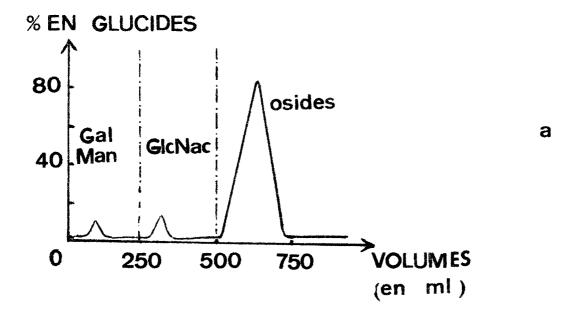
b

Chromatographie sur papier des hydrolysats partiels par le Dowex 50 (b) et des fractions "neutres" des acétolysats des glycopeptides & de l'ovomucoïde (aux temps I, 2, 4 jours). Chromatographie dans le système solvant n-butanol- acide acétique- eau (4:I:5). Révélation au réactif à l'oxalate d'aniline. T: témoins latéraux purs.

TABLEAU IX

Etude quantitative de l'acétolyse des glycopeptides β

1			
FRACTIONS	oses meutres	OSAMINES	OSES MEUTRES OSAMINES
A- PHASE CHLOROFORMQUE			
1- Fraction osidique neutre	123,44	193,63	0,63
2- Fraction glycopeptidique	10,70	8,27	1,30
B- PHASE AQUEUSE			
1- Fraction glycopeptidique	19,48	24,74	0,78
Glycopeptides & natif	151,94	242,56	0,62
rendement	161,1	93,40	



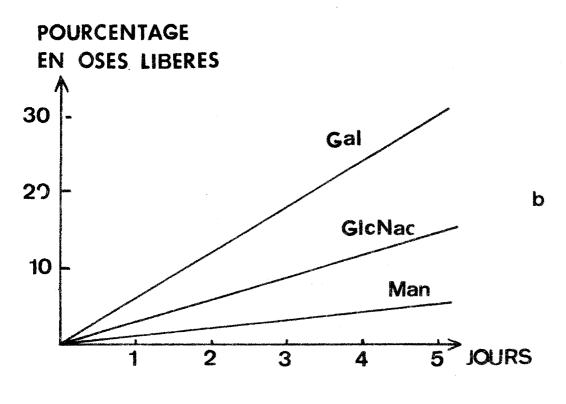


Figure 29

- a- Chromatographie d'adsorption des oses et des osides sur colonne de charbon-Celite.
- b- Etude quantitative de la libération des oses au cours d'une cinétique d'acétolyse des glycannes (3 de l'ovomucoïde. Les oses neutres (Gal: galactose; Man: mannose;) et la N-acétylglucosamine (Glc-Nac) ont été isolés selon le procédé décrit en a.

libération des monosaccharides (Fig. 29b) nous montre que l'acétolysat correspondant à une durée de 4 jours, renferme 34,4 p.100 de galactose, 5,4 p.100 de mannose et 14,7 p.100 de Nacétyl glucosamine. L'ordre de stabilité décroissant des 3 types de liaisons est donc:

Liaison mannosyl> Liaison N·acétyl glucosaminyl> Liaison galactosyl Remarquons cependant que l'on ne peut généraliser un tel résultat car la stabilité des liaisons glycosidiques est également fonction de la taille, de la forme et de la structure du glycanne; de ce fait ces résultats sont spécifiques des glycopeptides β de l'ovomucoide.

B $\overline{}$ ISOLEMENT DES OLIGOSIDES DE LA FRACTION "NEUTRE"

1 - Chromatographie sur colonne de charbon-Celite

Chacune des solutions de désorption, chromatographiée sur papier Whatman N°3 dans le système solvant n-butanol - acide acétique - eau (4:1:5), donne l'image d'une carte polysaccharidique comprenant une vingtaine d'osides (Fig. 30 p. 112)

Cependant ce procédé ne représente pas à lui seul une méthode de choix pour l'isolement des osides à l'état pur, chaque fraction renferme en mélange 3 à 7 osides qu'il convient ensuite de fractionner par chromatographie et électrophorèse préparative sur papier.

Hous avons isolé 16 osides homogènes (Fig. 31 p. 113 et Fig. 32 p. 114)

2 - Mise au point du procédé de carte chromatographique des osides

Nous avons utilisé la fraction "neutre" des acétolysats du glycopeptide (3 de l'ovomucoide, dont nous disposions des quantités élevées, pour mettre au point notre procédé. La figure 33 montre que la chromatographie sur papier des éluats éthanoliques (1,5 - 3,5 - 5 - 7;5 - et 10 p.100) des colonnes de charbon-Celite permet de mettre en évidence 19 oligosaccharides

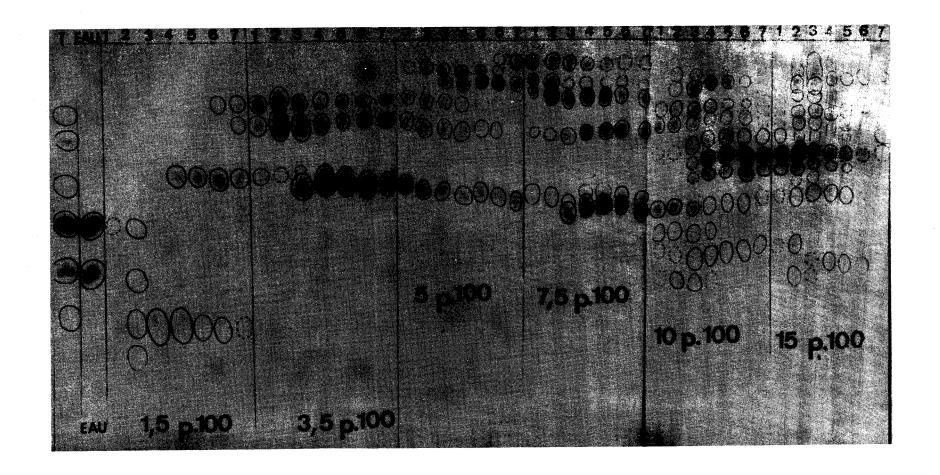
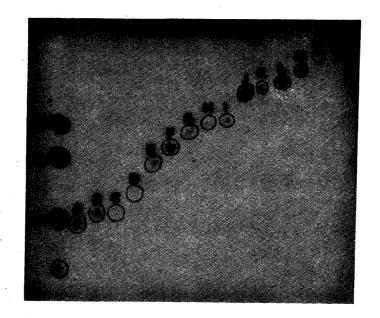


Figure 30

Chromatographie sur papier des différentes fractions de désorption d'un fractionnement sur charbon-Celite de la fraction "neutre" d'un acétolysat de glycopeptides β de l'ovomucoïde; l'élution de la colonne est effectuée par un gradient discontinu en alcool:solution à I,5; 3,5; 5; 7,5; IO; I5 p. IOO. Chacune des fractions de désorption représente un volume de 4,9 l réparti en 7 sous-fractions de 700 ml.



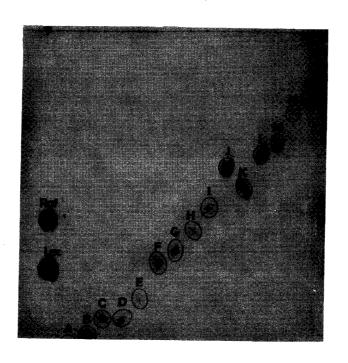


Figure 3I

Chromatographie sur papier des osides A à P isolés de la fraction "neutre" d'un acétolysat des glycopeptides β de l'ovomucoïde. Systèmes solvants :

a: n-butanol - acide acétique - eau (4:I:5)

b: pyridine -acétate d'éthyle - acide acétique - eau (5:5:I:3) Révélation à l'oxalate d'aniline.

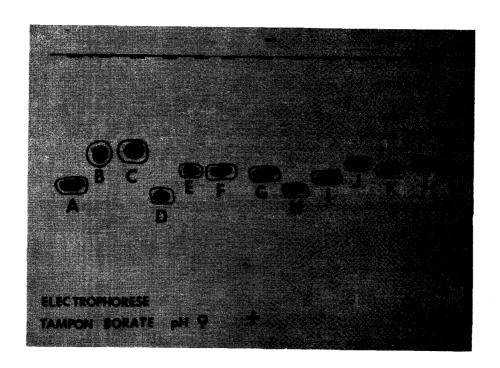


Figure 32

Electrophorèse sur papier Whatman n°3 des osides A à M. Tampon borate de sodium de pH: 9; I5 v/cm, durée 4 h. Révélation à l'oxalate d'aniline après élimination du borate de sodium par pulvérisation d'une solution de méthanolacide acétique (4:I).

TABLEAU X

Comportement chromatographique des osides par rapport à un témoin interne constitué de galactose dans les deux systèmes solvants suivants:

a - Butanol - acide acétique - eau 4:1:5

b - Pyridine - acétate d'éthyle - acide acétiqueeau 5:5:1:3

oside	système solvant a	système solvant b
Λ	0,870	0,956
В	0 , 850	0,926
C	0,814	0,810
D	0,780	0,794
E	0 , 750	0,740
F	0,600	0,690
G	0,550	0,631
H	0,504	0,482
I	0,392	0,400
J	0 , 3 7 9	0,460
K	0,351	0,357
L	0,313	0,338
M	0,230	0,241

I -----

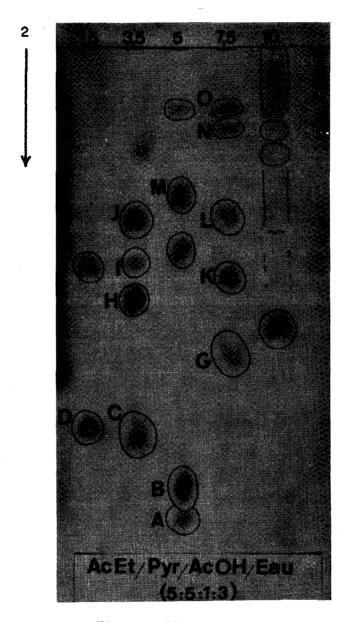


Figure 33

Procédé de carte polysaccharidique des fractions "neutres" (IO mg) des acétolysats des glycopeptides (à désacétylés. La chromatographie d'adsorption sur charbon-Celite (I) est couplée avec le chromatographie de partage sur papier (2). Papier Whatman n°3, durée 28 h. Système solvant : pyridine-acetate d'éthyle-acide acétique-eau (5:5:I:3).

nettement individualisés parmi lesquels 4 disaccharides, 5 trisaccharides, 3 tétrasaccharides, 1 pentasaccharide et 1 hexasaccharide. 10 mg. de glycopeptides suffisent pour réaliser une carte chromatographique. En outre, des expériences nous ont montré que les résultats étaient parfaitement reproductibles.

L'étude de ces cartes permet de mettre en évidence des différences parfois très faibles dans les séquences de monosaccharides constituant les glycannes de glycoproteines diverses. Son application nous paraît particulièrement indiquée dans le cas de l'étude comparative de glycoproteines homologues, comme celles des milieux sains et cancéreux, dont on dispose généralement de faibles quantités et dont les faibles variations de structure sont difficiles à saisir.

C - ETUDE DE STRUCTURE DES OSIDES

1 - La composition centésimale en glucides et les rapports molaires des oses sont déterminés en appliquant les procédés décrits précédemment (voir p. 86). Les résultats sont rapportés dans le tableau XI. Ils peuvent se résumer de la façon suivante:

a - Les osides A à M sont constitués en proportions variables de D - (+) - galactose, de D - (+) - mannose et de N-acétyl D -(+)-glucosamine (Fig. 34 p.120)

b - La détermination de la nature de l'ose réducteur nous informe des modalités de rupture sélective au sein du glycanne. A l'exception de l'oside B, identifié à la N-acétyl lactosamine, tous renferment une molécule de D-mannose en position terminale réductrice. Dans la majorité des cas nous avons identifié le mannitol par chromatographie sur papier (Fig.35 p. 121). L'identifier tion du mannose en position terminale réductrice nous permet de conclure qu'il existe une coupure sélective des liaisons mannosyl.

c - Nous déterminons la masse moléculaire approximative des osides :
E, F, G, H, I, J, K, L, M selon le protocole décrit page 104. Les résultats
que nous obtenons, sont rapportés dans le tableau XII et illustrés par la figure 36 p. 122. Les masses moléculaires trouvées sont en parfait accord avec celles

déterminées au cours de la composition centésimale des osides avant et après réduction (voir à ce sujet le tableau XI).

d - La révélation des chromatogrammes avec le réactif au chlorure de triphényltétrazolium de TREVELYAN, PROCTOR et HARRISSON (198) nous informe des modalités de liaisons entre l'ose réducteur et l'ose qui le précéde. Le chlorure de triphényltétrazolium, incolore, est réduit par les sucres en triphénylformazan rouge, à la condition cependant que la fonction alcoolique du carbone voisin du groupement réducteur soit libre. (Fig. 37 p. 124). Ainsi les osides C, E et F ne donnent pas de coloration rouge, on peut en conclure que le carbone 2 de l'ose réducteur est donc engagé dans une liaison osidique.

2 - Nous nous proposons de décrire en détail les résultats que nous avons obtenus à propos de chacun des osides.

OSIDE A

a - Préparation et isolement

L'oside A est élué avec les osides B (N-acétyl lactosamine), G, K, L, M d'une colonne de charbon-Celite par le passage d'éthanol à 7,5 p. 100. Sa vitesse de migration est sensiblement la même que celle de l'oside B dans la plupart des systèmes solvants, seul l'électrophorèse dans le tampon borate de pH 9,2, nous permet d'isoler ces deux composés à l'état pur.

b - Structure

L'oside A a été identifié au 0-A-D-2désoxy-2acétamido gluco-pyranosyl-(1->4)-mannopyrannose.

- Le D-mannose et la N-acétyl glucosamine sont dans un rapport équinoléculaire
- La chromatographie de l'hydrolysat de l'oside réduit par le borohydrure de potassium révèle la présence de mannitol.
- La perméthylation de cet oside et l'analyse chromatographique en phase gazeuse des esters méthyliques laisse apparaitre un pic de 3 4 6 tri⁰ méthyl glucosamine ainsi qu'un pic de 2 3 6 tri-0-méthyl mannose.

TABLEAU XI Composition centésimale et molaire des osides Λ à M isolés d'un acétolysat des glycopeptides β de l'ovomucoïde.

	Α	В	C	D	E	F	G	H	Ι	J	K	L	Pî
molaiv		water missage a		materia de la composition della composition dell	or recomplish is	·	promoter process	macha de de d	ender værsjære e	er en jari en 1	n copperan posses	N 1416 W. 1	baraka Mir. Mari Welling
Composition centésimale													
Oses "neutres" totaux	12	78	17	10	61	40	88	95	76	14	17	14	42
Osamines	10	7 5	14	0	81	73	3 8	46	37	13	15	21	60
Oses "neutres"/osamines	1,2	1,0	1,1	/	0,7	0,5	2 2	20	49	1,0	1,1	0,6	0,7
molaire Composition c entésim ale						, ,,,,,,,,,,		~				····	
des osides réduits													
Oses "neutres" totaux	1,3	75	1,0	61	0	O	14	56	15	70	82	17	21
Osamines	10	7	14	0	61	72	14	44	37	15	16	25	65
Oses "neutres"/osamines	01	/	/	1	1	/	1,0	1, 2	0,4	0,5	95	0,7	0,3
Composition molaire		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·											
D -(+)-lannose	1	0	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
D -(+)-Galactose	0	1	0	0	0	0	Ö	0	()	0	0	O	О
N-acétyl glucosamine	1	1	1	0	2	2	1	1	1	2	2	2	2

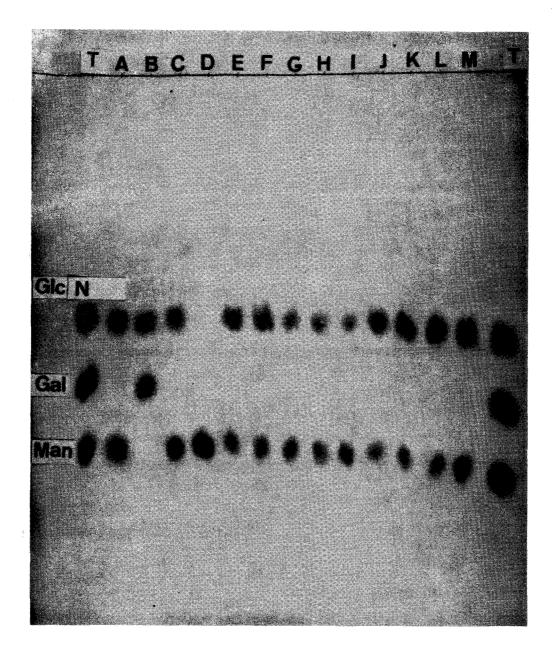


Figure 34

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques purifiés sur colonnes échangeuses d'ions des osides A à M. Papier Whatman n°3, système solvant : pyridine - acétate d'éthyle - acide acétique - eau (5:5:I:3). Révélation à l'oxalate d'aniline. T : témoins d'oses purs. GlcN : glucosamine ; Gal : galactose ; Man : mannose.

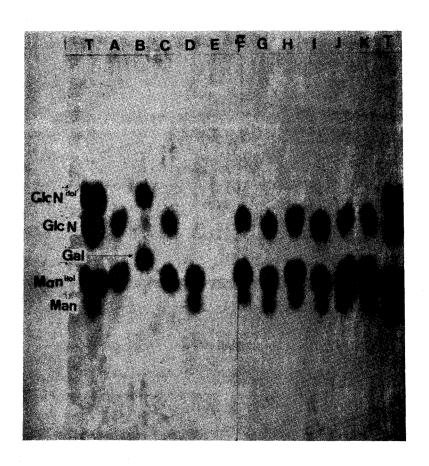


Figure 35

Chromatographie des hydrolysats des osides A à M préalablement réduits sur papier Whatman n°3 dans le système solvant : pyridine - acétate d'éthyle - acide acétique - eau (5:6:I:3); durée I8 heures. Révélation au nitrate d'argent.

Man : mannose ; GlcN :glucosamine ; Man-itol : mannitol ; GlcN-itol : glucosaminitol ; T : témoins.

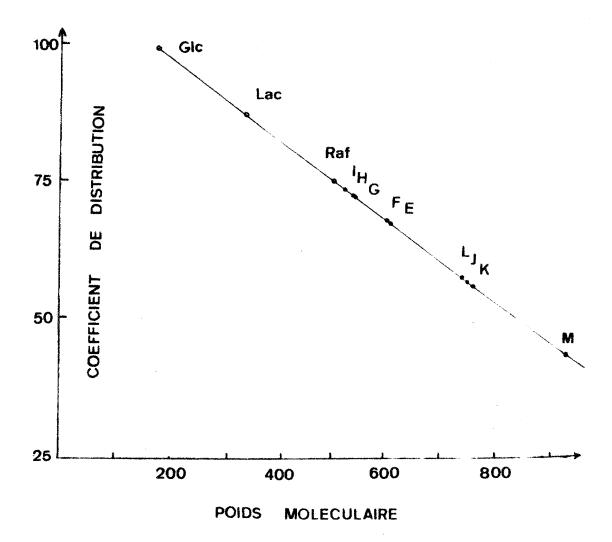
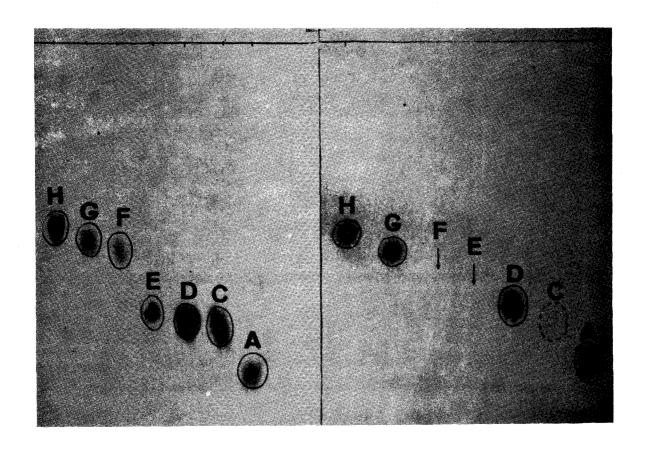


Figure 36
Détermination du poids moléculaire des osides par gel filtration (colonne de Séphadex G 25 fine, 130 x 1,8 cm). Elution avec le tampon NaCl 0,15M, fractions de 2ml en IO mn.

TABLEAU XII

Détermination du poids moléculaire des osides par gel filtration

tribution 100 87,6 75,6	trouvé ,	théorique 180 342 504
87,6 75,6	,	342
75,6		
		504
66 6		
66 6		
00,0	615	586
68,0	610	586
73,0	540	5 45
73 , I	540	545
74,3	525	545
57, 5	750	7 40
55,4	765	748
58,0	740	748
11 2	990	950
	73,I 74,3 57,5 55,4	73,1 540 74,3 525 57,5 750 55,4 765 58,0 740



A

В

Figure 37

Chromatographie sur papier des osides A,C,D,E,F,G,H.

A- Révélation à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE.

B- Révélation au chlorure de triphényltétrazolium de TREVELYAN, PROCTOR et HARRISSON (JSS). Les composés C,E et F dont l'hydroxyle est bloqué en 2 ne réagissent pas avec le réactif B.

Papier Whatman $n^{\circ}3$, système solvant n-butanol - acide acétique - eau (4:I:5).

— L'hydrolyse enzymatique par les β D- N-acétyl glucosaminidases coupe l'oside A . Il s'agit donc de l'anomérie β .

OSIDE B

a - Préparation et isolement

L'oside B est élué d'une colonne de charbon-Celite par le passage d'éthanol à 7,5 p 100, puis isolé à l'état pur par électrophorèse préparative dans le tampon boraté de pH 9,2.

b - Structure

L'oside B a été identifié à la N - acétyl lactosamine (0 - β D - galactosyl-(1-4)-2 désoxy- 2 acétamido glucopyranose) de la manière suivante :

- Le D-galactose et la N acétylglucosamine sont dans un rapport équinoléculaire.
- La chromatographie de l'hydrolysat de l'oside réduit par le borbhydrure de potassium révèle la présence de galactose et de glucosaminitol.
- La perméthylation et l'analyse chromatographique des esters méthyliques laisse apparaître un pic de 2-3-4-6 tétra-0-méthyl galactose et un pic de 3-6 diméthyl glucosamine, ce qui implique une liaison du type 1-4.
- —Ce résultat est d'ailleurs confirmé par chauffage en milieu alcalin de ce composé. En effet, chauffé à 100° pendant 5 mn en présence de carbonate de sodium 0,1 N, il ne fournit pas de chromogènes, ce qui implique un blocage de l'hydroxyle en 4. En milieu alcalin les N-acétyl hexosamines se dégradent en donnant 3 chromogènes qui se forment par deshydratation de la N-acétyl glucosamine à partir de sa forme furanose. La formation de chromogènes n'est donc possible que si la fonction hydroxyle en 4 de le N-acétyl hexosamine est libre.

c- Discussion

Notons que cet oside a été obtenu antérieurement par ADAIL-CHOSSON et MONTREUIL (199) à partir d'un hydrolysat de l'ovomucoïde. Il correspond à l'oside I. Ces auteurs ont fait deux remarques au sujot des modalités de libération de cet oside que nous résumerons très brièvement :

- cet oside a été caractérisé dans divers glycoprotéines et ces auteurs posent en hypothèse que la N-acétyllactosamine pourrait bien être un constituant commun à la plupart des glycoprotéines contenant du galactose et de la N-acétylglucosamine.
- la libération précoco de cet oside au cours de l'hydrolyse permet de conclure qu'il se trouve en position "externe" par rapport au reste de la molécule.

OSIDE C

a - Préparation et isolement

L'oside C est élué d'une colonne de charbon par le passage d'éthanol à 3,5 p 100, avec les osides I, H, J. Il est ensuite purifié par chromatographie préparative sur papier.

b - Structure de l'oside C

L'oside C a été identifié au 0 - β -D- 2 désoxy-2acétamido-glucopyranosyl (1-2)-mannopyranose de la façon suivante :

- Le mannose et le N-acétyl glucosamine sont dans un rapport équimoléculaire.
- La chromatographie de l'hydrolysat de l'oside réduit révèle la présence de mannitol et de glucosamine.
- La perméthylation de cet oside fournit le 3-4-6 tri-0-méthyl glucosamine et le 3-4-6 tri-0-méthyl mannose.
- Cette structure est confirmée par l'utilisation du réactif au trichlorure de triphényltétrazolium. En effet l'oside C donne une coloration négative avec ce réactif ; seul les sucres réducteurs réagissent à condition que la fonction alcool du carbone voisin du groupement réducteur soit libre.
- L'hydrolyse enzymatique par les β D-N-acétyl glucosaminidases coupe la liaison de l'oside C . Il s'agit donc de l'anomérie β .

c — Conclusions et discussions

Remarquons tout d'abord les différents comportements en chromatographie d'adsorption sur charbon des osides Λ (N-acétyl glucosaminyl 1->2 mannose). En effet l'oside

A est élué par une solution d'éthanol à 7,5 p 100 tandis que l'oside C est élué par une solution d'éthanol à 3,5 p100. Les composés renfermant des liaisons glycosidiques du type 1 → 4 sont plus fortement adsorbées que ceux renfermant des liaisons glycosidiques du type 1 → 2. La chromatographie sur colonne de charbon-Celite constitue à cet égard un procédé de séparation de 2 isomères en mélange se distinguant par la diversité de leur liaison 0-glycosidique.

— La structure de cet oside est à rapprocher de celle de l'oside VI, isolé par ADAM-CHOSSON et MONTREUIL d'un hydrolysat partiel d'ovomucoide. Cependant signalons qu'il n'existe pas une parfaite concordance entre les vitesses de migration données par les auteurs (oside VI : $R_{\rm gal}=0,70$) et les notres (oside C: $R_{\rm gal}=0,81$ dans le même système solvant : n-butanol - acide acétique -eau 4 : 1 : 5 .)

OSIDE D

a - Préparation et isolement

L'oside D est élué d'une colonne de charbon-Celite par le passage d'éthanol à 1,5 p 100, puis purifié en chromatographie sur papier.

b - Structure de l'oside D

L'oside D a été identifié au 0-%-D-mannopyranosyl (1-3%) mannopyranose (ou mannobiose) de la façon suivante :

- L'hydrolyse fournit uniquement du D-mannose.
- L'hydrolyse du composé préalablement réduit montre la disparition d'une molécule de mannose et l'apparition d'une molécule de mannitol.
- La perméthylation fournit le 2-3-4-6 tétra-0-méthyl D-mannose ainsi que le 2-4-6 tri-0-méthyl D-mannose.
- Ce composé réagit avec le réactif au chlorure de triphényl tétrazolium, la liaison 1-2 est donc exclue.
- Il est hydrolysé par les & D-mannosidases.

OSIDE F

a - Préparation et isolement

Il est élué d'une colonne de charbon avec une solution d' éthanol à 10 p 100. Il est purifié ensuite par chromatographie sur papier.

b - Structure de l'oside F L'oside F a été identifié au 0- β -D-2désoxy-2acétamido glucopyranosyl-(1->2)-0- β -D-2désoxy-2acétamido glucopyranosyl-(1->4) D-mannopyranose de la façon suivante:

- Le D-mannose et la N-acétyl glucosamine sont dans le rapport 1:2
- La chromatographie de l'hydrolysat de l'oside réduit laisse apparaître du mannitol et de la glucosamine.
- L'acétolyse de l'oside F fournit des traces de mannose et de glucosamine ainsi que les osides A (N-acétyl glucosamine 1->4 mannose) et C (N-acétyl glucosaminyl $1 \rightarrow 2$ mannose) dans les proportions 5:1.
- --- Ce composé donne une réaction négative avec le réactif au chlorure de triphényl tétrazolium, ce qui confirme le blocage de l'hydroxyle en 2 de l'osc réducteur.

c - Discussion

L'élution tardive de cet oside par une solution éthanolique à 10 p 100 d'une colonne de charbon peut s'expliquer par la présence de 2 molécules de N-acétylglucosamine; pour une de mannose. En effet les N-acétylhexosamines sont plus fortement adsorbées que les oses "neutres", cet oside semble cumuler la rétention des osides A et C.

OSIDE G

a - Préparation et isolement

Cet oside a été isolé de la fraction éthanolique à 7,5 p. 100 d'une colonne de charbon, puis purifié par chromatographie préparative sur papier.

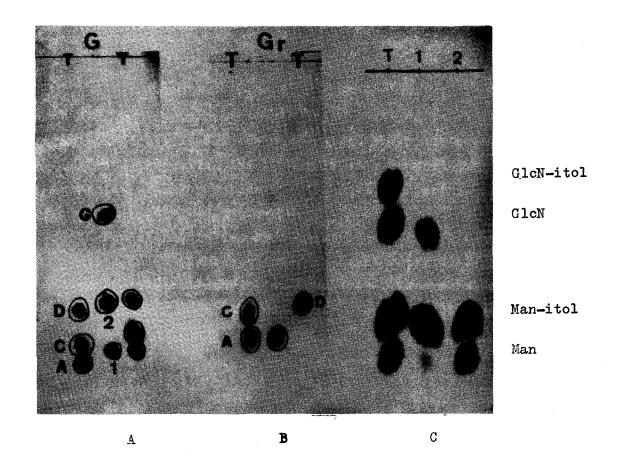


Figure 38

<u>A et B</u>: Chromatographie des acétolysats de l'oside G réduit et non réduit dans le solvant n-butanol- acide acétique- eau (4:I:5). Les osides Iet 2 ont le même comportement chromatographique que les osides A (N-acétylglucosaminyl I-4 mannose) et D (mannosyl I-3 mannose).

<u>C</u>:Chromatographie des hydrolysats purifiés des osides I et 2 préalablement réduits. Système solvant : pyridine-acide acétique-acétate d'éthyle-eau (5;I;5;3). Man: mannose ; GlcN: glucosamine ; Man-itol: marmitol; GlcN-itol: glucosaminitol.

b - Structure de l'oside G

La structure de l'oside G a été effectuée de la manière suivante :

- Le mannose et la glucosamine sont dans les rapports 2:1
- La chromatographie de l'hydrolysat de l'oside réduit révèle la présence de D-mannose, de D-glucosamine et de D-mannitol dans les proportions équimoléculaires
- La méthylation de cet oside nous fournit la 3-4-6 tri-0-méthyl glucosamine, le 2-3-6 tri-0-méthyl mannose ainsi que le 2-4-6 tri-0-méthyl mannose.
- L'acétolyse de 10 mg de l'oside G et la chromatographie de l'acétolysat en présence de témoins latéraux purs nous permet de confirmer les résultats précédents ; nous avons identifié dans l'acétolysat l'oside D (mannosyl $1\xrightarrow{\alpha} 3$ mannose) et l'oside A (glucosaminyl $1\xrightarrow{\alpha} 4$ mannose)
- L'acétolyse de 5 mg de l'oside G réduit nous permet, selon le principe exposé page 105, de localiser avec certitude l'emplacement de la N-acétyl glucosamine au sein de la molécule. Ainsi après réduction et acétolyse de l'oside G nous avons caractérisé le N-acétyl glucosaminyl ($1 \xrightarrow{\beta} 4$) mannose.
- La chromatographie sur gel filtration de ce composé en présence des témoins internes : bleu Dextran et glucose nous donne une masse moléculaire de 540. Il s'agit donc d'un trisaccharide. (Fig. 38 p. 129)

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que l'oside G a pour structure :

N-acétylglucosamine ($1 \xrightarrow{3} 4$) mannose ($1 \xrightarrow{4} 3$) mannose

OSIDE H

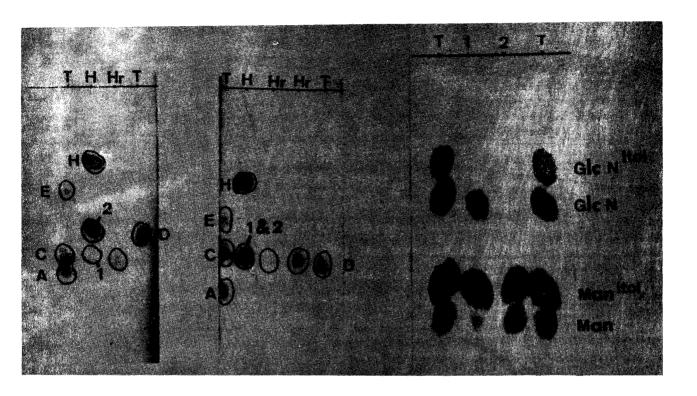
a - Préparation et isolement

L'oside H est élué d'une colonne de charbon-Celite par une solution éthanolique à 3,5 p 100, avec en mélange les osides I, J, C. Il est ensuite purifié par chromatographie préparative sur papier.

b - Structure de l'oside H

Sa structure a été identifiée de la manière suivante :

Le D-mannose et la N-acétyl glucosamine sont présents dans les rapports 2:1



A B C

Figure 39

<u>A et B</u> : chromatographie des acétolysats de l'oside H réduit (Hr) et non réduit (H) dans les systèmes solvants :

A: n-butanol-acide acétique-eau (4:I:5).

B: pyridine-acétate d'éthyle-acide acétique-eau (5:5:I:3).

C: chromatographie des hydrolysats purifiés des osides I et

2 préalablement réduits. Système solvant B. GlcN: glucosamine

GlcN-itol: glucosaminitol; Man: mannose; Man-itol: mannitol.

oside D : mannosyl I-3 mannose.

oside C: N-acétylglucosaminyl I-2 mannose.

- L'hydrolyse de l'oside réduit fournit le D-mannose, la glucosamine et le D-mannitol dans les proportions équimoléculaires.
- La méthylation de cet oside et l'analyse des esters méthyliques en chromato, graphie en phase gazeuse laisse apparaître troispics identifiés à la 5-4-6 tri-0-méthyl glucosamine, au 3-4-6 tri-0-méthyl mannose et au 2-4-6 tri-0-méthyl mannose.
- L'acétolyse de 10mg d'oside H, confirme les précédents résultats. La chromatographie de l'acétolysat dans les deux systèmes solvants habituels nous permet d'identifier le mannosyl ($1\rightarrow 3$) mannose (oside D) ainsi que le. Nacétyl glucosaminyl ($1\rightarrow 2$) mannose (oside C). (Fig. 39 p. 131)
- La chromatographie de l'acétolysat de l'oside H réduit, laisse subsister le N-acétyl glucosaminyl ($1 \rightarrow 2$) mannose, qui donne une coloration brune avec le réactif à l'oxalate d'aniline.

L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer la structure suivante :

N –acétyl glycosamine (1 $\xrightarrow{\beta}$ 2) mannose (1 $\xrightarrow{\gamma}$ 3) mannose

c- Discussion

Nous avons remarqué, antérieurement que l'oside A renfermant une liaison du type $1 \rightarrow 4$ était plus fortement adsorbé sur charbon-Celite que son isomère C renfermant une liaison du type $1 \rightarrow 2$. Cette règle se trouve une fois de plus vérifiée, en effet les osides G et H ne diffèrent que par un type de liaison, le composé G possédant une liaison $1 \rightarrow 4$ est élué par une solution éthanolique à 7,5 p 100 tandis que le composé H possédant une liaison $1 \rightarrow 2$ est élué par une solution éthanolique à 3,5p 100. On peut donc penser que le charbon adsorbe plus fortement les liaisons du type $1 \rightarrow 4$.

OSIDE I

a - Préparation et isolement

Cet oside a été isolé de la fraction éthanclique à 3,5 p 100 d'une colonne de charbon - Celite., puis purifié ensuite par chromatographie préparative sur papier. Ce composé est homogène en électrophorèse, en chromatographie sur papier dans différents systèmes solvants. IL ne présente qu'un pic symétrique en gel filtration.

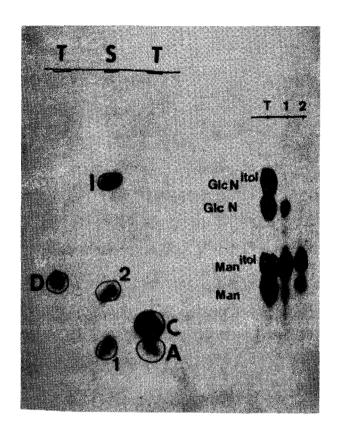


Figure 40

- A: Chromatographie sur papier Whatman n°3 de l'acétolysat O-désacétylé de l'oside I dans le système solvant : n-butanol-acide acétique- eau (4:I:5). Les osides I et 2 ont le même comportement chromatographique que les osides témoins A (N-acétylglucosaminyl I-4 mannose) et D (mannosyl I-3 mannose).
- B: Chromatographie sur papier des hydrolysats purifiés sur résines échangeuses d'ions, des osides I et 2 préalablement réduits.

b - Structure de l'oside I

L'étude de cette structure peut se résumer de la façon

suivante:

moléculaires.

- Le D-mannose et la M-acéty glucosamine sont présents dans les rapports 2:1 L'hydrolyse de l'oside réduit nous permet d'identifier par chromatographie sur papier le D-mannose, la glucosamine et le mannitol dans les rapports équi-
- L'acétolyse de l'oside: I, ainsi que la chroma ographie de l'acétolysat 0-désacétylé dans les deux systèmes solvants habituels (Fig 40 p 133) nous permet d'identifier, outre l'oside I non acétolysé, deux osides (1 et 2) dont les vitesses de migration sont identiques à celles des osides D (mannosyl (1-3) mannose) et A (N-acétyl glucosaminyl 1-4 mannose). Ces composés 1 et 2 sont réduits, hydrolysés et chromatographiés en présence de témoins latéraux purs. (Fig. 40 p 133).
- La détermination de la masse moléculaire par gel filtration confinne que l'oside I est bien un trisaccharide; son poids moléculaire est de 525.

L'ensemble des précédents résultats nous permet de conclure à la structure suivagine:

mannose ($1 \rightarrow 3$) mannose $\uparrow 4$

N-acétyl glucosamine

OSIDE J

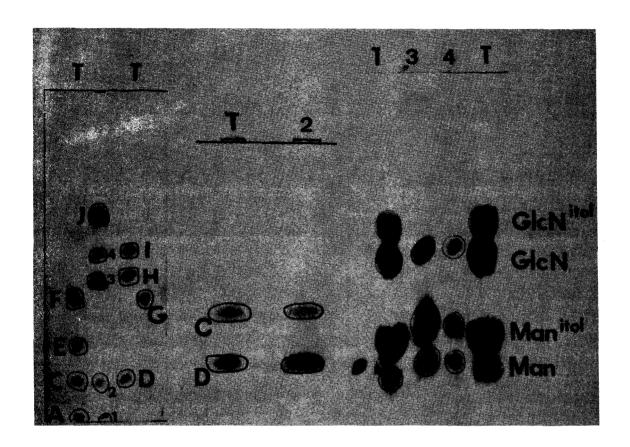
a - Préparation et isolement

L'oside J est élué avec les oside H et I d'une colonne de charbon-Celite par passage d'éthanol à 3,5 p100. Il est ensuite purifié par chromatographie sur papier.

b - Structure de l'oside J

Sa structure a été identifié de la manière suivante :

- Le D-mannose et la N-acétyl glucosamine existent dans un rapport équimoléculaire
- La chromatographie de l'hydrolysat de l'oside J réduit fournit le D-mannose
- le D-mannitol et la N-acétyl glucosaminæ dans les rapports molaires 1 : 1 : 2.



A B C

Figure 4I

- A: Chromatographie sur papier de l'acétolysat O-désacétylé de l'oside J. Identification de 4 osides numérotés de I à 4 et ayant le même comportement chromatographique que les osides témoins A, C, D, H, I. (voir la structure dans le texte).
- <u>B</u>: Electrophorése sur papier de l'oside n°2 isolé par chromatographie préparative. Identification, de deux osides ayant le même comportement électrophorétique que l'oside C (N-acétylglucosaminyl I-2 mannose) et D (mannosyl I-3 mannose).
- <u>C</u>:Chromatographie sur papier des hydrolysats purifiés des osides 3 et 4 préalablement réduits.

- La masse moléculaire de ce composé, déterminé par gel filtration est de 750 Il s'agit donc bien d'un tétrasaccharide.
- L'acétolyse de 10 mg de l'oside J nous permet d'obtenir cinq osides, numérotés 1, 2a, 2b, 3 et 4 (Fig. 41 A et B p. 135). Ces osides possèdent des comportements chromatographiques identiques à ceux des témoins latéraux précédemment étudiés, ces correspondances peuvent se résumer de la façon suivante:

Oside 1 = oside Λ (N-acétyl glucosaminyl (1 $\stackrel{6}{\rightarrow}$ 4) mannose)

Oside 2 = oside D (mannosyl ($1 \xrightarrow{\alpha} 3$) mannose)

- oside C (N-acétyl glucosaminyl (1 $\stackrel{a}{\rightarrow}$ 2) mannose)

Oside 3 = oside H (voir la structure page 131 et 132)

Oside 4 = oside I (voir la structure page 134)

Seuls les osides 3 et 4 ont été obtenus avec un bon rendement, ce qui nous a permis d'étudier leur structure. Ils renferment dans des proportions équimolé—culaires: le D-mannose, le D- mannitol et la N - acétyl glucosamine. Ces résultats corroborent les conclusions avancées, au sujet de leur comportement chromatographique.

L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer la structure suivante :

OSIDE K

a - Préparation et isolement

L'élution d'une colonne de charbon-Celite par une solution éthanolique à 7,5 p 100 déplace l'oside K ainsi que les osides A, B, G, L, M, 0 et P. L'oside K est ensuite purifié par chromatographie préparative sur papier dans différents systèmes solvants à base de pyridine. Nous avons obtonu 35 mg de ce composé qui s'est révélé homogène en électrophorèse ainsi qu'en chromatographie.

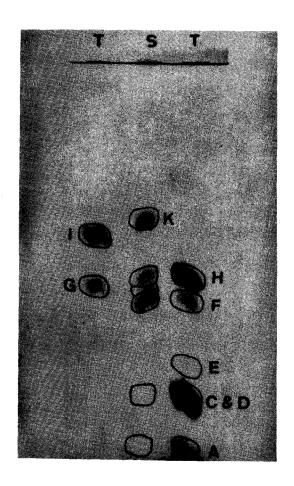


Figure 42

Chromatographie sur papier de l'acétolysat 0-désacétylé de l'oside K. Système solvant : pyridine - acétate d'éthyle acide acétique - eau (5:5:1:3). Papier Whatman n°3.

b - Structure de l'oside K

Cette structure a été identifiée de la manière suivante:

— La chromatographie des hydrolysats chlorhydriques (HCl 2 N, 2 h 100°) préalablement purifiés sur colonne échangeuses d'ions, laisse apparaître le D-mannose et la N-acétyl glucosamine dans les rapports équimoléculaires.

- La chromatographie sur papier de l'hydrolysat de l'oside K préalablement réduit par le borohydrure de sodium révèle la présence de D-mannose, de D-mannitol et de D-glucosamine dans les rapports 1:1:2.
- La gel filtration sur séphadex G:25 de ce polysaccharide dans le tampon MacL 0;15 M donne un pic unique, symétrique dont le volume d'exclusion (V₁) est supérieur au volume vide (V₀) de la colonne, déterminé avec le bleu Deutran (V₀ = 80 ml et V₁ = 124 ml). Ces valeurs nous donnent un poids moléculaire de 765 pour une masse moléculaire calculée de 748, soit une erreur voisine de 2p100. L'acétolyse de 10 mg de cet oside pendant une durée de 3 jours fournit à l'analyse chromatographique des traces de disaccharides et 3 trisaccharides ayant les comportements chromatographiques des osides G, F, H . 5(Fig.42 p 137) La chromatographie de l'acétolysat de 5 mg de l'oside K réduit et la révélation du chromatograpme à l'oxalate d'aniline laisse apparaître seul l'oside F.

L'ensemble de ces résultats nous conduisent à la conclusion qu'il s'agit de la structure suivante :

N-acétyl glucosamine (1 $\stackrel{\mbox{\colored}}{\longrightarrow}$ 2) mannose (1 $\stackrel{\mbox{\colored}}{\leadsto}$ 3) mannose



N-acétyl glucosamine

OSIDE L

a - Préparation et isolement

Cet oside est isolé de la fraction alcoolique à 7,5 p 100,—solution de désorption d'une colonne de charbon, puis purifié par chromatographie préparative sur papier. Nous avons isolé 125 mg de cet oside, homogène en chromatographie, en électrophorèse et en gel filtration.

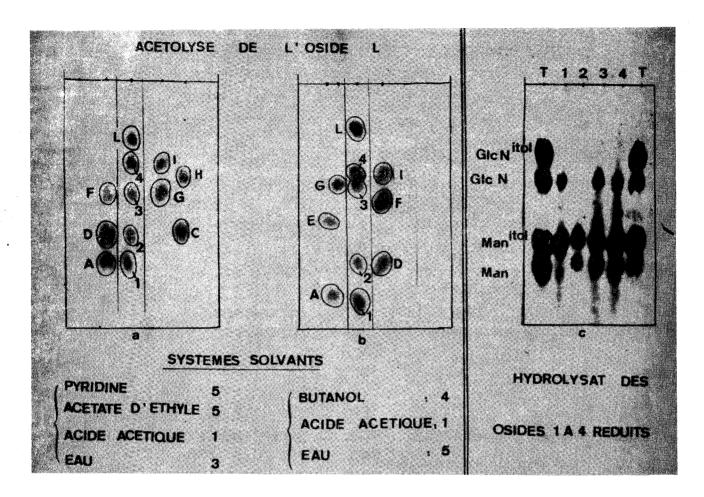


Figure 43

- <u>a et b</u>: chromatographie sur papier de l'acétolysat 0- désacétylé de l'oside L. Obtention de 4 osides ayant le même comportement chromatographique que les osides témoins A, D, I et G. (voir la structure dans le texte).
- c: chromatographie sur papier des hydrolysats purifiés des osides I,2,3,4 préalablement réduits. Man : mannose ; Man-itol mannitol ; GlcN :glucosamine ; GlcN-itol : glucosaminitol.

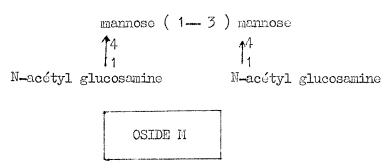
b - Structure de l'oside L

Nous avons établi sa structure de la manière suivante :

La chromatographie des hydrolysats chlorhydriques permet de caractériser
le D-mannose et la D-glucosamine. Les dosages colorimétriques précisent que
ces deux oses sont dans un rapport équimoléculaire.

- La chromatographie de l'oside L réduit, puis hydrolysé met en évidence le D-mannitol, le D-mannose et la D- glucosamine dans les rapports 1 : 1 : 2 .
- La gel filtration sur sephadex G 25 de ce polysaccharide nous donne un poids moléculaire de 740 pour un poids moléculaire calculé de 748 (sur la base de 1 mole de mannitol par mole d'oside); ces résultats nous permettent de conclure qu'il s'agit d'un tétrasaccharide, possédant une molécule de D-mannôse en position terminale réductrice.
- L'acétolyse de 10 mg de cet oside pendant une durée de 3 jours fournit à l'analyse chromatographique dans deux systèmes solvants a et b (Fig. 43 p 139) deux disaccharides et deux trisaccharides possédant les comportements chromatographiques des osides A, D, G et I

Les osides de l'acétolysate du polysaccharide L sont isolés en chromatographie préparative sur papier puis purifié sur une petite colonne de charbon-Celite. Les hydrolysats des osides 1, 2, 3 et 4 réduits sont ensuite chromatographiés dans le système solvant a (Fig.43 c p 139). L'étude de la composition et du rapport molaire des osides 1 à 4 confirme les précédents résultats et nous permettent de conclure à la structure suivante:



a - Isolement et préparation

L'oside M a été élué d'une colonne de charbon Celite par le passage d'une solution éthanolique à 5 p 100. Il est ensuite purifié par chromatographie sur papier.

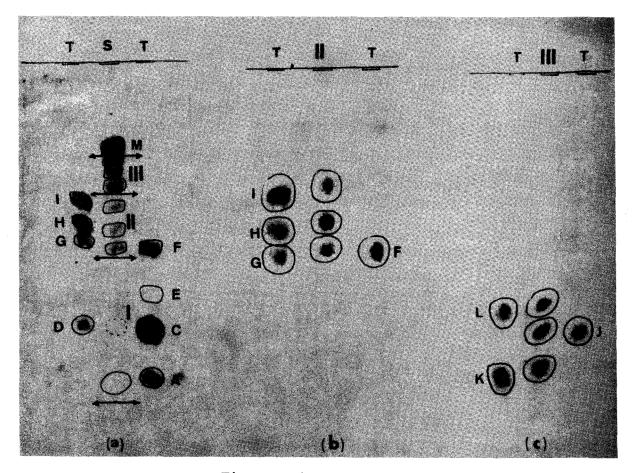


Figure 44

- <u>a</u>: chromatographie sur papier de l'acétolysat 0-désacétylé de l'oside M. Identification de 3 trisaccharides et 3 tétrasaccharides.
- <u>b</u>:chromatographie sur papier des trisaccharides (fraction II) Les osides de cette fraction ont le même comportement chromatographique que les osides témoins I, H, G, F.
- <u>c</u>: chromatogaphie sur papier des tétrasaccharides (fraction III) Les osides de cette fraction ont le même comportement chromatographique que les osides témoins K, J et L.

b - Structure de l'oside M

Sa structure a été déterminée de la manière suivante :

— La chromatographie de l'hydrolysat purifié révèle la présence de D-mannose et de D-glucosamine. Les dosages colorimétriques précisent que ces deux oses sont dans les rapports 2:3.

- -- La chromatographie de l'hydrolysat de l'oside M réduit met en évidence le D-mannitol, le D-mannose et la D-glucosamine dans les proportions 3 : 1 : 1.
- La gel filtration sur sephadex G 25 nous donne un poids moléculaire de 951 (sur la base d'une mole de mannitol par mole d'oside). Cet oside est donc un pentasaccharide.
- L'acétolyse de 10 mg de l'oside M nous procure dans des proportions variables 8 osides dont 2 disaccharides, obtenus à l'état de traces, 5 trisaccharides et 5 tétrasaccharides. Chacune de ces classes d'oside est isolée en chromatographie préparative puis chromatographiée de nouveau en présence des osides témoins précédemment obtenus (Fig 44 p 141)

Les tétrasaccharides possèdent les mêmes comportements chromatographiques que les osides J, K et L et les trisaccharides ont les mêmes vitesses de migration que les osides G, F, H et I, dans les différents systèmes solvants.

L'application ultérieure des méthodes de méthylation et d'oxydation periodique apporteront des informations complémentaires, cependant nous pouvons déja conclure qu'il s'agit de la structure suivante :

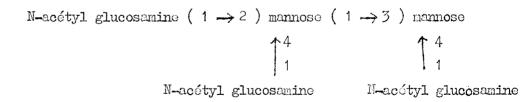
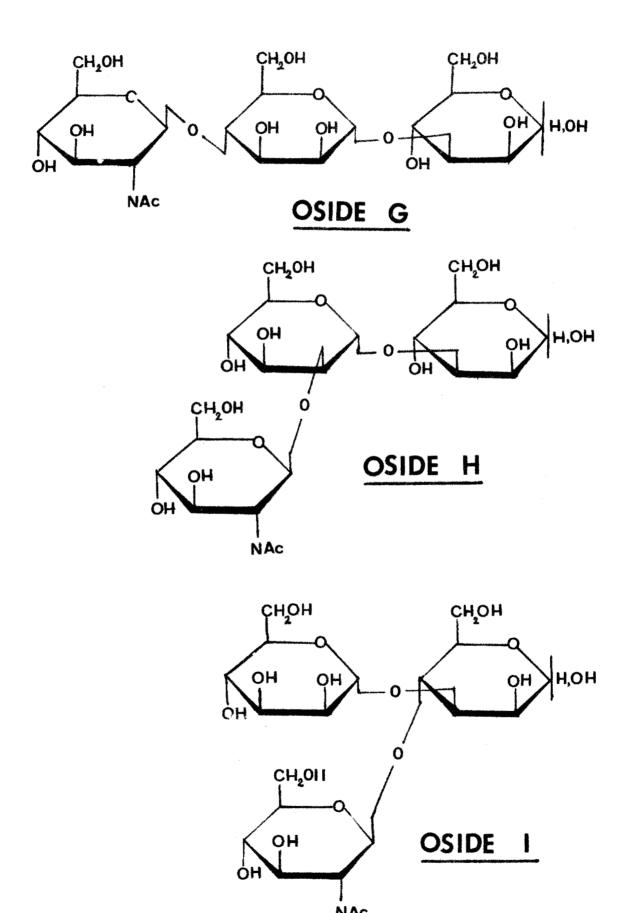


Figure 45

Schéma de structure des osides Λ à M, isolés de la fraction polysaccharidique neutre d'un acétolysat des glycopeptides β de l'ovomucoïde .

Figure 45

Schéma de structure des osides A, B, C, D, G, H, I, J, K, et L isolés par acétolyse des glycopeptides de l'ovomucoîde.



OSIDE J

OSIDE K

OSIDE M

CONCLUSIONS GENERALES

Les résultats que nous avons obtenus, au cours de la mise au point de l'acétolyse, nous conduisent aux conclusions générales suivantes:

1 - Afin d'obtenir un rendement quantitatif en osides, nous avons effectué une étude critique des divers procédés de 0-désacétylation car l'acétalyse des glycopeptides fournit des osides peracétylés, qu'il convient de désacétyler car leur pouvoir de résolution en chromatographie est faible. L'application de ces procédés au peracétyl galactose ainsi qu'à la peracétyl gl. cosamine, nous a montré que la désacétylation n'était pas toujours quantitative. En effet, les analychromatographiques et électrophorétiques auxquelles nous nous sommes livrées systématiquement, révèlent d'une part la présence d'artéfacts tels que des glycosylamines (procédé au méthanol ammoniacal) et d'autre part la présence de chromogènes de KUHN (procédé à la soude et au méthanol ammoniacal).

Cependant le procédé au méthoxyde de sodium constitue un procédé quantitatif de désacétylation des monsaccharides, dans les conditions expérimentales que nous avons définies, il respecte les oses "neutres" et les osamines.

- 2 Nos études sur la stabilité de <u>différents types de liaisons osidiques</u> nous permettent de prévoir les points de rupture préférentiels des liaisons osidiques au sein d'un glycanne ou d'un polysaccharide. Ainsi nous dénontrons :
 - a que les liaisons galactosyl sont plus labiles que les liaisons glucosyl (acétolyse comparée du lactose et du cellobiose).
 - b que la liaison N-acétylglucosaminyl est légèrement plus labile que la liaison glucosyl (acétolyse comparée du chitobiose et du cellobiose).
 - c que les liaisons du type 1 -> 6 sont totalement coupées après 3 jours d'acétolyse, de ce fait cette

liaison est plus labile que la liaison 1-4. (acétolyse comparée du mélibiose et du lactose). Notons que ce résultat est en parfait accord avec les travaux de FUJIMOTO, MATSUDA et ASO.

- d que l'anomérie de lisison (est plus labile que l'anomérie β (acétolyse comparée du maltose et du cellobiose).
- 3 Nous avons tiré parti des 3 propriétés suivantes:
 - la stabilité des liaisons sialosyl vis à vis de l'acétolyse
 - la grande stabilité des liaisons aspartyl N-acétyl glucosaminylamine
 - l'absence de N acétylation des amino-acides

 pour mettre au point un procédé de fractionnement des acétolysats sur échangeurs de cations et d'anions qui nous permet d'obtenir trois fractions.

 La première n'est pas retenue par les résines et contient des osides "neutres"
 qui proviennent de la partie centrale des glycannes. La seconde, "acide",
 déplacée de l'échangeur d'anions, est constituée de sialyl-oligosides qui
 appartiennent à la fraction la plus externe des glycannes. La troisième,
 "basique", éluée de l'échangeur de cations, renferme des glycopeptides et
 correspond aux séquences glucidiques au voisinage du point d'attache sur la
 chaîne peptidique.
- 4 La quantitativité et la reproductibilité de cette méthode nous a permis de l'appliquer :
 - à l'exploration de la structure d'un sialyloligosaccharides isolé du lait de femme.
 - -- ainsi qu'à l'exploration de la séquence des monosaccharides des glycannes (3 de l'ovomucoide.
 - a L'analyse des résultats obtenus nous a permis d'établir une étude comparée de l'hydrolyse ménagée et de l'acétolyse. Les observations que nous avons retenues sont les suivantes:
 -- Contrairement à l'hydrolyse ménagée, par les acides ou par les résines polystyrènes-sulfonés, l'acétolyse libère des quantités très faibles d'oses et une proportion élevée, quali-

tativement et quantitativement, d'oligosides. Elle représente donc le procédé de choix pour provoquer la dégradation partielle des glycannes et pour préparer, à partir de ceux-ci, des quantités importantes d'osides.

- Contrairement à l'hydrolyse acide, l'acétolyse ne fait courir aucun risque de transosidation.
- L'hydrolyse ménagée coupe préférentiellement les liaisons N-acétylosaminidiques tandis que l'acétolyse se porte principalement sur les liaisons glycosidiques des oses "neutres".
- Contrairement à l'hydrolyse acide, l'acétolyse préserve en partie les liaisons sialosyl;
- b Les études de structure des osides isolés de l'acétolysat d'un hexasaccharide, associées aux études complémentaires de méthylation et d'hydrolyse enzymatique nous ont permis d'établir la structure du dilactaminyl-lacto N-tétraose.
- c L'isolement d'un acétolysat des glycopeptides è de 15 osides et la détermination de la structure de 11 d'entr'eux nous a permis d'élucider partiellement le problème de la structure de ces glycannes. Nous avons isolé œs osides en quantités importantes pour qu'ils constituent des modèles moléculaires qui pourront servir ultérieurement pour la fabrication de la spécificité des glycosidases.
 - d Finalement nous avons conçu un procédé rapide, sensible et reproductible d'analyse des oligosaccharides de la fraction "neutre" en associant la chromatographie sur charbon et la chromatographie sur papier. Cette méthode fournit des cartes dont l'étude permet de mettre en évidence des différences parfois très faibles dans les séquences de monosaccharides constituant les glycannes de glycoprotéines diverses.

BIBLIOGRAPHIE

```
ABRAHAM S., CHAIKOFF I.L. et HASSID W.Z., J. Biol. chem., 1952, 195, 568 (119;143)
ADA G. L. et FRENCH E. L., Nature, 1959, 183, 1 740 (20)
```

ADAM_CHOSSON A. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol; 1965, 47, 81 (5,16, 57,189,199)

ASPINALL G. O. RASHBROOK R. B. et KESSLER G., J. Chem. Soc., 1958, 1, 215 (76,111)
ASPINALL G. O. et WHYTE J. N., J. Chem. Soc., 1962, 1, 170 (110)

BAILEY R. W., "The oligosaccharides" G Pergamon Press. ed. Oxford, 1965, 4, (64) BACON E. et BACON J.S.D., Biochem. J., 1954, 58, 396 (62)

BARKER S. A., FOSTER A. B., STACEY M. et WEBBER J. M., Chem. Ind.(London), 1957 (208); J. Chem. Soc., 1958, 2 218 (122,158)

BARKER S. A., PARDOE G. I. et HOPTON J. W.Abtr. 147th Neeting, Am. Chem. Soc. 1964 (28, 73)

BARKER S. A., PARDOM G.I., STACEY M. et HOPTON J.W., Nature, 1963, 197, 23 (27)

BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.M., Analyst., 1964, 79, 201 (132,140,176)

BERGMAN M., ZERVAS L. et SILBERKWEITE S., Chom. Ber. 1931, 64, 2 436 (70)

BOUQUELET S., Diplôme d'Etudes Approfondies, (180)

BHATTI T. et CLAMP I.R., Biochem Biophys. Acta, 1968, 170, 206 (195)

BOUVENG M. O. et LINDBERG B., Advan. Carbohydrate Chem., 1960, 15, 55 (39)

BRAGG P. D. et HOUGH L., Biochem. J., 1961, 78, 11 (49)

CEREZO A.S., DEULOFEU V., Carbohydrate Research, 1966, 2, 35 (153)

CHATTERTREE A. K. et MONTGONERY R., Arch. Biochem. Biophys., 1962,99? 426 (32)

CHOSSÓNIA,, MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., C.R. Acad. Sci., 1962,255, 3 261(12,56)

CLAMP J. R. et HOUGH L., Chem. Ind. (LONDON) 1963, 82 (9)

CLAMP J.R. et FUTNAM F.W., J. Bigl. Chem., 1964, 239, 3233 (58)

COTE R.H., J. Chem. Soc., 1959, 2248 (165)

CROON I., HERRSTROM G., KULL G. et LINDBERG B., Acta Chem. Scand., 1960 , 14, 1338 (38)

```
DATE J. W., Sdand. J. Clin. Lab. Invest., 1958, 10, 149 et 444 ( 146,154)
DENT C.E., Biochem. J., 1947,41,240 (170)
DICKEY E.E. et WOLFROM M.L., J. Amer. Chem. Soc., 1949, 71, 825 5(68)
DIXON A.S., Biochem. J., 1955, <u>59</u>, XXI et 1955, <u>60</u>, 165 (48)
DUBOIS W., GILLES K. A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F., Nature 1951, 168,
     167 (196)
DUPONT P., Diplôme d'Etudes Approfondies 1968 (15)
ELSON L.A. et MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1933, 27, 1824 (130, 175)
EYLAR E.H. et JEANLOZ R.W., J. Biol. Chem., 1962, 237, 622 (3,6)
FINDLAY J. et LEVY G. A., Biochem. J., 1960,77, 170 (25)
FISCHER E., Ber., 1890, 23, 3687 et 1895, 28, 3024 (60)
FISCHER E. et BERGIAN H., BER., 1917, 50, 1047 ( 145,152,156,158)
FOSTER A.B., Adv. Carbohydrate Chem., 1957, 12,81 et1952,57,230 (159)
FOSTER A.B. et STACEY M., J. Appl. Chem., 1953, 3, 19 (141)
FOURNET B., TAKERKART G., BROHON J. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol.
       1968,50, 1351 (4)
FRANCHIMONT A., Bor. 1879,12,1941(63,65)
FREDERICQ M., DEUTSCH H.F., J. Biol. Chem., 1949, 181, 499 ( 167,184)
FREUDENBURG K. et SOFF K., Ber., 1948,69, 1245 (99)
FUJIMOTO K., MATSUDA K. et ASO K., Tohoku J. Agr. Res., 1962,13, 61 (170)
GEORGES L.W., BOWER R.S., WOLFROM H.L., J. Amer. Chem. Soc., 1946, 68, 2169(102,104)
GOLSTEIN I.J., HAY G.W., LEWIS B.A.et SMITH F., Abtr. 147th Meeting Am. Chem.
     Soc., 1964, (29)
GORIN P.A.J. et PERLIN A.S., Can. J. Chem., 1956,34, 1796 (77,87,95)
GOTTSCHALK A., MURPHY W.H. et GRAHAM B.R.H., Nature 1962, 1941 (1)
GRIMIONPREZ L. ot MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 843 (168)
GRIMMONPREZ L. TAKERKART G. MONSIGNY M. ot MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci.,
            1967, 265 D, 2124 (182)
GRIMMONPREZ L., BOUQUELET S., BAYARD B., SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J.
           Eur. J. Biochem., 1970, 13, 484 (183)
```

```
HASSEL O. et OTTAR B., Acta Chem. Scand., 1947, I , 929 (41)
HAWWORTH W. N., Ber., 1932, 65A, 43 (43, 46)
HEIDT L.J. et PURVES C.B., J. Am. Chem. Soc., 1944,66, 1385 (42)
HOROWITZ S.T., ROSEMAN S. et BLUMENTHAL H.J., J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 5046(74)
HUGHES R.C. et JEANLOZ R.W., Biochem., 1964, 3, 1555 (26,163,179)
J. KUBCZAK B. ot MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1970 ( sous presse )
JEANLOZ R.W. et CLOSSE A. Fédération Proc., 1963, 22, 538 ( 34,37 )
JERKEMAN P., Acta Chem. Scand., 1963, 17, 2769 (11,121)
JERMYN M. A. et ISERWOOD F. A., Biochem. J., 1949, 44, 402 (134)
KAUFMAN H.H., MARSHALL R.O., Proc. 6th Intern. Congr. Biochem., Hew-York 1964, (10)
KUHN R. et EKONG D., Chem. Ber., 1963, 96,683 (83,113)
KUHN R. et KRUGER G., Chem. Ber., 1956, 89, 1473 et 1957, 90, 264 (75,129,160)
KUHN R. et WIEGANDT H., Chem. Ber., 1963, 96,866 (82,98,115,197)
KUNZ A. et HUDSON C.S., J. Amer. Chem. Soc., 1926, 48, 1978 (150)
LEE Y.E. et BALLOU C.E., Biochem., 1965, 4,257 (78,80,88,96)
LEE Y.E. et MONGOMERY R., Arch. Biockem. Biophys., 1962,97,9 (11,13,112)
LEVENE P.A. et MORI T., J. Biol. Chem., 1929,84,49 (17)
LEVY G.A. et Mc ALLAN A., Biochem. J., 1959,73, 127 (127)
MASAMUNE H. et YOSIKAWA Z., Tohoku J. Exp. Hed., 1956,64,257 (94,114)
MATSUDA K., WATANABE H., FUJIMOTO K. ASO K., Nature, 1961, 191, 278 (90, 108, 164)
Mc NEELY W.H., BINKLEY W.W. et WOLFRON H.L., J. Am. Chem. Soc., 1945, 67,527 (101)
MEYER K., Advan. Carb. Chem., 1945, 2,249 (18)
MICHL H., Monastsch. Chem., 1951,82,489 (142,169)
MONDGOMERY R.W., WU Y.C. et LEE Y.C., Biochem. 1965,4,578 (8,14,33)
MONSIGNY M., ADAM_CHOSSON A., MONTREUIL J., Bull.Soc. Chim. Biol., 1968, 50,843 (169,187)
MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R., MULLET S., C.R. Soc. Biol., 1960, 154, 752 (164)
MONTREUIL J., CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 1962,255,3071 (12,55,56)
MONTREUIL J., SPIK G., Microdosage des glucides (173,190,192)
MONTREUIL J., SPIK G., Dosage chromatographique des glucides neutres (178)
```

```
OLIN S.M., EVANS E.F. et WOLFRON M.L., J. Am. Chem. Soc., 1944, 66, 204 (119,118)
O'NEILL, J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 5074 (105, 106)
OST H., Angow. Chem. Soc., 1945, 18, 1170 ( 59 )
PAINTER T.J. et MORGAN W.T.J., Nature, 1961, 191, 39 (52)
PAINTER T.J., WATKINS W.M. et MORGAN W.T.J., Nature, 1962,193,1042 (53°)
PAINTER T.J., REGE U.P. et MORGAN W.T.J., Nature, 1963, 199, 569 (54)
PARTRIDGE J.M., Biochem. J., 1948, 42, 238 (137)
PARTRIDGE J.M.nBiochem. Soc. Symp., 1949,3,52 (133,136,145)
PAUL R., C.R. Acad. Sci., 1933, 197, 1652 et Bull. Soc. Chim. Fr., 1934 1,971(45)
PEAT S., WHELAN W.J. et EDWARDS T.E., J. Chem. Soc., 1961, 1, 29 (79,89)
REEVES R.E., J. Amer. Chem. Soc., 1950, 72, 1499 (44)
REISSIG J.LK, STROMINGER J.L. et LELOIR L.F., J. Biol. Chem., 1955, 217, 959
         (144,148,162,194)
RIMINGTON C., Biochem. J., 1931, 25, 1062 (125, 172)
ROTHFUS J.A., Feder. Proc., 1961,20,383 (30)
ROTHFUS J.A. et SMITH E.L., J. Biol. Chem., 1963, 238, 1402 (30,31)
SCHRAMN G. et MOHR E., Nature, 1959, 183, 1677 (21)
SCHMID K., Biochem. Biophys. Acta., 1954, 14, 437 (50)
SKRAUP Z.H. et KONIG J., Ber. 1901,34, 1115 (66)
SMITH F. et SRIVASTAVA H.C., J. Amer. Chem. Soc., 1956, 78, 1404 (91)
SPENCER C.C., Cellulosechemie, 1929, 10, 61 (67)
SPIK G., Thèse d Doct. Sci. Lille, 1968 (7)
SPIRO R.G., J. Biol. Chem., 1962,237,382 et1964,239,567 (19,35)
STACEY M. et WOOLEY J.H., J. Chem. Soc., 1940, 184;1942,550 (56)
STANLEY P.G., Aust. J. Exper. Biol. Med. Sci., 1953,31,187 (128)
SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L., NAture, 1958, 181, 1154 (139)
TATE M.E. et BISHOP C.T., Can. J. Chom., 1962,40,1043 (137)
TAUFEL K., IWAINSKY H. ot RUITLOFF H., J. Prakt. Chem., 1956,4,89 (61)
TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1929,215,36 (124,147,171)
TOLBERT N.E. et ZILL L.P., Arch. Biophys. Biochem., 1954,50,392 (51)
TREVELYAN W.E., PROCTOR D.P. et HARRISSON J.S., NAture, 1950, 444; 166 (135, 198)
```

WALLENFELS K. et MALMOTRA O.M. in BOYER P.D., The Enzymes, Vol. 4, Acad. Press, New-york 1960, P.409 (24)

WALLENFELS K., ZARNITZ M.L., LAULE G., BENDER H., KESER M., Biochem.Z., 1959, 331, 459(23)

WERNER I. et ODIN L., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230 (132, 177)

WHELAN W.J., Communication personnelle (120)

WISTLER R.L. et CORBETT W.M. in PIGNAN W., The Carbohydrates, Acad. Press, New-york, 1957, 702 (84,85)

WISTLER R.L. et DURSO D.F., J. Am. Chem. Soc., 1950, 444,166 (193)

WHITAKER D.R., TATE M.E., BISCHOP C.T., Can. J. Chem., 1962, 40, 1885 (159)

WOLFROM M.L. et DACONS J.C., J. Am. Chem. Soc., 1952,74,533 (69,86,103,107;166)

WOLFROM M.L. et THOMFSON A. in PIGHAN W., The Carbohydrates, Acad. Press, New-york, 1957, 188 (40,47)

YAMASHINA I., MAKINO M., J. Biochem., 1962,51,359 (168,186)

YOSIZAWA Z., Tohoku, J. Exptl. Med., 1949,51,51 et 1950,52,11 (81,92,93,116)

ZECHHEISTER L., Ber., 1923,56,573 (71)

ZEMPLEN G., et KUNZ A., Ber., 1923,56,1705 (149,154,157)

ZILLIKEN F., BRAUN G.A., ROSE C.S. et GYORGY P., J. Am. Chem. Soc., 1955,77, 1296 (72)

