

50376  
1971  
137

50376  
1971  
137

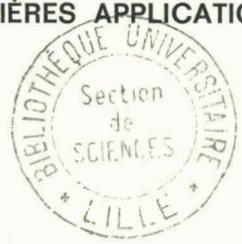
UNIVERSITÉ DE LILLE  
FACULTÉ DES SCIENCES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ A LA FACULTÉ DES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE  
POUR L'OBTENTION DU TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR  
SPÉCIALITÉ BIOCHIMIE

PAR MADAME ANNIE LOÏEZ-HENNETTE

# RECHERCHES SUR LES GLYCOPROTIDES DE L'URINE HUMAINE

- 1° — ÉTUDE DES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES
- 2° — CHROMATOGRAPHIE DES GLYCOPROTIDES  
SUR GELS DE DEXTRANNES
- 3° — PREMIÈRES APPLICATIONS AUX URINES DE CANCÉREUX



PRÉSENTÉ LE 25 JUIN 1971 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. J. MONTREUIL, PRÉSIDENT

M. G. BISERTE, RAPPORTEUR

M<sup>lle</sup> G. SPIK, EXAMINATEUR



Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL, Chef de Service du Département de Biochimie Cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Directeur : Professeur J. DRIESSENS).

50376  
1971  
137

50376  
1971  
137

TABLE DES MATIERES

---

INTRODUCTION

GENERALITES

I - <u>LES GLUCIDES LIBRES DE L'URINE</u>	3
A - <u>LES OSES</u>	3
B - <u>LES OSIDES</u>	4
II - <u>LES ACIDES URONIQUES</u>	5
A - <u>LES URONOCONJUGUES</u>	5
1° - Formés à partir de composés exogènes	5
2° - Formés à partir de composés endogènes	7
B - <u>LES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES</u>	7
1° - Préparation	7
2° - Dosages	12
3° - Discussion	14
III - <u>LES GLYCOPROTIDES</u>	15
A - <u>HISTORIQUE</u>	15
B - <u>LES COMPOSES DEFINIS</u>	19
1° - Les protéines urinaires d'origine plasmatisque	19
a) Les séromucoïdes	19
b) Les hormones gonadotropes	21
c) L'érythropoïétine	21
d) Les glycoprotéines à activité de groupe sanguin	21



2° - Les uromucoïdes	22
a) La glycoprotéine de TAMM et HORSFALL	22
b) Autres uromucoïdes	27
3° - Les glycopeptides	29
a) Glycopeptides riches en acide sialique	30
b) Glycopeptides riches en fucose	30
c) Glycopeptides riches en osamines	31
d) Glycopeptides riches en acide uronique	31
e) Glycopeptides riches en hydroxyproline	33
4° - Les complexes MPA-protéines	34
C - <u>FRACTIONNEMENT DE L'ADIALYSABLE URINAIRE</u>	34
1° - Précipitation alcoolique	35
2° - Précipitation par le sulfate d'ammonium	38
3° - Ultrafiltration	38
a) travaux de BERGGARD	38
b) travaux de BOYCE, KING <u>et al.</u>	39
4° - Filtration sur gel	40
D - <u>GLYCOPROTEINES ET CANCER</u>	45
1° - Modifications quantitatives dans les urines de sujets cancéreux	45
2° - Modifications de la structure des glycoprotides	46
3° - Isolement d'entités spécifiques du cancer	46
a) La toxohormone	48
b) Le polypeptide spécifique des urines de cancéreux	49
c) Le mucopolypeptide acide de MASAMUNE	49
d) La $\gamma$ -glycoprotéine anormale de HAKOMORI	50
e) La glycoprotéine des sujets atteints de plasmocytose	50
4° - Conclusions	51
IV - <u>CONCLUSIONS</u>	51

## TRAVAUX PERSONNELS

---

I - <u>METHODES GENERALES D'ANALYSE</u>	54
A - <u>DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE</u>	54
<u>EN GLUCIDES</u>	
1° - Les oses neutres	54
2° - Les acides uroniques	55
3° - Les osamines	55
4° - Les acides sialiques	55
B - <u>DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLAIRE EN OSES</u>	55
1° - Les oses neutres	55
a) Hydrolyse acide et purification des hydrolysats	56
b) Chromatographie quantitative	56
2° - Les acides uroniques	57
a) Hydrolyse acide	57
b) Identification	57
3° - Les osamines	57
a) Hydrolyse acide	57
b) Identification	57
4° - Les acides sialiques	58
a) Hydrolyse acide et purification des hydrolysats	58
b) Identification	59
C - <u>ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE</u>	59
1° - Préparation des immunosérums	59
2° - Réalisation des immunoélectrophorèses	60

D - <u>ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES POLYSACCHARIDES</u> <u>ACIDES</u>	60
II - <u>PREPARATION DU MATERIEL D'ETUDE</u>	61
A - <u>PREPARATION DE L'ADIALYSABLE URINAIRE</u>	61
1° - Prélèvement des urines	61
2° - Concentration	62
3° - Fractionnement éthanolique	62
B - <u>COMPOSITION DE L'ADIALYSABLE URINAIRE</u>	64
1° - Composition centésimale en oses	64
2° - Identification des glucides et composition molaire	64
a) Les oses neutres	64
b) Les acides uroniques	66
c) Les acides sialiques	66
d) Les osamines	66
3° - Analyse immunoélectrophorétique	66
4° - Electrophorèse des polysaccharides acides	68
C - <u>CONCLUSIONS</u>	68
III - <u>MUCOPOLYSACCHARIDES</u>	71
A - <u>ETUDE CRITIQUE DE LA PRECIPITATION AU CETAVLON</u>	71
1° - Application à des solutions de témoins	71
a) Mode opératoire	72
b) Résultats et discussion	72
2° - Application aux urines	73
a) Méthode de DI FERRANTE	73
b) Méthode de MAROTEAUX	74
c) Méthode de MEYER	74
d) Comparaison des méthodes	75
e) Discussion	75
3° - Conclusions concernant la précipitation des MPA par le CTAB	77

<b>B - <u>ETUDE EN GEL FILTRATION DU PRECIPITE CETAVLON</u></b>	<b>78</b>
<b><u>ET DE L'ADIALYSABLE URINAIRE</u></b>	
1° - Matériel et méthodes	79
a) Chromatographie	79
b) Etude des fractions	79
c) Préparation des extraits urinaires par dialyse	80
d) Préparation des extraits urinaires par précipitation alcoolique	80
2° - Résultats	81
a) Premier bilan : la dialyse	81
b) Second bilan : la précipitation alcoolique	85
3° - Conclusions	88
 <b>IV - <u>FRACTIONNEMENT DE L'ADIALYSABLE URINAIRE PAR GEL</u></b>	<b>88</b>
<b><u>FILTRATION</u></b>	
 <b>A - <u>CHOIX DE LA RETICULATION DU GEL</u></b>	<b>89</b>
1° - Mode opératoire	89
2° - Résultats et discussion	89
a) Sephadex G-100	89
b) Sephadex G-75	94
c) Sephadex G-50	94
 <b>B - <u>FRACTIONNEMENT DE L'ADIALYSABLE URINAIRE</u></b>	<b>96</b>
<b><u>SUR SEPHADEX G-50</u></b>	
1° - Matériel et Méthodes	96
a) La chromatographie	96
b) Etude des propriétés des fractions	96
2° - Résultats et discussion	96
a) La chromatographie	97
b) Composition des fractions	97
c) Composition molaire en oses neutres et osamines	99
d) Composition en amino-acides	105
3° - Conclusions	105
 <b>C - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT DES PICS I et II SUR SEPHADEX</u></b>	<b>106</b>
1° - Sous-fractionnement du pic I	106
a) Deuxième chromatographie sur Sephadex G-50	106

b) Sous-fractionnement du pic Ia	109
2° - Sous-fractionnement du pic II	109
a) Deuxième chromatographie sur Sephadex G-50	109
b) Sous-fractionnement des pics IIb et IIc	110
3° - Conclusions	110
D - <u>ETUDE COMPAREE DES PICS I et II PURIFIES</u>	113
1° - Purification des pics	113
2° - Composition centésimale et molaire	114
a) La fraction I	114
b) La fraction II	114
3° - Composition en acides aminés	117
4° - Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique	117
a) La fraction I	117
b) La fraction II	117
E - <u>CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX I x 4 DES PICS I ET II PURIFIES</u>	121
1° - Mode opératoire	121
a) La chromatographie	121
b) Analyse des fractions	122
2° - Résultats obtenus avec le pic I purifié	122
a) La chromatographie	122
b) Analyse des fractions	123
3° - Résultats obtenus avec le pic II purifié	126
a) La chromatographie	126
b) Analyse des fractions	126
4° - Conclusions	128
F - <u>CHROMATOGRAPHIE DES PICS I ET II PURIFIES SUR DEAE-SEPHADEX</u>	130
1° - Mode opératoire	130
a) La chromatographie	130
b) Analyse des fractions	131

2° - Résultats obtenus avec le pic I purifié	131
a) La chromatographie	131
b) Analyse des fractions	131
3° - Résultats obtenus avec le pic II purifié	134
a) La chromatographie	134
b) Analyse des fractions	134
4° - Conclusions	136
G - <u>ETUDE DU PIC B</u>	136
1° - Action de l'amylase	138
a) Mode opératoire	138
b) Résultats et discussion	139
2° - Action de la $\beta$ -glycuronidase	139
a) Mode opératoire	139
b) Résultats et discussion	140
3° - Chromatographie du pic B sur échangeur de cations	140
a) Mode opératoire	140
b) Résultats	141
4° - Recherche d'oligosaccharides	141
5° - Problème des glucoronoconjugués	143
a) Mode opératoire	143
b) Résultats	143
6° - Conclusions	143
V - <u>APPLICATION AUX URINES DE CANCEREUX</u>	145
A - <u>ETUDE QUANTITATIVE</u>	145
1° - Mode opératoire	145
2° - Résultats	146
a) Dosages des glycoprotides	146
b) Rapports molaires	147
3° - Discussion	148

B - <u>FRACTIONNEMENT SUR SEPHADEX DES URINES DE</u> <u>CANCEREUX</u>	149
1° - Mise au point d'un procédé reproductif	149
2° - Résultatset discussion	154
C - <u>CONCLUSIONS</u>	157
 <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	 161
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	 163

GENERALITES

---

- I LES GLUCIDES LIBRES
- II LES ACIDES URONIQUES
- III LES GLYCOPROTIDES

## INTRODUCTION

Le travail que nous présentons concerne l'étude des glycoprotides des urines humaines de sujets sains et cancéreux.

L'urine étant un milieu d'excrétion de produits du métabolisme, il est permis de penser qu'il existe des variations quantitatives ou qualitatives de composés urinaires dont la mise en évidence permettrait un élément de diagnostic pour certains cas de cancer.

Avant d'aborder les cas pathologiques, il était nécessaire de définir la composition de l'urine des sujets sains. De nombreuses études ont été faites, mais les résultats en sont fragmentaires et dispersés. En effet, comme nous le verrons dans l'exposé des travaux des différents auteurs, les tentatives de fractionnement par les méthodes classiques d'échange d'ions ou d'électrophorèse donnent souvent des résultats difficiles à interpréter.

Il nous a semblé intéressant d'aborder l'étude des glycoprotides urinaires par la méthode de filtration sur gel de dextrane qui permet une première classification des composés d'après leur taille moléculaire. Par ailleurs, un problème était posé par la dispersion des résultats obtenus par différents auteurs à propos du taux d'acides uroniques. C'est pourquoi nous avons repris la question, en effectuant une étude critique de ces résultats et en les comparant à ceux que nous avons obtenus au laboratoire.

Dans la première partie de ce mémoire, nous tenterons de faire le point des connaissances acquises sur les glucides urinaires, que nous classerons en :

- Glucides libres : oses et polyosides

- Acides uroniques : urono-conjugués et mucopolysaccharides acides.

- Glucides conjugués : glycoprotéines et glycopeptides.

Dans la deuxième partie, nous exposerons nos résultats personnels concernant :

- Le dosage des mucopolysaccharides acides.
- Le fractionnement des glycoprotides.
- Les premières applications aux urines de cancéreux.

## I - LES GLUCIDES "LIBRES" DE L'URINE

L'existence d'une glucidurie physiologique discrète chez tous les sujets normaux est connue depuis longtemps. Elle représente environ 1,5 g de glucides totaux par litre d'urine dont 1 g d'oses neutres et de polyosides.

### A - LES OSES

MONTREUIL et BOULANGER (1) en 1953, furent les premiers à identifier par chromatographie sur papier, dans les dialysats d'urine de sujets sains, les sucres suivants :

- Glucose, fructose, arabinose, xylose, à des taux variant de 30 à 50 mg/l.
- Fucose, mannose, saccharose (3 à 15 mg/l).
- Rhamnose, galactose en plus faibles proportions et ribose à l'état de traces.

Ces résultats furent confirmés par les travaux de WHITE et HESS (2) en 1956.

D'autre part, MONTREUIL (3) a signalé l'existence de six cétooses urinaires que STRECKER (4) a identifiées aux ribulose, xylulose, D-allulose, D-fructose, D-altrioheptulose et D-mannoheptulose. Trois autres substances cétoosiques restent à identifier.

On ne trouve pas de sucres aminés libres dans l'urine normale, si ce n'est à l'état de traces ; mais elle contient de grandes quantités de composés de faible poids moléculaire contenant des osamines. D'après BOAS (5), l'adulte normal excrète environ 80 mg de sucres aminés par 24 h, dont 47 p. 100 sont dialysables.

## B - LES OSIDES

A notre connaissance, peu de travaux ont été publiés sur les osides des urines humaines et les résultats obtenus sont hétérogènes.

En 1958, MONTREUIL (communication personnelle) avait isolé 10 osides du dialysable urinaire et il en avait étudié la composition. La même année, DATE (6) avait mis en évidence, dans l'urine de femme enceinte, six oligosaccharides identiques aux osides du lait isolés par KUHN (7) et par MONTREUIL (8). Ces oligosaccharides n'ont pas été retrouvés dans l'urine normale.

Plus récemment, LUNDBLAD (9, 10) a caractérisé dans les urines des sujets de groupes sanguins A<sub>1</sub> et B, de type sécréteur, deux oligosaccharides spécifiques, qui sont sérologiquement inactifs. Par contre, BOURRILLON et GOUSSAULT (11) ont isolé un fucohétero-polysaccharide adialysable, ayant une activité sérologique O (H).

CORNILLOT et BOURRILLON (12) ont également mis en évidence un triholoside adialysable, constitué de deux résidus d'acide N-acétyl-neuraminique et d'un résidu de galactose. BOURRILLON, CORNILLOT et DABAT (13) ont isolé des fractions glycaniques riches en fucose, dans le surnageant de la précipitation de l'urine par 50 p. 100 d'éthanol.

D'autre part, les oligosaccharides contenant de l'acide sialique ont été plus particulièrement étudiés par HUTTUNEN et MIETTINEN (14) qui ont isolé un triholoside formé d'acide N-acétyl-neuraminique lié au lactose. HUTTUNEN (15) a, par la suite, montré la présence dans l'urine normale de 6 à 8 oligosaccharides renfermant de l'acide N-acétyl-neuraminique.

La question des osides a été reprise, au laboratoire, par STRECKER (16) qui a réussi à en isoler une cinquantaine dont il a déterminé la composition et pour certains d'entre eux la structure (Tableau I ; p. 6).

## II - LES ACIDES URONIQUES

---

Le taux normal d'acides uroniques totaux excrétés par 24 h se situe aux environs de 500 mg : CORNILLOT (17), FISHMAN et GREEN (18). La contribution des mucopolysaccharides acides est très faible (5 à 10 mg d'acide uronique par 24 h). L'acide uronique libre existe, mais en faible quantité, sous forme de D-glucuronolactone : WHITE et HESS (19).

### A - LES URONO-CONJUGUES

#### 1° - Formés à partir de composés exogènes

Ce sont des composés de poids moléculaire relativement faible. Ils sont généralement considérés comme des formes de détoxification : la majorité des substances étrangères à l'organisme, en particulier des médicaments, subissent, avant d'être excrétés, des transformations métaboliques ; celles-ci jouent un rôle important dans l'action thérapeutique ou la toxicité que de tels composés peuvent avoir. Les principales de ces réactions métaboliques sont soit des conjugaisons avec l'acide glucuronique, le glycofolle, la cystéine, le groupement sulfate, soit des méthylations et des acétylations : SMITH et WILLIAMS (20).

En particulier, parmi les composés se conjuguant avec l'acide uronique, citons le phénol et le benzène qui sont convertis dans les mêmes conjugués : phénylglucuronoconjugué ou phénylsulfate, avant d'être éliminés. De même, l'acide salicylique, l'acide nicotinique, etc... sont éliminés sous

TABLEAU I

Oligosaccharides des urines humaines d'après STRECKER (21)

OSIDES NEUTRES	non azotés	(Glc ↔ Fru) ; (Glc, 2Fru) ; (Glc, 3Fru)	
		(Glc → Glc) ; (Gal → Glc (3 isomères)) (Gal → Gal) ; (Xyl ↔ Xyl) ; (Rib ↔ Rib)	
		(Ara ↔ Ara) ; (Gal, Fuc) → Glc	
		(2Gal, 2Fuc) → Glc ; (Fuc → Glc) (Xyl ↔ Glc) ; (3Glc → Glc).	
OSIDES NEUTRES	azotés	Avec N-acétylglucosamine	Avec N-acétylgalactosamine
		(2Man, GlcNac) → GlcNac ; (2Gal, Man, 2Fuc) → GlcNac ; (2Gal, Man, Fuc, GlcNac) → Gal	(Fuc, GalNac) → Gal ; (Fuc, Gal) → GalNac ; (Gal, Fuc, GalNac) → Glc ; (Gal, 2Fuc, GalNac) → Glc ; (2Gal, 1Fuc, GalNac) → Glc ; (2Gal, 2Fuc, GalNac) → Glc.
OSIDES ACIDES	Avec acide N-acétyl-neuraminique	Avec acide glucuronique	(2GlcAU) → Glc ; (GlcAU, GlcNac) → Glc (2 isomères)
			GlcAU → Glc ; GlcAU → GlcNac.

forme de glucuronoconjugués. Selon leur nature, les glucuronoconjugués seront excrétés soit dans l'urine, soit dans la bile soit à la fois dans l'urine et dans la bile.

## 2° - Formés à partir de composés endogènes

La plupart des hormones stéroïdes excrétées dans l'urine humaine le sont sous forme conjuguée : JAYLE et PASQUALINI (22). Le pourcentage des stéroïdes libres est très faible. La majorité de ces composés de conjugaison sont des glucuronoconjugués. Spécialement parmi les métabolites de la progestérone, des oestrogènes et des corticostéroïdes, il apparaît jusque 95 p. 100 de glucuronoconjugués.

Cependant, les reins ne sont pas la seule voie d'élimination des hormones conjuguées. Dans le cas particulier des hormones thyroïdes, l'excrétion par la bile est prédominante.

## B - LES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES OU GLYCOSAMINOGLYCANNES

Les mucopolysaccharides acides ou MPA, encore appelés glycosaminoglycannes, d'après la nomenclature de JEANLOZ (23), sont des polysaccharides constitués par une longue chaîne dont l'unité de répétition est un disaccharide, composé d'une molécule d'osamine (glucosamine ou galactosamine, le plus souvent N-acétylée) et d'une molécule d'acide uronique (en général, l'acide D-glucuronique ; il est remplacé par le L-iduronique dans le chondroïtine sulfate B et par le D-galactose dans le kératansulfate).

Dans l'urine, les MPA sont souvent conjugués à des protéines par des liaisons O-glucosidiques de sérine et de thréonine.

### 1° - Préparation

La présence dans les urines humaines de complexes

MPA-protéines, semblables à ceux du cartilage est signalée dès 1895 par MORNER (24).

Par la suite, de nombreuses méthodes de préparation de ces composés ont été proposées. Mais peu d'études analytiques précises avaient été faites pour identifier les MPA de l'urine normale jusqu'aux travaux de VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (25) en 1967.

#### a) Méthodes de fractionnement

Elles peuvent se classer en trois catégories :

- Les MPA peuvent être séparés d'après leur mobilité électrophorétique sur papier : HEREMANS et VAERMAN (26), sur gel : MATHEWS (27), sur acétate de cellulose : SZABO et ROBOZ-EINSTEIN (28), VAILLANT-DELACROIX (29), et en utilisant des révélations appropriées : bleu alcian et bleu de toluidine.
- Ils peuvent être séparés aussi par chromatographie sur échangeurs d'anions, sur Dowex 1 x 4 : MEYER et al. (30), sur Ecteola cellulose et DEAE-Sephadex en éluant avec des solutions de molarité ou de force ionique croissante : SCHMIDT (31), KELLEY et al. (32), WESSLER (33), TELLER et ZIEMANN (34), ANTONOPOULOS et al. (35).
- Enfin les méthodes enzymatiques sont nombreuses. Elles utilisent pour la plupart la différence entre la hyaluronidase testiculaire, spécifiquement active sur l'acide chondroïtine sulfurique A ou C et l'acide hyaluronique, et la hyaluronidase bactérienne qui agit seulement sur le dermatan-sulfate et l'héparine : LINKER et TERRY (36), LINKER et al. (37). Par ailleurs, MAYES et HANSEN (38), BOWNESS (39) utilisent des chondroitinases spécifiques des acides chondroïtine-sulfuriques et de l'acide hyaluronique.

## b) Résultats

KELLEY, DONCHY et DE FERFANTE (40) ont montré l'hétérogénéité de la préparation de MPA précipités par le CTAB selon la méthode de MONTAGNANI (41). Par chromatographie sur Dowex 1 x 2 puis sur Tutonia cellulose, ils obtiennent 10 pics, susceptibles d'être à nouveau fractionnés selon le degré de sulfatation. Ils soupçonnent, sans pouvoir le démontrer, la présence de kératan-sulfate.

VARADI, CIFONELLI et DOREMAN (42) identifient dans l'urine tous les mucopolysaccharides trouvés dans les tissus conjonctifs, à l'exception de l'héparine. Leur méthode, qui associe à la gel filtration, la précipitation par les sels cuivriques et la chromatographie sur Dowex 1, est résumée dans la figure 1 (p. 10). Elle permet d'obtenir la distribution qualitative des MPA urinaires. Ceux qui prédominent sont une famille de chondroïtine-sulfate caractérisés par un taux variable de sulfate. La répartition des MPA est donnée dans le tableau II (p. 11).

De plus, les auteurs démontrent que le chondroïtine-sulfate monosulfaté excrété dans l'urine normale est formé de fragments de petite taille moléculaire dont certains sont liés par covalence à un peptide.

Auparavant, BERENSON et DALFERES (43) ont isolé et étudié les MPA urinaires. Leur méthode utilise principalement les techniques de dialyse, de précipitation par l'éthanol associé au sulfate ferrique et d'électrophorèse de zone. Leurs résultats sont comparables, du point de vue qualitatif à ceux de VARADI et al., mais différents du point de vue quantitatif. En particulier, BERENSON et DALFERES trouvent des taux de chondroïtine-sulfate B et de kératan-sulfate nettement supérieurs.

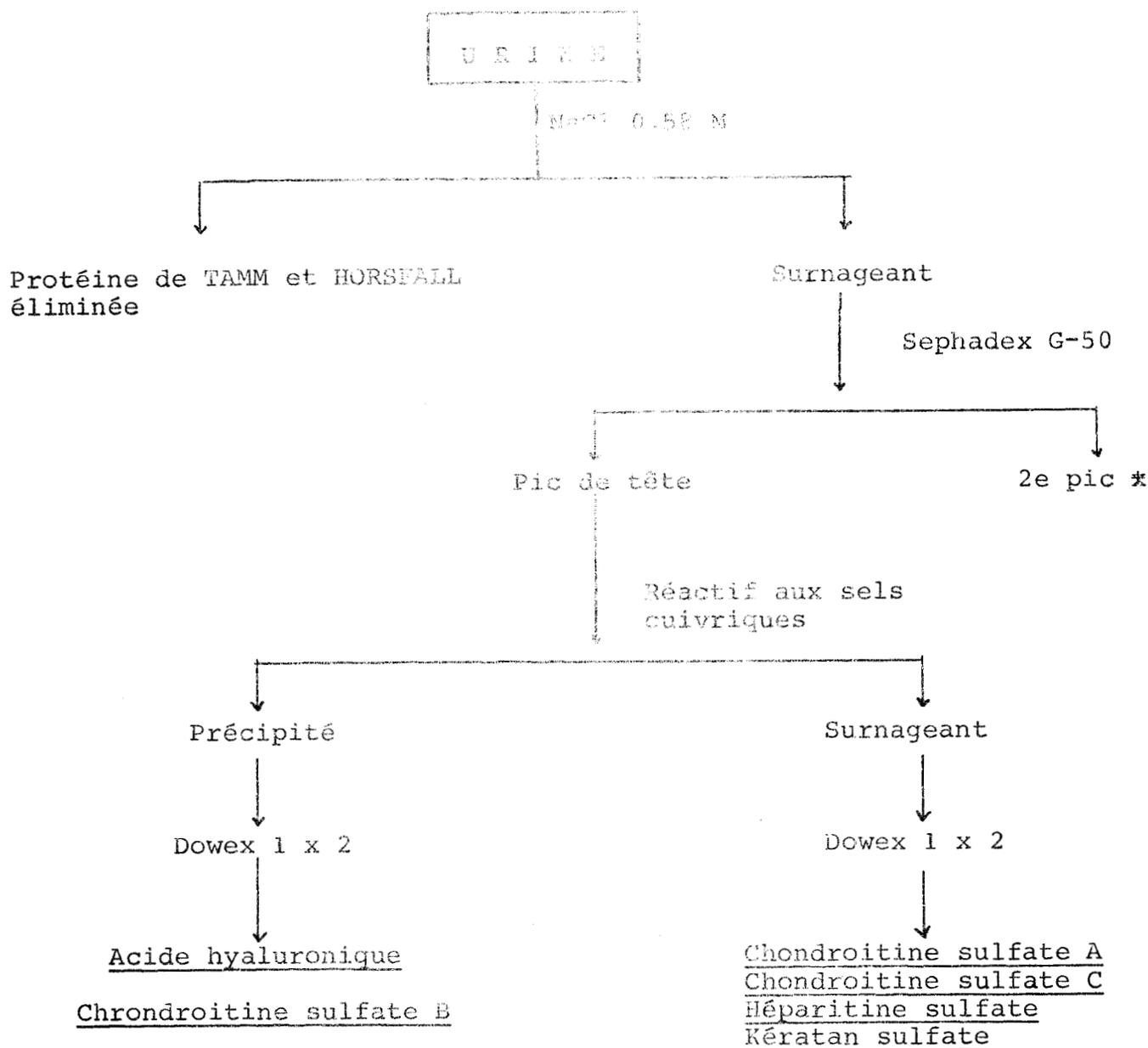


Figure 1

Isolement des MPA de l'urine d'après VARADI et al. (44)

- \* Le 2e pic contient des acides uroniques non précipitables par le chlorure de cétypyridinium mais libérés à 95 p. 100 par la  $\beta$ -glucuronidase de foie.

TABLEAU II

Répartition des MPA dans l'urine normale d'après VARADI et al. (45)

Glycosaminoglycannes	Pourcentage du total des glycosaminoglycannes	Remarques
Acide chondroïtine sulfurique C	34	
Acide chondroïtine sulfurique A	31	
Acide chondroïtine	25	complètement non sulfaté
Acide chondroïtine sulfurique B	8	légèrement sous-sulfaté
Acide hyaluronique	1	
Kéراتان sulfate	1	très fortement sulfaté



WESSLER (46) a proposé une méthode de détermination des MPA à petite échelle applicable dans des cas pathologiques. Par chromatographie sur Ecteola-cellulose, il sépare les MPA en composés sulfatés et non sulfatés. Il obtient pour les urines de sujets sains, des taux d'excrétion comparables à ceux de DI FERRANTE et RUIZ (47). Mais, il indique qu'une partie des MPA est perdue au cours de la préparation.

Enfin, SPRANGER, TODT et WIEDEMAN (48), après chromatographie sur Dowex 1 du précipité au Cétavlon, différencient les chondroitines-sulfates A et C et le chondroitine-sulfate B par un test à la hyaluronidase.

## 2° - Dosages

Si peu d'auteurs, à notre connaissance, se sont intéressés à la question du dosage des glycoprotéines urinaires totaux, par contre, les MPA ont été beaucoup plus étudiés d'abord parce qu'ils sont physico-chimiquement mieux définis et ensuite, à cause de leur grande importance clinique.

Le taux des MPA dans les urines de sujets sains, exprimé en acide glucuronique, est de 5 à 10 mg par 24 h. Les principaux résultats des auteurs sont réunis dans le tableau III (p. 13).

On observe une grande dispersion dans les valeurs obtenues selon les méthodes employées par les auteurs. En particulier, la méthode de dosage des MPA après précipitation par le bromure de cetyltriméthyl-ammonium ou CTAB, qui est la plus employée, donne des résultats assez peu constants. D'ailleurs, DI FERRANTE (49), dans une étude critique de sa propre méthode, souligne les causes d'erreurs qu'elle entraîne, en particulier, la non-précipitation de la totalité des MPA.

TABLEAU III

Excrétion journalière des MPA dans l'urine  
(exprimée en mg/24 h d'acide glycuronique)

Auteurs	Procédé de précipitation	Résultats
DI FERRANTE <u>et al.</u> (50)	CTAB	H. 6 $\pm$ 0,303 F. 3,77 $\pm$ 0,24
RICH (51)	CTAB	E. 2,5 $\pm$ 0,92
MEYER <u>et al.</u> (52)	CTAB	6 à 10
TELLER (53)	CTAB	E. 4 ans 3,5 $\pm$ 1,6 E. 14 ans 7,3 $\pm$ 2,6
CLAUSEN et ASBOE-HAUSEN (54)	CTAB	3,7
LOEWI (55)	CTAB-éthanol	H. 2,7 à 17,2 F. 2,5 à 12,9 E. 13,55 $\pm$ 7,0
KERBY (56)	Benzidine	H. 4,9 $\pm$ 1,3 F. 3,6 $\pm$ 0,6
KING <u>et al.</u> (57)	Ultrafiltration et sulfate d'ammonium	8
MALLEVAIS-GOUBET (58)	Ethanol + dialyse	H. 13,12 $\pm$ 3,02 F. 11,33 $\pm$ 3,26
BERENSON <u>et al.</u> (59)	Ethanol + électrophorèse	4,5 à 5,5

H. : Homme ; F. : Femme ; E. : Enfant



Les résultats obtenus au laboratoire par MALLEVAIS-GOUBET (60), au terme d'une étude systématique portant sur cinquante urines de chaque sexe, sont nettement supérieurs à ceux obtenus par la précipitation classique au CTAB.

### 3° - Discussion

Tous les MPA caractérisés dans le tissu conjonctif ont pu être mis en évidence dans l'urine à des taux variables et on peut supposer une relation entre le métabolisme tissulaire et la quantité de mucopolysaccharides contenue dans l'urine.

Il est donc important d'avoir une connaissance exacte de l'excrétion normale des MPA comme standard de comparaison avec une éventuelle excrétion anormale dans des troubles métaboliques du tissu conjonctif.

En effet, des variations quantitatives et qualitatives ont été observées dans l'urine des sujets sains suivant leur âge. TELLER et al. (61) signalent une augmentation du taux des MPA chez les enfants et les adolescents. RICH, DI FERRANTE et ARCHIBALD (62) ont noté chez les adolescents de 13 à 15 ans, des taux, exprimés en acide glucuronique, de 13 à 23 mg, soit 3 fois plus élevés que les valeurs moyennes trouvées chez les adultes.

Du point de vue qualitatif, WESSLER (63) et ORI (64) ont montré des différences dans la répartition quantitative des MPA sulfatés et non sulfatés entre les urines d'adultes et les urines d'enfants.

Selon ALLALOUF et BER (65), la proportion des MPA résistants à la hyaluronidase testiculaire est accrue avec l'âge. Ces résultats sont en accord avec ceux de MAYES

et HANSEN (66) qui indiquent une augmentation de la quantité de chondroïtine-sulfate par rapport aux MPA totaux chez les personnes âgées. Cependant, TELLER (67) estime que les pourcentages de chondroïtine-sulfate A et C ne varient pas quelque soit l'âge et SPRANGER, TODT et WIEDEMAN (68) reportent même une augmentation de ces composés avec l'âge.

Devant ces résultats contradictoires, dûs aux différentes méthodes employées, il n'est pas possible d'interpréter les variations de composition des MPA urinaires quant à leur signification physiologique.

Sur les MPA des urines pathologiques, de nombreux travaux ont été effectués. En particulier, DORFMAN et LORINCZ (69) ont montré en 1957 que l'urine d'un sujet atteint du syndrome de HURLER contenait de grandes quantités de chondroïtine-sulfate B et d'héparine-sulfate. De nombreuses études indiquent une augmentation plus ou moins marquée du taux des MPA excrétés dans d'autres maladies (voir par exemple, les travaux de WESSLER (70), CLAUSEN et al. (71), MEYER et al. (72), CLAUSEN et ASBOE-HAUSEN (73)). Dans le syndrome de MARFAN, l'excrétion d'acide hyaluronique et de chondroïtine-sulfate est considérable (BERENSON et SERRA (74)). De même, dans la maladie de MORQUIO-ULRICH, il y a une augmentation dans l'excrétion urinaire de la quantité totale des MPA et de kératan-sulfate : ZELLWEGGER et al. (75), mais ce dernier est absent dans le syndrome de MORQUIO-BRAILFORD (MAROTEAUX et LAMY) (76).

Enfin, dans les néoplasies (leucémie, sarcome, myélome multiple), RICH et MYERS (77) trouvent des taux d'acide uronique urinaire, précipitable par le Cétavlon, 2 à 10 fois supérieur à la normale.

### III - LES GLYCOPROTIDES

---

#### A - HISTORIQUE

La présence de protéines dans l'urine humaine normale a été reconnue dès 1895 par MÖRNER (78). Puis, RIGAS et HELLER (79) déterminèrent la valeur de la protéinurie physiologique (45 mg/l) et décelèrent en électrophorèse libre une frontière albumine et des frontières globulines plus ou moins bien caractérisées. Par la suite, GRANT et EVERALL (80) en 1957, puis PATTE et al. (81) en 1958, montrèrent l'existence de protéines plasmatiques dans l'urine. Le caractère glycoprotéique des "colloïdes" urinaires a été révélé par HAMERMAN et al. (82).

La composition en oses de l'adialysable urinaire a été réalisée dès 1953, par MONTREUIL et BOULANGER (83). Par chromatographie des hydrolysats, ils identifient le galactose, le mannose, le fucose, des osamines et l'acide glycuronique en forte proportion, le glucose et le xylose en petites quantités. Ces deux derniers sucres posent un problème quant à leur origine, car ils ne sont pas habituellement présents dans les hydrolysats de glycoprotéines.

De nombreux auteurs ont tenté de déterminer la composition totale de l'adialysable urinaire et de la comparer à celle du sérum (Tableau IV ; p. 17).

L'emploi des méthodes classiques d'électrophorèse donnent pour l'urine des schémas assez médiocres. En électrophorèse sur gélose (Figure 2 ; p. 18), on remarque en particulier une plus grande mobilité de l'albumine urinaire par rapport au schéma du sérum et l'apparition d'une zone floue entre les  $\beta$ - et les  $\gamma$ -globulines.

D'autre part, des travaux d'ordre chimique et immunologique ont permis de caractériser puis d'isoler quelques-uns des glycoprotides présents dans les urines de sujets sains.

TABLEAU IV

Composition comparée du sérum et de l'adialysable  
urinaire de sujets normaux d'après KING et al. (84)

(Résultats exprimés en pourcentage de poids sec par litre)

	Protéines	Hexoses	Acide sialique	Hexosamines	Lipides	Cendres	Eau
Adialysable urinaire total	47	16,6	9,7	6,2	3,3	8,5	12,2
Sérum	72	1,8	0,8	1,3	5	-	-



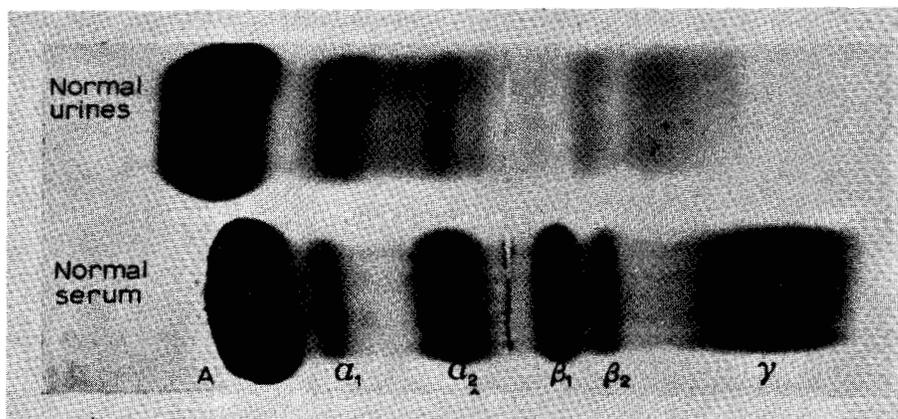


Figure 2

Electrophorèse de sérum et d'urine normale d'après la méthode de WIEME (85).

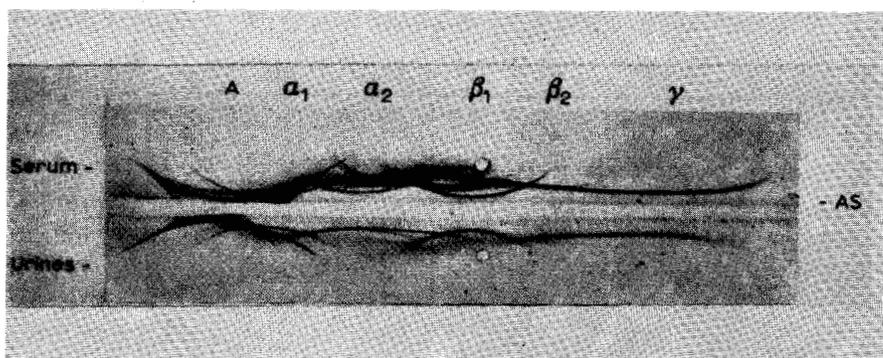


Figure 3

Schéma immunoélectrophorétique d'urine normale. Comparaison avec le sérum normal.  
L'antisérum est un antisérum de cheval anti-sérum humain.



Avant d'étudier les tentatives de fractionnement des glycoprotéines urinaires, nous proposons d'étudier les composés définis et de les classer en quatre groupes :

- . les composés d'origine sérique ;
- . les uromucoïdes ;
- . les glycopeptides ;
- . les complexes MPA-protéine.

## B - LES COMPOSES DEFINIS

### 1° - Les protéines urinaires d'origine plasmatique

#### a) Les séromucoïdes

Les méthodes immunologiques (méthode de OUCHTERLONY et immunoélectrophorèse) ont confirmé l'origine sérique de certains glycoprotides urinaires décelés en électrophorèse.

La figure 3 (p. 18), montre une immunoélectrophorèse de sérum et d'urine contre un anti-sérum de cheval. L'urine donne une dizaine d'arcs de précipitation. Ces méthodes associées aux techniques d'ultracentrifugation et de diffusion libre, ont permis l'identification plus précise des composés plasmatiques de l'urine : GRANT (86), PATTE et al. (87), KEUTEL et al. (88), BISERTE, HAVAZ et HAYEM-LEVY (89), HEREMANS, VAERMAN et HEREMANS (90), DE VAUX St CYR et al. (91).

On admet généralement la présence régulière dans l'urine normale d'une vingtaine de protéines sériques dont la plus grande partie est identifiée.

Ce sont :

- . La préalbumine de SCHULTZE (92)
- . L'albumine : GRANT (93)

- . L' $\alpha_1$ -séromucoïde : PATTE et al. (94)
- . L' $\alpha_1$ -lipoprotéine : BERGGARD (95)
- . L' $\alpha_1$ -antitrypsine : PATTE et al. (96)
- . La céruléoplasmine : BERGGARD (97)
- . L'haptoglobuline : PATTE et al. (98)
- . L' $\alpha_2$ -macroglobuline : BERGGARD (99), REVILLARD (100)
- . La transferrine : PATTE et al. (101)
- . La  $\beta_1$ A-globuline : BERGGARD (102)
- . La IgA-globuline : PATTE et al. (103)
- . La fibrinogène : BERGGARD (104)
- . Les Ig-globulines : GRANT (105)
- . La Ba- $\alpha_2$ -glycoprotéine
- . La Zn- $\alpha_2$ -glycoprotéine
- . Un composant de groupe sanguin
- . L'hémopexine
- . La  $\beta_{1E}$ -globuline.

Ces cinq dernières ont été identifiées par BERGGARD, CLEVE et BEARN (106).

En outre, CORNILLOT, BOURRILLON, MICHON et GOT (107) ont isolé une  $\gamma$ -globuline de constante de sédimentation 3,5 S différente de la  $\gamma$ 7S par son poids moléculaire et ses caractéristiques immunochimiques et qui serait un produit de dégradation des globulines sériques.

Les principales caractéristiques des protéines plasmatiques de l'urine par rapport aux protéines du sérum sont d'avoir un poids moléculaire plus faible et une partie glucidique plus importante que les fractions correspondantes du plasma : BERGGARD (108. 109).

### b) Les hormones gonadotropes

Les urines contiennent d'autres glycoprotéines qui proviennent du sang. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire, douées de propriétés biologiques importantes. Citons, les hormones protéiques, la corticotropine, l'érythropoïétine et les substances de groupe sanguin.

La seule gonadotropine urinaire que l'on trouve en quantité appréciable est la gonadotropine du chorion, présente dans l'urine de femme enceinte. Elle a été étudiée particulièrement par GURIN, BACHMAN et WILSON (110). GOT et BOURRILLON (111) ont montré que la gonadotropine humaine postménopausale est inactivée par la neuraminidase.

La corticotropine a été signalée par BONAR et PERKINS (112).

### c) L'érythropoïétine

Il existe une substance dans le sang et dans l'urine des animaux et des hommes anémiques qui stimule l'érythropoïèse.

HODGSON et TOHA (113) furent les premiers, en 1954, à démontrer une activité érythropoïétique dans l'urine. Par extraction alcoolique, HODGSON et al. (114, 115) identifièrent l'activité dans une substance adialysable qui contient des hexoses, des osamines et des acides sialiques. Comme l'héparine, l'érythropoïétine urinaire donne une réaction métachromatique avec le bleu de toluidine : WINKERT et al. (116).

### d) Les glycoprotéines à activité de groupe sanguin

Les glycoprotéines ayant une activité de groupe sanguin sont généralement identifiées par leurs réactions sérologiques avec les érythrocytes. On les a identifiées dans de

nombreux liquides biologiques, tels que mucines gastriques, salive, urine.

Dans l'urine, FREUDENBERG et EICHEL (117, 118) étudient des substances ayant une spécificité pour les groupes sanguins A, O, B. La substance à activité de groupe A est généralement plus abondante et plus facile à isoler. L'activité de groupe sanguin pour les substances se rapportant aux groupes A et B a été démontrée par KING, FIELDEN et BOYCE (119) et KING, FIELDEN, GOODMAN et BOYCE (120). Ces glycoprotéides renferment jusque 80 p. 100 de glucides totaux, essentiellement du galactose, du fucose, de la N-acétylglucosamine et de la N-acétylgalactosamine.

## 2° - Les uromucoïdes

### a) La glycoprotéine de TAMM et HORSFALL

Avec un antisérum obtenu contre des "colloïdes" urinaires totaux et absorbé avec les protéines plasmatiques, GRANT (121) montre la présence dans les urines humaines de 12 composés antigéniques au moins qui ne peuvent être détectés dans le sérum. Il est le premier à décrire des schémas d'immuno-électrophorèse obtenus de cette façon.

L'un de ces composés est la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL (122, 123) qui est le seul uromucoïde isolé jusque maintenant. C'est une "mucine" insoluble à froid. L'homme en excrète environ 25 mg par litre d'urine.

### - Préparation

Elle est précipitée de l'urine totale en amenant celle-ci à une concentration en NaCl de 0,58 M. Il se forme un précipité que l'on recueille par centrifugation : TAMM et HORSFALL (124).

Elle a été isolée également par précipitation éthanolique, précipitation isoélectrique, par addition d'acide, de bromure de cétyltriméthylammonium, d'acide benzoïque : ANDERSON (125), ANDERSON et MAC LAGAN (126, 127) et par ultracentrifugation : ADA et GOTTSCHALK (128).

#### - Nature physico-chimique

Sa composition en glucides a été étudiée par GOTTSCHALK (129) et par ODIN (130). Elle contient environ 20 p. 100 de sucres liés et 9 p. 100 d'acide sialique (Tableau p. 24). On voit qu'elle varie selon les auteurs et l'on peut se demander s'il ne s'agit pas d'un mélange, bien qu'elle se comporte en électrophorèse (PELMANN, TAMM et HORSFALL) (131) et en ultracentrifugation (TAMM, BUGHER et HORSFALL) (132), comme une substance homogène.

La composition en amino-acides a été étudiée spécialement par MAXFIELD et STEFANYE (133), FRIEDMAN et JOHNSON (134) et par FLETCHER, NEUBERGER et RATCLIFFE (135) (Tableau VI p. 25). Ces derniers auteurs (136) ne peuvent mettre en évidence d'acides N-terminal dans la glycoprotéine native, mais, après action du bromure de cyanogène, ils obtiennent un amino-acide N-terminal par sous-unité correspondant à une masse moléculaire de  $79\ 000 \pm 6\ 000$ .

Des études en ultracentrifugation de MAXFIELD (137) ont montré que la substance décrite par TAMM et HORSFALL est un mélange de deux composés principaux ayant des constantes de sédimentation de 20 S et 65 S et des poids moléculaires de  $7.10^6$  et  $28.10^6$  respectivement. Les deux formes ont le même comportement électrophorétique et sont également visibles au microscope électronique, sous forme de filaments flexibles : MAXFIELD (138). Les molécules les plus grandes seraient des tétramères des autres, associés côte à côte ou bout à bout (voir la figure 4 ; p. 26).

TABLEAU V

Composition centésimale en oses  
de la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL

	GOTTSCHALK (139)	ODIN (140)	FLETCHER et al. (141)
Hexoses	8,1	6,8	11,5 ± 0,2
Fucose	1	0,7	0,8 ± 0,2
Galactose	5,4	-	
Mannose	2,7	-	
Xylose	traces		
Hexosamine	7,6	6,4	11,2 ± 0,2 (c)
Acide sialique	5	7,3 (a)	4,4 ± 0,2 (d)
		8,2 (b)	
		9,4	
		9,1 (a)	
		9,2 (b)	
		9,1	
		9,4 (b)	
		9	
		1,1	
		Ultra-centrifugation	
		Relargage par NaCl 0,58 M	
		Précipitation éthanologique	
		Préparation modifiée selon ADA et GOTTSCHALK (142)	

- (a) Dosage par le réactif de BIAL, d'après WERNER et ODIN (143)
- (b) Dosage par le réactif d'ERLICH, d'après WERNER et ODIN (144)
- (c) Exprimé en N-acétylhexosamine
- (d) Dosage par la méthode de WARREN (145)  
après hydrolyse dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50mM à 80° C, 1 h

TABLEAU VI

Composition en amino-acides de  
la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL  
(en résidus pour 100 résidus dans la protéine)

	MAXFIELD et STEFANYE (a) (146)	FRIEDMANN et JOHNSON (a) (147)	FLETCHER et al. (148)
Acide aspartique	11,83	11,75	10,90
Thréonine	8,22	7,67	7,63
Sérine	8,55	8,00	7,86
Acide glutamique	8,55	9,22	8,44
Proline	5,61	4,73	4,26
Glycocolle	8,88	8,28	8,41
Alanine	6,72	7,89	6,79
Valine	6,89	5,91	6,40
Cystine	2,17	7,12	8,41 (b)
Méthionine	2,22	2,05	2,05
Isoleucine	2,67	2,55	2,46
Leucine	8,27	7,64	7,58
Tyrosine	2,78	3,15	3,83
Phénylalanine	3,44	3,35	3,14
Lysine	2,78	3,10	2,65
Histidine	2,78	2,54	2,67
Arginine	4,72	3,92	4,49
Tryptophane	2,94	1,11	1,68

(a) Recalculé d'après les données des auteurs

(b) Déterminé en acide cystéique



Figure 4

La glycoprotéine de TAMM et HORSFALL, vue au microscope électronique d'après MAXFIELD (149).

La marque représente 1  $\mu$ .

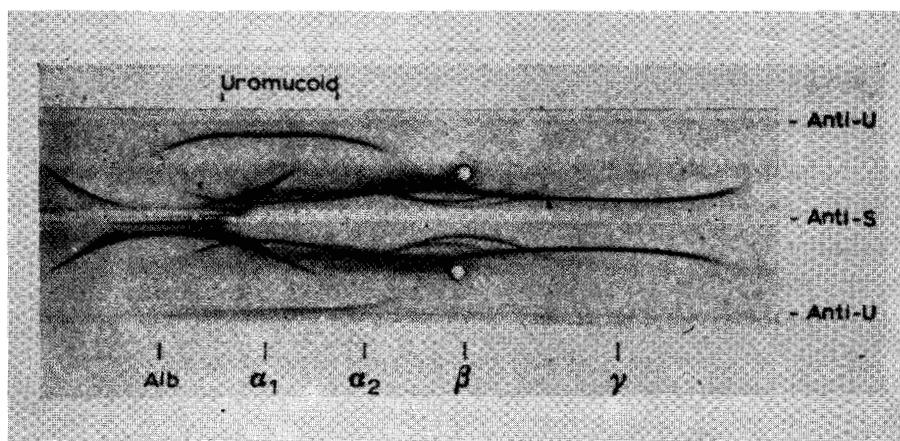


Figure 5

Analyse immunoélectrophorétique de l'uromucoïde  
(Anode à gauche)

- Anti U : sérum de lapin anti-uromucoïde
- Anti S : sérum de lapin antisérum humain.



En immunoélectrophorèse (GRANT (150), HEREMANS et al. (151), VAERMAN et HEREMAN (152)), elle migre entre l'albumine et l' $\alpha_2$  globuline. Il apparaît un arc de précipitation à double incurvation et on ne sait pas, à l'heure actuelle, s'il s'agit de deux composés distincts ou simplement de formes polymères différentes de la glycoprotéine (Figure 5 p. 26).

#### - Propriétés biologiques et physiologiques

La glycoprotéine de TAMM et HORSFALL possède la propriété de se combiner avec les virus de l'influenza, des oreillons et de la maladie de NEWCASTLE et d'inhiber ainsi la réaction d'hémagglutination entre les hématies et les virus.

Sensiblement constant chez l'homme adulte, le taux d'excrétion de la glycoprotéine diminue avec l'âge et parallèlement on observe des taux plus élevés chez les enfants : SUDHOF, KRIEGER, SCHULTZ (153).

#### b) Autres uromucoïdes

##### - La substance de DONAGGIO

La substance de DONAGGIO (154, 155, 156) décrite en 1931, responsable du "phénomène d'obstacle", caractéristique de l'état de fatigue ou de certaines maladies typhoïde, rhumatisme, cancer, a été isolée et identifiée à une glycoprotéide par TAYEAU (157) et TAYEAU, BISERTE, MONTREUIL et MARQUEVIELLE (158). Sa composition est donnée dans le tableau VII (p. 28).

Cependant, il semble d'après les travaux de TAYEAU, JENSEN et REISS (159) que le "phénomène d'obstacle" soit dû aux variations quantitatives des glycoprotéides urinaires et la substance de DONAGGIO ne représenterait que l'ensemble des mucoïdes urinaires.

TABLEAU VII

Composition en oses des différentes préparations de mucoïdes urinaires  
d'après BISERTE et TAYEAU (160)

	Proportions moléculaires				Osamines	Acides uroniques	Acide sialique
	Gal	Glc	Man	Xyl			
Adialysable urinaire	10	2	6	4	1	3 à 15	10 à 11
Mucoïde de DONAGGIO	10	2	7	0	7	-	-
Mucoïde de ANDERSON et Mac LAGAN	10	0	4	1	1	-	-
Glycoprotéïdes sanguins totaux	2	+	3	+	0	-	-
Mucoïde de TAMM et HORSFALL	5,4	0	2,7	-	1	6,6 à 9,4	5 à 9

Gal : Galactose      Glc : Glucose      Man : Mannose      Xyl : Xylose  
Fuc : Fucose



- Les glycoprotéines de ANDERSON et MAC LAGAN

ANDERSON et MAC LAGAN (161) ont décrit une méthode d'isolement d'un mucoïde urinaire par adsorption sur l'acide benzoïque puis dissolution dans l'acétone. Ils obtiennent deux fractions, appelées "mucoprotéines A et B", chimiquement très semblables, contenant 10,5 p. 100 d'azote et 14,4 p. 100 d'osamines (Tableau VII ; p. 28).

En fait, s'il s'agit d'un mélange complexe dont l'hétérogénéité a été montrée en immunoélectrophorèse par HAYEM-LEVY (162) qui identifie l'orosomucoïde, une  $\alpha_2$ -globuline, une  $\beta_1$ - et une  $\beta_2$ -globuline. La préparation renferme en outre, des substances à spécificité de groupe sanguin, des inhibiteurs de l'hémagglutination de virus et des gonadotropines : ANDERSON, LOCKEY et MAC LAGAN (163).

- Le mucopolyoside de DI FERRANTE

De même, le mucopolyoside isolé par DI FERRANTE et RICH (164), au moyen de la précipitation au cétavlon et apparemment identique au chondroïtine-sulfate est un mélange complexe de MPA, contenant également la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL et sans doute d'autres glycoprotéines.

3° - Les glycopeptides

Il existe dans l'urine un grand nombre de composés de masse moléculaire inférieure à 15 000 et renfermant jusqu'à 80 p. 100 d'oses. Dans cette catégorie entrent les "glycopeptides" de BLIX (165), BOURRILLON et al. (166, 167), HAKOMORI et al. (168), et les "mucosaccharides" décrits par MIETTINEN (169, 170).

Il est malaisé de définir exactement ces constituants urinaires lorsque les auteurs les fractionnent

en utilisant des méthodes différentes d'extraction. Les comparaisons ne sont possibles que lorsque des substances pures peuvent être isolées et que leur composition en oses et acides aminés est déterminée.

Nous distinguerons :

- a) des glycopeptides riches en acide sialique,
- b) des glycopeptides riches en fucose,
- c) des glycopeptides riches en osamines,
- d) des glycopeptides riches en acide uronique,
- e) des glycopeptides riches en hydroxyproline.

a) Glycopeptides riches en acide sialique

Dans le fractionnement éthanolique mis au point par BOURRILLON et al. (171), les glycopeptides se trouvent dans la fraction soluble dans l'éthanol à 50 p. 100. Bien que présentant un seul pic en ultracentrifugation (I S), cette fraction se révèle très hétérogène en électrophorèse. Elle est constituée de galactose, glucose, mannose, fucose, glucosamine, galactosamine et acide sialique, c'est-à-dire les mêmes constituants glucidiques que ceux des glycoprotéines sériques. La teneur en glucides est très élevée et peut dépasser 90 p. 100.

Tout récemment, CARRION, BOURRILLON et CABEZAS (172) ont isolé et caractérisé deux sialoglycopeptides particulièrement riches en acide sialique (30 p. 100) (voir le tableau VIII ; p. 32). D'après les auteurs, ces glycopeptides seraient d'origine tissulaire.

b) Glycopeptides riches en fucose

Des fractions glycopeptidiques riches en fucose sont décrites par LUNDBLAD (173). Par gel filtration

et électrophorèse préparative, l'auteur obtient trois glycopeptides assez purs pour être caractérisés chimiquement. Ces fractions à haut pourcentage de fucose et faible taux d'acide sialique ont une composition proche des antigènes de groupe sanguin mais ils sont sérologiquement inactifs.

HAKOMORI, KAWAUCHI et ISHIMODA (174) ont étudié les glycopeptides dialysables de l'urine normale et isolé trois composés renfermant outre des acides aminés, du glucose, du galactose et du fucose, composition proche de glycopeptides du tissu conjonctif de l'aorte. Leurs propriétés chimiques indiquent une structure N-peptidyl-I-cétosamine (voir tableau VIII ; p. 32).

#### c) Glycopeptides riches en osamines

MAC GALE et JEVONS (175, 176, 177) utilisant le fractionnement sur Zeocarb 225 puis la filtration sur Sephadex G 25 et des électrophorèses préparatives, caractérisent deux glycopeptides riches en osamines, sans acide uronique, et dont l'un est dépourvu d'acide sialique (Tableau VIII ; p. 32).

D'autres composés de faible poids moléculaire et contenant des osamines ont été signalés par PECHAN (178), BRADA (179), VERMOUSEK et BRADA (180). Ce sont en partie des oligosaccharides mais aussi des glycopeptides qui, pour la plupart, sont dialysables.

#### d) Glycopeptides riches en acide uronique

BASU (181) a récemment isolé et cristallisé un glycopeptide urinaire, contenant de l'acide glucuronique. A notre connaissance, c'est le seul composé urinaire qui ait été jusqu'à présent cristallisé.

TABLEAU VIII

Comparaison des glycopeptides urinaires

	CHERIAN et al. (182)	CARRION et al. (183)	LUNDBLAD (184)	Mac GALE et al. (185)	BASU (186)	HAKOMORI (187)
Résultats	Rapports molaire	µ mole/mg de substrat	p. 100 du poids sec	Rapports molaire	Rapports molaire	p. 100 du poids sec
Dénomination		I : II	A <sub>3b</sub> : B : C : Fb	1 : 2		I : II : III
Osés neutres	4,52	1,02 : 0,90	73,8 : 51 : 67,1		10	
Hexoses			50,1 : 34,4 : 40,4	12,0 : 4,0		13,5 : 5,6 : 7,5
Fucose		0,37 : 0,31	23,7 : 16,6 : 26,7	1,0 : 1,5		5,6 : 0,2 : 2,5
Osamines	0,83	0,95 : 0,45		16,5 : 16,0	1	0 : 0 : 3,5
Glc NH <sub>2</sub>			23,9 : 17,4 : 15,4	+ : +	+	+
Gal NH <sub>2</sub>			6,4 : 2,9 : 3,3	+ : +	+	+
Acide sialique	1,52	0,94 : 5,7	1,0 : 3,6 : 1,0	2,0 : 0	0	0 : 0 : 0
Acide uronique	5,17	0 : 0		0 : 0	1	0 : 0 : 0
Acides aminés totaux	18,16		6,9 : 19,2 : 10,4			
Proline	1,00	0 : 0	0 : 0 : 0		0	- : + : +
OH-Pro	1,21	0 : 0	0 : 0 : 0		0	- : + : +



La partie peptidique est constituée de sérine, glycolle, alanine, acide aspartique et acide glutamique. La partie glucidique renferme du galactose, du xylose, de l'acide glucuronique, de la glucosamine et de la galactosamine (Tableau VIII ; p. 32). Ce glycopeptide proviendrait du métabolisme des glycosaminoglycannes.

Le glycopeptide de CHERIAN et RADHAKRISHNAN (188) contient également de l'acide glucuronique.

#### e) Glycopeptides riches en hydroxyproline

En 1965, CHERIAN et RADHAKRISHNAN (189) ont décrit un glycopeptide caractérisé par une partie glucidique riche en acide uronique et surtout par une partie peptidique riche en hydroxyproline et sarcosine (Tableau VIII ; p. 32). La présence de proline et d'hydroxyproline semblerait indiquer que ce glycopeptide dérive du collagène. Mais l'existence de sarcosine qui ne se trouve pas dans le collagène et la nature du glycanne suggèrent qu'il dérive d'un groupement protéine-glucide plus complexe.

Enfin, BOURRILLON et VERNAY (190) ont trouvé également deux glycopeptides à proline et hydroxyproline dans le surnageant alcoolique S50.

En conclusion, la fraction glycopeptidique urinaire, plus importante pondéralement (60-70 p. 100 de l'adialysable total) que la fraction glycoprotéinique semble être aussi complexe, si ce n'est plus, que cette dernière.

La différence de composition existant entre les glycopeptides étudiés montre une différence d'origine de ces composés. On considère souvent que ce sont des produits du métabolisme soit de glycoprotéines, soit de glycosaminoglycane de poids moléculaire plus élevé. En effet, le taux d'excrétion

de certains glycopeptides augmente dans les processus inflammatoires et néoplasiques : MASAMUNE (191), DI FERRANTE (192). Mais une origine post-rénale ne peut être exclue.

#### 4° - Les complexes MPA-protéines

Bien que n'étant pas de nature protéique, les MPA doivent être mentionnés ici parce qu'ils se trouvent le plus souvent associés à des protéines ou à des chaînons peptidiques par des liaisons O-glycosidiques de sérine et de thréonine. De nombreux travaux ont été réalisés sur ce sujet, concernant le mode de liaison dans les mucopolysaccharides de tissu conjonctif en particulier : MUIR (193), RODÉN et al. (194), LINDAHL et RODÉN (195).

Un chaînon chondroïtine-sulfate-polypeptide a été isolé à partir des MPA urinaires par VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (196). La partie peptidique est particulièrement riche en sérine, glycolle et acide glutamique.

#### C - FRACTIONNEMENT DE L'ADIALYSABLE URINAIRE

De très nombreux travaux ont été effectués pour tenter d'isoler des entités glycoprotidiques à partir de l'adialysable urinaire. Nous étudierons les plus significatifs, en les classant d'après les méthodes de fractionnement utilisées

- 1 - Précipitation alcoolique
- 2 - Précipitation par le sulfate d'ammonium
- 3 - Ultracentrifugation
- 4 - Filtration sur gel

## 1° - Précipitation alcoolique

BOURRILLON et KAPLAN (197) fractionnent les composés urinaires selon leur solubilité dans l'éthanol à différentes concentrations. Leur méthode, décrite en 1960, est schématisée dans la figure 6 (p.36). Ils obtiennent ainsi quatre fractions, précipitables à 50, 60, 80 et 90 p. 100 d'alcool qu'ils analysent qualitativement et quantitativement. Les principaux résultats sont groupés dans le tableau IX (p. 37).

La fraction F 50 est la moins riche en glucides. Par immunoélectrophorèse contre un antisérum normal, on y met en évidence sept protéines d'origine plasmatique, dont certaines ont été caractérisées comme nous l'avons vu précédemment.

Les fractions F 60, F 80 et F 90 n'ont pas de caractère antigénique vis-à-vis de l'antisérum humain. On y trouve en majeure partie des composés de poids moléculaire inférieur à 15 000, de nature glycopeptidique.

De cette étude, complétée par d'autres travaux de sous-fractionnement, en particulier ceux de BOURRILLON, GOT, MICHON (198) et de BOURRILLON, GOT, CORNILLOT (199), il ressort une complexité indiscutable de l'adialysable urinaire.

DISCHE et al. (200) proposent un schéma de composition des glycanes des glycoprotéines urinaires ultra-filtrables mais non dialysables, après un fractionnement par l'isopropanol à quatre concentrations différentes : 67, 75, 83 et 87 p. 100. La solution surnageante de la fraction 87 p. 100 est, en outre, précipitée par l'addition de sept volumes d'isopropanol et de huit volumes d'éther sulfurique.

Ces cinq fractions, soumises à l'électrophorèse préparative en flot continu, donnent quarante sous-fractions caractérisées par leur rapport acide sialique/fucose et par leur mobilité électrophorétique ; toutes sont hétérogènes.

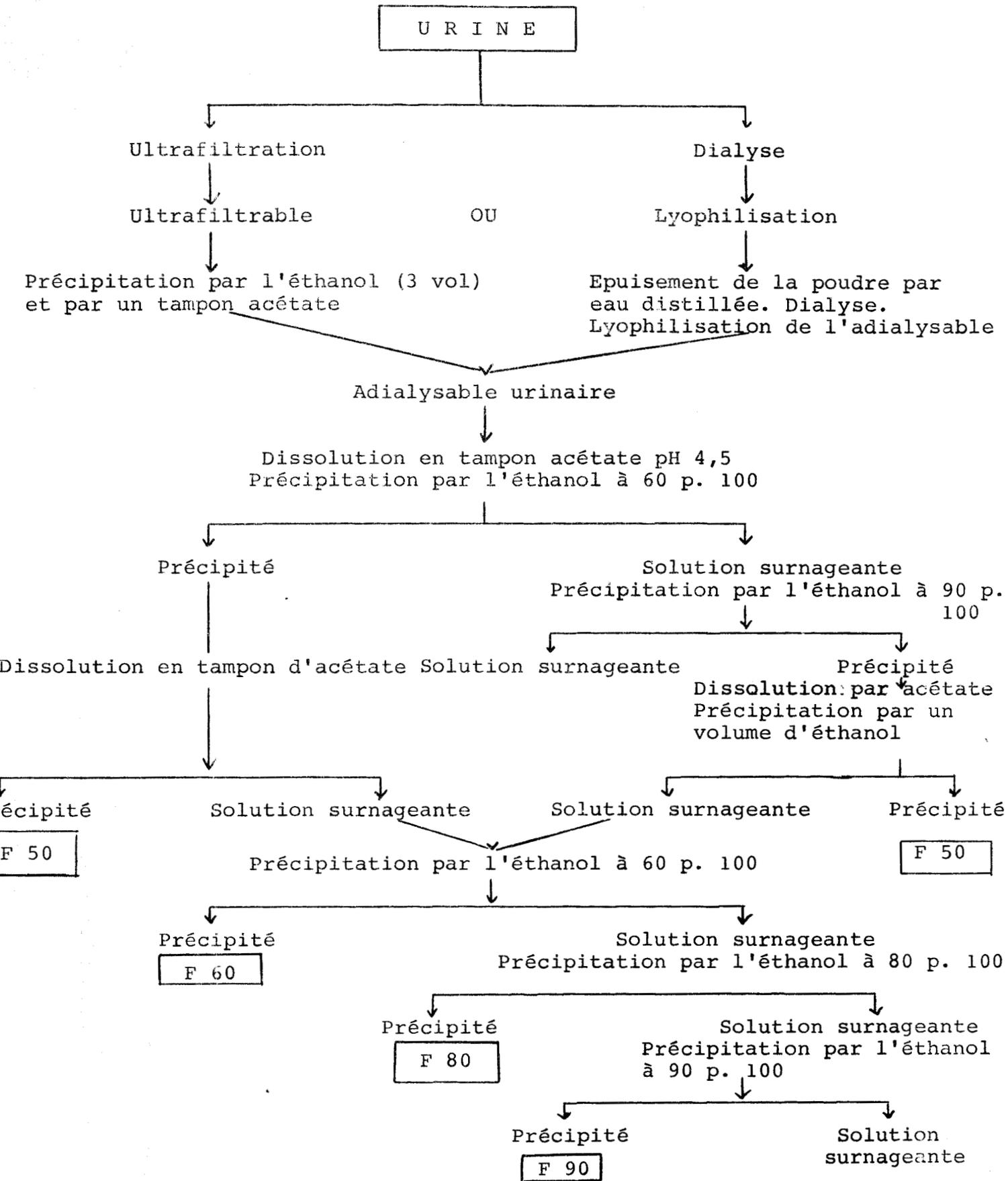


Figure 6

Fractionnement des glycoprotides urinaires  
(d'après BOURRILLON et KAPLAN) (201)



TABLEAU IX

Composition des fractions de BOURRILLON et KAPLAN (202)

Fractions	Poids sec en mg/l	Hexoses	Fucose	N-acétyl- osamines	Acide sialique
Urine totale	141	14,5 (13,4 à 15,2)	2,9 (2,7 à 3,2)	11,4 (10,6 à 12)	9,7 (8,8 à 10,2)
F 50	47 (38 à 52)	8,7 (8,1 à 9,6)	1,25 (1,1 à 1,4)	7,5 (6,1 à 8,5)	3,4 (3,1 à 3,6)
F 60	30 (26 à 37)	15,2 (14 à 16,1)	1,8 (1,7 à 2,1)	12,5 (11,1 à 12,9)	8,5 (8,2 à 9)
F 80	50 (43 à 61)	21 (19,8 à 23,2)	3,36 (3,1 à 3,7)	13,7 (11,6 à 15)	13,5 (13 à 14,1)
F 90	25 (21 à 27)	24 (22 à 26,7)	4,4 (4,2 à 4,5)	18 (16,5 à 21,4)	14,2 (13,8 à 15,5)



Les auteurs ont tenté de classer leurs préparations glycoprotéidiques d'après leur composition glucidique et ils proposent de les comparer avec les différents glycoprotéides tissulaires d'où ils tireraient leur origine.

## 2° - Précipitation par le sulfate d'ammonium

KAO et al. (203, 204), ont décrit une méthode simple de fractionnement de l'adialysable urinaire qui, selon les auteurs, a l'avantage de ne pas dénaturer les composés.

Après élimination de la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL, l'adialysable urinaire est précipité par le sulfate d'ammonium 100 p. 100. Le précipité obtenu, exempt de mucopolysaccharides et de glycopeptides, est à nouveau traité par des concentrations croissantes de sulfate d'ammonium ce qui permet de séparer les glycoprotéines en groupes de poids moléculaire décroissant. Une chromatographie sur DEAE-cellulose permet aux auteurs de classer les composés urinaires selon leur taux d'acide sialique. Mais toutes les fractions obtenues sont hétérogènes en électrophorèse.

## 3° - Ultrafiltration

### a) Travaux de BERGGARD

BERGGARD (205) emploie la méthode d'ultrafiltration en tubes de cellophane Visking pour fractionner l'urine après avoir calibré les membranes utilisées et obtient trois fractions principales A, B et C.

La fraction A, de poids moléculaire compris entre 30 000 et 40 000, contient toutes les protéines sériques excrétées dans l'urine, sauf une partie des  $\alpha$ -globulines de faible poids moléculaire qu'on retrouve dans B. Les fractions B

(molécules de PM 10 000 à 15 000) et C (molécules de PM 4 000) sont composées essentiellement de glycopeptides. Dans chacune de ces fractions, l'auteur met en évidence plusieurs composés à acide uronique, correspondant à des mucopolysaccharides plus ou moins polymérisés.

Le fractionnement est reproductible mais donne des composés très hétérogènes.

b) Travaux de BOYCE, KING et al. (206)

Les auteurs proposent une technique de fractionnement reproductible et tentent, pour la première fois, d'effectuer la synthèse des résultats obtenus par d'autres travaux.

Le mode opératoire est résumé dans la figure 7 (p. 41) et les résultats concernant l'analyse des trois fractions principales sont rassemblés dans le tableau X (p. 42).

La fraction ultrafiltrable UFO, qui représente 67 p. 100 des composés urinaires, contient des glycopeptides, des substances à activité de groupe sanguin et une partie des mucopolysaccharides acides précipitables au bromure de cetyltriméthylammonium. KING et BOYCE (207) ont sous-fractionné ces derniers par le sulfate d'ammonium, ils obtiennent 6 sous-fractions riches en acide uronique, mais aucune n'est une entité physico-chimiquement définie.

Dans la fraction non ultrafiltrable, on peut distinguer RI qui est constituée par la glycoprotéine de TAMM et HORSFALL (208) et RSI. Cette dernière préparation a été sous-fractionnée par une méthode dérivée du fractionnement de COHN pour le plasma : BOYCE et KING (209). RSI contient toute la sérum albumine de l'urine et toutes les protéines sériques de plus grande taille que l'albumine. Parmi les composés plus petits, des substances de groupe sanguin sont identifiées par

chromatographie sur DEAE-cellulose : KING, FIELDEN, GOODMAN et BOYCE (210). Enfin, en associant la précipitation par le sulfate d'ammonium et la chromatographie sur DEAE, les auteurs isolent les mucopolysaccharides à partir de la fraction RSI.

Les résultats de BERGGARD (211) sont difficilement comparables à ceux de BOYCE et al. (212) car ces derniers n'ont pas déterminé la limite de taille des molécules ultrafiltrables. Cependant, d'après leur composition centésimale, une partie de la fraction A de BERGGARD (213) correspondrait à la fraction non ultrafiltrable RSI de BOYCE et al. (214) et aux fractions CPC II et MPA + glycopeptides de KAO et al. (215).

#### 4° - Filtration sur gel

La filtration sur gel de dextranne ou tamisage moléculaire permet un fractionnement de base des constituants d'un mélange selon leur taille moléculaire. Ces dernières années, cette méthode a été employée par de nombreux auteurs pour purifier des préparations de composés urinaires, en particulier : BERGGARD (216), STEVENSON (217), HAKOMORI (218), BOURRILLON (219) ou pour les doser : MAC KENZIE et al. (220), DAVIS, FLYNN et PLATT (221).

MIETTINEN (222, 223), après passage de l'urine concentrée sur Sephadex G-25, obtient avec une bonne reproductibilité, quatre fractions A, B, C, D dont la composition est donnée dans le tableau XI (p. 42). La fraction A contient les colloïdes urinaires et les mucopolysaccharides et représente l'adialysable urinaire qu'il est ainsi possible de séparer facilement de la fraction dialysable.

D'autre part, MIETTINEN et HUTTUNEN (224), par chromatographies successives sur Dowex 2 et sur Charbon-Célite, montrent l'hétérogénéité des zones B et C, constituées en majeure partie de substances dialysables.

U R I N E

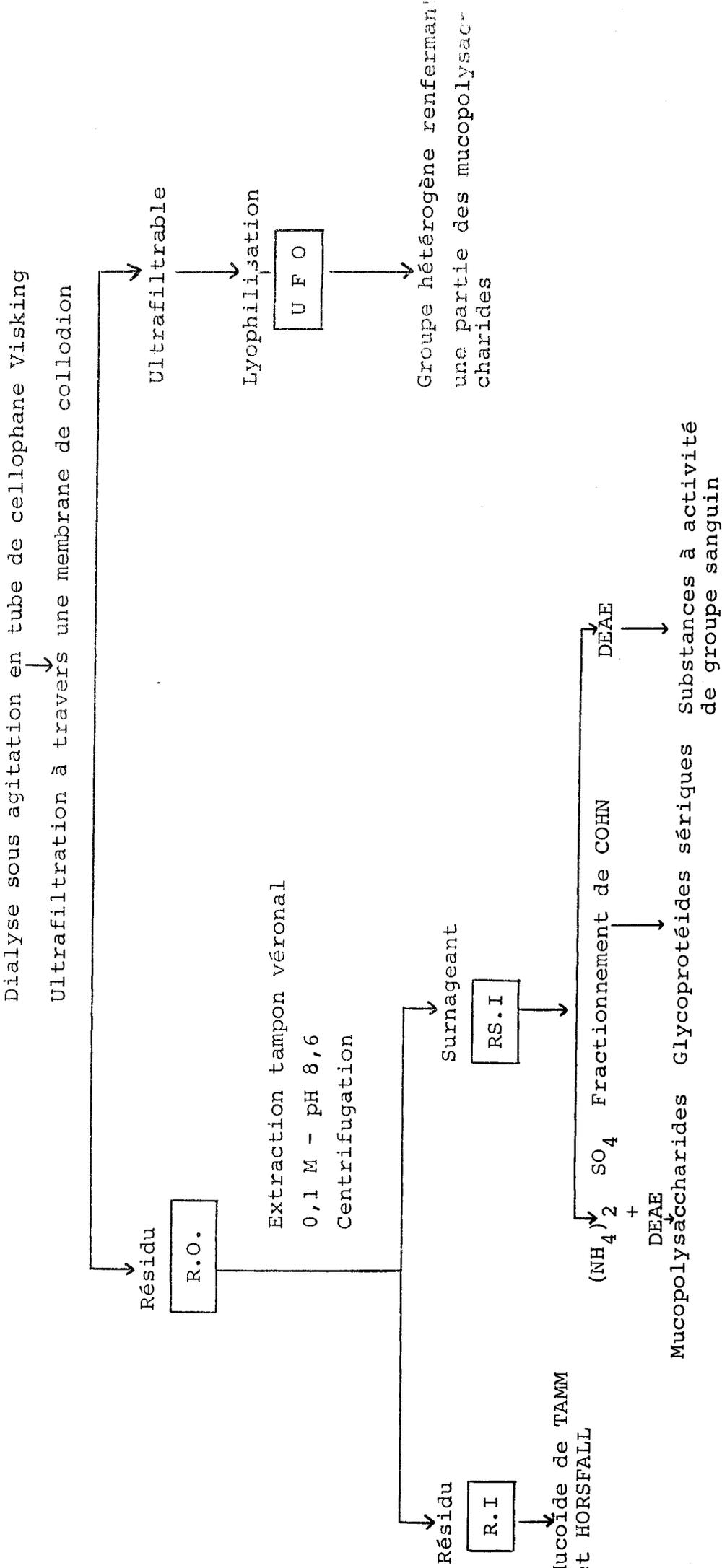


Figure 7

TABLEAU X

Composition des fractions de BOYCE et al. (226)  
(en p. 100 du poids sec)

Fractions	Hexoses		Hexosamines		Acides sialiques	Acides uroniques
	Méthode à l'anthrone (a)	Méthode à l'orcinol (b)	Homme	Femme		
R <sub>1</sub>	13,52 ± 0,76	8,03 ± 0,53	6,24 ± 0,23	4,14 ± 0,23	3,52 ± 0,91	-
RS <sub>1</sub>	11,96	8,63	6,03 ± 0,31	6,16 ± 2,23	6,09 ± 1,23	-
UFO	21,59 ± 2,57	15,20 ± 0,60	10,41 ± 0,77	8,66 ± 0,59	10,55 ± 0,69	1,33 ± 0,18

(a) Méthode à l'anthrone de SCOTT et MELVIN (227)

(b) Méthode à l'orcinol de WEIMER et MOSHIN (228)



TABLEAU XI

Composition des fractions de MIETTINEN (229)  
(Urines de la nuit)

Fractions	Hexoses		Hexosamines		Acides sialiques		Acides uroniques		Protéine:
	mg/12 H	p. 100	mg/12 H	p. 100	mg/12 H	p. 100	mg/12 H	p. 100	
A	30,8	8,3	17,0	33,2	17,5	37,8	7,9	3,6	79,0
B	27,8	7,2	6,5	12,2	9,7	21,2	7,0	3,3	-
C	330,5	24,5	27,6	54,6	18,8	41,0	107,7	47,9	-
D	-	-	-	-	-	-	98,5	45,2	-
TOTAL	388,1	100	51,1	100	46,0	100	221,1	100	79,0



LUNDBLAD et BERGGARD (230) obtiennent des résultats concordants par gel filtration sur Sephadex G-25 du matériel urinaire ultrafiltrable. Ils déterminent par dosage des hexoses à l'anthrone, le profil de six pics reproductibles, correspondant aux fractions B et C de MIETTINEN (231) et les étudient.

De plus, la gel filtration sur Sephadex G-25 et G-75, associée à l'électrophorèse de zone, a permis à LUNDBLAD (232, 233) d'isoler trois glycopeptides à taux élevés de fucose dont nous avons vu la composition dans le tableau VIII (p. 32).

La filtration sur Sephadex G-50 a été employée par VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (234), dans une étude sur les mucopolysaccharides acides. Les auteurs séparent l'adialysable urinaire en deux pics :

- Le premier contient les acides uroniques mucopolysaccharidiques.

- Le second pic, de poids moléculaire plus faible, contient également des acides uroniques mais, cette fois, non précipitables par le Cétavlon et dont la nature n'a pas été déterminée.

HARRISSON et NORTHAM (235) utilisent de la Sephadex G-100 en colonne ou en couche mince. Associée à une étude électrophorétique et immunochimique, cette méthode a permis aux auteurs de mettre en évidence, dans les cas de maladies rénales, une augmentation de l'excrétion des protéines plus légères que l'albumine et des variations de la nature de ces protéines.

Citons, enfin, les travaux des Russes FEDOROV et KASATKIN (236, 237) qui ont tenté de séparer des composés de faible poids moléculaire de l'urine humaine sur gels de Sephadex G-25, G-50, G-75. Dans les conditions expérimentales utilisées par les auteurs, le meilleur pouvoir séparateur est observé avec les colonnes de G-75-médium. Mais aucune des substances isolées n'est homogène.

## D - GLYCOPROTEINES ET CANCER

L'intérêt de la relation entre glycoprotéines et cancer vient en grande part de l'observation que les taux de sucres liés à des protéines, dans le sang, subissent une augmentation significative au cours des processus néoplasiques : WINZLER (238, 239). Mais ce phénomène apparaît aussi dans d'autres maladies et n'apporte pas beaucoup de renseignements sur l'état cancéreux. Il semble donc important de rechercher l'apparition de substances spécifiques de la présence d'une tumeur.

### 1° - Modifications quantitatives dans les urines de sujets cancéreux.

Selon PECHAN (240), l'apparition d'un cancer ne provoque pas de modification du taux des substances glucidiques urinaires de poids moléculaire faible et renfermant des osamines. De même, STRECKER et MONTREUIL, au laboratoire, n'observent pas de variations importantes sur le taux et la nature des polysaccharides.

En ce qui concerne les glycoprotides sériques, les variations quantitatives les plus importantes ont été signalées par WINZLER et SMYTH (241), dans des expériences réalisées sur les sérums de sujets cancéreux. L'électrophorèse révèle en particulier, une augmentation des glycoprotéines dans la zone des  $\alpha$ -globulines et principalement au niveau de l'orosomucoïde.

Dans l'urine des variations similaires sont probables. LOCKEY, ANDERSON et MAC LAGAN (242) trouvent une augmentation du taux des glycoprotides, en relation avec le degré de dissémination du tissu tumoral. Au contraire, LEYTON et al. (243) observent, sur 10 cas de cancer du col utérin, une diminution de la diurèse et du taux des glycoprotides de l'ordre

de 50 p. 100 (Tableau XII ; p. 47). Cette diminution s'explique difficilement, alors que l'augmentation du taux des glycoprotides dans le sérum et les urines peut s'expliquer, comme l'a signalé CATCHPOLE (244) par une dépolymérisation du tissu conjonctif au voisinage du tissu tumoral et l'apparition de glycoprotides de masse moléculaire faible qui diffusent et parviennent jusque dans le sang et dans les urines.

## 2° - Modifications de la structure des glycoprotides

BISERTE et al. (245) signalaient déjà en 1957 que la composition en glucides de la fraction glycoprotéinique d'urines de cancéreux, isolée selon la méthode d'ANDERSON et MAC LAGAN se caractérisait par une teneur plus élevée en fucose et une augmentation du taux d'hexosamines conjuguées.

KALLE, DEBIASI, KARYPIDIS, HEIDE et SCHWICK (246) ont montré que dans un cas de leucémie myéloïde chronique les glycoprotéides présents dans les urines possédaient une capacité de liaison avec la vitamine B<sub>12</sub> largement supérieure à la capacité de liaison des glycoprotides d'urines de sujets normaux. Ces mêmes auteurs ont montré que l'une des uroglycoprotéines présentes dans les urines de leucémiques, qui possédait la capacité de fixer la vitamine B<sub>12</sub>, était de l'orosomucoïde "immature", c'est-à-dire sans acide sialique.

## 3° - Isolement d'entités spécifiques du cancer

Dans les tissus, un "malignolipide" a été identifié par KOSAKI et al. (247). HAKOMORI et JEANLOZ (248) ont isolé des sphingolipides de membranes à partir d'adénocarcinomes gastrique et bronchique.

Dans les sérums, BURROWS et NEILL (249) ont mis en évidence un polypeptide immunologiquement actif.

TABLEAU XII

Excrétion par 24 heures des "protéoses urinaires"  
chez les sujets normaux et cancéreux (LEYTON et al.) (250)

	Diurèse totale (en ml)	Polypeptides totaux (en mg)	Oses neutres totaux (en mg)	Hexosamines (en mg)	Acides sialiques (en mg)	Acides uroniques (en mg)
Sujets sains	1 300	69 - 100	24 - 25	15 - 27	10 - 23	4,4 - 14
Sujets cancéreux	690	30 - 78	5 - 18	5 - 21	6 - 16	1,2 - 7



Une protéine embryonnaire, l' $\alpha_1$ -foeto-protéine ou fétuine a été trouvée dans le sérum de certains cancéreux ; chez les adultes atteints de carcinome primaire du foie, la fétuine est présente dans 70 p. 100 des cas : URIEL et al. (251) ; elle a été également détectée dans le sérum d'enfants atteints de tératomes ovariens et testiculaires par MAWAS et al. (252) et dans le sérum d'adultes atteints de tératoblastomes testiculaires par ABELEV et al. (253), en 1967.

D'autre part, la présence d'une  $\alpha_2$ H-globuline d'origine hépatique a été démontrée par immunodiffusion et radio-immunodiffusion dans les sérums de cancéreux par BUFFE, RIMBAULT et BURTIN (254), en 1968. Elle est présente dans 50 p. 100 des cas chez les cancéreux, mais aussi dans 20 p. 100 des cas chez les malades non cancéreux.

Dans les urines, les substances spécifiques étudiées jusqu'à présent sont les suivantes :

a) La toxohormone

La toxohormone est une substance (ou un groupe de substance) produite par les cellules cancéreuses vivantes et trouvée dans les tissus, le sang et les urines des cancéreux. Elle possède la propriété d'inhiber la catalase hépatique. Ces recherches ont été effectuées surtout par NAKAMARA et al. (255) et en ce qui concerne les urines, par MASAMUNE et al. (256).

Il a été démontré que la perte d'activité de la catalase était liée à la croissance de la tumeur. La toxohormone n'agirait pas directement sur les molécules de catalase mais elle inhiberait la synthèse de l'enzyme.

b) Le polypeptide spécifique des urines de cancéreux

En 1958, TUNIS, WEINFELD et SANDBERG (257) ont isolé des urines de leucémiques, un polypeptide qui provoque l'inhibition de la précipitation des acides désoxyribonucléiques en présence d'acide trichloracétique.

Cette étude a été reprise en 1962 par TUNIS et WEINFELD (258) qui ont étudié les glycoprotéides de l'urine après précipitation par l'acide benzoïque. Ces auteurs obtiennent ainsi, pour 78 p. 100 des leucémiques, une "fraction II" qui possède la propriété d'augmenter la solubilité des acides désoxyribonucléiques en présence d'acide trichloracétique et d'être très stable vis-à-vis de la chaleur. Une telle "fraction II" n'existe pas -ou seulement à l'état de traces dans les urines de sujets sains.

c) Le mucopolypeptide acide de MASAMUNE

En 1959, MASAMUNE, HAKOMORI et SUGO (259) ont publié une méthode permettant de mettre en évidence un mucopeptide supplémentaire dans certains cas de cancer, en particulier dans le cancer gastrique.

Ce mucopolypeptide, soluble dans l'éthanol à 90 p. 100 et le méthanol à 99 p. 100 et insoluble dans l'alcool et l'acétone, était préparé par précipitation alcoolique suivie d'un traitement à l'acétate de plomb et d'une nouvelle précipitation éthanolique et enfin, repris par l'acétone. Le précipité était alors soumis à l'électrophorèse bidimensionnelle et à la chromatographie sur colonne de Dowex 1 x 2. Mais ce "kappa-mucopeptide" s'est révélé être hétérogène et l'étude n'a pas été poursuivie par les auteurs.

d) La  $\alpha$ -glycoprotéine anormale de HAKOMORI

En 1961, HAKOMORI, ISHIMODA, KAWAUTI et EIDOH (260) ont isolé et caractérisé une glycoprotéine anormale de l'urine de cancéreux. Les auteurs fractionnent les glycoprotéines adsorbables sur l'acide benzoïque par électrodialyse. Une des fractions obtenues, riche en sucres mais pauvre en acide sialique, présente des variations significatives dans sa composition glucidique au cours de la cancérisation ; une  $\alpha$ -glycoprotéine a pu être isolée. Cette  $\alpha$ -glycoprotéine est caractérisée, en comparaison avec la  $\alpha$ -glycoprotéine normale par :

- un poids moléculaire 3 à 4 fois plus élevé,
- un degré de branchement 2 à 2,5 fois plus grand,
- la perte de glucides, en particulier, la diminution du taux oses/osamines.

HAKOMORI et al. (261) étudient alors, dans l'urine de Rat, les variations du rapport hexoses/hexosamines et du degré de branchement en oses terminaux en fonction d'un cancer provoqué et confirment expérimentalement l'observation précédente. D'autre part, ces auteurs observent que le rapport oses totaux/oses terminaux est pratiquement doublé dans le cas de cancer. Les variations de rapport sont l'indice d'une profonde modification de la structure des branchements glycaniques.

e) La glycoprotéine des sujets atteints de plasmocytose

WEICKER, HUHNSTOCK et GRASSLIN (262), en 1963, ont mis en évidence dans l'urine de patients atteints de plasmocytose, une glycoprotéine de poids moléculaire

relativement faible : 19 900, renfermant 38,1 p. 100 d'oses totaux (soit 16,6 p. 100 d'hexoses, 4,5 p. 100 de méthylpentoses, 10,2 p. 100 d'osamines et 6,8 p. 100 d'acide sialique).

L'originalité de cette glycoprotéine tient dans la présence de rhamnose, car ce méthylpentose ne se rencontre jamais dans la structure des groupements glycaniques des glycoprotides d'origine sérique ou urinaire. En immunoelectrophorèse, elle présente une identité antigénique commune partielle contre un antisérum anti-humain dans la région  $\alpha_1$ -globuline.

#### 4° - Conclusions

Ces travaux ont comme point commun d'avoir montré que la nature des glycoprotéines urinaires était modifiée par l'apparition d'un phénomène de cancérisation. Ces modifications ne s'accompagnent pas d'une élévation sensible et spécifique du taux des glycoprotéines urinaires mais portent essentiellement sur l'existence de substances modifiées dont l'étude demandera la mise en oeuvre de méthodes d'analyse très fines.

#### IV - CONCLUSIONS

Si l'on fait exception des protéines sériques, de la mucoprotéine de TAMM et HORSFALL (263) et de quelques glycopeptides, il n'y a aucune entité glycoprotéinique qui ait été définie dans les urines.

Le grand nombre et la diversité des méthodes de fractionnement employées par les auteurs rend difficile l'interprétation des résultats et la comparaison entre les différents types de fractions obtenues. D'autre part, aucune de ces fractions n'est homogène.

Devant la complexité du problème, nous avons tenté, dans nos recherches, d'éclaircir la question de la composition de l'adialysable urinaire en classant les composés au moyen de la filtration sur gel, associée à d'autres méthodes, afin de pouvoir détecter par la suite, d'éventuelles modifications dans des cas pathologiques, en particulier dans des cas de cancer.

## TRAVAUX PERSONNELS

---

- I - METHODES GENERALES D'ANALYSE
- II - PREPARATION DU MATERIEL D'ETUDE
- III - MUCOPOLYSACCHARIDES
- IV - FRACTIONNEMENT DE L'ADIALYSABLE URINAIRE PAR GEL  
FILTRATION
- V - APPLICATION AUX URINES DE CANCEREUX

## I - METHODES GENERALES D'ANALYSE

---

### A - DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES

La composition centésimale en oses neutres (hexoses et 6-desoxy-hexoses), en acides uroniques, en osamines et en acides sialiques a été déterminée sur l'extrait sec à l'aide des méthodes suivantes (voir revue générale de MONTREUIL et SPIK) (264).

#### 1° - Oses neutres

Nous avons dosé les oses neutres par la méthode à l'orcinoï de TILLMANS et PHILIPPI (265) modifiée par RIMINGTON (266) en introduisant une double correction (SPIK et MONTREUIL (267) ; MONTREUIL et SPIK (268)) :

- L'une concerne le choix du témoin interne utilisé dans chaque série de dosages, nous avons déterminé par un dosage au citrate d'aniline (procédé de DATE (269)), la composition molaire de la fraction glycoprotéidique des urines et nous avons employé comme solution-témoin-interne, une solution de composition identique.

- L'autre correction est destinée à éliminer l'interférence des acides uroniques, grâce à une formule de correction introduisant les résultats fournis par le dosage des acides uroniques par le carbazol sulfurique.

## 2° - Acides uroniques

Nous avons utilisé pour le dosage des acides uroniques, la méthode au carbazol de DISCHE (270), en introduisant également une formule de correction pour éliminer l'interférence des oses neutres (MONTREUIL et SPIK) (271).

Pour éliminer les erreurs dues à la coloration des pigments urinaires, une correction a été faite, quand cela était nécessaire, en effectuant le dosage avec et sans carbazol.

## 3° - Osamines

Les osamines ont été dosées par la méthode d'ELSON-MORGAN (272) modifiée par BELCHER et al. (273) après une hydrolyse des composés par l'acide chlorhydrique 4 N, redistillé et exempt de fer, à 100° C pendant 4h en tube scellé sous vide.

## 4° - Acides sialiques

Les acides sialiques ont été déterminés par la méthode à la diphénylamine de WERNER et ODIN (274).

# B - DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLLAIRE EN OSES

## 1° - Les oses neutres

Les oses neutres ont été identifiés et dosés par chromatographie sur papier selon les procédés décrits par MONTREUIL, SPIK et KONARSKA (275).

a) Hydrolyse acide et purification des hydrolysats

Les oses libres ou conjugués sont d'abord hydrolysés par l'acide chlorhydrique 1,5 N pendant 1,5 heure à 100° C et les hydrolysats sont purifiés par un passage sur échangeurs d'ions : échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 : forme acide) puis d'anions (Duolite A 40 : forme formiate).

b) Chromatographie quantitative

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

- n - butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) de PARTRIDGE (276), pendant 48 h sur papier Whatman 3, qui donne une bonne séparation du xylose et du fucose.

- pyridine/acétate d'éthyle/eau (1 : 2 : 2) de JERMYN et ISHERWOOD (277) pendant 24 h sur papier Whatman 1 qui donne une bonne séparation du galactose et du glucose.

Après séchage des chromatogrammes, la révélation est faite par le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (278).

Pour le dosage, nous avons employé soit la méthode de MONTREUIL et SCHEPPLER (279) (réduction du ferricyanure de potassium en ferrocyanure, passage par addition d'un sel ferrique, au ferricyanure ferrique et dissolution du précipité au bleu de Prusse par l'acide oxalique), soit la méthode de HUGUES et JEANLOZ (280) (révélation des chromatogrammes par le phtalate d'aniline et élution des taches colorées par l'éthanol chlorhydrique).

## 2° - Les acides uroniques

### a) Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide est conduite de la même façon que pour libérer les oses neutres. Les acides uroniques, fixés sur l'échangeur d'anions, sont élués par l'acide formique à 5 p. 100.

### b) Identification

Une première électrophorèse préparative à pH 3,9, dans le tampon de MICHL, permet de séparer la zone des acides uroniques qui après élution, sont identifiés par une électrophorèse sur papier en tampon boraté à pH 9,2. La révélation se fait par l'oxalate d'aniline après élimination du borate par du méthanol acétique.

## 3° - Les osamines

### a) Hydrolyse acide

Les osamines sont libérées par hydrolyse à l'acide chlorhydrique 4N, redistillé, pendant 4 h à 100° C, en tube scellé sous vide. L'élimination de l'acide chlorhydrique est réalisée par évaporation sous vide.

### b) Identification

La mannosamine n'étant pas présente dans les glycoprotéines, les méthodes permettant de séparer et de doser la glucosamine et la galactosamine, peuvent être employées.

#### a) Méthode de chromatographie sur colonne de GARDELL (281)

Par chromatographie sur les colonnes d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8, 200-400 "mesh"), la glucosamine et la galactosamine donnent deux pics bien distincts, repérés par dosage colorimétrique.

β) Méthode de N-réacétylation de ROSEMAN et LUDOWIEG (282)

L'hydrolysat d'osamines, purifié sur échangeur de cations, est N-réacétylé par l'anhydride acétique en milieu bicarbonate de sodium. Les N-acétyl-osamines sont séparées en électrophorèse sur papier réalisée en tampon borate à 1 g pour 100 ml. Après l'électrophorèse, les papiers sont immédiatement séchés à l'étuve et les chromogènes de KUHN formés en milieu alcalin par les N-acétyl-hexosamines, sont révélés par le réactif d'ERLICH.

γ) Dosage spécifique de la galactosamine par la méthode colorimétrique de LUDOWIEG et BENMAMAN (283)

Dans un premier temps, les osamines totales sont dosées à l'aide des réactifs (acétylacétone et paradiméthylaminobenzaldéhyde) dans des conditions donnant la même absorbance molaire pour chacune des osamines.

Puis, la galactosamine (ou la mannosamine) est dosée spécifiquement en tirant partie de la différence de réactivité de ces deux osamines d'une part, et de la glucosamine d'autre part, vis à vis de l'acétylacétone à 0° C. La glucosamine est transformée en une céto-imine qui ne réagit pas avec le réactif d'ERLICH. Au contraire, la galactosamine ou la mannosamine donnent des chromogènes qui fournissent une coloration rose avec ce réactif.

4° - Les acides sialiques

a) Hydrolyse acide et purification des hydrolysat

Les acides sialiques sont préalablement libérés par une hydrolyse ménagée ( $H_2SO_4$ , 0,1 N, 100° C, 1,5 h). Les

hydrolysats sont ensuite purifiés sur colonne d'échangeur de cations (Dowex 50 x 8 : forme acide) puis sur colonne d'échangeur d'anions (Dowex 1 x 8 : forme formiate). Après un lavage à l'eau distillée de l'échangeur d'anions, les acides sialiques sont déplacés par le passage d'une solution d'acide formique 0,33 N (SVENNERHOLM) (284).

#### b) Identification

Les acides sialiques sont séparés par chromatographie sur papier dans le système solvant de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (285) : N-butanol / N-propanol / HCl 0,1 N (1 : 2 : 1) ; ils sont révélés par le réactif au paradiméthylaminobenzaldéhyde.

### C - ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE

Les analyses immunoélectrophorétiques ont été effectuées en appliquant les méthodes de SCHEIDEGGER (286) et de GRABAR et al. (287) d'immunoélectrophorèse en gélose.

#### 1° - Préparation des immunosérums

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

Quatre injections sont effectuées à chaque lapin à une semaine d'intervalle, avec des doses croissantes de solution antigénique (0,5 - 1 - 1,5 - 2 p. 100). Après un repos d'au moins un mois, le lapin subit un deuxième cycle d'injections. Cinq à six cycles sont quelquefois nécessaires pour obtenir de bons antisérums.

Lorsque le nombre d'arcs est jugé maximal, 40 ml de sang environ sont prélevés par incision d'une veine de l'oreille. Après centrifugation du caillot, on obtient le sérum anti-protéides urinaires (ASU) qui est conservé à + 2° C.

## 2° - Réalisation des immunoélectrophorèses

La substance à analyser est d'abord soumise à une électrophorèse en gélose dans un tampon véronal de pH 8,2 et de force ionique 0,1, sous une tension de 4 à 5 V/cm, pendant 2 h.

Ensuite on laisse diffuser pendant 48 h, le sérum antiprotéides urinaires et les substances antigéniques. La formation du complexe antigène-anticorps donne des arcs de précipitation qui sont révélés à l'aide du réactif à l'amidoschwartz, après une élimination soigneuse par le sérum physiologique du sérum anti-protéides urinaires.

## D - ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES POLYSACCHARIDES ACIDES

L'électrophorèse est effectuée sur bande d'acétate de cellulose (4 x 17 cm) dans un tampon pyridine/acide formique eau (1 : 2 : 46) de pH 3 sous une tension de 3 V/cm pendant 4 h (DALFERES et al.) (288).

Vingt µl d'une solution à 20 p. 100 de glycoprotéides suffisent. Les témoins employés sont l'acide chondroïtine sulfurique A ou C, l'acide chondroïtine sulfurique B ou β-héparine, l'acide hyaluronique et l'héparine.

La révélation est effectuée à l'aide du réactif au Bleu Alcian, après fixation à l'alcool absolu. Un chauffage à l'étuve à 40° C permet d'obtenir une feuille translucide.

## II - PREPARATION DU MATERIEL D'ETUDE (\*)

---

Le taux de glycoprotéines dans les urines est très faible. La majeure partie des constituants normaux de l'urine sont des composés minéraux (chlorures, phosphates) ou organiques (urée, acide urique, acides aminés) de nature micromoléculaire qui peuvent être éliminés par des techniques simples comme la dialyse. Par contre, les pigments urinaires tels que l'urochrome, l'urobiline, par exemple, contaminent habituellement les préparations d'adialysable urinaire employées pour l'étude des glycoprotides.

Il se pose donc un double problème concernant la concentration des urines et l'obtention d'une fraction enrichie en glycoprotides.

Nous verrons successivement :

- Les modalités de la préparation du matériel d'étude
- Ses caractéristiques chimiques et électrophorétiques

### A - PREPARATION DE L'ADIALYSABLE URINAIRE

#### 1° - Prélèvement des urines

Les urines d'hommes de 20 à 50 ans, recueillies sur toluène et gardées 24 h à 4° C, sont filtrées sur papier

---

(\*) Ce travail a été effectué en collaboration avec B. MALLEVAIS-GOUBET, G. SPIK, G. STRECKER et F. VAILLANT.

Whatman n° 1, ce qui permet d'éliminer les urates et également la mucoprotéine de TAMM et HORSFALL, insoluble.

## 2° - Concentration

La concentration des urines sous vide au moyen d'un évaporateur rotatif provoquant une dégradation importante des protéides, nous avons adopté au laboratoire, la lyophilisation. Nous évitons ainsi les fermentations bactériennes ou enzymatiques.

Le lyophilisat (2 à 3 g/l d'urine) est repris par de l'eau distillée et amené à pH 8 pour faciliter sa dissolution, de façon à ce que le "concentré urinaire" obtenu représente le dixième du volume initial d'urine.

## 3° - Fractionnement éthanolique

La précipitation alcoolique est effectuée à - 20° C pour éviter au maximum la dénaturation des composés.

La concentration en éthanol à utiliser a été déterminée par un gradient de 50 à 90 p. 100 en éthanol. Elle doit atteindre 90 p. 100 pour obtenir la précipitation complète de tous les composés antigéniques.

Le protocole expérimental que nous utilisons est schématisé dans la figure 8 (p. 63).

Le "concentré urinaire" amené à pH 4 avec de l'acide chlorhydrique est précipité par 9 volumes d'éthanol absolu à - 70° C. Après un repos de 30 mn, on centrifuge à 2800 tours/minute, à - 20° C. Au précipité dissous dans le



minimum d'eau et ajusté à pH 4, on ajoute 9 volumes d'éthanol absolu à - 70° C et on procède comme précédemment. On effectue de même une troisième précipitation.

Le précipité final est dissous dans l'eau distillée et mis à dialyser pendant 3 à 5 jours, en tube de cellophane (NOJAX x 16). Un lavage préalable des boudins de dialyse est nécessaire pour éliminer les polyosides adialysables solubles ainsi que les protides éventuellement présents dans les membranes de cellophane.

La poudre obtenue par lyophilisation de la fraction adialysable (250 mg/l d'urine environ) constitue notre matériel d'étude, que nous appellerons "adialysable du précipité alcoolique" ou simplement "adialysable urinaire".

## B - COMPOSITION DE L'ADIALYSABLE URINAIRE

### 1° - Composition centésimale en oses

Nous avons déterminé la composition en oses neutres, acides uroniques, osamines et acides sialiques par les méthodes colorimétriques décrites à la page 54, en effectuant les corrections pour éliminer les interférences des oses neutres dans le dosage des acides uroniques et réciproquement.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XII (p. 65).

### 2° - Identification des glucides et composition molaire

#### a) Les oses neutres

La chromatographie d'un hydrolysat chlorhydrique "d'adialysable urinaire" permet de mettre en évidence du

TABLEAU XIII

Composition centésimale de l'"adialysable urinaire"

	Osés neutres	Osamines	Acides sialiques	Acides uroniques	Protéines (%)
mg/l d'urine	48 ± 5mg	28 ± 3	40 ± 5	9 ± 3	
p. 100 du poids sec "d'adialysable"	20 à 25	12 à 16	17 à 22	2,5 à 4	33 à 35

\* dosées par la méthode de LOWRY

TABLEAU XIV

Composition molaire de l'"adialysable urinaire"

	Gal	Glc	Man	Xyl	Fuc	Glc NH <sub>2</sub>	Gal NH <sub>2</sub>	Glc UA	NANA
Nombre de résidus	10	2,5	5,5	0,7	4,3	8,2	2,8	3,5	8,8



galactose, du mannose et du fucose, plus du glucose et du xylose en faible proportion (Tableau XIV ; p. 65).

b) Les acides uroniques

L'électrophorèse permet d'identifier l'acide glucuronique seul.

Il existe également de l'acide iduronique, présent dans le chondroïtine-sulfate B, mais en très faible quantité.

c) Les acides sialiques

L'urine humaine normale contient exclusivement de l'acide N-acétylneuraminique.

d) Les osamines

La méthode par chromatographie sur Dowex de GARDELL (289) ainsi que la méthode par dosages spécifiques de LUDOWIEG et BENMAMAN (290), permettent de calculer le rapport glucosamine/galactosamine qui est égal à 3, aussi bien pour les urines d'Homme que de Femme.

3° - Analyse immunoélectrophorétique

La figure 9 (p. 67) montre un exemple d'immunoélectrophorègramme obtenu avec un antisérum anti-protéides urinaires. Ce schéma présente une grande complexité. Au moins une vingtaine d'arcs peuvent être détectés.

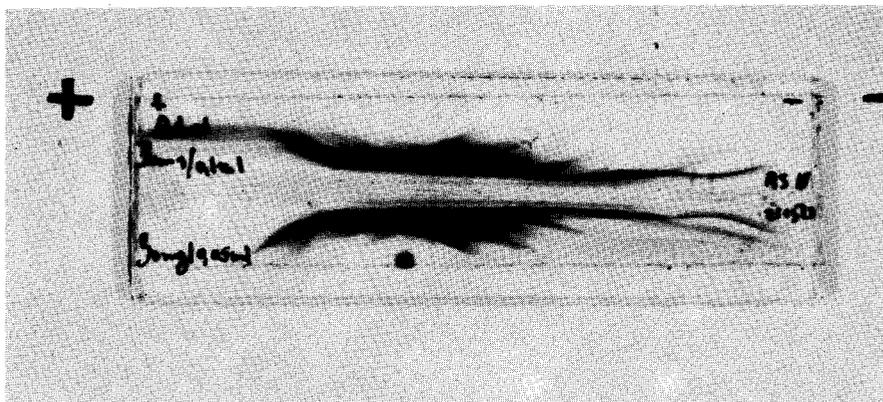


Figure 9

Immuno-électrophorèse de l'"adialysable urinaire"  
 ASU = sérum de lapin anti-protéides urinaires.

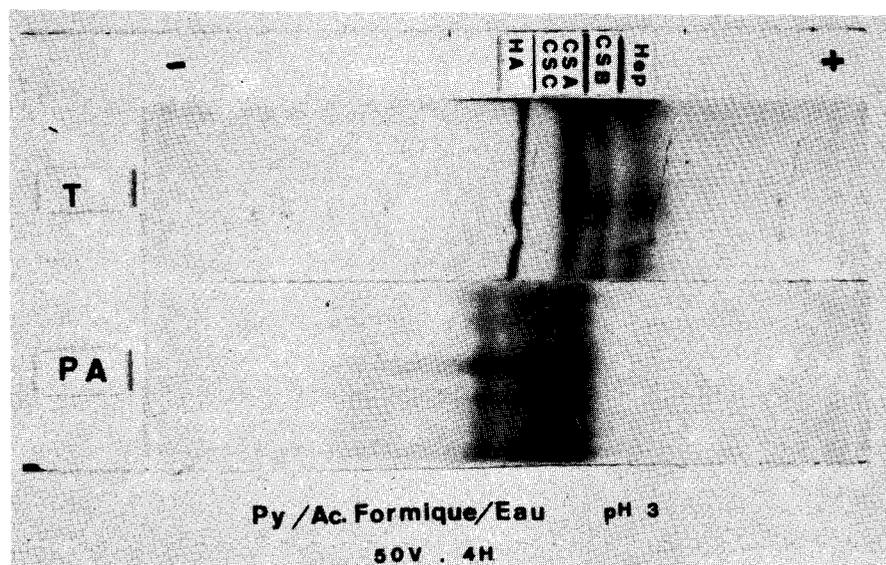


Figure 10

Electrophorèse sur acétate de cellulose de l'"adialysable urinaire". Révélation par le Bleu Alcian.  
 CSA et CSC : mélange des acides chondroïtines sulfuriques A et C ; CSB : acide chondroïtine sulfurique B ; HA : acide hyaluronique ; Hep : Héparine (document fourni par F. VAILLANT).



Cependant, "l'adialysable urinaire" a un pouvoir antigénique assez faible et il faut employer des concentrations très importantes (20 mg/0,1 soit 20 p. 100) pour obtenir de nombreux arcs de précipitation, d'autre part, il faut employer plusieurs concentrations différentes pour pouvoir observer tous les arcs.

#### 4° - Electrophorèse des polysaccharides acides

Le Bleu Alcian révèle les groupements acides, en particulier les MPA.

On obtient quatre bandes bien distinctes mais qui n'ont pas la même migration électrophorétique que les témoins MPA, à l'exception d'une bande qui migre comme le chondroïtine sulfate (Fig. 10 ; p. 67).

#### C - CONCLUSIONS

La préparation de glycoprotides urinaires, obtenue par triple précipitation alcoolique suivie de dialyse, présente les caractéristiques suivantes :

- 1 - le taux d'oses totaux élevé, de plus de 60 p. 100, qui indique une nature plutôt glycopeptidique que glycoprotéinique de l'ensemble des constituants ; ceci explique son faible pouvoir antigénique.
- 2 - la présence de glucose et de xylose qui n'entrent pas dans la composition des glycoprotéines. Le glucose pourrait provenir d'osides adialysables. Le xylose est impliqué dans la liaison mucopolysaccharide - protéine (RODÉN) (291, 292).

3 - les rapports molaires des oses neutres, qui sont différents de ceux des glycoprotéines sériques, avec en particulier, un taux de fucose plus élevé dans l'urine que dans le sang.

4 - le taux de galactosamine important, qui peut s'expliquer par la composition des mucopolysaccharides acides et des substances de groupe sanguin.

Cette méthode de préparation des glycoprotides urinaires est particulièrement intéressante parce qu'elle permet d'obtenir un matériel d'étude défini et reproductible. Mise au point par MALLEVAIS-GOUBET, SPIK, STRECKER, LOIEZ, VAILLANT et MONTREUIL (293) (voir aussi la thèse de B. MALLEVA (294), elle a été appliquée à l'étude systématique et statistique des urines de 24 h de sujets sains, permettant de définir une constante biologique avec des "écarts-types" faibles pour l'excrétion des glucides urinaires (Tableau XV ; p. 70).

La constance des rapports : oses neutres/acide sialique et oses neutres/osamines et la similitude de ces derniers chez l'Homme et chez la Femme, laissent supposer que l'on a affaire à des entités glycoprotéiniques bien définies.

Cependant, le dosage des acides uroniques ne donne pas entière satisfaction. Les résultats varient nettement plus que pour les autres oses : les valeurs limites obtenues sont :

- pour les urines d'Hommes : 7,25 mg à 21,3 mg/24
- pour les urines de Femmes : 6,55 mg à 21,9 mg/24

Les valeurs moyennes sont de  $13,12 \pm 3,02$  mg/24 h et  $11,33 \pm 3,26$  mg/24 h respectivement. Le rapport oses/acides uroniques présente aussi une grande dispersion avec une marge de 40 p. 100 environ.

TABLEAU XV

Elimination journalière en mg de glucides glycoprotidiques  
(d'après MALLEVAIS-GOUBET) (295)

(Moyennes, écarts types, valeurs extrêmes)

	Homme		Femme	
	Moyennes	Valeurs extrêmes	Moyennes	Valeurs extrêmes
Oses neutres	69,23 ± 10,63	50,8 à 91,6	59,4 ± 10,2	41,87 à 88,8
Acide sialique	51,94 ± 7,32	37,9 à 67,7	43,0 ± 7,8	33,07 à 69,10
Osamines	37,64 ± 5,02	28,9 à 50,15	31,4 ± 5,0	22,33 à 44,15
Acides uroniques	13,12 ± 3,02	7,25 à 21,36	11,33 ± 3,26	6,55 à 21,9
Oses/Acide sialique	1,33 ± 0,106	1,14 à 1,51	1,376 ± 0,124	1,07 à 1,61
Oses/Osamines	1,87 ± 0,182	1,61 à 2,35	1,92 ± 0,17	1,60 à 2,30
Oses/Acides uroniques	5,42 ± 1,08	3,35 à 8,10	5,48 ± 1,13	3,29 à 8,0

De plus, les valeurs d'élimination journalière d'acides uroniques conjugués que nous obtenons sont en général très nettement supérieures à celles données par les auteurs utilisant la méthode de précipitation par le Cétavlon (voir le tableau III ; p. 13).

Notre travail a donc consisté, d'abord à définir de façon précise la composition de l'"adialysable urinaire" et, en particulier, la nature des acides uroniques dosés, puis à le fractionner dans le but d'isoler des entités physico-chimiquement pures.

### III - MUCOPOLYSACCHARIDES

---

Nous avons tenté d'élucider la question des acides uroniques de l'"adialysable urinaire". Dans un premier temps, nous avons fait une étude critique de la précipitation par sels d'ammonium quaternaire. La méthode de purification des glycosaminoglycannes par précipitation par des composés aminés quaternaires (bromure de cetyltriméthyl-ammonium =CTAB ou chlorure de cetylpyridinium = CPC), a été introduite par SCOTT (296), en 1960. Elle a été appliquée à l'urine par DI FERRANTE (297), pour la préparation des mucopolysaccharides acides et leur identification, puis adaptée par différents auteurs au dosage, avec application à des cas pathologiques en particulier.

En second lieu, nous avons commencé l'étude de la composition de ce précipité par gel filtration.

#### A - ETUDE CRITIQUE DE LA PRECIPITATION AU CETAVLON

##### 1° - Application à des solutions de témoins

### a) Mode opératoire

Le CTAB (Cétavlon) est employé à une concentration de 2 g pour 100 ml d'eau. Il faut 2 ml de cette solution à 2 p. 100 pour précipiter les MPA correspondant à 1 mg d'acide uronique.

La solution additionnée de Cétavlon est laissée en repos pendant 18 à 24 heures. Après centrifugation, le précipité est recueilli soigneusement et lavé deux fois par de l'éthanol saturé en NaCl. Les surnageants sont éliminés et le culot dissous dans de l'eau distillée ajustée à pH 9 avec de la soude diluée pour faciliter la dissolution.

Dans la suite de l'exposé, les taux de MPA seront exprimés en mg d'acides uroniques. Ces derniers sont dosés par la méthode au carbazol sulfurique de DISCHE et les calculs effectués en tenant compte de l'interférence des oses neutres et éventuellement de la coloration de fond.

### b) Résultats et discussion

#### a) MPA en solution dans l'eau distillée

Nous avons tenté de précipiter du chondroïtine-sulfate et de l'héparine en solution dans de l'eau distillée à une concentration de 20 mg pour 100 ml. Le précipité par addition de CTAB est négligeable après un repos de 24 h et même 48 h. Il n'y a pas d'acide uronique dosable dans le culot.

#### β) MPA en solutions dans NaCl à différentes concentrations

Dans une première série d'expériences, nous avons préparé des solutions de chondroïtine-sulfate dans NaCl de 0,05 M à 0,33 M.

Dans une seconde série, nous avons ajouté à chaque solution, de la Célite (Célite 535, 1,5 g pour 100 ml). L'addition de Célite a pour but de fixer le précipité formé qui est très léger et se dépose mal : TANAKA et GORE (298).

Dans chacun des cas, nous avons vérifié l'influence de la température en laissant le précipité se former d'une part à 4° C, d'autre part à la température du laboratoire.

Le rendement de MPA précipités est le meilleur pour une concentration en NaCl de 0,17 M et à 20° C. Dans ces conditions, nous pouvons doser 90 p. 100 des acides uroniques totaux dans le précipité. L'influence de la température n'est pas négligeable et nous avons remarqué des taux d'acides uroniques précipités de 10 p. 100 supérieurs environ quand la solution a été maintenue à 20° C plutôt qu'à 4° C. Cependant ceci ne peut être appliqué aux urines qui ne peuvent être laissées pendant 24 h à 20° C sans risque de dégradation.

Enfin, l'addition de Célite permet de fixer le précipité qui est léger, "nuageux", mais il est difficile ensuite de remettre les mucopolysaccharides acides en solution quantitativement. Nous obtenons des pertes en acides uroniques adsorbés sur la Célite atteignant 30 et même 50 p. 100.

## 2° - Application aux urines

### a) Méthode de DI FERRANTE (299)

Le protocole décrit précédemment est appliqué à des aliquots de 100 ml d'urine ajustée à pH 5. On y ajoute 4 ml d'une solution de Cétavlon à 2,5 p. 100. Après un repos

de 18 heures à 4° C, le précipité obtenu par centrifugation est lavé deux fois par 100 ml d'éthanol saturé en NaCl.

Le culot est dissous dans de l'eau distillée additionnée d'une goutte de NaOH 0,2 N. Les dosages colorimétriques pour les oses neutres et les acides uroniques sont alors effectués.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XVI (p. 76).

La moyenne exprimée en mg d'acides uroniques par 24 h, est de 4,5 mg pour les Hommes, de 3,6 mg pour les Femmes.

b) Méthode de MAROTEAUX (300)

A 60 ml d'urine ajustée à pH 5, on ajoute 4 ml de Cétavlon à 2,5 p. 100. Après 48 h de repos, le précipité est lavé par 100 ml d'éthanol saturé en NaCl ; le précipité est ensuite dissous dans 10 ml d'acétate de sodium à 10 p. 100 à pH 9. On précipite de nouveau les MPA de cette solution amenée à pH 5 par HCl, par 3 volumes d'éthanol.

Les dosages des oses neutres et des acides uroniques sont effectués sur ce nouveau précipité après dissolution dans l'eau distillée.

Pour les urines normales, les valeurs obtenues sont très faibles : 2 à 2,5 mg d'acides uroniques mucopolysaccharidiques par litre d'urine.

c) Méthode de MEYER (301)

A 100 ml d'urine à pH 6 sont ajoutés 1,7 ml de Cétavlon à 5 p. 100. On laisse une nuit à 4° C ; le précipité formé est centrifugé, lavé par 200 ml d'éthanol, puis repris par 50 ml d'acétate de sodium à 10 p. 100 à pH 9.

L'insoluble est centrifugé et lavé par 50 ml d'eau. Les deux dernières solutions surnageantes (100 ml) sont rassemblées et ajustées à pH 5. Les MFA sont alors précipités par 150 ml d'éthanol absolu. Après une nuit de contact, le précipité est repris par 5 ml d'eau distillée et dosé.

Les résultats sont résumés dans le tableau XVII (p. 76).

Pour une même urine, les valeurs sont assez reproductibles. Ils se situent aux environs de 2 mg d'acides uroniques par litre comme avec la méthode de MAROTEAUX.

#### d) Comparaison des méthodes

Sur des aliquots d'une même urine, nous avons successivement appliqué trois méthodes. Les résultats sont les suivants, exprimés en mg d'acides uroniques.

- Précipitation alcoolique et dialyse d'après MALLEVAIS-GOUBET (302) : 10,8 mg (de 10,5 à 11,8).

- Précipitation au Cétavlon d'après DI FERRANTE (303) : 5,57 mg (de 5,01 à 6,13).

- Précipitation au Cétavlon et précipitation alcoolique d'après MEYER (304) : 2,35 mg (de 2,11 à 2,59).

#### e) Discussion

Les taux d'acides uroniques obtenus par précipitation par le Cétavlon sont toujours nettement inférieurs à ceux obtenus par précipitation alcoolique. Ils sont diminués encore quand la précipitation par l'éthanol est associée au traitement par le Cétavlon. Cependant, les résultats que nous obtenons par les différentes méthodes employées, sont en accord avec ceux des auteurs.

TABLEAU XVI

Précipitation des MPA urinaires par la méthode de DI FERRANTE

Comparaison avec la précipitation alcoolique

(Résultats exprimés en mg d'acides uroniques)

	Précipitation Cétavlon		Précipitation alcoolique
	mg/l	mg/24 h	mg/24 h
Moyenne	4,2	4,4	14,0
Valeurs extrêmes	1,2 à 6,9	1,7 à 7,2	11,9 à 16,5

TABLEAU XVII

Précipitation des MPA urinaires par la méthode de MEYER

Comparaison avec la précipitation alcoolique

(Résultats exprimés en mg d'acides uroniques)

	Précipitation Cétavlon		Précipitation alcoolique
	mg/l	mg/24 h	mg/24 h
Moyenne	1,81	2,0	14,0
Valeurs extrêmes	0,94 à 2,44	1,1 à 2,6	11,9 à 16,5



A partir de l'"adialysable urinaire", lyophilisé et remis en solution saline (NaCl 0,17 M), l'addition de Cétavlon permet la précipitation de 33 à 35 p. 100 des acides uroniques totaux, ce qui correspond à la valeur du précipité de DI FERRANTE.

Une partie des acides uroniques du surnageant de la précipitation au Cétavlon sont précipités par addition de 9 volumes d'éthanol absolu à - 70° C, dans les conditions définies précédemment. Ce précipité contient une quantité d'acides uroniques équivalentes aux acides uroniques mucopolysaccharidiques du précipité Cétavlon.

L'"adialysable urinaire" renferme donc :

- des acides uroniques précipitables à la fois par le Cétavlon et par l'éthanol (MPA),
- et des acides uroniques précipitables par l'éthanol et non par le Cétavlon (glucuroconjugués de faible poids moléculaire).

Remarque : Pour obtenir le taux exact d'acides uroniques par le dosage au carbazol sulfurique, il est nécessaire d'introduire un terme de correction dû à la présence d'oses neutres dans le précipité de MPA, dans le rapport oses neutres/acides uroniques : 1 à 1,5.

### 3° - Conclusions concernant la précipitation des MPA par le CTAB

Etant donné la dispersion des résultats, la méthode de précipitation par le Cétavlon peut difficilement être employée pour une étude quantitative des urines normales ; par contre elle est intéressante dans les cas pathologiques, en particulier les mucopolysaccharidoses où les augmentations des taux d'acides uroniques sont très importantes.

La dispersion des résultats semble être due, au moins en partie, à la forme inconsistante du précipité et à des pertes au cours du lavage de ce dernier par l'éthanol.

Enfin, comme l'a montré LINDAHL (305), cette méthode permet d'isoler non seulement les glycosaminoglycannes, mais des "protéoglycannes", c'est-à-dire des complexes "MPA-protéines", dans lesquels une séquence protéique est liée par covalence à plusieurs chaînes de glycosamino-glycannes sulfatés. LINDAHL montre, en outre, que sur mastocytome de souris et capsule de foie bovin, des protéines autres que celles liées par covalence aux chaînes de polysaccharides, contaminent le précipité.

L'étude en gel filtration du précipité avant et après action de la pronase nous a montré que le précipité Cétavlon urinaire contient également des glycoprotéines. Ce fait, joint à la difficulté d'éliminer le détergent, ne permet pas de retenir cette méthode pour préparer un "extrait urinaire" exempt de MPA et d'acides uroniques qui aurait servi de matériel de base pour le fractionnement des glycoprotides.

#### B - ETUDE EN GEL FILTRATION DU PRECIPITE CETAVLON ET DE L'ADIALYSABLE URINAIRE

L'excès des acides uroniques précipités par l'alcool et adialysables, par rapport aux acides uroniques mucopolysaccharidiques précipitables par le Cétavlon, pouvait s'expliquer par l'hypothèse séduisante d'une double nature des MPA :

- MPA liés à une séquence protidique, précipitables par le Cétavlon et l'éthanol,

- MPA libres, non précipitables par le Cétavlon.

Nous avons pensé pouvoir séparer ces deux fractions par chromatographie sur Sephadex et nous avons effectué une étude comparative des deux matériels de dosage :

1° - Précipité au CTAB d'après DI FERRANTE,

2° - Précipité alcoolique d'après MALLEVAIS-GOUBE  
et al.

## 1° - Matériel et méthodes

### a) Chromatographie

Le gel de Sephadex G-50 (médium) est mis en suspension dans 10 volumes de NaCl 0,08 M pendant une nuit ; la suspension est décantée, dégazée et versée dans une colonne de 100x5 cm, en chambre froide à 4° C. Le débit est réglé par une pompe péristaltique à 16-20 ml/heure. Le déplacement des composés est effectué par une solution de NaCl 0,08 M.

Les fractions à recueillir sont rassemblées et dialysées contre eau distillée pendant 3 jours.

### b) Etude des fractions

Le repérage est effectué en UV, à 278 nm, pour les protides. Cependant, notons que des fractions fortement pigmentées et pauvres en protides absorbent à cette longueur d'onde.

Pour les glucides, nous avons effectué les dosages colorimétriques tube par tube, des oses neutres, des acides uroniques, des osamines et des acides sialiques.

La composition centésimale des pics élués est faite sur les poudres lyophilisées et séchées sous vide. Les

méthodes de dosage ont été décrites aux pages 54 et 55.

c) Préparation des extraits urinaires par dialyse

Nous avons repris la préparation utilisée par VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (306) pour la chromatographie sur Sephadex G-50.

Un mélange d'urines d'hommes est recueilli sur toluène et chloroforme, laissé reposer à 4° C pendant une nuit puis filtré.

Une première aliquot d'un litre est mise en dialyse en boudin de cellophane, 3 jours contre eau courante puis un jour contre eau distillée. L'urine dialysée (adialysable total) est lyophilisée et le résidu, repris par NaCl 0,03 M, est chromatographié sur Sephadex G-50.

Sur une deuxième aliquot d'un litre, nous avons effectué une précipitation par le Cétavlon selon le procédé de DI FERRANTE (307) décrit précédemment. Le précipité Cétavlon est dialysé et lyophilisé avant d'être chromatographié sur Sephadex G-50.

Le surnageant de la précipitation au Cétavlon est dialysé dans les mêmes conditions que l'urine totale et chromatographié également sur Sephadex G-50.

d) Préparation des extraits urinaires par précipitation alcoolique

Nous partons du même mélange d'urines d'homme que dans le cas précédent.

Sur une aliquot d'un litre, nous effectuons une triple précipitation alcoolique selon la technique de MALLEVAIS-GOUBET et al. (308). L'adialysable ou précipité

alcoolique est lyophilisé, repris par NaCl 0,08 M et chromatographié sur Sephadex G-50.

Sur une deuxième aliquot, nous avons effectué une précipitation des MPA par le CTAB selon le procédé de DI FERRANTE.

Le surnageant est concentré 10 fois et précipité à trois reprises par 9 volumes d'éthanol absolu à - 70° C puis dialysé 3 jours contre eau distillée. Après lyophilisation, ce surnageant ainsi traité est chromatographié sur Sephadex G-50.

## 2° - Résultats

### a) Premier bilan : la dialyse

Par chromatographie sur Sephadex G-50 de l'"adialysable total", nous obtenons deux pics colorés, bien séparés : pic A et pic B, auxquels correspondent deux pics d'acides uroniques. Entre A et B et chevauchant la première moitié de B, un pic important et assez étalé est riche en oses neutres, osamines et acides sialiques, il ne contient pas d'acides uroniques et n'est pas repérable en UV, (ce pic correspond aux fractions 2 et 3).

Pour faciliter l'étude, nous avons déterminé arbitrairement 4 fractions (voir la figure 11 ; p. 83). Leur composition centésimale est donnée dans le tableau XVIII (p. 84).

Nous nous sommes particulièrement attachés à l'étude des 2 pics d'acides uroniques. Le pic A est élué avec le volume d'exclusion de la colonne : il contient donc des composés de poids moléculaire 15 000.

La chromatographie du "précipité Cétavlon" donne un seul pic repéré en UV, élué avec le volume d'exclusion, qui correspond donc au pic A. Il contient également des osamines et des oses neutres et absorbe à 278 nm. Sa composition molaire est donnée dans le tableau XVIII (p. 84).

Pour une même urine, la quantité totale des acides uroniques est égale à la moitié environ de celle du pic A de l'"adialysable total".

L'adialysable du "surnageant Cétavlon" donne un diagramme de fractionnement comparable à celui de l'"adialysable total". Nous avons fait le même découpage en 4 fractions dont la composition centésimale est donnée dans le tableau XVIII (p. 84).

Pour les oses neutres, les diagrammes sont comparables. Les osamines sont nettement diminuées dans le pic A du surnageant. Les acides sialiques ne peuvent être dosés dans les fractions 1 et 2 à cause des interférences dues au CTAB non totalement éliminé après dialyse.

Au point de vue des acides uroniques, le pic A devient beaucoup moins important tandis que le pic B garde la même intensité ; le rapport acides uroniques du pic B/acides uroniques du pic A passe de 1,5 à 4,2.

Si l'on compare les diagrammes d'acides uroniques de l'adialysable total, du précipité Cétavlon et de l'adialysable du surnageant Cétavlon, (Figure 11 ; 83) on peut observer que les mucopolysaccharides acides, précipitables par le CTAB, sont élués avec le volume d'exclusion de gel ; cependant les acides uroniques du pic A de l'adialysable urinaire total ne sont pas retrouvés quantitativement dans le précipité Cétavlon. De plus les acides uroniques du pic B ne sont pas de nature mucopolysaccharidique : non seulement ils ne sont pas précipitables par les

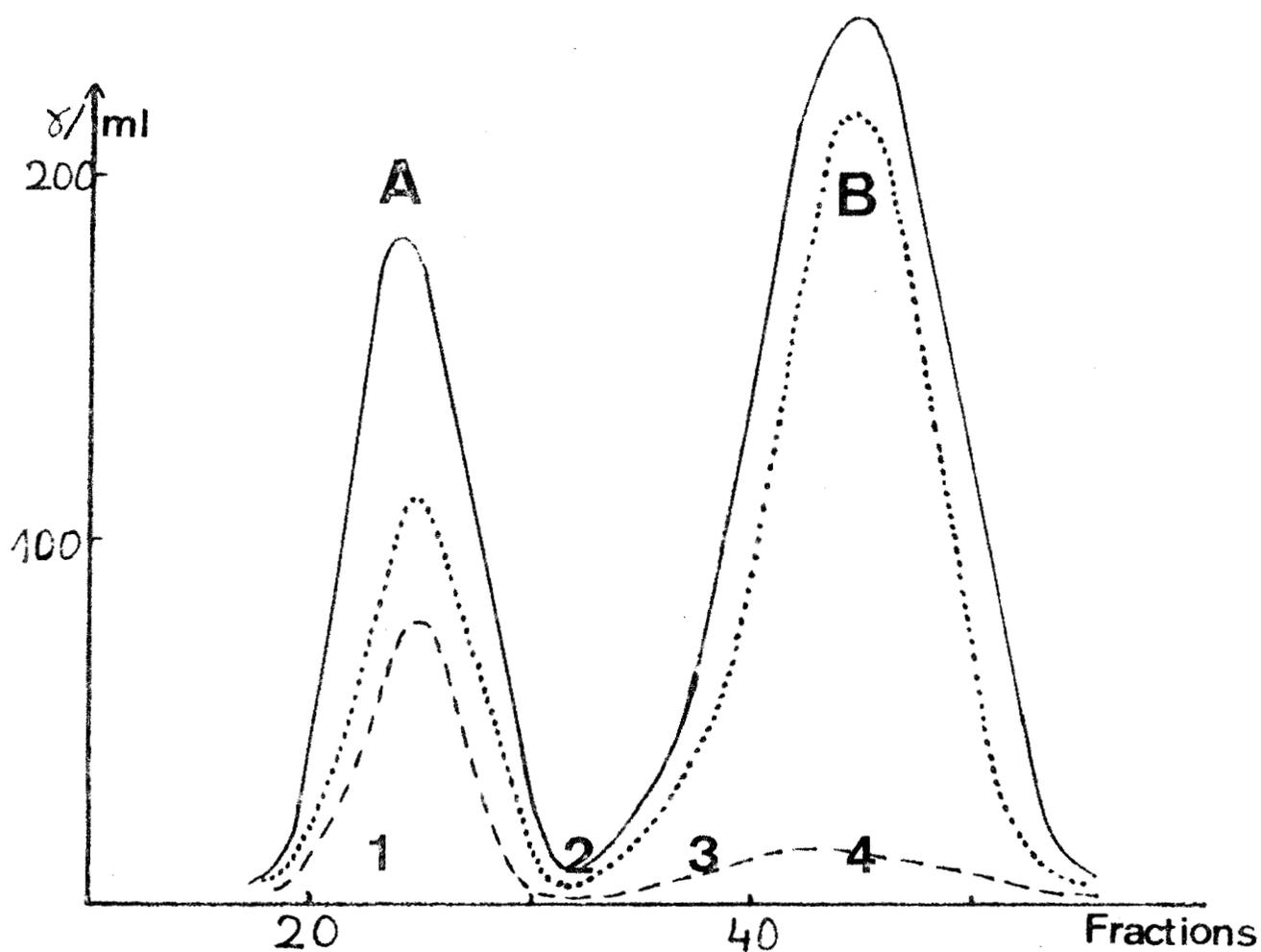


Figure 11

Répartition des acides uroniques dans les fractions obtenues par chromatographie sur Sephadex G-50 :

a) de l'urine dialysée (—) ; b) du précipité Cétavlon (---) ; c) du surnageant dialysé du précipité Cétavlon (....).

En abscisse, le nombre de fractions éluées ; en ordonnée, les quantités d'acides uroniques en  $\gamma$ /ml.

TABLEAU XVIII

Composition centésimale des fractions obtenues par gel filtration, à partir des substrats préparés par dialyse. (Résultats en p. 100 du poids sec).

Fractions	Poids sec mg/l	Oses neutres	Acides uroniques	Acides sialiques	Osamines	Glucides totaux
1	45	9,9	3,0	9,1	7,0	29,1
2	50	20,7	0,6	15,6	15,8	52,7
3	50	22,4	1,7	15,1	13,2	52,4
4	10	11,3	6,0	0	traces	17,3
Précipité Cétavlon	18	4,7	3,1	7,0	6,5	21,3
Surnageant Cétavlon dialysé	25 52 50 10	8,8 19,4 18,4 9,4	1,4 0,8 2,2 6,6	- - 17,6 -	5,2 16,3 9,4 traces	47,5 16



sels d'ammonium quaternaires mais encore, à cette fraction d'acides uroniques ne correspond pas de pic d'osamines. Ces acides uroniques n'entrent pas dans la composition des glycoprotéines.

b) Second bilan : la précipitation alcoolique

Nous avons effectué la filtration sur Sephadex G-50 de l'"adialysable du précipité alcoolique". Nous obtenons un schéma de fractionnement comparable à celui de l'"adialysable total" ; nous l'étudierons en détail dans le paragraphe suivant (IV). Cependant, ce matériel est moins riche en glucides que l'"adialysable total". Dans ce cas, nous obtenons un rapport acides uroniques du pic B/acides uroniques du pic A variant de 0,7 à 2. La quantité des acides uroniques contenus dans le pic A est de 8 mg par litre d'urine en moyenne (de 6 à 11 mg/l). Le pic B est moins riche que dans le cas de l'"adialysable total" et ne renferme que 5 à 12 mg/l d'acides uroniques. Le rapport acides uroniques du pic B/acides uroniques du pic A varie de 1,5 à 2,4.

Le pic A d'acides uroniques de l'"adialysable du précipité alcoolique" est équivalent à celui obtenu par gel filtration du "précipité Cétavlon".

Le surnageant Cétavlon, précipité par l'alcool et dialysé, donne un schéma de fractionnement dans lequel le pic A est totalement dépourvu d'acides uroniques (Figure 12 ; p. 86). La composition centésimale des fractions 1 à 4 obtenues pour ces différents fractionnements est donnée dans le tableau XIX ; (p. 87).

A titre comparatif, nous avons rassemblé sur une même figure les diagrammes d'élution des acides uroniques du précipité alcoolique, du précipité Cétavlon et du précipité alcoolique du surnageant Cétavlon (Fig. 12 ; p. 86) Nous voyons

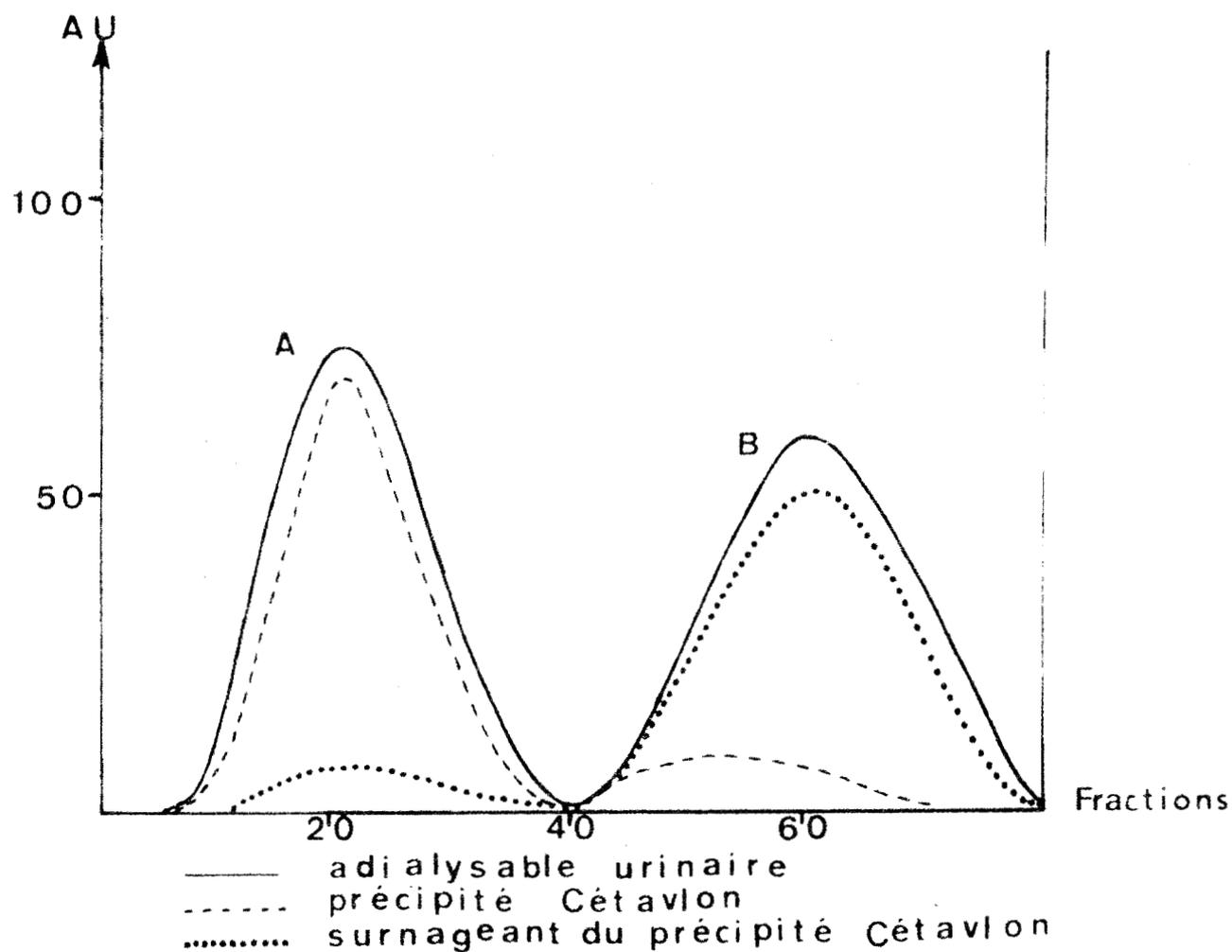


Figure 12

Répartition des acides uroniques dans les fractions obtenues par chromatographie sur Sephadex G-50 :

a) de l'adialyseable du précipité alcoolique (———)

b) du précipité Cétavlon (- - - -)

c) de l'adialyseable du surnageant Cétavlon après précipitation alcoolique (.....)

En abscisse, le nombre de fractions éluées ; en ordonnée, les quantités d'acides uroniques en  $\gamma$ /ml.



TABEAU XIX

Composition centésimale des fractions obtenues par gel filtration, à partir des substrats préparés par précipitation alcoolique. (Résultats en p. 100 du poids sec).

Fractions	Poids sec mg/l	Oses neutres	Acides uroniques	Acides sialiques	Osamines	Glucio total
1	40	10,8	3,5	10,2	4,1	28,6
2	38	21,2	0,7	15,1	13,3	50,3
3	35	13,3	1,5	13,4	12,8	41
4	5	3,3	4,5	0	0	7,8
Précipité Cétavlon	18	4,7	3,1	7,0	6,5	21,3
1	20	14,2	0,6	12,0	4,3	36,1
2	35	21,5	0,6	16,9	15,4	54,4
3	34	15,7	1,9	15,4	7,8	39,8
4	5	5,2	5,4	0	0	10,6



que tous les acides uroniques précipités par le Cétavlon sont retrouvés dans le pic A; quant au surnageant Cétavlon après traitement par l'alcool, il ne contient que les acides uroniques micromoléculaires du pic B.

### 3° - Conclusions

Cette série d'expériences nous permet donc :

- de confirmer la valeur de la précipitation des MPA par le CTAB,

- d'expliquer l'excès d'acides uroniques du matériel glycoprotidique urinaire précipitable par l'alcool et adialysable. En effet, à côté des acides uroniques mucopolysaccharidiques, qui existent en quantité constante, nous trouvons une quantité égale ou supérieure d'acides uroniques liés de nature micromoléculaire. Ces derniers existent en quantité variable, ce qui explique les larges fluctuations rencontrées dans le dosage de ces composés. Bien que les MPA libres aient le même comportement que le pic A et soient éluées avec le volume d'exclusion, il semble que les MPA urinaires soient liées à des glycoprotéines : le précipité Cétavlon, après purification absorbe en UV à 278 m $\mu$  et contient toujours outre des acides uroniques et des osamines, des oses neutres et des acides sialiques. De plus, il donne plusieurs arcs (4 ou 5) en immunoélectrophorèse.

## IV - FRACTIONNEMENT DE L'ADIALYSABLE URINAIRE PAR GEL FILTRATION

VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (309) ont fait paraître en 1967 une étude sur les mucopolysaccharides de l'urine normale, dans laquelle ils étudient la répartition qualitative des MPA et la composition d'un mucopeptide isolé de l'urine. Les auteurs utilisent pour préparer leur fraction mucopolysaccharidique, la chromatographie, sur Sephadex G-50 médium, de l'urine dialysée. Ils obtiennent ainsi deux pics

contenant à la fois des osamines et des acides uroniques et seul le premier pic, élué avec le volume d'exclusion de la colonne, contient des mucopolysaccharides acides précipitables par le chlorure de cétypyridinium.

Il nous a semblé intéressant de reprendre le mode opératoire de ces auteurs pour aborder le fractionnement des composés urinaires, mais à partir de l'adialysable du précipité alcoolique qui, étant un matériel de base mieux défini et déjà purifié, nous permettait d'espérer un résultat intéressant. D'autre part, nous avons soumis les fractions obtenues à différents sous-fractionnements chromatographiques.

## A - CHOIX DE LA RETICULATION DU GEL

### 1° - Mode opératoire

Le gel de Sephadex (G-100, G-75, G-50) est mis en suspension et la colonne est équilibrée avec le tampon utilisé pour l'élution.

L'"adialysable urinaire" (200 à 500 mg de poudre lyophilisée) est dissous dans le tampon et centrifugé : le culot insoluble est éliminé et le surnageant (5 ml environ) est déposé au sommet de la colonne.

Chacune des fractions obtenues est soumise à l'étude systématique de sa composition centésimale en glucides, de sa composition glycoprotidique par les méthodes immunoelectrophorétiques et de sa composition en polysaccharides acides. Les méthodes employées sont décrites aux pages 54 à 60.

### 2° - Résultats et discussion

#### a) Sephadex G-100

Nous avons effectué, la chromatographie en éluant successivement avec :

- de l'eau distillée,

- du chlorure de sodium 0,08 M,
- du chlorure de sodium 1 M.

Les schémas de fractionnements obtenus sont représentés par la figure 13, p. 91. La composition centésimale des fractions est donnée dans les tableaux XX et XXI (p. 92, 93)

Quelque soit le mode d'élution, nous obtenons des profils très voisins. Deux fractions colorées en jaune et absorbant l'UV (1 et 3) sont bien séparées. La courbe des oses présente deux pics, le premier correspondant à 1, le second décalé par rapport à 3 et plus rapide que celui-ci.

Le pic 1 correspond au volume d'exclusion de la colonne ( $PM > 100\ 000$ ), il présente un épaulement.

L'élution par NaCl 1 M donne une meilleure séparation des pics 1 et 1', ces deux fractions contiennent des acides uroniques mucopolysaccharidiques.

Nous avons éliminé l'élution par l'eau distillée qui donne un profil médiocre.

La fraction 2 est la plus riche en glucides totaux (50 à 60 p. 100 du poids sec) avec un très faible pourcentage d'acide uronique.

La fraction 3 ne donnant pas de bande révélabl au Bleu Alcian, après électrophorèse sur acétate de cellulose, les acides uroniques de cette fraction ne sont donc pas de nature mucopolysaccharidique.

De même que la composition en glucides, la composition en amino-acides des fractions 1 et 1' est très voisine ; elles sont en particulier riches en acides aspartique et glutamique, en glyccolle, tyrosine et phénylalanine. Les fractions 2 et 3 sont plus pauvres en amino-acides aromatiques.

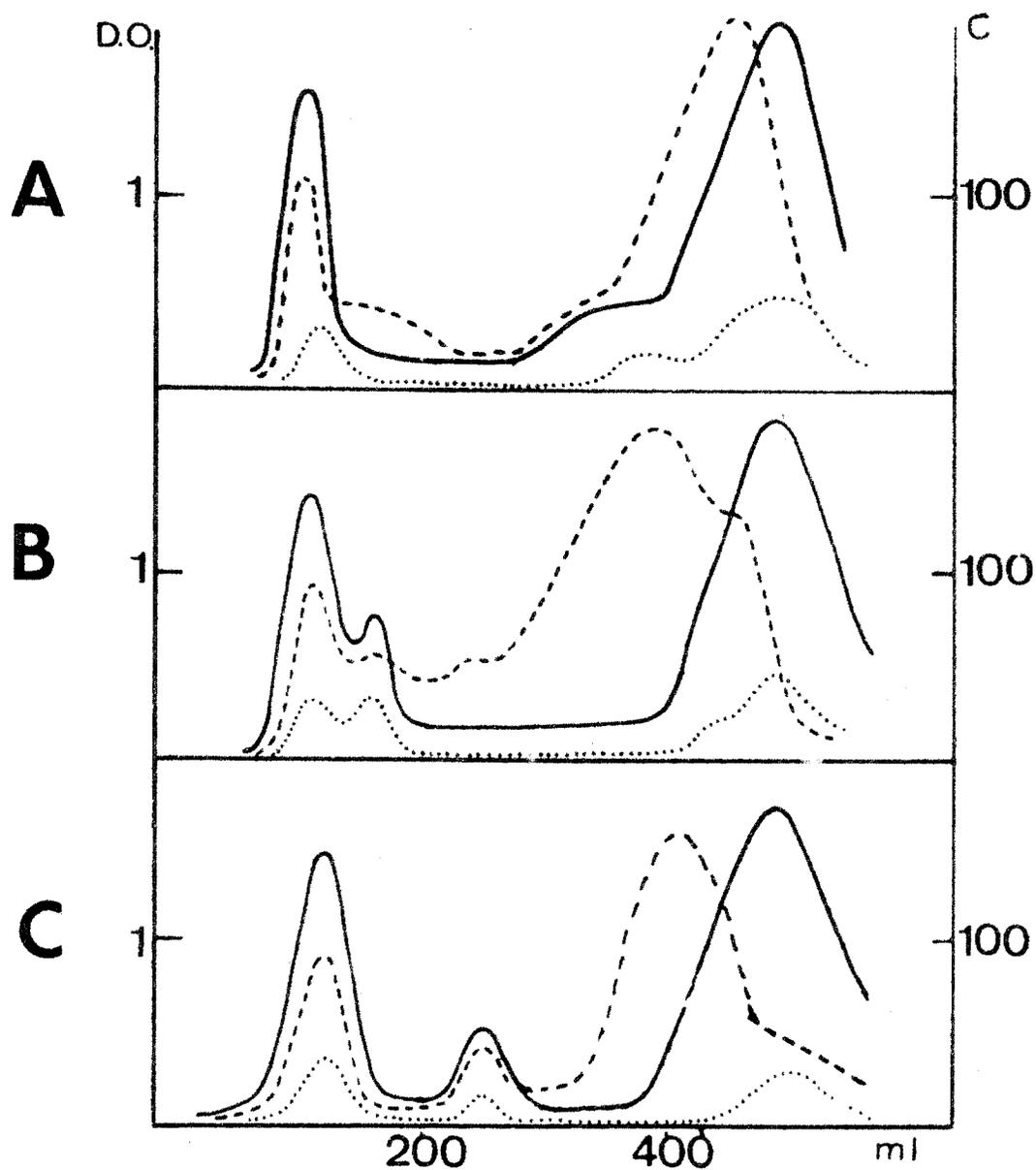


Figure 13

Courbes d'élution des glycoprotides urinaires soumis à une chromatographie sur Sephadex G-100

A - élution par l'eau distillée

B - élution par NaCl 0,08 M

C - élution par NaCl 1 M

————— UV

----- oses neutres

..... acides uroniques



TABIEAU XX

Composition en glucides des fractions obtenues par chromatographie sur Sephadex G-100 (élution par NaCl 0,08 M) de l'"adialyisable urinaire".

	Poids pour 100 mg	Osés		Acides		Acide		Osamines		Osés Acide Sialique	Osamines	Arcs (a)	Bandes B-a (b)
		Neutres p. 100	Acides p. 100	Uroniques p. 100	Sialique p. 100	Sialique	Sialique						
1	8	9,2	1,9	13,1	7,14	0,70	1,30	6	2				
1'	6	11,4	3,7	14,5	8,9	0,80	1,26	6	3				
2	18	23,2	1,5	19,7	14,3	1,62	1,62	3	3				
3	10	9,3	3,2	6,7	4,8	1,4	1,24	2	0				

(a) nombre d'arcs en immunoelectrophorèse

(b) nombre de bandes de constituants acides révélés par le Eleu Alcian sur acétate de cellulose.

TABLEAU XXI

Composition en glucides des fractions obtenues par chromatographie sur Sephadex G-100 (élution par NaCl 1 M) de l'"adialysable urinaire"

	Poids p. 100 mg	Oses Neutres p. 100	Acides Uroniques p. 100	Acide Sialique p. 100	Osamines p. 100	Oses Acide Sialique	Oses Osamines
1	13	8,1	1,2	11,4	6,3	0,71	1,28
1'	8	6,0	2,8	7,4	5,7	0,81	1,05
2	33	14	1,3	13,0	10,3	1,08	1,36
3	9	6,4	1,1	3,9	1,4	1,64	4,57



b) Sephadex G-75

En effectuant l'élution par NaCl 0,08 M, nous obtenons le même type de schéma de fractionnement, avec deux fractions colorées riches en acides uroniques et une fraction intermédiaire chevauchant le pic coloré le plus retardé, riche en oses neutres et n'absorbant que faiblement l'U.V. Nous avons effectué le découpage comme dans le cas précédent en trois fractions dont la composition centésimale est donnée dans le tableau XXII (p. 95). Le rendement du fractionnement est de 45 p. 100.

Dans ce cas, le pic 1, contenant les acides uroniques mucopolysaccharidiques est entièrement élué avec le volume d'exclusion de la colonne de Sephadex G-75, ce qui correspond à un poids moléculaire supérieur à 45 000.

c) Sephadex G-50

L'étude systématique de ce type de fractionnement sera faite dans le paragraphe suivant (B - p. 96).

Le gel de Sephadex G-50 médium, élué par NaCl 0,08 M, a été finalement retenu pour les études ultérieures sur la composition glycoprotidique de l'"adialysable urinaire". En effet, avec ce type de tamis moléculaire, toutes les molécules de poids moléculaire supérieur à 10 ou 15 000 (selon la forme de la molécule) sont déplacées avec le volume d'exclusion de la colonne, ce qui permet d'effectuer un premier découpage du matériel urinaire en glycoprotéines et mucopolysaccharides acides dans le pic de tête et glycopeptides dans les pics plus retardés.

TABLEAU XXII

Composition centésimale des fractions obtenues par chromatographie sur Sephadex G-75 (élution par NaCl 0,08 M) de l'"adialysable urinaire".

Poids pour 100 mg	Oses neutres p. 100	Acides uroniques p. 100	Acide sialique p. 100	Osamines p. 100	Oses	
					Acide sialique	Osamines
1	7,5	2,7	5,9	5,0	1,27	1,50
2	19,1	0,5	19,4	12,3	0,98	1,55
3	8,7	2,9	0	0	-	-



## B - FRACTIONNEMENT DE L'ADIALYSABLE URINAIRE SUR SEPHADEX G-50

### 1° - Matériel et méthodes

#### a) La chromatographie

300 à 600 mg d'"Adialysable urinaire" dissous dans le tampon de départ (10 ml de NaCl 0,08 M) sont chromatographiés sur une colonne de Sephadex G-50 médium (3 x 100 cm) dégazé et stabilisé en chambre froide à + 4° C.

Le déplacement des composés se fait par passage d'une solution du même tampon chlorure de sodium 0,08 M.

Le débit de la colonne est réglé par une pompe péristaltique (20 ml/heure) et des fractions de 10 ml sont recueillies automatiquement sur collecteur de fractions, puis analysées en UV à 278 m $\mu$  pour détecter les protéides. Pour tracer la courbe, les oses sont dosés tous les deux tubes. Chaque fraction isolée est dialysée contre eau distillée pour enlever le NaCl et lyophilisée.

#### b) Etude des propriétés des fractions

La composition centésimale en glucides des fractions obtenues et leur composition molaire en oses neutres et osamines, ont été déterminées par les méthodes décrites aux pages 54 à 60. Nous avons effectué également les analyses immunoélectrophorétiques et électrophorétiques.

### 2° - Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 14 ; 15 ; 16, et les tableaux XXIII, XXIV et XXV (p. 98 et 100 à 104).

### a) La chromatographie

Le dosage dans chaque fraction éluée des "oses neutres", des osamines et de l'acide sialique, permet de repérer le passage de deux pics (pics I et II). Le dosage des acides uroniques fournit deux pics également, dont l'un (pic A) coïncide avec le pic I et l'autre (pic B) se dissocie du pic II et est plus retardé que ce dernier.

Pour la simplification de l'étude, nous avons découpé le schéma en quatre fractions numérotées de 1 à 4 (voir figure 14 ; p. 98).

### b) Composition des fractions

#### - Le pic I

L'étude de la composition du pic I (tableau XXIII; p.100) montre qu'il renferme une proportion de glucides relativement faible (30 p. 100 de glucides totaux). Ce résultat, associé au fait que ce pic se déplace avec le front du solvant, permet de conclure qu'il est de nature glycoprotéinique. De plus, il est très antigénique (10 arcs en immunoélectrophorèse).

L'analyse électrophorétique sur acétate de cellulose montre la présence de polysaccharides acides révélés par le Bleu Alcian. Ce résultat explique le taux des acides uroniques et le fait que la totalité de ceux-ci se retrouve dans le précipité du pic I par le Cétavlon.

#### - Le pic II

Il renferme une proportion plus élevée de glucides totaux (55 à 60 p. 100). Il est donc de nature glycopeptidique et ne renferme pas de mucopolysaccharides acides.

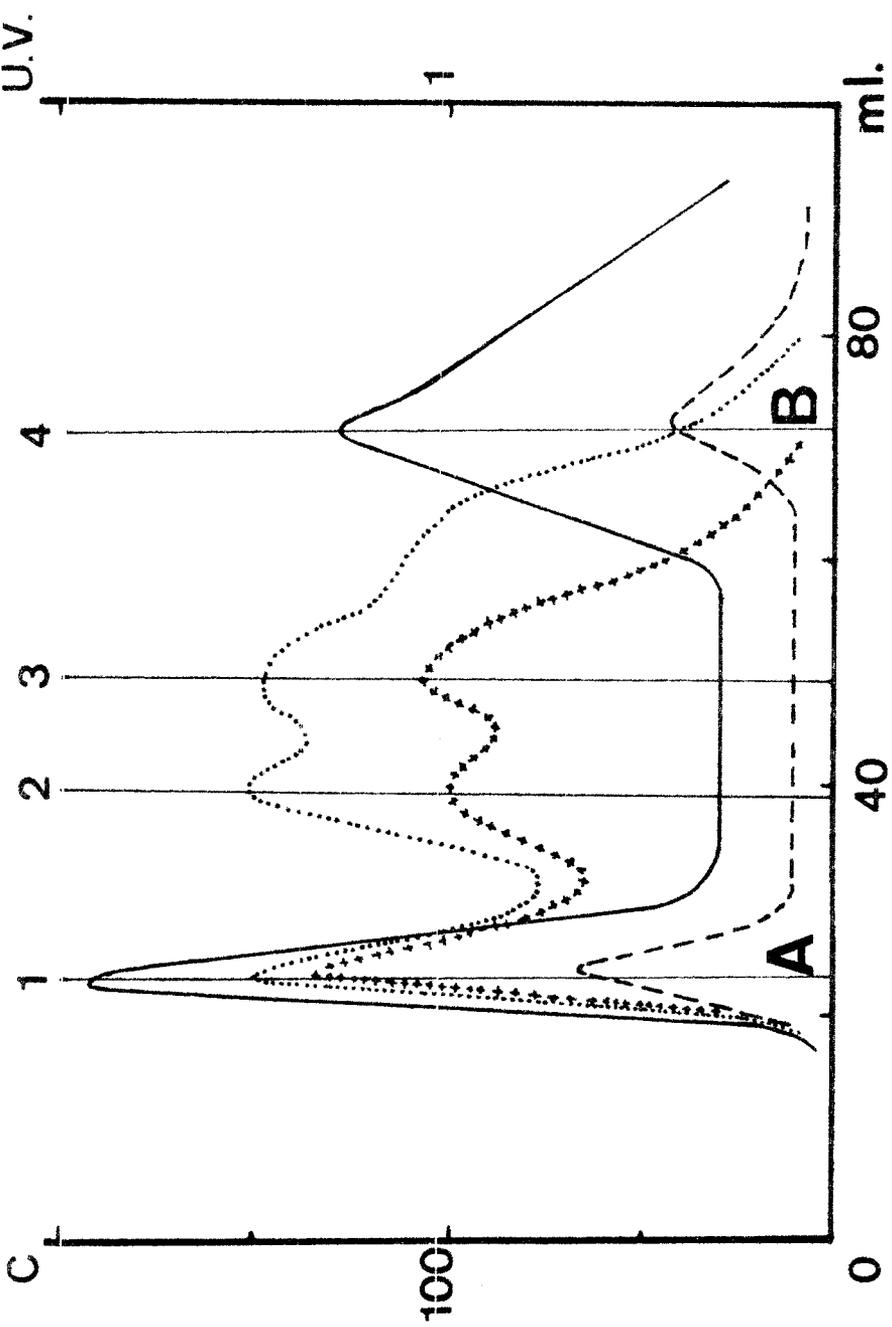


Figure 14

Courbes d'élution des glycoprotides urinaires soumis à une chromatographie sur Sephadex G-50.

En abscisse : volume d'élution. En ordonnée : à droite, absorbance en UV ; à gauche, concentration des oses en  $\mu$ /ml.

(————) UV ; (-----) acides uroniques ; (.....) oses neutres ; (++++++) osamines.



Cependant les fractions 2 et 3 constituant le pic II sont encore antigéniques (3 arcs en immunoélectrophorèse) et contiennent des mucopolysides révélables au Bleu Alcian après électrophorèse.

En comparant le comportement du pic II sur Sephadex G-50 avec celui de glycopeptides de poids moléculaire connu (tel que "le glycopeptide  $\beta$ " de l'ovomucoïde) nous pouvons estimer que les constituants du pic II ont des poids moléculaires allant de 2500 à 5000 ; et ceci est confirmé par la chromatographie de ce pic II sur Sephadex G-25.

- Le pic B

Il est fortement coloré en jaune brun.

Il ne contient pas d'osamines mais des acides uroniques et des oses neutres en faible proportion. Il ne peut donc pas s'agir de MPA, d'autant plus qu'aucun constituant de cette fraction n'est révélé au Bleu Alcian après électrophorèse.

Cette fraction n'est pas antigénique.

BUS  
LILLE

c) Composition molaire en oses neutres et en osamines

L'étude de la composition en oses des différents pics montre que les pics I et II renferment bien des composés de nature ou d'origine protéinique puisque ces derniers sont constitués de galactose, de mannose et de fucose.

Le pic B est particulièrement riche en glucose, probablement d'origine osidique.

Le rapport glucosamine/galactosamine égal à 2 dans le pic I est en accord avec la présence des mucopolysaccharides acides dans cette fraction (Tableau XXIV ; p. 101).

TABLEAU XXIII

Composition centésimale en glucides des fractions obtenues par chromatographie sur Sephadex G-50 de l'"Adialysable urinaire". (voir Fig. 14 ; p. 98).

Fractions	Osés "neutres" p. 100	Acides Uroniques p. 100	Acides Sialiques p. 100	Osamines p. 100	Osés "Neutres" Acides uroniques	Osés "Neutres" Acides sialiques	Osés "Neutres" Osamines
1	10,1	2,8	13,1	3,6	3,6	0,77	2,8
2	16,4	1	13,7	12,9	16,4	1,2	1,3
3	18,4	1	14,9	9,8	18,4	1,2	1,9
4	4,6	2,6	0	traces	1,7	-	-



TABLEAU XXIV

Composition molaire en glucides des fractions obtenues par chromatographie sur sephadex G-50 de l'"Adialysable urinaire". (voir Fig. 14 ; p. 98).

Fractions	Gal (a)	Man (a)	Fuc (a)	Glc (a)	Xyl (a)	Osamines	Glc NH <sub>2</sub> Gal NH <sub>2</sub>	Acides Uroniques	Acides Sialiques
1	10	4,5	2,7	0,5	0,5	5,5	2	4,5	13,4
2	10	5,5	4,4	1	0,6	16,6	3,6	1,2	10,0
3	10	6,1	5,5	3,2	0,9	13,4	2,6	1,25	11,8
4	2	2	0	10	-	-	-	5,2	-

(a) Résidus de mannose, de fucose, de glucose, de xylose pour 10 résidus de galactose.

(b) Méthodes de GARDELL et de LUDOWIEG et BENMAMAN.



TABLEAU XXV

Composition en amino-acides des fractions obtenues  
sur Sephadex G-50  
(Fig. 14 ; p. 98)

(en p. 100 de la somme des amino-acides à l'exception du Try)

	F1	F2	F3	F4
Asp	10,57	13,00	14,09	9,49
Thr	7,27	8,76	6,40	4,15
Ser	8,18	8,27	8,62	10,75
Glu	10,21	10,42	12,89	13,41
Pro	6,90	9,73	7,72	-
Gly	7,71	15,30	13,10	17,02
Ala	7,92	8,53	7,14	8,12
Val	4,72	3,11	-	3,35
Cys	4,49	-	2,06	9,56
Met	1,42	0,64	2,09	-
Ileu	3,26	4,38	2,02	2,27
Leu	7,83	6,75	2,68	5,10
Tyr	3,54	2,14	1,63	2,03
Phe	3,86	2,28	3,32	2,03
Lys	5,38	4,08	5,28	7,00
His	2,48	1,57	1,67	3,23
Arg	4,23	2,85	2,68	2,54



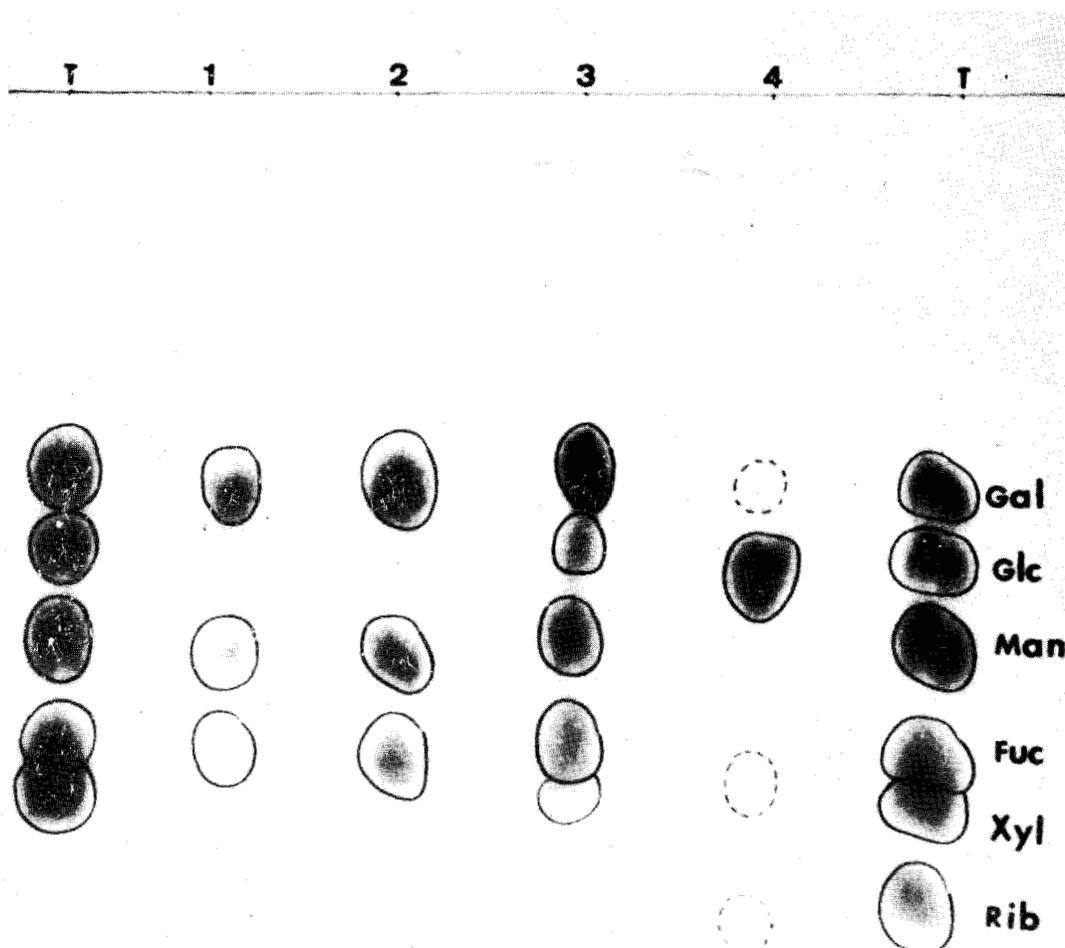


Figure 15

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques (HCl 2 N, 2 h, 100° C) des fractions 1 à 4 de la figure 14 (p. 98). Système-solvant : pyridine/acétate d'éthyle/eau (1 : 2 : 2) ; durée de la chromatographie : 24 heures, révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

Gal : galactose ; Glc : glucose ; Man : mannose ; Fuc : fucose ;  
Xyl : xylose ; Rib : ribose.



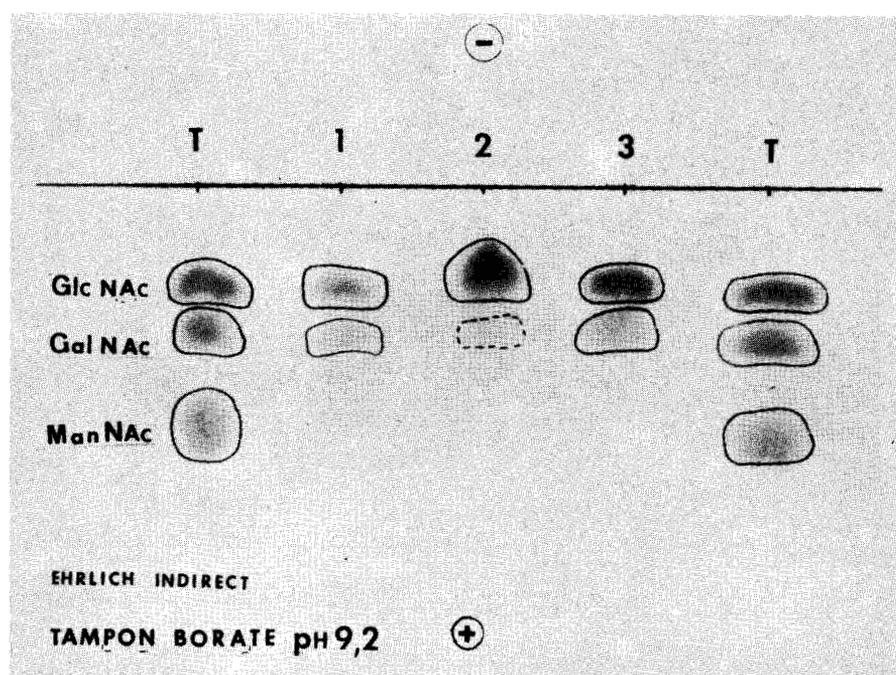


Figure 16

Electrophorèse des osamines N-réacétylées des fractions 1, 2 et 3 de la figure 14 (p. 98) obtenues par gel filtration sur Sephadex G-50.

Tampon borate à 1 p. 100 de pH 9,2 ; 10 10 V/cm pendant 4 h ; révélation par la réaction d'Erlich "indirecte".



#### d) Composition en amino-acides

Le pourcentage de protéines, (dosage par la méthode de Lowry résultats exprimés par rapport à la Sérum Albumine bovine) est de :

- . 70 p. 100 pour le pic I
- . 32 p. 100 pour le pic II
- . 30 p. 100 pour le pic B

L'analyse à l'Auto-analyseur Technicon (\*), des hydrolysats chlorhydriques donne, pour les différentes fractions, des résultats semblables (Tableau XXV ; p. 102) avec des pourcentages élevés d'acides aspartique, glutamique et glycolle. Ce résultat pourrait s'expliquer par une origine commune des différentes molécules réparties dans les fractions 1, 2 et 3.

#### 3° - Conclusions

La "gel filtration" de l'"adialysable urinaire", total sur Sephadex G-50, fournit donc un procédé de fractionnement intéressant et reproductible.

Il nous permet, en effet, de préciser la nature de l'"extrait urinaire" que nous utilisons, qui est également le substrat de dosage des glycoprotéides totaux de l'urine. Il s'agit donc d'un mélange de glycoprotéines et de glycopeptides dérivant vraisemblablement les uns des autres.

---

(\* ) Les dosages d'acides-amino à l'Auto-analyseur Technicon ont été effectués au laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de LILLE par M. MONSIGNY et L. BERTHIAUX que nous remercions vivement.

D'autre part, nous avons vu que les acides uroniques ne sont pas quantitativement des acides uroniques mucopolysaccharidiques.

Une chromatographie préalable de notre "adialysable urinaire" sur colonne Sephadex G-50, va fournir, à présent un excellent fractionnement de base des glycoprotides urinaires, préalable à de nouveaux sous-fractionnements.

### C - SOUS-FRACTIONNEMENT DES PICS I ET II SUR SEPHADEX

#### 1° - Sous-fractionnement du pic I

a) Deuxième chromatographie sur Sephadex G-50  
(élution par l'eau).

Nous avons effectué le "recyclage" sur le même gel de Sephadex G-50, du pic I, élué avec le front du solvant dans une première chromatographie. Le déplacement des substances est, cette fois, réalisé par de l'eau distillée.

Le schéma de fractionnement montre un découpage en trois pics, colorés en brun plus ou moins foncé (Figure 17 ; p. 107). Le pic le plus important est élué avec le front du solvant. Les deux premiers pics contiennent, outre des oses neutres et des acides sialiques, des osamines et des acides uroniques, tandis que le dernier pic très coloré, ne contient que des acides uroniques et des oses neutres en petite quantité.

La composition centésimale et le comportement immunoélectrophorétique des fractions obtenues sont donnés dans le tableau XXVI (p. 108).

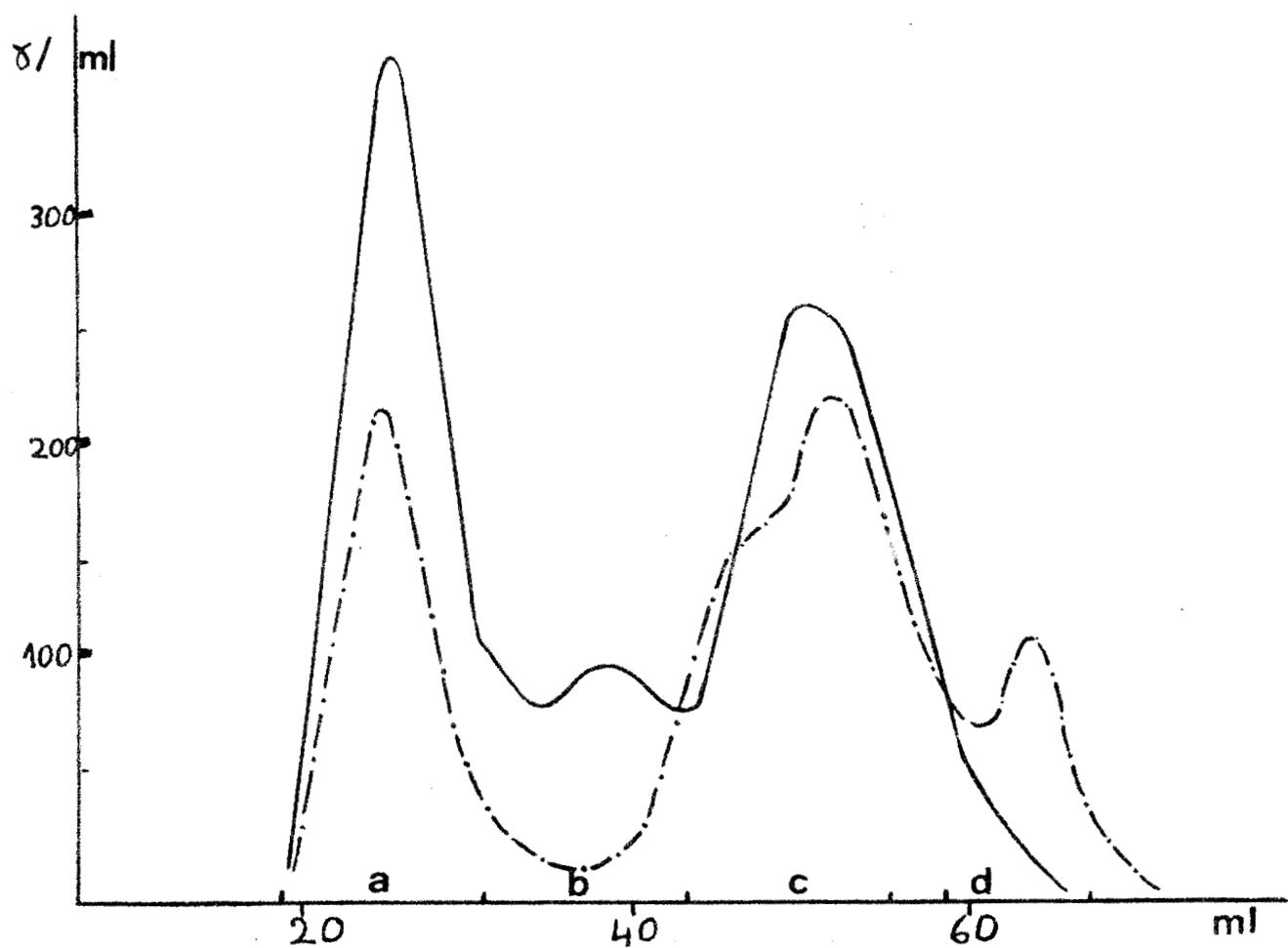


Figure 17

Fractionnement du pic I (voir figure 14 ; p. 98) sur Sephadex G-50, élution par l'eau distillée.

Oses neutres : (—) ; acides uroniques (·—·—).



TABLEAU XXVI

Composition centésimale des fractions obtenues par sous-fractionnement du Pic I (Fig. 17 ; p. 107).

Fractions	Poids sec pour 100 mg	Osés "neutres" p. 100	Acides uroniques p. 100	Acides sialiques p. 100	Osés "neutres" Acides sialiques	Osés "neutres" Osamines	Arcs (*)
a	50 ± 5	9,6	1,5	11,8	0,82	2,14	6
b	9 ± 2	13,2	3,3	15,6	0,85	1,18	4
c	16 ± 5	11,7	5,7	16,5	0,71	1,15	5
d	1,5 ± 0,5	7,1	3,2	0	-	-	0

(\*) Nombre d'arcs obtenus en immunoelectrophorèse contre un anti-sérum antiglycoprotides urinaires.



### b) Sous-fractionnement du pic Ia

La fraction Ia a été soumise successivement à deux nouvelles chromatographies sur Sephadex G-200 et sur Dowex 1 x 4.

Pour la chromatographie sur Sephadex G-200, le déplacement des composés est effectué par de l'eau distillée. Nous obtenons 4 fractions riches en sucres (33 à 45 p. 100 de glucides totaux), contenant toutes des acides uroniques et des osamines et de plus une fraction plus retardée, très colorée, ne contenant que 7 p. 100 d'oses neutres et 3,3 p. 100 d'acides uroniques. Le premier pic correspond au volume d'exclusion du gel, ce qui indique que certains glycoprotides urinaires ont un poids moléculaire élevé, supérieur à 200 000. Toutes les fractions sont très hétérogènes et n'ont pu être retenues pour de nouveaux essais de purification.

Ce même pic Ia a été alors chromatographié sur Dowex 1 x 4, l'élution a été effectuée successivement par de l'eau distillée, de l'acide chlorhydrique 0,1 N puis de l'acide chlorhydrique 3 N.

La fraction HCl 3 N est la plus intéressante ; elle représente la moitié du matériel élué, c'est la seule fraction à contenir des acides uroniques et elle donne 3 bandes très colorées par révélation au Bleu Alcian après électrophorèse sur acétate de cellulose. Elle contient donc les mucopolysaccharides acides, que nous pouvons ainsi séparer du reste des glycoprotéines. La fraction neutre et les 4 fractions obtenues par l'élution HCl 0,1 N sont toutes hétérogènes et présentent de 3 à 6 arcs en immunoélectrophorèse.

## 2° - Sous-fractionnement du pic II

a) Deuxième chromatographie sur Sephadex G-50  
(élution par l'eau)

De même que pour le pic I, nous avons rechromatographié le pic II sur le même gel de Sephadex G-50, élué

par de l'eau distillée. Les résultats obtenus sont rassemblés pages 108 et 111 (Fig. 18 et Tableau XXVI).

L'absorbance élevée en UV des fractions c et d correspond à une importante coloration marron, les fractions a et b ne sont pas colorées. La dernière fraction (d), peu importante pondéralement, est composée essentiellement de pigments, elle est pauvre en glucides mais contient des acides uroniques.

#### b) Sous-fractionnement des pics IIb et IIc

Les fractions les plus abondantes, b et c, ont été soumises à une nouvelle gel filtration sur Sephadex G-100.

Sur Sephadex G-100, éluée par de l'eau distillée, la fraction IIb donne un pic principal ; ce composé, donnant après lyophilisation une poudre parfaitement blanche, contient 52 p. 100 de glucides et est dépourvu d'acides uroniques ; il donne deux arcs en immunoélectrophorèse.

De même, nous avons chromatographié la fraction IIc sur Sephadex G-100 ; nous obtenons 4 fractions dont la plus importante contient 55 p. 100 de glucides dont 2,3 p. 100 d'acides uroniques, c'est une poudre colorée en brun. En immunoélectrophorèse, elle donne un seul arc mais ceci ne peut être retenu comme critère d'homogénéité car il s'agit d'une fraction de nature glycopeptidique et donc faiblement antigénique.

#### 3° - Conclusions

Les sous-fractionnements sur Sephadex ne nous ont apporté que peu de renseignements. Il semble qu'il y ait des phénomènes de polymérisation et de dépolymérisation des composés de faible poids moléculaire, puisque une fraction homogène éluée de Sephadex G-50 avec un solvant est résolue en plusieurs composés avec un autre solvant. Cette observation rejoint celle faite par MAC GALE (310) à propos de

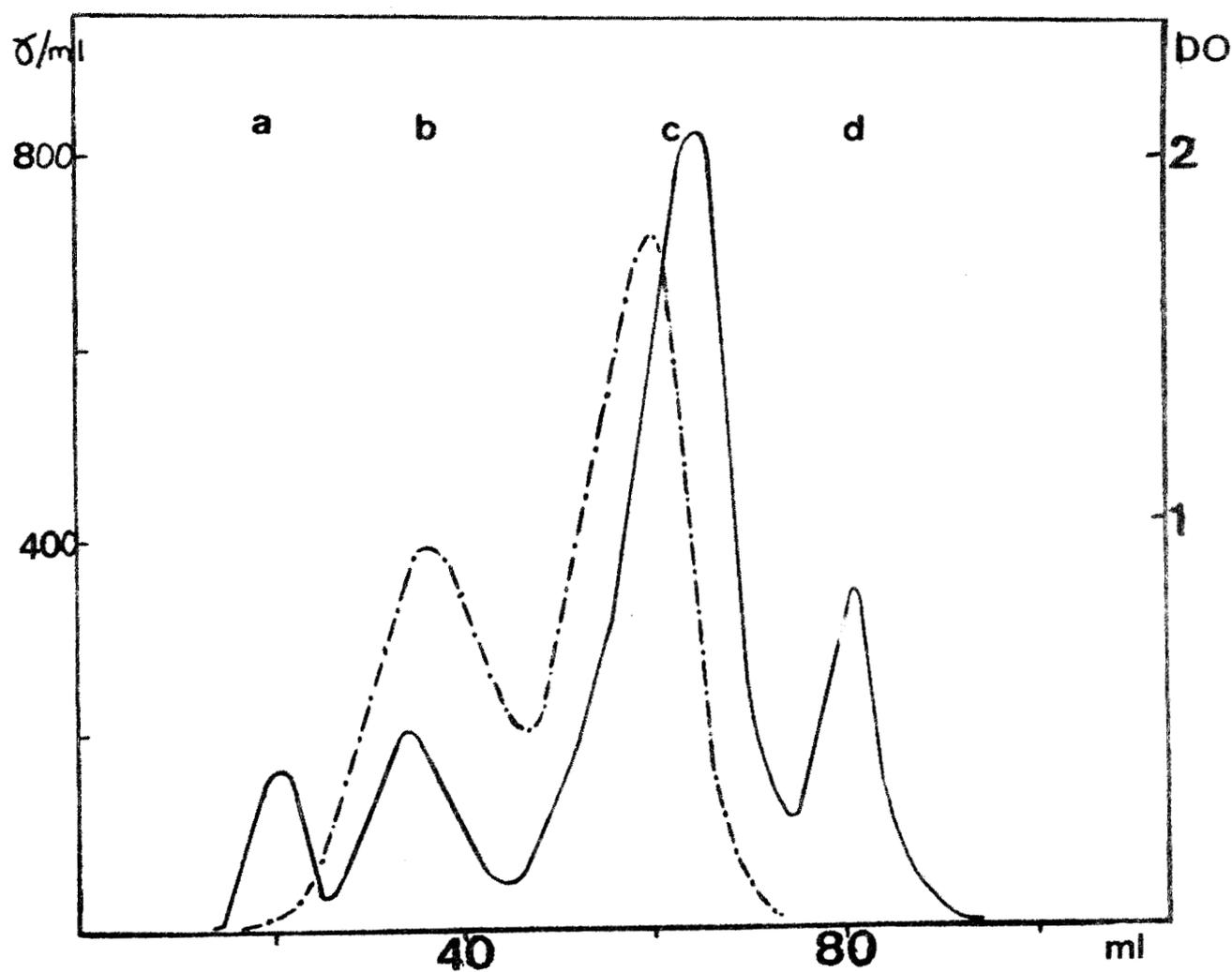


Figure 18

Fractionnement du pic II (voir Fig. 14 ; p. 98) sur Sephadex G - 50, élution par l'eau distillée ; absorbance UV : (—) ; oses neutres : (- · - · -).



TABLEAU XXVII

Composition centésimale des fractions obtenues par sous-fractionnement du pic II (Fig. 18 ; p. 111)

Fractions	Poids sec pour 100 mg	Osés "neutres"		Acides uroniques		Acides sialiques		Osamines		Osés "neutres"		Osés "neutres" Osamines
		p. 100		p. 100		p. 100		p. 100		Acides sialiques		
a	3	20,9		0,7		19,2		11,0		1,09		1,94
b	30	23,8		0		24,6		15,4		1,63		1,54
c	36	18,8		1,9		21,6		11,35		0,87		1,65
d	5	2,9		1,2		0		0		-		-



chromatographies sur Sephadex G-75. Selon cet auteur, ces effets d'"agglomérations" expliqueraient la présence de composés de faible poids moléculaire dans les fractions urinaires non ultrafiltrables et non dialysables et limiteraient l'emploi de la gel filtration pour la détermination des poids moléculaires des fractions contenant plusieurs composés.

#### D - ETUDE COMPAREE DES PICS I ET II PURIFIES

##### 1° - Purification des pics

Nous avons effectué un recyclage des pics obtenus lors d'une première chromatographie en utilisant exactement la même méthode que pour cette première chromatographie, c'est-à-dire Sephadex G-50 (colonne de 3 x 100 cm) élution par NaCl 0,08 M (voir paragraphe B, p. 96).

Pour la purification, nous abaissons la quantité d'échantillon à chromatographier de 500 à 300 mg.

Au deuxième passage, le pic I donne un seul pic important repérable en UV à 278 nm, et par dosages des oses neutres à l'orcinol sulfurique et des acides uroniques au carbazol sulfurique. Ce pic passe entre 200 et 320 ml d'élution. La courbe des oses neutres présente un épaulement entre 340 et 380 ml, tandis que l'UV indique une trainée jusque 800 ml, de densité optique égale à 0,1 environ (alors que la densité optique au sommet du pic est supérieure à 2).

Nous recueillons donc l'élution entre 200 et 320 ml. Le rendement de cette opération de purification est de 70-75 p. 100, (pic I purifié).

Pour le pic II, après un second passage sur Sephadex G-50, nous effectuons uniquement les repérages en UV

et par dosage des oses neutres, tube par tube.

Nous obtenons un premier pic très petit correspondant au pic I, qui est éliminé. La courbe des oses neutres se présente comme un pic très important, presque symétrique ; tandis qu'en UV, nous obtenons deux pics mal séparés, le premier correspondant aux oses ; le second légèrement coloré en brun, chevauche la branche la plus retardée du pic des oses neutres. Nous recueillons l'élution contenant les oses, en éliminant les deux extrémités de la courbe, soit entre 350 et 550 ml. Nous obtenons après dialyse et lyophilisation, le pic II purifié avec un rendement de 60 à 65 p. 100.

## 2° - Composition centésimale et molaire

Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux XXVIII et XXIX (p. 115 et 116).

### a) La fraction I

La fraction I est assez pauvre en glucides totaux mais plus riche en protéines (30 et 70 p. 100 respectivement). Elle contient des acides uroniques. Parmi les oses neutres, outre le galactose, le mannose et le fucose, on trouve un peu de xylose, le glucose n'est trouvé qu'à l'état de traces. En ce qui concerne les osamines, la galactosamine est presque aussi abondante que la glucosamine puisque le rapport glucosamine/galactosamine est de 1,4.

### b) La fraction II

La fraction II est nettement glycopeptidique, puisqu'elle contient 70 p. 100 de glucides totaux, parmi lesquels un fort pourcentage d'acides sialiques et d'osamines et par contre, très peu d'acides uroniques.

Les rapports molaires ne présentent pas de caractéristiques particulières si ce n'est l'augmentation du rapport glucosamine/galactosamine.

TABLEAU XXVIII

Composition centésimale des fractions I et II purifiées

	: Fraction I purifiée	: Fraction II purifiée
Protéines (*)	73,66	32,10
Glucides totaux	33,07	70,27
Oses neutres	12,55	23,92
Acides uroniques	3,01	1,50
Acides sialiques	12,95	18,41
Osamines	4,56	16,44
Oses neutres/acides uroniques	4,17	15,95
Oses neutres/acides sialiques	0,97	1,30
Oses neutres/osamines	2,75	1,45

(\*) Dosées par la méthode de Lowry et exprimées en p. 100 par rapport à la sérum albumine bovine.



TABLEAU XXIX

Rapports molaires (pour 10 résidus de galactose) des oses, osamines, acides sialiques et acides uroniques des fractions I et II purifiées.

	Fraction I purifiée	Fraction II purifiée
Galactose	10	10
Glucose	Traces	1
Mannose	4,4	4,9
Fucose	2	2,7
Xylose	0,3	0,2
Osamines	6	13
$\frac{\text{Glc NH}_2}{\text{Gal NH}_2}$	1,4	3,3
Acides sialiques	10	8,3
Acides uroniques	4	1



### 3° - Composition en acides aminés

La composition en acides aminés a été réalisée sur un hydrolysate chlorhydrique (HCl 5,6 N ; 100° C ; 24 h ; en tube scellé sous vide) à l'Auto-analyseur Technicon.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau XXX (p. 118).

Nous pouvons observer la similitude de composition en acides aminés des fractions I et II purifiées ; la fraction II étant plus riche en acides aminés aliphatiques et plus pauvre en acides aminés aromatiques que la fraction I.

### 4° - Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique

Les résultats sont illustrés dans les figures 19 et 20 (p. 119 et 120).

a) La fraction I en électrophorèse sur acétate de cellulose donne deux bandes très nettes et très fines, migrant sensiblement au même niveau que l'acide hyaluronique.

En immunoélectrophorèse, le pic I se révèle très antigénique ; on peut dénombrer autant d'arcs que dans l'adialysable urinaire total et même certains arcs supplémentaires apparaissent, étant donné que cette préparation est plus riche en protéines que l'adialysable urinaire total. On obtient également plusieurs arcs en effectuant l'immunoélectrophorèse du pic I purifié contre un sérum antiprotéines sériques humaines.

b) La fraction II donne également deux bandes de mucopolysides acides révélables au Bleu Alcian, après électrophorèse sur acétate de cellulose.

Ces deux bandes se situent au niveau des chondroitines sulfates.

TABLEAU XXX

Composition en acides aminés des fractions I et II purifiées

	Fraction I purifiée	Fraction II purifiée
	(a)	(a)
Asp	10,80	15,22
Thr	7,69	10,17
Ser	8,19	8,57
Glu	12,60	10,41
Pro	-	3,12
Gly	6,60	19,19
Ala	6,93	8,58
Cys	4,13	0,16
Val	4,35	0,35
Met	0,82	-
Ileu	2,97	3,51
Leu	9,20	4,60
Tyr	4,30	1,99
Phe	4,67	2,48
Lys	8,29	5,49
Hist	3,55	2,57
Arg	4,91	3,53

(a) en p. 100 de la somme d'acides-amino (Try non dosé).



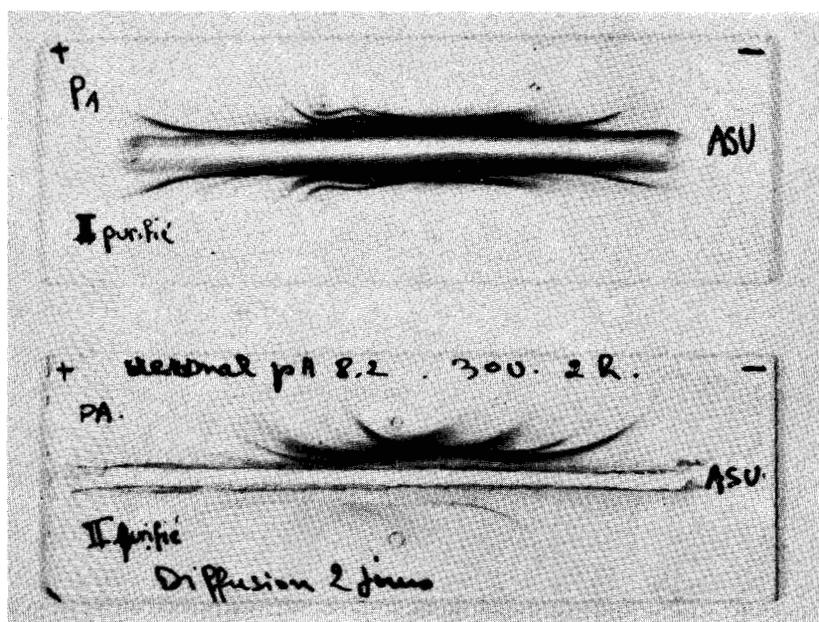


Figure 19



Immuno-électrophorèse des fractions I et II purifiées

ASU : sérum de lapin antiprotéides urinaires

PA : adialysable de précipité alcoolique

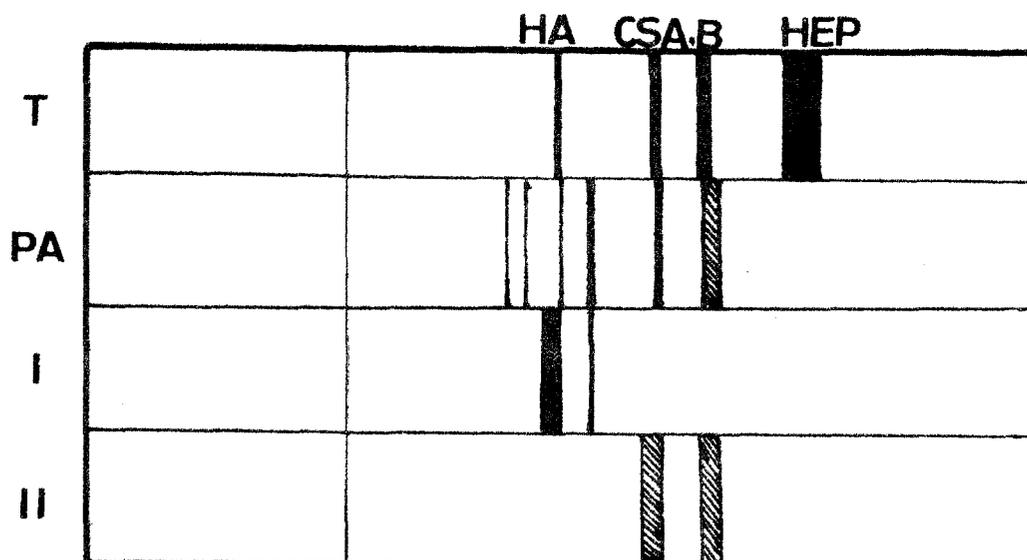


Figure 20

A - Electrophorèse sur acétate de cellulose des fractions I et II purifiées.

Tampon pyridine/acide formique/eau pH3.

Tension 3 V/cm - durée 4 h.

Révélation par le réactif au Bleu Alcian.

T : - témoins mucopolysaccharides acides : HA, acide hyaluronique ; CAS, acides chondroitines sulfuriques A, C ; CSB, chondroïtine sulfate B, Hep, Héparine.



En immunoélectrophorèse, après purification et malgré sa nature glycopeptidique, le pic II est encore antigénique si la diffusion est faite contre un sérum anti-protéines urinaires. Par contre, nous n'obtenons plus aucun arc si la diffusion est faite contre un sérum antiprotéines sériques.

Ayant défini les deux fractions principales constituant les glycoprotides urinaires, nous avons étudié leur comportement sur échangeurs d'ions : Dowex 1 x 4 et DEAE-Sephadex.

#### E - CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX 1 x 4 DES PICS I ET II PURIFIES

##### 1° - Mode opératoire

###### a) Chromatographie

La résine Dowex 1 x 4 (200 - 400 "mesh") est une résine échangeuse d'anions, c'est-à-dire qu'elle fixe les composés acides. Elle est régénérée d'abord en béccher, puis en colonne, en utilisant successivement de la soude 3 N, un rinçage à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre, de l'acide formique concentré et un rinçage à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre.

Nous avons utilisé des colonnes de 2 x 40 cm pour chromatographier des quantités de 300 mg de poudre. Le substrat, dissous dans 5 ml d'eau distillée, est déposé au sommet de la colonne de résine. Le dépôt doit être fait en une couche très fine pour éviter la dispersion pendant la chromatographie.

Une pompe péristaltique permet de régler le débit de la colonne à 15 ml/h et des fractions de 5 ml sont recueillies sur collecteur de fractions automatique. Le fractionnement est effectué à + 4° C pour éviter toute fermentation et surtout la dégradation des glycoprotides par l'acide chlorhydrique à température ambiante.

L'élution est réalisée successivement par :

- . l'eau distillée
- . l'acide chlorhydrique 0,1 N
- . l'acide chlorhydrique 3 N

Le repérage des pics se fait par dosage en UV à 278 nm. Les fractions obtenues sont dialysées et lyophilisées.

#### b) Analyse des fractions

Toutes les fractions ont été étudiées du point de vue de leur composition centésimale en glucides, ainsi que de leur comportement en électrophorèse et immunoélectrophorèse. Nous avons décrit aux pages 54 à 60, les méthodes employées pour ces analyses.

### 2° - Résultats obtenus avec le pic I purifié.

#### a) Chromatographie

L'élution par l'eau distillée donne une seule fraction FN, l'acide chlorhydrique 0,1 N donne un profil d'élution avec trois pics principaux, un quatrième pic,

matérialisé par un anneau brun se déplaçant le long de la résine, est obtenu en trop faible quantité pour être étudié. Avec l'acide chlorhydrique 3 N, on n'obtient qu'une seule fraction.

Certains pigments urinaires sont fixés irréversiblement sur la résine et il est impossible d'éluer toute la coloration brune se trouvant au sommet de la colonne.

#### b) Analyse des fractions

Les fractions neutres et HCl 3 N sont les plus importantes pondéralement. Sauf avec la fraction neutre, les poudres obtenues sont colorées plus ou moins en jaunemarron.

Le rendement de la chromatographie est de 50 p. 100. Les résultats sont résumés dans le tableau XXXI (p. 124) et la figure 21 (p. 125).

Nous observons que les fractions neutres et HCl 0,1 N sont dépourvues d'acides uroniques ou en contiennent des quantités négligeables.

Tous les acides uroniques sont élués par l'HCl 3 N.

Les taux d'oses neutres, d'acide sialique et d'osamines augmentent régulièrement de FN à F3 tandis que les rapports oses neutres/acide sialique et oses neutres/osamines restent assez constants, en particulier pour les pics élués par l'HCl 0,1 N.

Toutes les fractions se révèlent hétérogènes en immunoélectrophorèse (Figure 21 ; p. 125) différentes les unes des autres, mais cependant il semble que certaines protéines se retrouvent dans plusieurs fractions.

TABEAU XXXI

Composition des fractions obtenues par chromatographie  
sur Dowex 1 x 4 du pic I purifié

Fractions	Poids P. 100 mg	Oses neutres P. 100 mg	Acides uroniques P. 100	Acides sialiques P. 100	Osamines P. 100	Oses neutres Acides Sialiques	Oses neutres Osamines	Arcs (#)	B.A. (**)	
eau distillée	FN	11,5 mg	5,53	0	3,38	3,19	1,63	1,73	6	0
HCl 0,1 N	1	2,8 mg	4,33	0	5,29	2,56	0,82	1,69	5	(1)
HCl 0,1 N	2	9,1 mg	6,20	0,18	6,83	3,59	0,91	1,73	6	0
HCl 0,1 N	3	6,2 mg	14,06	0,22	13,54	10,42	1,04	1,35	4	0
HCl 3 N	F 3 N	21,9 mg	11,10	8,45	12,15	10,87	0,91	1,02	4	4

(\*) - Nombre d'arcs en immunoelectrophorese  
(\*\*\*) - Nombre de bandes révélées au Bleu Alcian.



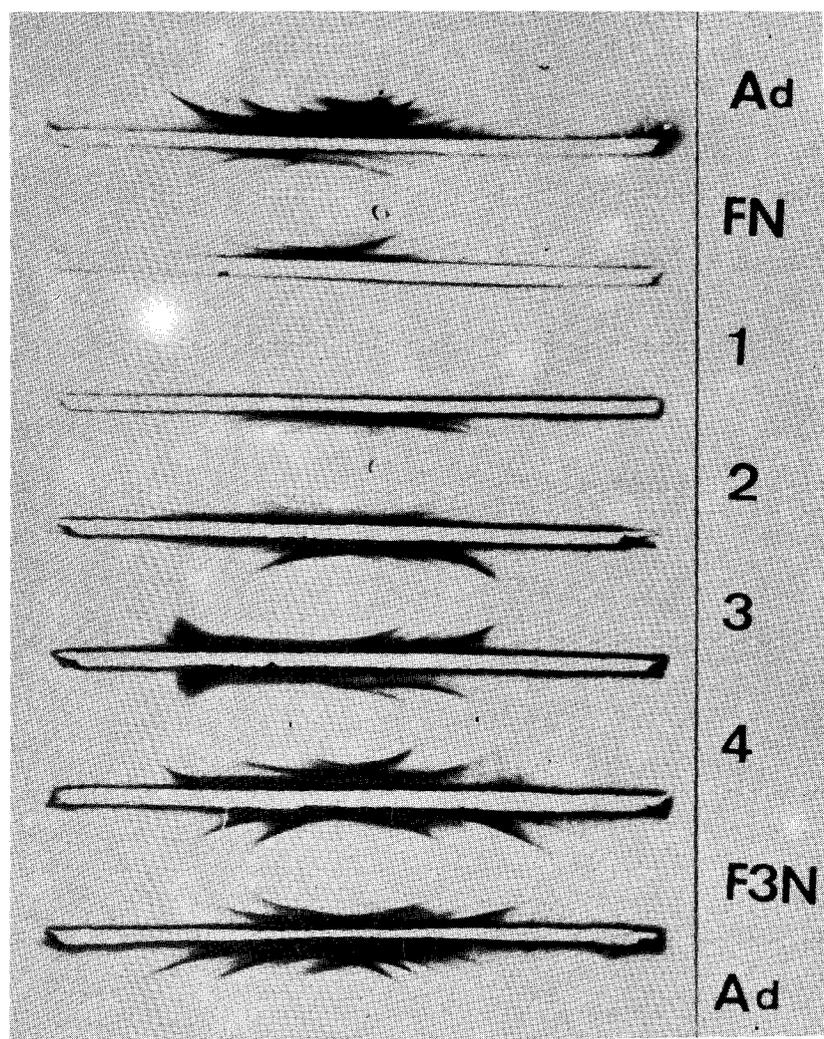


Figure 21



Immuno-électrophorèse des fractions obtenues par chromatographie du pic I purifié sur Dowex 1 x 4.

Ad. : "Adialysable urinaire"

Dans les gouttières : immunsérum anti-protides urinaires.

L'électrophorèse en acétate de cellulose donne des résultats intéressants puisque seule la fraction HCl 3 N donne 4 bandes très intenses, ce qui, vu le rapport acide uronique/osamines voisin de I dans cette fraction, confirmerait la présence des MPA associés à des protéines antigéniques.

### 3° - Résultats obtenus avec le pic II purifié

#### a) Chromatographie

Comme dans le cas précédent, nous obtenons une fraction neutre FN, trois pics avec l'acide chlorhydrique 0,1 N et une fraction acide F HCl 3 N.

#### b) Analyse des fractions

Les fractions les plus abondantes sont les fractions neutres et le troisième pic élué par HCl 0,1 N qui se présentent sous forme de poudre blanche.

Le rendement de la chromatographie est de 70 p. 100.

L'intérêt de la chromatographie sur Dowex 1 x 4 est d'obtenir, parmi les pics de tête du fractionnement, des composés dépourvus d'acide uronique (voir tableau XXXII ; p. 127).

La troisième fraction HCl 0,1 N qui représente 23 p. 100 du matériel chromatographié, est particulièrement riche en glucides (67 p. 100 de glucides totaux).

De plus, c'est une fraction riche en sialo-conjugués.

TABLEAU XXXII

Composition centésimale des fractions obtenues par chromatographie de la fraction II purifiée sur Dowex 1 x 4

Agent d'éluion	Fractions	Poids p. 100 mg	Osés neutres p. 100 mg	Acides uroniques p. 100	Acides sialiques p. 100	Osamines p. 100	Osés		Arcs : B.A. (*) : (**)	
							neutres	Acides sialiques		
Eau distillée	FN	36 mg	14,7	0	7,0	8,7	2,10	1,68	3	0
HCl 0,1 N	1	2,3 mg	10,2	0,4	9,5	6,7	1,07	1,52	4	0
HCl 0,1 N	2	6,5 mg	20,5	0,4	17,2	12,7	1,19	1,61	(2)	0
HCl 0,1 N	3	23,1 mg	28,0	1,7	29,1	8,5	0,96	3,29	0	(3)
HCl 3 N	F 3 N	8 mg	3,26	2,8	3,5	3,6	0,93	0,90	0	2

(\*) - Nombre d'arcs en immunoelectrophorèse

(\*\*) - Nombre de bandes sur acétate de cellulose révélées au Bleu Alcian.



Sa nature glycopeptidique explique qu'elle ne soit pas antigénique (Figure 22 ; p. 129). On constate, que seules sont antigéniques, les fractions de tête qui sont moins riches en glucides totaux.

Inversement, sur acétate de cellulose, les révélations au Bleu Alcian indiquent la présence de mucopolysides autres que des MPA dans les fractions très acides.

#### 4° - Conclusions

Dans les deux cas de sous-fractionnements des pics I et II sur Dowex 1 x 4, nous obtenons à la fois, une fraction neutre et des fractions acides.

Cependant, la chromatographie des deux pics est assez différente et si le pic I donne en majorité des MPA (FHCl 3 N), le pic II est surtout riche en FHCl (3) et cette dernière, par son comportement chromatographique et sa composition en glucides, présente une analogie avec le pic 7 obtenu par chromatographie sur Dowex, dans les mêmes conditions, de l'"adi-lysable urinaire"total (VAILLANT-DELACROIX) (311).

Mais, toutes les "sous-fractions" obtenues sont encore hétérogènes en immunoélectrophorèse.

L'intérêt de ce type de chromatographie est de permettre d'éliminer les acides uroniques par l'élution HCl 3 N, ce qui donne des fractions dépourvues de MPA pour l'étude des glycoprotéines à partir du pic I, et des fractions dépourvues de glucoronoconjugués pour l'étude des glycopeptides, à partir du pic II.

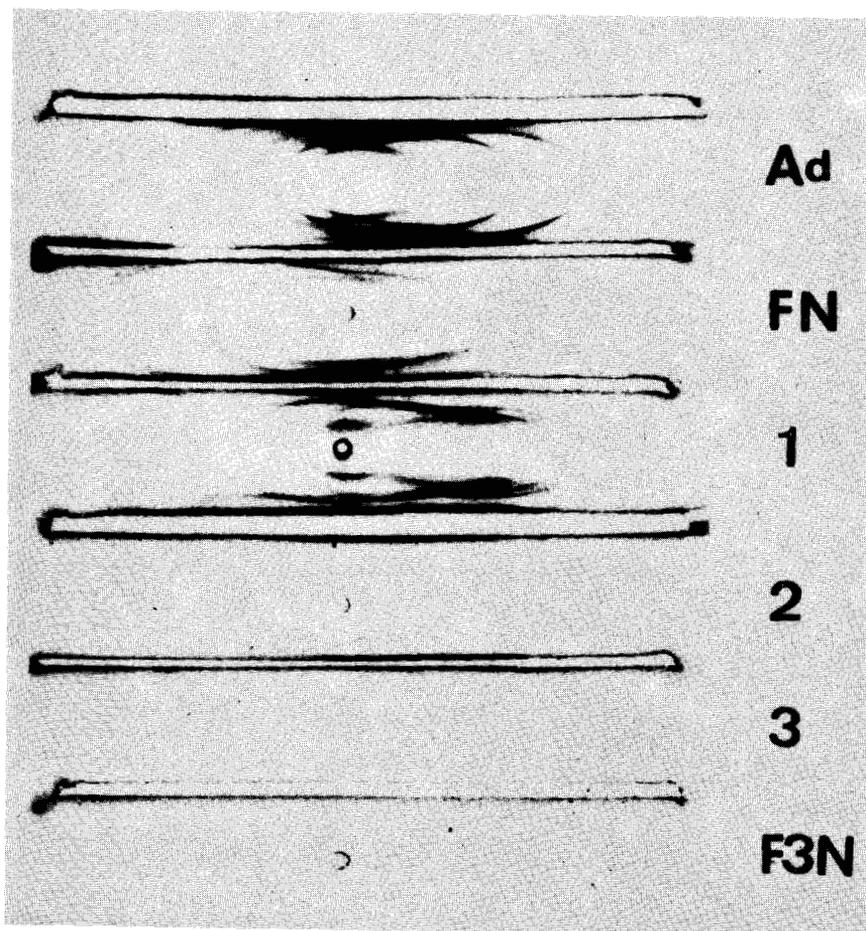


Figure 22

Immuno-électrophorèse des fractions obtenues par chromatographie du pic II purifié sur Dowex 1 x 4.

Ad. : "Adialysable urinaire"

Dans les gouttières : immunosérum anti-protides urinaires.



F - CHROMATOGRAPHIE DES PICS I ET II PURIFIES SUR DEAE-SEPHADEX

Nous avons appliqué le procédé de fractionnement des glycoprotides urinaires proposé par ANDERSON (312).

1° - Mode opératoire

a) Chromatographie

Nous avons employé de la DEAE-Sephadex A-50, fournie par les laboratoires "Pharmacia" (UPPSALA, Suède).

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

Elle est équilibrée, dans la colonne, avec le tampon de départ.

Après tassement de la colonne, l'échantillon est déposé au sommet de celle-ci : 500 mg, dissous dans le tampon de départ (phosphate de sodium 0,02 M pH 6,7) sont chromatographiés sur des colonnes de 2,5 x 25 cm.

L'élution est effectuée en gradient discontinu, de molarité croissante en NaCl et de pH constant.

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

### b) Analyse des fractions

Le repérage des fractions est effectué en UV à 278 nm.

Les fractions sont ensuite rassemblées et dialysées, 3 à 5 jours, pour éliminer le tampon, avant d'être lyophilisées.

Les méthodes employées pour déterminer la composition en glucides et effectuer l'étude électrophorétique et immunoélectrophorétique des fractions ont été décrites aux pages 54 à 60.

## 2° - Résultats obtenus avec le pic I purifié.

### a) Chromatographie

Chaque tampon décroche un pic, sauf l'élution par le tampon phosphate additionné de NaCl 0,2 M qui donne deux fractions.

La fraction 4, élue par le tampon phosphate additionné de NaCl 0,4 M, est la plus importante pondéralement et représente environ 50 p. 100 du total des composés élués.

Après lyophilisation, les fractions 1 et 2 se présentent sous forme d'une poudre blanche et par contre, les fractions 5, 6 et 7 sont nettement colorées en brun-marron.

Le rendement de la chromatographie, 60 p. 100 est assez intéressant.

### b) Analyse des fractions

Nos résultats sont rassemblés dans le tableau XXXIII (p. 132) et la figure 23 (p. 133).

TABLEAU XXXIII

Composition des fractions obtenues par chromatographie  
du pic I purifié sur DEAE-Sephadex

Agent d'élution	Fractions	Poids p. 100 mg	Oses neutres p. 100	Acides uroniques p. 100	Acides sialiques p. 100	Osamines p. 100	Oses neutres Acides sialiques	Oses neutres Osamines	Arcs (*)	B.A (**)
phosphate 0,02 M	1	5,5	11,6	0	4,8	4,1	2,42	2,82	4	0
phosphate 0,02 M NaCl 0,01 M	2	3	9,3	0,2	8,1	3,0	1,15	3,10	2	0
phosphate 0,02 M NaCl 0,2 M	3a	4	12,6	0,4	13,7	5,4	0,92	2,33	5	0
	3b	11,2	12,0	0,4	14,4	7,7	0,83	1,55	4	1
phosphate 0,02 M NaCl 0,4 M	4	27,4	11,3	1,6	16,7	8,4	0,67	1,34	5	3
phosphate 0,02 M NaCl 0,6 M	5	5	11,2	8,0	8,1	8,0	1,38	1,40	6	2
phosphate 0,02 M NaCl 1 M	6	5	7,2	15,8	4,1	14,4	1,75	0,5	4	2
phosphate 0,02 M NaCl 2 M	7	1,2	7,1	2,6	3,0	0,8	2,36	8,8	0	1

(\*) Nombre d'arcs en immunoélectrophorèse

(\*\*) Nombre de bandes sur acétate de cellulose révélées au Bleu Alcian



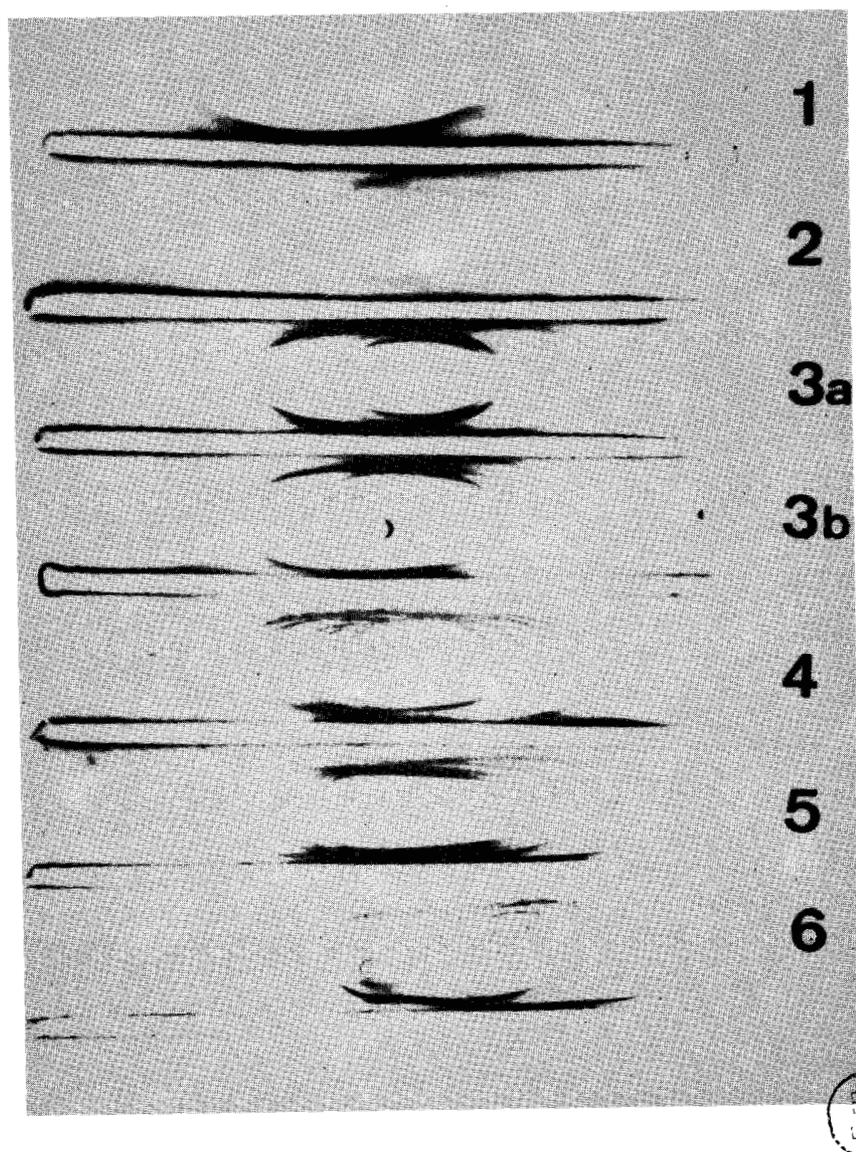


Figure 23

Immuno-électrophorèse des fractions obtenues par chromatographie du pic I sur DEAE-Sephadex.

Dans les gouttières : immunsérum anti-protides urinaires.

Nous pouvons observer que toutes les fractions sont hétérogènes en immunoélectrophorèse, et différentes les unes des autres.

Elles sont également différentes par leur composition en glucides. En particulier, les fractions 1, 2 et 3 ne contiennent pratiquement pas d'acide uronique et ne donnent aucune bande révélabale au Bleu Alcian après électrophorèse sur acétate de cellulose. Elles ne contiennent donc pas de mucopolysaccharides acides. Par contre, les fractions 5 et surtout 6, sont très riches en acides uroniques et donnent des bandes très colorées au Bleu Alcian. C'est donc dans ces pics que sont fractionnés les mucopolysaccharides acides.

### 3° - Résultats obtenus avec le pic II purifié

#### a) Chromatographie

Chaque tampon donne une fraction différente ; la première élution permet de différencier 3 pics. Les fractions 1, 2 et 3 sont incolores tandis que les suivantes sont plus ou moins colorées en brun-marron.

Le rendement de la chromatographie est de 65 p. 100, les fractions les plus importantes étant éluées avec les 2 premiers tampons.

#### b) Analyse des fractions

Comme nous le constatons d'après le tableau XXXIV (p. 135) nous obtenons, du point de vue acide uronique, deux types de fractions : les fractions 1 et 2, pour lesquelles le pourcentage est négligeable, et les autres fractions qui en contiennent jusque 6,6 p. 100.

TABLEAU XXXIV

Composition des fractions obtenues par chromatographie  
du pic II purifié sur DEAE-Sephadex

Concentration d'élution	Fractions	Poids p. 100 mg	Oses neutres p. 100	Acides uroniques p. 100	Acides sialiques p. 100	Osamines p. 100	Oses neutres Acides sialiques	Oses neutres Osamines	Arcs (*)	B.A. (**)
Phosphate 0,02 M	1a	13	32,7	0,2	9,6	16,0	3,40	2,04	3	0
	1b	13	27,6	0,2	20,5	17,5	1,35	1,58	(1)	0
	1c	3	29,3	0,1	6,0	16,7	4,88	1,75	0	0
Phosphate 0,02 M + NaCl 0,1 M	2	18	25,2	0,3	13,8	15,5	1,82	1,62	2	0
Phosphate 0,02 M + NaCl 0,2 M	3	6,6	13,7	2,9	15,7	9,1	0,87	1,50	3	1
Phosphate 0,02 M + NaCl 0,4 M	4	2,2	9,3	4,2	6,2	5,3	1,50	1,75	2	2
Phosphate 0,02 M + NaCl 0,6 M	5	0,6	8,9	6,6	-	5,2	-	1,71	0	1
Phosphate 0,02 M + NaCl 1 M	6	1	11,2	3,1	-	3,2	-	3,50	0	1
Phosphate 0,02 M + NaCl 3 M	7	2	10,2	2,0	-	-	-	-	0	1

(\*) Nombre d'arcs en immunoélectrophorèse

(\*\*) Nombre de bandes sur acétate de cellulose révélées au Bleu Alcian



Les fractions 1 et 2, nettement glycopeptidiques puisque renfermant 55 et 60 p. 100 de glucides totaux, sont néanmoins antigéniques (Figure 24 ; p. 137).

#### 4° - Conclusions

La chromatographie sur DEAE-Sephadex permet de localiser les MPA dans 3 fractions dans le cas du pic I et pour le pic II, permet d'obtenir les fractions 1 et 2, les plus importantes, totalement dépourvues d'acides uroniques.

D'autre part, ce type de fractionnement fournit des composés nettement différents les uns des autres et également différents suivant la nature du pic chromatographié. Nous pouvons distinguer, en effet, des composés riches en acides sialiques, en osamines ou en acides uroniques.

Mais, aucune des sous-fractions obtenues n'est homogène en immunoélectrophorèse et en électrophorèse sur acétate de cellulose. Et cette méthode ne permet pas d'obtenir de composés définis, ni même de fractions suffisamment simplifiées pour laisser espérer l'isolement facile d'"uromucoïdes".

#### G - ETUDE DU PIC B

Le pic B (correspondant à la fraction 4 de la figure 14 (p. 98) est caractérisé :

. Par son faible poids moléculaire : son comportement sur Sephadex G-50 est analogue à celui de disaccharides ou même d'acide glucuronique libre (nous avons vérifié par électrophorèse qu'il ne s'agit pas d'acide uronique libre).

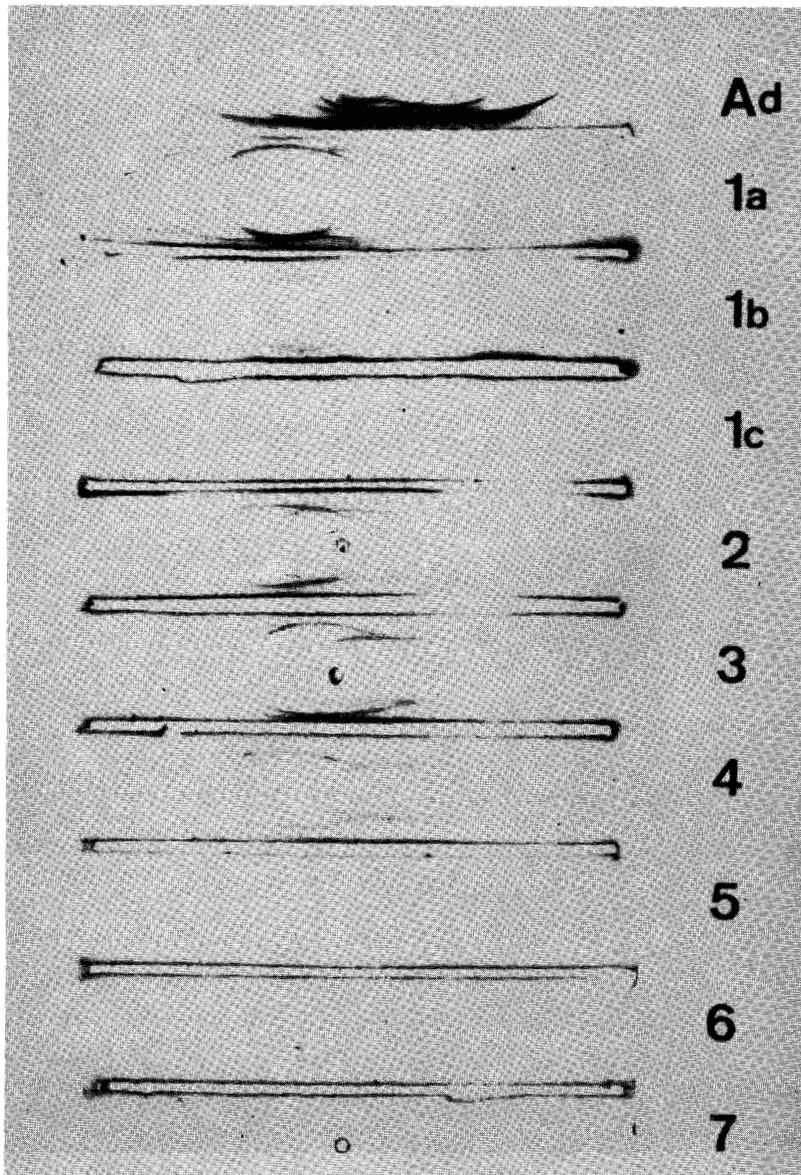


Figure 24

Immuno-électrophorèse des fractions obtenues par chromatographie du pic II purifié sur DEAE-Sephadex.

Ad. : "Adialysable urinaire".

Dans les gouttières : immunsérum anti-protides urinaires



. Par son faible pourcentage en glucides totaux, (10 à 15 p. 100) composés d'oses neutres et d'acides uroniques dans un rapport voisin de 1.

. Par la présence de glucose.

. Par un taux d'acides aminés de 30 p. 100.

. Par sa coloration brun-marron très accentuée, liée à la présence d'acide uronique, ce qui pose le problème de l'"urochrome", pigment urinaire, isolé par DRABKIN (313) en 1930, et soluble dans les solvants organiques, en particulier le n-butanol et l'isobutanol. En effet, une partie de la coloration du pic B est extractible par le butanol.

#### 1° - Action de l'amylase

Posant en hypothèse que le glucose trouvé dans le pic B pouvait s'expliquer par la présence, dans l'urine, de produits de dégradation du glycogène, nous avons testé l'activité de l'amylase sur ce pic B.

##### a) Mode opératoire

L'amylase (Sigma) employée est une  $\alpha$ -amylase de Bacillus subtilis, d'activité 500-600 unités par mg (pH optimum 4,6).

Nous avons également employé de la  $\beta$ -amylase, ayant un pH optimum d'activité de 6,9.

Le mode opératoire est le suivant :

A 1,5 ml de glycogène (ou de substrat F 4) à 1 p. 100, sont ajoutés 0,5 ml de tampon (acétate de Ca pH 4,6 ou phosphate de Na pH 6,9 suivant le cas) et 0,2 ml d'enzyme (2 mg/ml).

Après incubation à 37°C (18 à 24 h), nous passons sur colonnes couplées de Dowex 50 x 8 et Duolite A-40. L'effluent neutre contient oses neutres et osides. Un témoin sans enzyme est préparé dans chaque expérience.

#### b) Résultats et discussion

Sur le témoin glycogène, l' $\alpha$ -amylase libère du glucose, la  $\beta$ -amylase libère du maltose.

Dans les mêmes conditions, ni l' $\alpha$ , ni la  $\beta$ -amylase n'ont d'activité enzymatique sur le pic B de l'urine et nous n'obtenons aucun produit de dégradation.

#### 2° - Action de la $\beta$ -glycuronidase

##### a) Mode opératoire

L'enzyme (Type B 10 Sigma) est employé à une concentration de 2 000 unités/ml, dans du tampon acétate 0,5 M, pH 4.

5 ml de tampon contenant l'enzyme sont ajoutés à 50 mg de poudre et mis à incuber à 40°C pendant 24 h.

Un témoin sans enzyme est préparé pour chaque expérience. Des cinétiques de temps d'incubation et de concentration enzyme/substrat ont été effectuées.

Les acides uroniques libérés sont recueillis dans la fraction dialysable, après une dialyse prolongée.

## b) Résultats et discussion

Le taux maximum de libération des acides uroniques est atteint dès 16 h d'incubation.

Après action de la  $\beta$ -glycuronidase, 70 à 75 p. 100 des acides uroniques totaux du pic B sont retrouvés dans la fraction dialysable et donc ont été libérés de leurs liaisons.

Mais, dans les mêmes conditions expérimentales en milieu tamponné à 40°, sans action enzymatique, 35-38 p. 100 des acides uroniques du pic B deviennent dialysables également.

Enfin, VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (314), obtiennent une libération de 95 p. 100 des acides uroniques par incubation, avec la  $\beta$ -glycuronidase, de leur deuxième pic, obtenu par gel filtration d'urine dialysée.

### 3° - Chromatographie du pic B sur échangeur de cations

#### a) Mode opératoire

300 mg de pic B, dissous dans l'eau distillée et amenés à pH 8,7, sont chromatographiés sur Dowex 1 x 4 (forme formiate ; colonne 2,5 x 40 cm). La préparation de la résine a été décrite précédemment (voir p. 121).

L'élution est effectuée par :

- . l'eau distillée (1 l)
- . l'acide formique 5 p. 100 (1 l)
- . l'acide formique 10 p. 100 (1 l)

L'acide formique des éluats est éliminé par lyophilisation.

## b) Résultats

Nous obtenons une fraction différente avec chacun des tampons d'élution.

Avec les tampons acides, une partie de la coloration est éluée ; un anneau brun se déplace le long de la colonne et est élué.

De nombreux composés sont fixés irréversiblement sur la résine et le rendement de la chromatographie n'est que de 30 p. 100.

La fraction neutre, contenant 24 p. 100 d'oses neutres, est dépourvue d'acide uronique. C'est dans cette fraction que se trouve le glucose du pic B. Les fractions acides contiennent des acides uroniques et des oses neutres (11 et 9 p. 100).

### 4° - Recherche d'oligosaccharides

Le pic B (300 mg) est purifié par passage sur colonnes couplées de Dowex et Duolite. L'effluent (FN) et l'élution de la Duolite par l'acide formique (FA) sont chromatographiés.

Nous obtenons, dans ces deux fractions, des osides, révélés par l'oxalate d'aniline (voir figure 25 ; p. 142). Nous avons évalué que ces osides représentent environ 5 p. 100 des oses totaux de l'"adialysable urinaire".

Nous avons mis en évidence également ces osides du pic B par chromatographie sur charbon-Celite, élué par de l'éthanol à 50 p. 100.

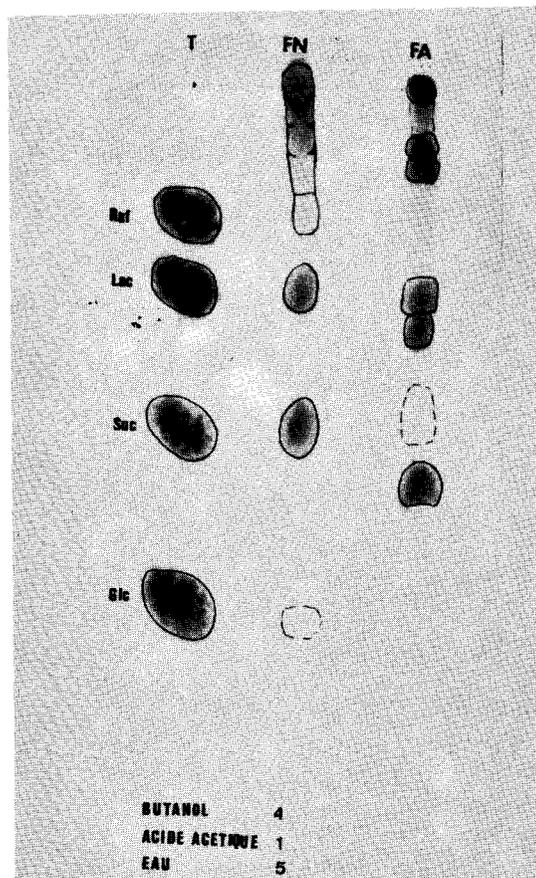


Figure 25

Chromatographie des fractions "neutre" et "acide" obtenues par passage du pic B sur échangeurs d'ions.

Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) ;  
durée de la chromatographie : 4 j. ; révélation à l'oxalate d'aniline.



## 5° - Problème des glucurono-conjugués

Nous avons recherché ce que devenait le taux d'acides uroniques chez un sujet sain ayant absorbé une quantité massive d'aspirine. En effet, l'aspirine est éliminée sous forme d'urono-conjugué.

### a) Mode opératoire

Après absorption d'aspirine (8 x 500 mg répartis dans la journée), les urines sont recueillies pendant 2 jours et traitées comme nous l'avons décrit p. 61 et suivantes.

L'"adialysable urinaire" correspondant à l'urine de 24 h est chromatographié sur Sephadex G-50.

### b) Résultats

La figure 26 (p. 144) montre les courbes d'élution des acides uroniques pour une urine témoin et après absorption d'aspirine.

Le pic A reste constant. Par contre, dans le pic B, il y a une augmentation très importante des acides uroniques, dès le jour d'absorption du médicament.

Nous pouvons donc conclure que les urono-conjugués, excrétés dans l'urine, sont retrouvés dans le pic B de la gel filtration sur Sephadex G-50.

## 6° - Conclusions

Les acides uroniques de l'"adialysable du précipité alcoolique urinaire" ne sont donc pas en totalité mucopolysaccharidiques puisque, en général, 50 p. 100 constituent le pic B, de nature micro-moléculaire. Il s'agit vraisemblablement d'"uronoconjugués", qui, malgré leur faible poids moléculaire (500 environ), ne dialysent pas à cause de leur charge électro-négative, due à l'acide uronique. En effet, même après 6 jours de dialyse, l'acide glucuronique n'est

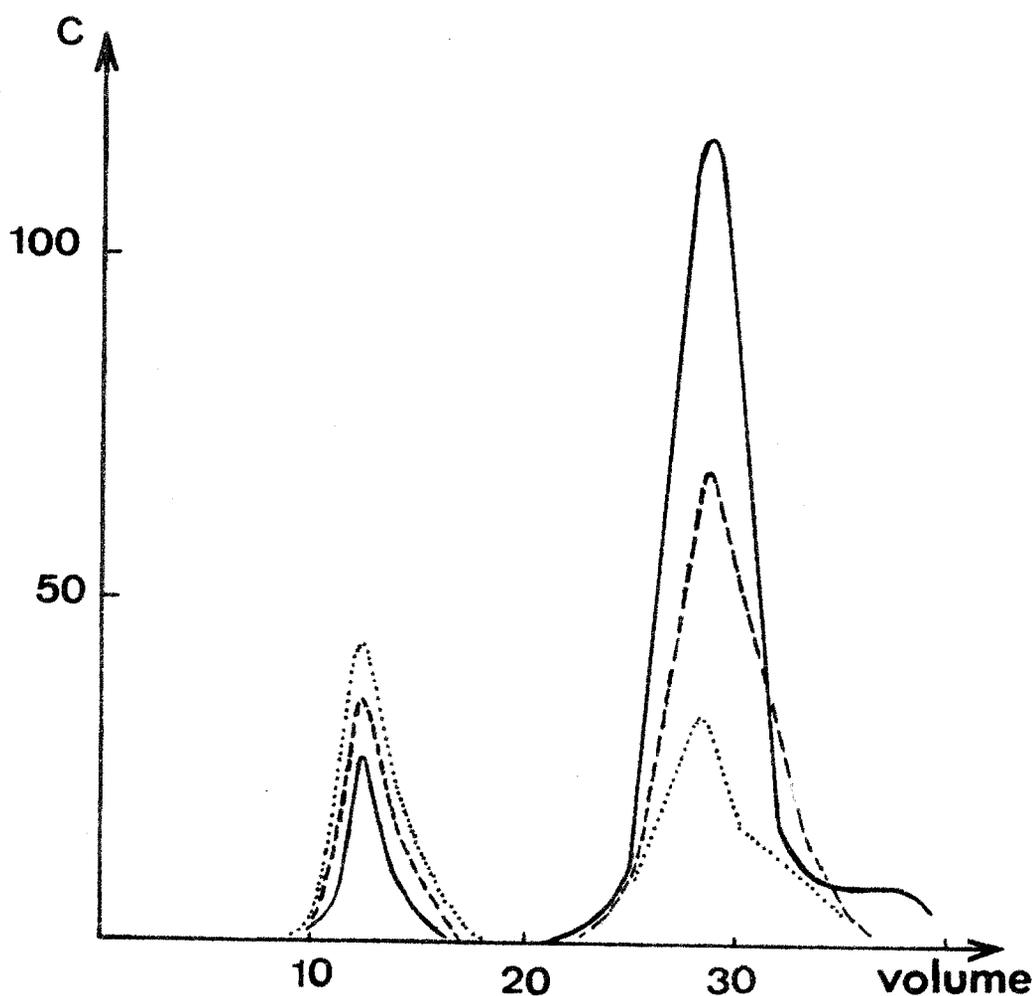


Figure 26

Courbes d'élution des acides uroniques des urines de 24 h, recueillies après absorption d'aspirine en dose massive. Chromatographie sur Sephadex G-50, élution par NaCl 0,08 M des "adialysables urinaires".

- a) Témoin urine normale : (.....)  
 b) Absorption d'aspirine (1er jour) : (—————)  
 c) Absorption d'aspirine (2e jour) : (-----)



pas éliminé complètement, tandis qu'il suffit de 2 à 3 jours pour obtenir la dialyse totale du glucose et du glucuronolactone.

D'autre part, la présence du glucose dans l'"adialysable du précipité alcoolique urinaire" posait un problème, car celui-ci n'entre pas dans la composition des glycoprotéines. La mise en évidence d'osides, en faible quantité (ils représenteraient moins de 5 p. 100 des oses totaux) dans l'"adialysable urinaire" fournit une explication simple à cette question du glucose.

#### V - APPLICATION AUX URINES DE CANCEREUX

---

Comme nous l'avons vu précédemment, un procédé original de dosage des glycoprotides des urines a été mis au point au laboratoire par MALLEVAIS-GOUBET. L'étude systématique des urines de 24 h de sujets sains a permis d'établir des constantes d'élimination journalières (Tableau XV ; p. 70).

Nous servant de ces constantes comme référence, nous avons commencé l'exploration des urines de 24 h de malades atteints de différents cancers. La plupart des urines proviennent de malades hospitalisés au Centre Anticancéreux Oscar LAMBRET (Directeur : Monsieur le Professeur J. DRIESSENS).

#### A - ETUDE QUANTITATIVE

##### 1° - Mode opératoire

Les urines de 24 h sont recueillies de la manière suivante :

- l'urine du lever est rejetée, on note l'heure,  
- toutes les urines de la journée sont recueillies  
ainsi que l'urine du lendemain matin, prélevée 24 h après  
l'élimination de l'urine de la veille.

Les urines sont recueillies sur un mélange de  
toluène-chloroforme, gardées à 4° C et traitées comme nous  
l'avons décrit p. 61.

Un volume de 500 ml, prélevé sur la totalité  
de la diurèse, est lyophilisé ; la poudre obtenue est reprise  
par de l'eau distillée pour former un volume final de 50 ml.

Des fractions de 10 ml exactement (correspondant  
donc à 100 ml d'urine brute) sont alors précipitées par 9  
volumes d'éthanol. Cette opération est répétée 3 fois au total.  
Le précipité final, dissous dans 20 à 30 ml d'eau distillée,  
est dialysé pendant 3 jours contre 200 ml d'eau distillée,  
maintenue à 4° C et renouvelée tous les jours. La fraction  
non dialysable du précipité forme l'"adialysable". Il est  
amené à 50 ml et la concentration en oses neutres, osamines,  
acides sialiques et acides uroniques est déterminée sur la  
solution obtenue.

Les résultats obtenus en mg/l sont ensuite  
rapportés à la diurèse.

## 2° - Résultats

### a) Dosage des glycoprotides

Nous avons étudié les "adialysables" des urines  
suivantes :

- Cancer de la gorge (amygdale, base de langue, sinus piriforme, cordes vocales)	18 cas
- Cancer du poumon	14 cas
- Cancer de l'oesophage	4 cas
- Cancer de la vessie	2 cas
- Cancer du sein	8 cas
- Cancer de l'ovaire	7 cas

Les résultats sont rassemblés dans les tableaux XXXV (p. 150) et XXXVI (p. 151) et dans la figure 27 (p. 153)

#### b) Rapports molaires

Sur quelques "adialysables" répartis parmi les différents types de cancer étudiés, nous avons recherché les rapports molaires des oses neutres et des osamines et identifié les acides sialiques.

Les rapports molaires des oses neutres sont rassemblés dans le tableau XXXIII (p. 152).

Pour les osamines, les rapports glucosamine/galactosamine, obtenus par la méthode de GARDELL sont les suivants :

- Sinus piriforme	4,5	
- Cancer de l'oesophage	3,95	
- Cancer du poumon	4,7	
- Cancer du poumon	3,75	
- Cancer de la vessie	4,7	
- Cancer de la vessie	8,1	←
- Cancer du sein	4,8	
- Cancer de l'ovaire	9,5	←
- Cancer de l'ovaire	4,5	
- Cancer de l'ovaire	4,0	

Sur les cas étudiés, nous n'avons pas observé de différences par rapport aux urines normales quant à la nature des acides sialiques, puisque nous n'avons identifié que de l'acide N-acétyl-neuraminique.

### 3° - Discussion

Nous avons effectué les dosages sur une cinquantaine de cas, répartis parmi 6 types de cancer.

Il n'y a pas de variations significatives du taux des glycoprotides urinaires. En effet, si nous observons des variations, elles sont assez anarchiques : tantôt les taux d'oses augmentent, tantôt ils diminuent. Par rapport aux résultats obtenus par MALLEVAIS-GOUBET dans son étude statistique de 100 urines normales d'homme et de femme (Tableau XV ; p. 70), les urines pathologiques donnent des résultats très dispersés, avec des valeurs extrêmes, pour les oses neutres par exemple, aussi basses que 28 mg/24 h ou aussi élevées que 228 mg/24 h (Fig. '27 ; p. 153).

Cette dispersion des résultats correspond aux deux seuls travaux que nous connaissons, concernant l'étude quantitative des glycoprotides urinaires chez les cancéreux. LOCKEY et al. (315) signalent une augmentation du taux des glycoprotides tandis que LEYTON et al. (316) observent une diminution de la diurèse et du taux des glycoprotides.

Dans les cas de variations par défaut, on peut penser qu'une erreur a été commise dans la détermination de la diurèse elle-même, le malade n'ayant recueilli qu'une partie de ses urines. Mais dans la plupart des cas, les urines contiennent des quantités de glucides très nettement supérieures à la normale, en particulier les taux d'acides sialiques sont toujours élevés. Nous observons en général,

une diminution sensible du rapport oses neutres/acides sialiques ; dans le tableau XXXV (p. 150), où nous avons rapporté les urines des cancéreux bronchiques car par cas, tous les rapports oses neutres/acides sialiques sont inférieurs à la moyenne (1,33) voisins de 1 et dans plusieurs cas, inférieurs à 1.

Les rapports oses neutres/osamines varient peu par rapport à la moyenne. Notons cependant, dans les cas de cancers de l'ovaire et de la vessie, une augmentation des osamines par rapport aux oses neutres.

Au contraire, pour toutes les urines que nous avons étudiées, nous avons trouvé une augmentation du rapport glucosamine/galactosamine. Or une pareille augmentation a été signalée chez les vieillards (plus de 80 ans :  $\text{GlcNH}_2/\text{GalNH}_2 = 4,3$ ), (MALLEVAIS-GOUBET) (317). L'âge des malades dont nous avons obtenu les urines se situe entre 40 et 60 ans.

Les rapports molaires des oses neutres ne sont pas profondément modifiés. Il y a une légère augmentation du taux de mannose accompagnée d'une diminution de celui du fucose.

## B - FRACTIONNEMENT SUR SEPHADEX DES URINES DE CANCEREUX

N'ayant pas observé de variations essentielles et significatives sur les dosages des glycoprotides totaux des urines de cancéreux, nous avons fractionné les "adialysables urinaires" sur Sephadex, appliquant le protocole décrit dans le paragraphe IV (B - p. 96).

### 1° - Mise au point d'un procédé reproductif

Nous avons repris notre procédé de fractionnement des urines sur Sephadex G-50 et l'avons appliqué aux

TABLEAU XXXV

Glucides glycoprotidiques des urines de 24 h de malades atteints de différents cancers. Moyenne et valeurs extrêmes. Résultats en mg/24 h. Les valeurs obtenues pour les urines normales sont rassemblés dans le tableau XV (p. 70).

Urines	Nombre de cas	Oses "neutres"	Acide sialique	Osamines	Acides uroniques	Oses Acide sialique	Oses Osamines	Oses Acides uroniques
Cancer de la gorge	18	68,24 (28,6 à 150,7)	54,87 (23,6 à 119,2)	37,76 (16,7 à 88,7)	12,45 (5,7 à 22,2)	1,30 (1,01 à 1,55)	2,02 (1,60 à 3,17)	5,89 (4,45 à 13,7)
Cancer du poumon	14	76,9 (52,7 à 123,4)	73,75 (42,8 à 109,0)	37,45 (25,7 à 81,7)	18,62 (9,64 à 31)	1,12 (0,88 à 1,29)	1,89 (1,51 à 2,50)	4,67 (2,5 à 8,27)
Cancer de l'oesophage	4	53,93 (43,4 à 61,6)	51,53 (39,03 à 62,36)	30,29 (18,3 à 38,8)	10,92 (9,25 à 12,87)	1,06 (0,86 à 1,16)	1,86 (1,60 à 2,37)	5,10 (4,38 à 6,19)
Cancer de la vessie	2	159,8 77,8	133,5 95,13	100,4 45,9	25,20 29,8	1,20 0,82	1,59 1,69	6,34 2,61
Cancer du sein	8	67,66 (34,78 à 122,42)	56,12 (31,45 à 107,20)	36,07 (23,15 à 52,29)	23,80 (8,0 à 35,60)	1,22 (0,91 à 1,77)	1,795 (1,47 à 2,34)	5,36 (3,44 à 7,56)
Cancer de l'ovaire	7	91,53 (30 à 228,60)	70,22 (25,66 à 163)	59,65 (24,10 à 149)	15,64 (4 à 20,6)	1,29 (1,16 à 1,42)	1,56 (1,42 à 1,76)	6,24 (4,26 à 8,7)



TABLEAU XXXVI

Glucides glycoprotidiques des urines de 24 h de malades atteints de cancer du poumon (résultats en mg/24 h). Les valeurs obtenues pour les urines normales sont rassemblées dans le tableau XIV (p. 70)

Cas	Osés neutres	Acides sialiques	Osamines	Acides uroniques	Osés Acide sialique	Osés Osamines	Osés Acides uroniques
1	77,8	62,3	40,6	13,3	1,17	1,79	5,85
2	105,4	88,2	42,0	19,6	1,19	2,50	4,32
3	81,3	65,8	45,3	18,4	1,23	1,80	4,55
4	79,7	76,6	45,2	9,64	1,04	1,77	8,27
5	56,10	42,8	25,7	10,9	1,29	2,18	5,12
6	123,4	109,0	81,7	31,9	1,13	1,51	3,87
7	81,5	73,8	38,1	17,6	1,10	2,13	4,61
8	87,8	68,5	52,3	17,8	0,99	1,68	4,93
9	96,1	78,6	48,5	17,6	1,22	1,98	5,47
10	52,7	59,5	30,5	19,1	0,88	1,72	2,75
11	68,0	94,2	57,8	22,5	0,94	1,52	3,91
12	79,4	69,1	40,7	31,0	1,10	1,95	2,50
13	91,3	80,8	42,7	19,5	1,10	2,10	4,60
14	55,3	43,3	28,8	11,7	1,29	1,92	4,70



TABLEAU XXXVII

Composition molaire en oses neutres de l'adialysable des  
urines de différents cancéreux

Cas étudiés	Gal	Glc	Man	Xyl	Fuc
Normal (Homme)	10	2,5	5,5	0,7	4,3
Poumon	10	2,3	7,25	0,5	2,0
Vessie	10	1,7	7,5	0,6	3,5
Oesophage	10	2,3	6	0,8	2,55
Sinus piriforme	10	2,3	6,15	0,45	3,4
Normal Femme	10	2,55	5,7	0,8	4,0
Sein	10	5	4,5	0,6	3,0
Ovaire	10	5,3	7,2	0,6	4,0
Peau	10	2,9	8	1,1	4,5



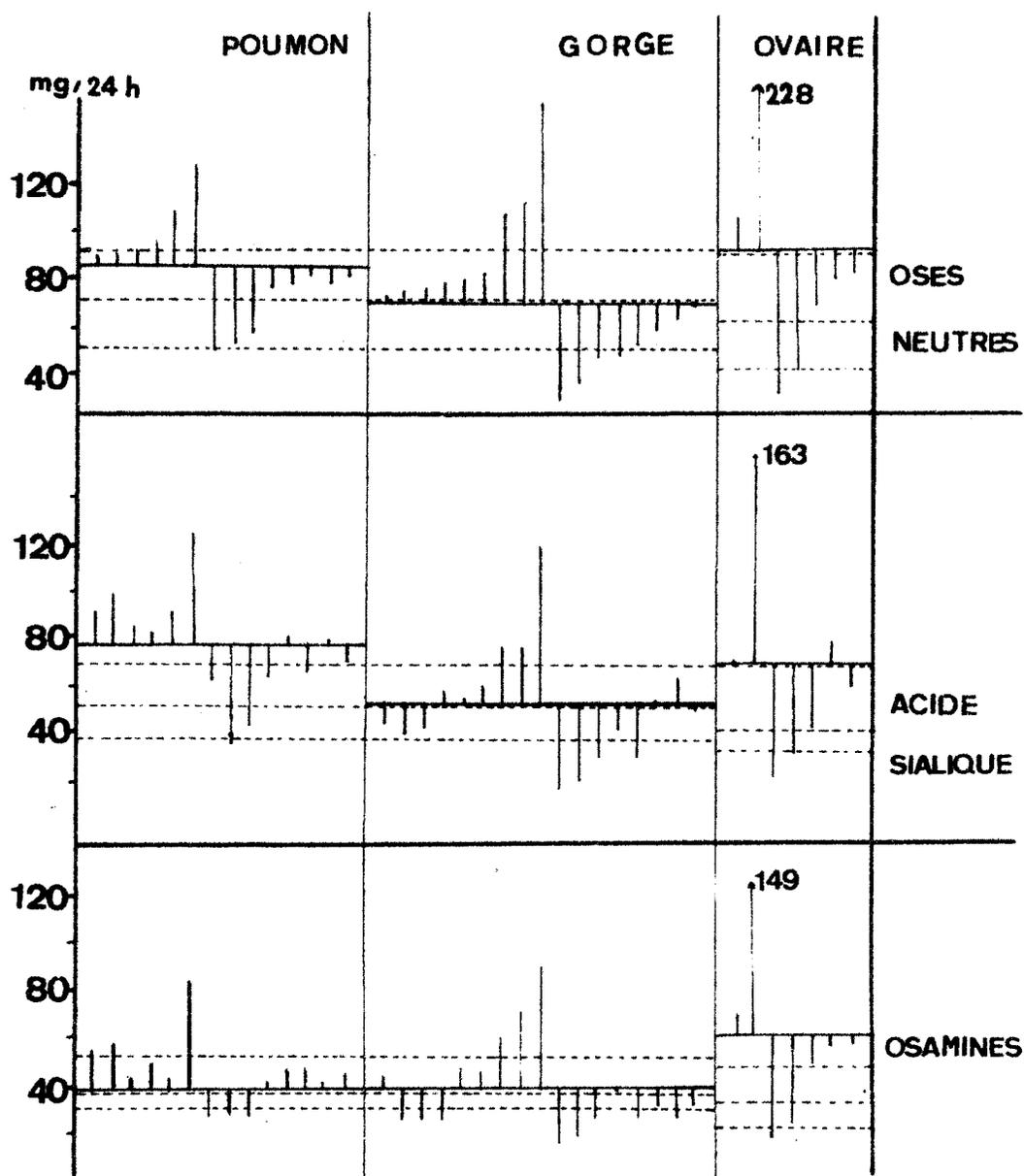


Figure 27

Excrétion journalière des différents constituants glucidiques des "Adialysables urinaires" de cancéreux.

En pointillé, la moyenne statistique et les limites d'excrétion pour les urines normales.



"Adialysables" de la diurèse totale (300 à 400 mg). Dans des conditions expérimentales bien définies (Colonne de 2,5 x 80 cm, débit de 16 ml/h, réglé par pompe péristaltique), nous obtenons des profils de fractionnement reproductibles et nous avons pu établir des diagrammes-types à partir de plusieurs urines de sujets sains, hommes et femmes.

Les courbes sont établies, après chaque passage sur colonne, en effectuant les dosages, tube par tube, des oses neutres, des acides uroniques et sialiques et des osamines.

## 2° - Résultats et discussion

Nous avons étudié de cette manière des urines de malades atteints de cancers de la gorge, de la vessie, du poumon et de l'oesophage pour les hommes, de cancers de l'ovaire et du sein pour les femmes.

Les figures 28 et 29 (p. 155 et 156) donnent des diagrammes de fractionnement d'urines de cancéreux, comparés au diagramme d'urine normale.

Il n'y a pas de bouleversements profonds des profils d'élution. Des variations assez importantes sont enregistrées dans certains cas, mais elles ne sont pas retrouvées systématiquement chez tous les malades. Comme dans l'étude quantitative, nous trouvons des diurèses plus riches en glucides conjugués que la moyenne, cette augmentation se répartit sur l'ensemble des composés.

L'augmentation des acides sialiques, observée au cours des dosages des glycoprotides totaux, est surtout sensible dans le pic I et se porte donc essentiellement sur les glycoprotéines.

Dans plusieurs cas de cancers de l'ovaire, du sein, de la vessie, il y a une diminution des acides uroniques

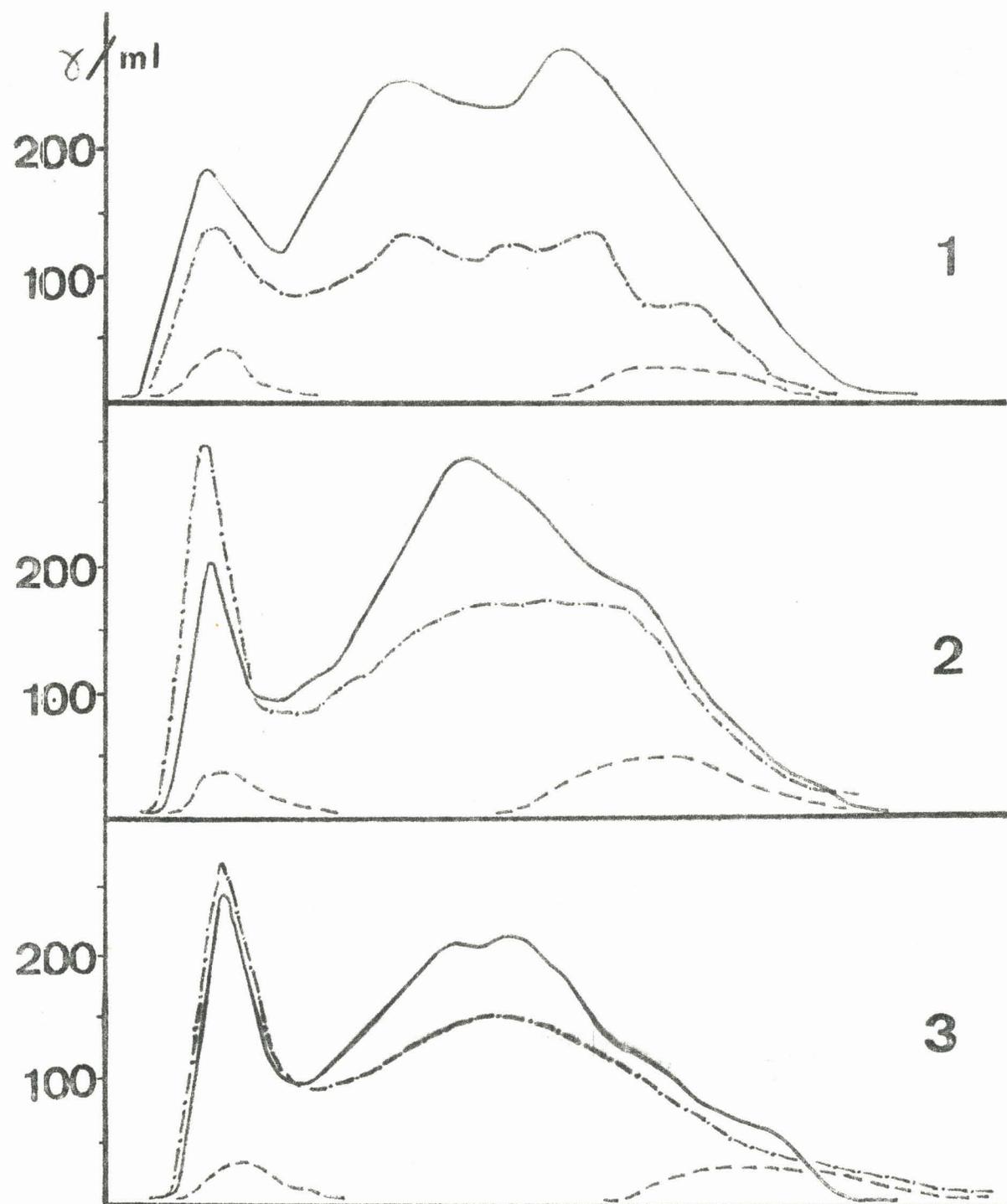


Figure 28

Diagrammes d'élution sur Sephadex G-50 d'urines d'hommes :  
 1 : sujets sains ; 2 : cancer du poumon ;  
 3 : cancer de la vessie.

(—) oses neutres ; ( - - - - ) acides sialiques  
 (- - - - -) acides uroniques.

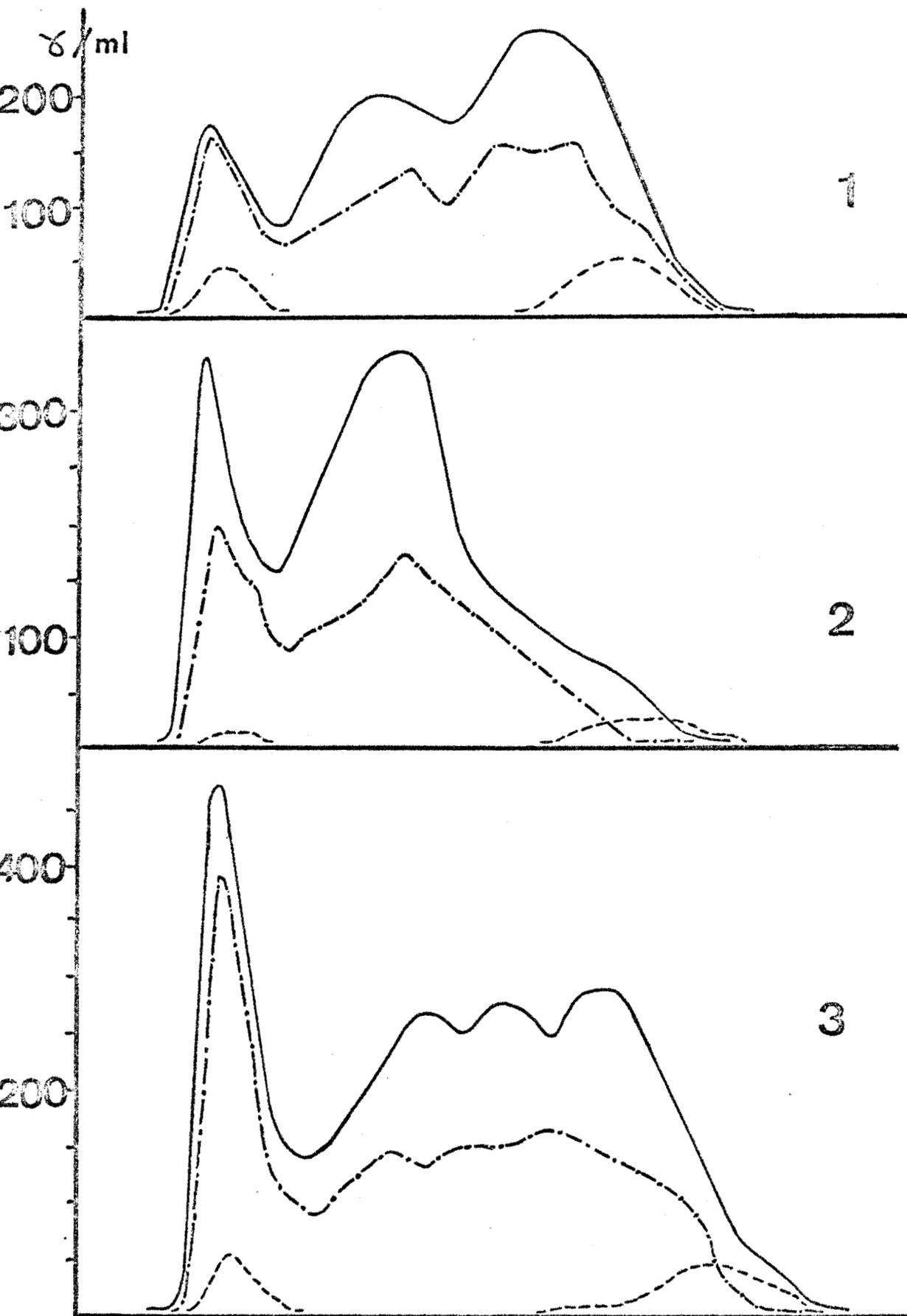


Figure 29



Diagrammes d'élution sur Sephadex G-50 d'urines de femmes :  
 1 : sujets sains ; 2 : cancer de l'ovaire ;  
 3 : cancer du sein.

(—) oses neutres (---) acides sialiques

(.....) acides uriques

mucopolysaccharidiques du pic I. Pour ces fractionnements, le rapport oses neutres/acides uroniques de ce pic I est de 9 à 12 alors qu'il varie de 3 à 5 dans les urines normales. Cette observation, associée à la diminution de la galactosamine chez ces mêmes malades est en faveur de variations et de diminution de l'excrétion des MPA urinaires dans certains cas de cancer.

### C - CONCLUSIONS

Si l'état cancéreux provoque des variations dans la fraction glycoprotidique des urines, il s'agit de modifications infimes, qui ne peuvent être observées par les méthodes générales de dosages et de fractionnement dont nous disposons actuellement.

Pour déceler des différences spécifiques, il faudra mettre en oeuvre des méthodes d'investigation plus fines, en particulier les techniques d'immunochimie. Mais en ce domaine les premiers résultats, obtenus au cours d'un travail réalisé en collaboration avec G. SPIK et C. DEHAINE, ne nous permettent pas de conclure.

Nous avons préparé des immunosérums antiglycoprotides urinaires de cancéreux et nous avons pratiqué, sur ces immunosérums des réactions d'absorption avec, comme antigène, des glycoprotides urinaires de sujets sains. Dans certains cas, en particulier avec les sérums préparés à partir des urines de cancéreux du poumon et de l'ovaire, nous obtenons des immunosérums "épuisés", "mono-spécifiques", donnant un arc de précipitation dans la zone des  $\alpha_2$ - $\beta$ -globulines, contre les antigènes urinaires de ces cancéreux. (Fig. 30 ; p. 158).

Nous avons donc espéré, pendant un moment, avoir mis en évidence une protéine "spécifique" de certains cancers. Mais notre espoir a été déçu avec la suite de l'expérimentation.

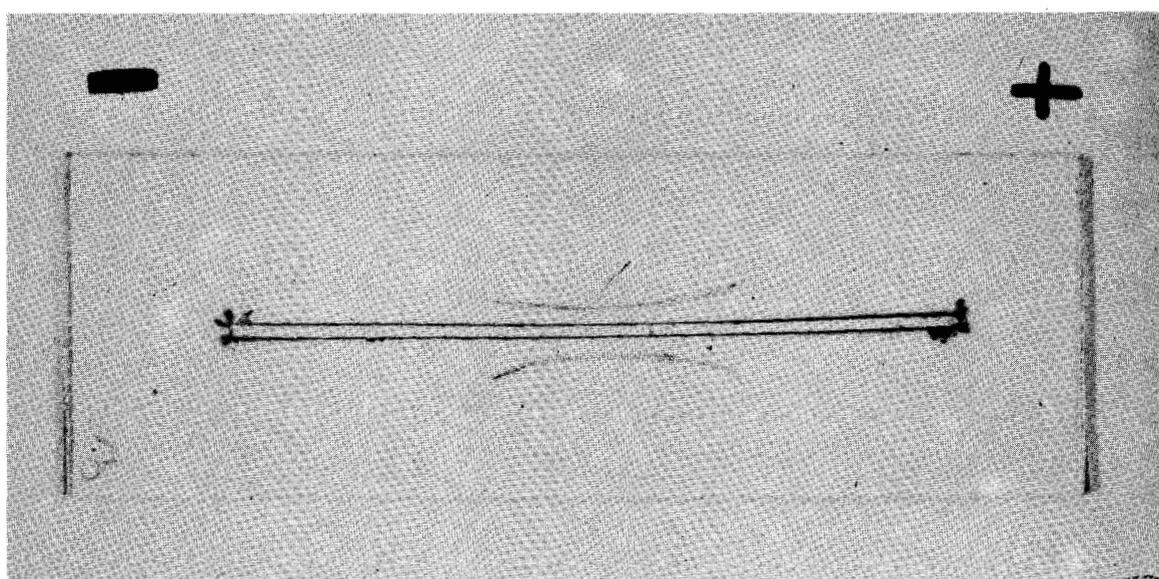


Figure 30

Exemple de réaction positive en immunoélectrophorèse, avec un "Adialysable" cancéreux (leucémie).

L'antisérum est un sérum anti-glycoprotides urinaires de cancer du poumon épuisé par de l'"Adialysable" d'urines normales mélangées.

En effet, les réactions d'absorption étaient réalisées avec des "pools" d'urines normales et nous avons vérifié à chaque fois qu'elles étaient complètes. Ensuite, nous avons étudié individuellement une cinquantaine d'urines de sujets sains, parmi lesquelles 40 p. 100 environ donnaient une réaction positive contre l'immunsérum "épuisé" :

- chez les hommes, sur 25 urines étudiées, 4 présentaient une réaction nettement positive, 5 présentaient une réaction faiblement positive et 16, une réaction négative

- chez les femmes, sur 24 urines étudiées, 11 présentaient une réaction positive, 12 une réaction négative et pour une, la réaction était douteuse.

En ce qui concerne les adialysables des urines de cancéreux, les résultats sont les suivants : sur 75 urines de cancéreux (cancer du poumon, de la vessie, de l'oesophage, de la gorge, du sein, de l'ovaire, du col utérin et leucémie), 61 donnent un arc de précipitation avec l'immunsérum "épuisé". En particulier, donnent une réaction positive :

- 25 cancéreux du poumon sur 27 cas étudiés,
- 15 leucémiques sur 16 et
- 7 malades atteints de cancer ovarien sur 7.

Bien que la forme et l'intensité des arcs de précipitation, obtenues entre les antisérums épuisés et les urines normales, semblent différentes de celles des arcs obtenus avec les urines de malades, il se produit une réaction d'identité totale, à la fois par les techniques de double diffusion et d'immunoélectrophorèse en "fente courte".

D'autre part, il semble que cet antigène, soit d'origine sérique car l'immunsérum épuisé permet de révéler l'arc de type  $\beta$ -globuline dans certains sérums : sérums de cancéreux et également sérums de sujets sains.

Enfin, nous devons comparer nos résultats à ceux de ARON et ISAAC (318) qui ont observé l'apparition d'un antigène supplémentaire dans des immunsérums totaux anti-protides urinaires de cancéreux, par rapport aux immunsérums obtenus à partir des urines de sujets sains. Les "extraits cancéreux", contre leurs immunsérums "cancéreux", révèlent un arc caractéristique qui s'étend de la zone des  $\alpha_2$ -globulines aux  $\beta$ -globulines, en un site constant (arc K).

## CONCLUSIONS GENERALES

---

Une étude critique des méthodes de préparation et de fractionnement de l'urine nous a amenés au laboratoire, à une méthode reproductible d'isolement des glycoprotides urinaires, permettant de déterminer des valeurs constantes pour les glucides, chez les individus sains.

Cependant, la concentration en acides uroniques de notre matériel d'étude était trop importante pour que tous les acides uroniques que nous dosions aient pu être d'origine mucopolysaccharidique. Confirmant les résultats de VARADI, CIFONELLÍ et DORFMAN (319) nous pouvons conclure, grâce au fractionnement de l'"adialysable urinaire" sur Sephadex G-50, que seule la fraction de poids moléculaire le plus élevé contient les glycosaminoglycannes urinaires. La moitié des acides uroniques adialysables font partie des glucuronoconjugués d'origine différente.

Par ailleurs, la gel filtration nous a permis de définir la composition exacte de notre matériel de départ et de démontrer qu'il s'agit de glycoprotides et non de glycoprotéines seules. En effet, nous obtenons une fraction glycoprotéinique et une fraction glycopeptidique, bien distinctes l'une de l'autre et possédant des caractéristiques nettement différenciées.

Le problème du fractionnement des glycoprotides urinaires se trouve ainsi simplifié mais il est loin d'être résolu car, malgré de nombreux essais de sous-fractionnement, nous ne sommes pas parvenus à isoler des entités pures. Cependant, par la chromatographie d'échange d'ions associée à la gel filtration, nous pouvons effectuer un classement d'une part des glycoprotéines, d'autre part, des glycopeptides, selon leur teneur en acides uroniques, acides sialiques et osamines.

Nous avons ensuite appliqué les méthodes mises au point, à l'étude qualitative et quantitative des urines de cancéreux :

a) Les dosages des glycoprotides totaux montrent des variations importantes, qui se traduisent à la fois par des augmentations et des diminutions par rapport aux moyennes définies pour les urines normales.

b) Par fractionnement sur Sephadex, nous ne sommes pas parvenus à cerner les différences enregistrées dans l'une ou l'autre des fractions.

c) Enfin, par la technique d'immunoélectrophorèse nous avons pu mettre en évidence une  $\beta$ -globuline, d'origine sérique. Mais cet antigène n'est pas spécifique du cancer, car nous le retrouvons dans 40 p. 100 des urines normales et 80 p. 100 des urines de malades atteints de différents cancers.

## B I B L I O G R A P H I E

---

- ABELEV G.I., ASSECRI TOVA I.V., KRAEVSKY N.A., PEROVA S.D.  
et PEREVODCHIKOVA N.I., *Int. J. Cancer* 1967, 2, 551 (253)
- ADA G. et GOTTSCHALK., *Austr. J. Science*, 1952, 14, 160 (128,
- ALLALOUF D. et BER A., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1970, 201, 61 (
- ANDERSON A.J., *Biochem. J.*, 1954, 56, 24 (15)
- ANDERSON A.J., *Biochem. J.*, 1967, 102, 719 (312)
- ANDERSON A.J., LOCKEY E. et MAC LAGAN N.F., *Biochem. J.*, 1955,  
60, 41 (163)
- ANDERSON A.J., MAC LAGAN N.F., *J. Physiol*, 1954, 125, 44 P (12
- ANDERSON A.J. et MAC LAGAN N.F., *Biochem. J.*, 1955, 59, 638  
(127, 161)
- ANTONOPOULOUS C.A., FRANSSON L.A., HEINEGARD D., GARDELL S.,  
*Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 148, 158 (35)
- ARON M. et ISAAC J.P., *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1970, 271, 5D, 5  
(318)
- BASU D., *Biochem. J.*, 1969, 112, 379 (181, 186)
- BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.N., *Analyst.*, 1954, 79,  
201 (273)
- BERENSON G.S. et DALFERES E.R., *Biochim. Biophys. Acta*, 1955,  
101, 183 (43, 59)
- BERENSON G.S. et SERRA M.T., *Fédération Proc.*, 1959, 18, 749  
(74)
- BERGGARD I., *Acta Soc. Med. Ups.*, 1959, 64, 156 (108)
- BERGGARD I., *Clin. Chim. Acta*, 1961, 6, 546 (97, 104)
- BERGGARD I., *Arkiv. Kemi*, 1962, 18, 291 (109, 205, 211, 213, 2
- BERGGARD I., *Nature*, 1963, 199, 174 (95, 99)
- BERGGARD I., CLEVE H. et BEARN A.G., *Clin. Chim. Acta*, 1964, 10  
I (102, 106)

- BISERTE G. et TAYEAU F., Clin. Chim. Acta, 1956, I, 115 (160)
- BISERTE G., HAVEZ R. et HAYEM-LEVY A., Pathol. Biol. Semaine Hop., 1959, 7, 123 (89)
- BISERTE G., LEVY A. et HAVEZ R., Cancérologie, 1957, 3, 7 (24)
- BLIX G., in Protides of the Biological Fluids, 11th Colloquium Bruges. 1963, H. PEETERS ed., Elsevier-Amsterdam. 1964, p. 303 (165)
- BOAS N.F., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1956, 92, 122 (5)
- BONAR J.R. et PERKINS W.H., J. Clin. Endocrinol. Metab., 1962 22, 38 (112)
- BOURRILLON R. et CORNILLOT P., in Protides of the Biological Fluids, 12th Colloquium-Bruges, 1964, H. PEETERS ed. Elsevier Amsterdam 1965, p. 300 (219)
- BOURRILLON R., CORNILLOT P. et DABAT M.T., Bull. Soc. Chim. B. 1965, 47, 1795 (13)
- BOURRILLON R., GOT R. et CORNILLOT P., Clin. Chim. Acta, 1961 6, 730 (166, 199)
- BOURRILLON R., GOT R. et MICHON J., Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 91 (167, 198)
- BOURRILLON R. et GOUSSAULT Y., Carbohydrate Res., 1968, 8, 175 (11)
- BOURRILLON R. et KAPLAN J.C., Clin. Chim. Acta, 1960, 5, 732 (171, 197, 201, 202)
- BOURRILLON R. et VERNAY J.L., Biochim. Biophys. Acta, 1966, 117, 319 (190)
- BOWNESS J.M., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 101, 27 (39)
- BOYCE W.H. et KING J.S., J. Clin. Invest., 1959, 38, 1525 (209)
- BOYCE W.H., KING J.S., LITTLE J.M. et ARTOM C., J. Clin. Invest. 1958, 37, 1658 (206, 212, 214, 225, 226)
- BRADA Z., Nature, 1963, 197, 592 (179)
- BUFFE D., RIMBAULT C. et BURTIN P., Int. J. Cancer, 1968, 3, 850 (254)

- BURROWS D. et NEILL D.W., *Brit. Med. J.*, 1958, 1, 370 (249)
- CARRION A., BOURRILLON R. et CABEZAS J.A., *Clin. Chim. Acta*, 1969, 25, 351 (172, 183)
- CATCHPOLE H.R., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1950, 75, 221 (244)
- CHERIAN M.G., RADHAKRISHNAN A.N., *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 101, 241 (182, 188, 189)
- CLAUSEN J. et ASBOE-HANSEN G., *Clin. Chim. Acta*, 1966, 13, 47 (54, 73)
- CLAUSEN J., DYDDVE H.V. et MELCHIOR J.C., *Arch. Disease Childhood*, 1963, 38, 364 (71)
- CORNILLOT P., *Clin. Chim. Acta*, 1962, 7, 42 (17)
- CORNILLOT P. et BOURRILLON R., in *Protides of the Biological Fluids 12th Colloquium-Bruges*, 1964, H. PEETERS ed., Elsevier-Amsterdam 1965, p. 320 (12)
- CORNILLOT P., BOURRILLON R., MICHON J. et GOT R., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 71, 89 (107)
- DALFERES E.R., RADHAKRISHNAMURTHY B. et BERENSON G.S., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, 118, 284 (288)
- DATE J.W., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1958, 10, 149 (6)
- DATE J.W., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1958, 10, 444 (269)
- DAVIS J.S., FLYNN F.V. et PLATT H.S., *Clin. Chim. Acta*, 1968, 21, 357 (221)
- DE VAUX ST-CYR C., CLEVE H. et GRABAR P., *Rev. Franç. Etudes Clin. Biol.*, 1963, 8, 485 (91)
- DI FERRANTE N., *J. Clin. Invest.*, 1957, 36, 1516 (192)
- DI FERRANTE N., *J. Clin. Invest.*, 1963, 61, 633 (41)
- DI FERRANTE N., *Anal. Biochem.*, 1967, 21, 98 (49)
- DI FERRANTE N. et RICH C., *J. Lab. Clin. Med.*, 1956, I, 519 (45, 164, 297, 299, 303, 307)
- DI FERRANTE N. et RICH C., *J. Lab. Clin. Med.*, 1956, 48, 491 (47)
- DISCHE Z., *J. Biol. Chem.*, 1947, 167, 189 (270)

- DISCHE Z., KAWASAKI H., ROTHSCHILD C., DANILCHENKO A. et ZINSSER H.H., Arch. Biochem. Biophys., 1964, 107, 209 (200)
- DONAGGIO A., Atti R., Acad. Sci. Modena (série IV), 1931, 4, 3 (154)
- DONAGGIO A., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1933, 8, 1456 (155)
- DONAGGIO A., Boll. Soc. Ital. Sper., 1934, 9, 184 (156)
- DORFMAN A. et LORINCZ A.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1957 43, 443 (69)
- DRABKIN D.L., J. Biol. Chem., 1930, 88, 433 (313)
- ELSON L.A., MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1933, 27, 1824 (272)
- FEDOROV N.A. et KASATKIN Y.N., Vop. Med. Khim., 1963, 9, 83 (236)
- FEDOROV N.A. et KASATKIN Y.N., Vop. Med. Khim., 1963, 9, 522 (237)
- FISHMAN W.H. et GREEN S., J. Biol. Chem., 1955, 215, 527 (18)
- FLETCHER A.P., NEUBERGER A. et RATCLIFFE W.A., Biochem. J. 1970, 120, 417 (135, 141, 148)
- FLETCHER A.P., NEUBERGER A. et RATCLIFFE W.A., Biochem. J. 1970, 120, 425 (136)
- FREUDENBERG K. et EICHEL H., Ann. Chem., 1934, 510, 240 (117)
- FREUDENBERG K. et EICHEL H., Ann. Chem., 1935, 518, 97 (118)
- FRIEDMAN T. et JOHNSON P., Biochim. Biophys. Acta, 1966, 130, 355 (134, 147)
- GARDELL S., Acta Chem. Scand., 1953, 7, 207 (281, 289)
- GOT R. et BOURRILLON R., Nature, 1961, 189, 234 (111)
- GOTTSCHALK A., Nature, 1952, 170, 662 (139)
- GOTTSCHALK A., Biochem. J., 1955, 61, 298 (129)
- GRABAR P. et WILLIAMS C.A., Biochim. Biophys. Acta, 1955, 17, 65 (237)
- GRANT G.H., J. Clin. Path., 1959, 12, 510 (121)
- GRANT G.H. et EVERALL P.H., J. Clin. Path., 1957, 10, 360 (80, 86, 93, 105, 150)
- GURIN S., BACHMAN C. et WILSON D.W., J. Biol. Chem., 1940, 133, 477 (110)

- HAKOMORI S.I., ISHIMODA T., KAWAUTI H. et EIDOH F., *Journal of Biochemistry*, 1961, 49, 310 (260)
- HAKOMORI S.I. et JEANLOZ R.W., *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 2827 (248)
- HAKOMORI S.I., KAWAUTI H. et ISHIMODA T., *Nature*, 1961, 190, 26 (261)
- HAKOMORI S.I., KAWAUTI H. et ISHIMODA T., *Biochim. Biophys. Acta* 1962, 65, 546 (168, 174, 187, 218)
- HAMERMAN D., HATCH F.T., REIFE A. et BARTZ K.W., *J. Lab. Clin. Med.*, 1955, 46, 848 (82)
- HARRISSON J.F. et NORTHAM B.E., *Clin. Chim. Acta*, 1966, 14, 679 (235)
- HAYEM-LEVY A., *Thèse de Pharmacie, Lille*, 1960, (162)
- HEREMANS J.F. et VAERMAN J.P., *Clin. Chim. Acta*, 1958, 3, 340 (162)
- HEREMANS M.T., VAERMAN J.P. et HEREMANS J.F., in *Protides of the Biological fluids*, 7th Colloquium-Bruges, 1959. H. PEETERS ed., Elsevier-Amsterdam, 1960, p. 396 (90, 151)
- HODGSON G., FISCHER S., PERRETA M., ESKUCHE I., ARAYRA G. et DINAMARCA M., *Blood*, 1960, 16, 1398 (114)
- HODGSON G., PERRETA M., YUDILEVICH D. et ESKUCHE I., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1958, 99, 137 (115)
- HODGSON G. et TOHA J., *Blood*, 1954, 9, 299 (113)
- HUGUES R.C. et JEANLOZ R.W., *Biochem. J.*, 1964, 3, 1535 (280)
- HUTTUNEN J.K., *Ann. Med. Exptl. Biol. Fenniae (Helsinki)*, 1966 44, Suppl. 12, 3 (15)
- HUTTUNEN J.K. et MIETTINEN T.A., *Anal. Biochim.*, 1969, 29, 44 (14)
- JAYLE M.F. et PASQUALINI J.R., in *Glucuronic Acid Free and Combined*, DUTTON G.J. ed., Academic Press, 1966, p. 507 (22)
- JEANLOZ R.W., *Arthr. Rheu.*, 1960, 3, 233 (23)
- JERMYN M.A. et ISHERWOOD F.A., *Biochem. J.*, 1949, 44, 402 (277)
- KALLE E., DEBIASI S., KARYPIDIS C., HEIDE K. et SCHWICK H.G., *Acta Isotopica*, 1964, 4, 103 (246)
- KAO K.Y.T., WIZER C. et MAC GAVACK T.H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1965, 119, 193 (203, 215)
- KAO K.Y.T., LESLIE J.G. et MAC GAVACK T.H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1966, 122, 1129 (204)

- KELLEY W.R., PONCET I.B. et DI FERRANTE N., *Nature*, 1963, 197, 204 (32, 40)
- KERBY G.P., *J. Clin. Invest.*, 1954, 33, 1168 (56)
- KEUTEL H.J., HERMANN G. et LIEHT W., *Clin. Chim. Acta*, 1959, 4, 665, (88)
- KING J.S. et BOYCE W.H., *J. Clin. Invest.*, 1959, 38, 1927 (207)
- KING J.S., BOYCE W.H., LITTLE J.M. et ARTOM C., *J. Clin. Invest.* 1958, 37, 315 (84)
- KING J.S., FIELDEN M.L. et BOYCE W.H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, 90, 12 (119)
- KING J.S., FIELDEN M.L. et BOYCE W.H., *Clin. Chim. Acta*, 1962, 7, 316 (57)
- KING J.S., FIELDEN M.L., GOODMAN H.O. et BOYCE W.H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 95, 310 (120, 210)
- KOSAKI T., IKODA T., KOTANI Y., NAKAGAWA S. et SAKA T., *Science* 1958, 127, 1176 (247)
- KUHN R., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, 40, 297 (7)
- LEYTON G.R., CONTRERAS E.G., SCHLOTFELDT H. S. et BARRIGA R.B., *Clin. Chim. Acta*, 1964, 9, 157 (243, 250, 316)
- LINDAHL U. et RODÉN L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1964, 17, 254 (195, 305)
- LINKER A. et TERRY K.D., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1963, 113, 743 (36)
- LINKER A., TERRY K.D. et TELLER W.H., *Fed. Proc.*, 1962, 21, 170 (37)
- LOCKEY E.E., ANDERSON A.J. et MAC LAGAN M.F., *Brit. J. Cancer*, 1956, 10, 209 (242, 315)
- LOEWI G., *Ann. Rheum. Dis.*, 1959, 18, 239 (55)
- LUDOWIEG J. et BENMAMAN J.D., *Anal. Biochem.*, 1967, 19, 80 (283, 290)
- LUNDBLAD A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 101, 46 (173, 232)
- LUNDBLAD A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 101, 177 (184, 233)
- LUNDBLAD A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 130, 130 (9)

- LUNDBLAD A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 148, 151 (10)
- LUNDBLAD A. et BERGGARD I., *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 57, 129 (230)
- MAC GALE E.H.F., *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.*, 1969, 24, 435 (310)
- MAC GALE E.H.F. et JEVONS F.R., *Biochem. J.*, 1966, 98, 112 (175, 185)
- MAC GALE E.H.F. et JEVONS F.R., *Clin. Chim. Acta*, 1966, 14 528 (176)
- MAC GALE E.H.F. et JEVONS F.R., *Proc. Biochem. Soc.*, 1966, 98 IIP (177)
- MAC KENZIE J.M., FOWLER P.R. et FIORICA V., *Anal. Biochem.*, 1966, 16, 139 (220)
- MALLEVAIS-GOUBET B., D.E.A. de Biochimie, Lille, 1969 et Thèse Docteur ès Sciences, Lille, 1971, (58, 60, 294, 295, 302, 317)
- MALLEVAIS-GOUBET B., SPIK G., STRECKER G., LOIEZ A., VAILLANT et MONTREUIL J., Communication personnelle (293, 308)
- MAROTEAUX P. et LAMY M., *Rev. Franç. Etudes Clin. Biol.*, 1961, 6, 481 (76)
- MAROTEAUX P., *Med. Infant.*, 1962, 5, 327 (300)
- MASAMUNE H., HAKOMORI S. et SUGO T., *Tohoku J. Exptl. Med.*, 1959, 69, 383 (191, 259)
- MASAMUNE H., KAKETA H. et ABE S., *Tohoku J. Exptl. Med.*, 1958, 67, 4, 329 (256)
- MATHEWS M.B., *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 48, 402 (27)
- MAWAS C., KOHEN M., LEMERLE J., BUFFE D., SCHWEISGUTH O. et BURTIN P., *Int. J. Cancer.*, 1969, 4, 76 (252)
- MAXFIELD M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, 89, 281 (137)
- MAXFIELD M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 49, 548 (138, 149)
- MAXFIELD M. et STEFANYE D., *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 2522 (133, 146)
- MAYES J. et HANSEN R.G., *Anal. Biochem.*, 1965, 10, 15 (38)
- MAYES J. et HANSEN R.G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1966, 122, 927 (66)

- MEYER K., DAVIDSON E., LINKER A. et HOFFMAN P., *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 21, 506 (30)
- MEYER K., GRUMBACH M., LINKER A. et HOFFMAN P., *Proc. Soc. Expt Biol. Med.*, 1958, 39, 664 (52, 72, 301, 304)
- MIETTINEN T.A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1962, 14, 380 (162, 222, 231)
- MIETTINEN T.A., *Clin. Chim. Acta*, 1963; 8, 693 (170, 223, 229)
- MIETTINEN T.A. et HUTTUNEN J.K., *Acta Chem. Scand.*, 1964, 18, 579 (224)
- MONTREUIL J., *Bull. Soc. Biol.*, 1957, 39, 395 (3, 8)
- MONTREUIL J. et BOULANGER P., *C.R. Acad. Sci.*, 1953, 236, 337 (183)
- MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, 41, 13 (279)
- MONTREUIL J. et SPIK G., *Microdosage des glucides Fasc. I : Méthodes colorimétriques de dosages des glucides totaux*, *Lab. de Chim. Biol., Fac. Sci. ed., Lille*, 1963 (264, 268, 271)
- MONTREUIL J., SPIK G. et KONARSKA A., *Microdosage des glucides Fasc. III : Dosages chromatographiques des oses "neutres"*, *Lab. Chim. Biol., Fac. Sci., Lille*, 1967, (275)
- MÖRNER K.A.H., *Scand. Arch. Physiol.*, 1895, 6, 332 (24, 78)
- MUIR H., *Biochem. J.*, 1958, 69, 195 (193)
- NAKAMARA W. et FUKUOKA F., in *Chemistry of Cancer Toxin*, Thomas Pub. 1960 (255)
- ODIN L., *Nature*, 1952, 170, 663 (130, 140)
- ORII T., *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 170, 204 (64)
- ORII T., *Physiol. Chem.*, 1968, 349, 816 (70)
- PARTRIDGE S.M., *Biochem. J.*, 1948, 42, 238 (276)
- PARTRIDGE S.M., *Biochem. Soc. Symp.*, 1950, 3, 52 (278)
- PATTE J.C., BALDASSAIRE G. et LORET J., *Rev. Franç. Etudes Clin. Biol.*, 1958, 3, 960 (81, 87, 94, 96, 98, 101, 103)
- PECHAN Z., *J. Chromatog.*, 1963, 10, 104 (178)
- PECHAN, *Neoplasma*, 1964, 11, 279 (240)

- PELMANN G.E., TAMM I. et HORSFALL F.L., J. Exptl. Med., 1952, 95, 88 (131)
- REVILLARD J.P., dans les Protéïnuries au cours des maladies rénales, Gatheron ed., Pont de Veyle, France, 1964 (100)
- RICH C., J. Lab. Clin. Med., 1959, 54, 381 (51)
- RICH C., DI FERRANTE N. et ARCHIBALD R., J. Lab. Clin. Med., 1957, 50, 686 (62)
- RICH C. et MYERS P.L., J. Lab. Clin. Med., 1959, 54, 223 (77)
- RIGAS D.A. et HELLER C.G., J. Clin. Invest., 1951, 30, 853 (79)
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1940, 34, 931 (266)
- RODÉN L., Fed. Proc., 1964, 23, 484 (291)
- RODÉN L., Fed. Proc., 1966, 25, 409 (292)
- RODÉN L., GREGORY J.D. et LAURENT T.C., Fed. Proc., 1963, 22, 413 (194)
- ROSEMAN S. et LUDOWIEG J., J. Amer. Chem. Soc., 1954, 76, 300 (282)
- SCHEIDEGGER J.J., Inter. Arch. Allergy. Appl. Immunol., 1955, 7, 103 (286)
- SCHMIDT M., Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 346 (31)
- SCHULTZE H.E., SCHONENBERGER M. et SCHWICK G., Biochem. Z., 1956, 328, 267 (92)
- SCOTT J. E., Methods Biochem. Anal., 1960, 8, 145 (296)
- SCOTT T.A. et MELVIN E.H., Anal. Chem., 1953, 25, 1656 (227)
- SMITH R.L. et WILLIAMS R.T., in Glucuronic Acid Free and Combined DUTTON G.J. ed., Academic Press, 1966, p. 457 (20)
- SPIK G. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 739 (267)
- SPRANGER J., TODT H. et WIEDEMAN H.R., Clin. Chim. Acta, 1967, 17, 142 (48, 68)
- STENVENSON G.T., J. Clin. Invest., 1960, 39, 1192 (217)
- STRECKER G., D.E.A. de Biochimie, 1968, Lille (4)
- STRECKER G., Thèse de Doctorat d'Etat, 1970, Lille (16, 21)

- SÜDHOF H., KRIEGER D. et SCHULTZ E., Deut. Arch. Klin. Med., 1958, 205, 285 (153)
- SVENNERHOLM L., Acta Soc. Med. Ups., 1956, 61, 75 (284)
- SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L., Nature, 1958, 181, 1154 (285)
- SZABO M.M. et ROBOZ-EINSTEIN E., Arch. Biochem. Biophys., 1962, 98, 406 (28)
- TAMM I., BUGHER J.C. et HORSFALL F.L., J. Biol. Chem., 1955, 212, 125 (132)
- TAMM I. et HORSFALL F.L., Proc. Soc. Exptl. Biol., 1950, 74, 108 (122, 124, 263)
- TAMM I. et HORSFALL F.L., J. Exptl. Med., 1952, 95, 71 (123, 263)
- TANAKA Y. et GORE I., J. Chromatog., 1966, 23, 254 (298)
- TAYEAU F., Tunisie Med., 1951, 29, 664 (157)
- TAYEAU F., BISERTE G., MONTREUIL J. et MARQUEVIELLE S., C.R. Acad. Sci., 1953, 237, 627 (158)
- TAYEAU F., JENSEN R. et REISS D., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 585 (159)
- TELLER W., Monatsschr. Kinderheilk., 1964, 112, 538 (53)
- TELLER N., Nature, 1967, 213, 1132 (61, 67)
- TELLER W. et ZIEMAN A., Klin. Wochschr., 1966, 44, 1142 (34)
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1929, 215, 36 (265)
- TUNIS M., WEINFELD H. et SANDBERG A.A., Cancer Res., 1958, 18, 911 (257)
- TUNIS M. et WEINFELD H., Cancer Res., 1962, 22, 764 (258)
- URIEL J., DE NECHAUD B., STANISLAWSKI-BIRENCWAJG M., MASSEYEF R., LEBLANC L., QUENUM C., LOISILLIER F. et GRABAR P., C.R. Acad. Sci. (Paris), 1967, 265, 75 (251)
- VAERMAN J.P. et HEREMANS J.F., Experientia, 1959, 15, 226 (152)
- VAILLANT-DELACROIX F., D.E.A. de Biochimie, Lille, 1969 et Thèse de 3e Cycle, Lille, 1970 (29, 311)
- VARADI D.P., CIFONELLI J.A. et DORFMAN A., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 141, 103 (25, 42, 44, 45, 196, 234, 306, 309, 313, 319)
- VERMOUSEK I. et BRADA Z., Clin. Chim. Acta, 1966, 13, 757 (180)
- WARREN L., J. Biol. Chem., 1959, 234, 1971 (145)

- WEICKER H., HUNSTOCK K. et GRASSLIN D., Clin. Chim. Acta, 1967, 9, 19 (262)
- WEIMER H.E. et MOSHIN J.R., Amér. Rev. Tuberc., 1952, 58, 594 (228)
- WESSLER E., Clin. Chim. Acta, 1967, 16, 235 (33, 46, 63, 70)
- WERNER I. et ODIN L., Acta Soc. Med. Ups., 1952, 57, 230 (143, 144, 274)
- WHITE A.A. et HESS W.C., Arch. Biochem. Biophys., 1956, 64, 57 (2, 19)
- WIEME R.J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 235 (85)
- WINKERT J., GORDON A.S., PILIERO S.J. et MEDICI P.T., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1958, 98, 351 (116)
- WINZLER R.J., Methods Biochem. Anal., 1955, 2, 279 (238)
- WINZLER R.J., Clin. Chim. Acta, 1965, 11, 339 (239)
- WINZLER R.J. et SMYTH I.M., J. Clin. Invest., 1948, 27, 617 (241)
- ZELLWEGGER H., PONSETTI I.V., PEDRINI V., STAMLER F.S. et VON NOORDEN G.K., J. Pediat., 1961, 59, 549 (75)