

50376  
1971  
21

N° d'ordre : 235

50376  
1971  
21

UNIVERSITE DE LILLE  
FACULTE DES SCIENCES

MEMOIRE PRESENTE  
A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LILLE  
POUR L'OBTENTION DU GRADE  
DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

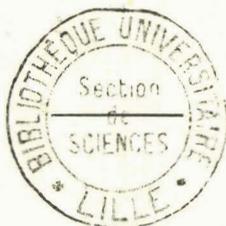
Brigitte MALLEVAIS-GOUBET

---

# LES GLUCIDES LIBRES ET CONJUGUES DE L'URINE

1° - ETUDE DE L'URINE HUMAINE

2° - ETUDE DE L'URINE DE DIFFERENTS MAMMIFERES



Présenté le 15 février 1971 devant la commission d'examen

Président : J. MONTREUIL  
Rapporteur : R. GOT  
Examineurs : G. BISERTE  
C. LOUCHEUX

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur J. MONTREUIL, dans son service de Biochimie cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de LILLE (Directeur : Professeur J. DRIESSENS) et dans son Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de LILLE.

Il est le résultat d'un travail d'équipe réalisé avec la collaboration scientifique de Mademoiselle Geneviève SPIK, chargée de Recherches du C.N.R.S., de Monsieur Gérard STRECKER, attaché de recherches du C.N.R.S. de Madame Annie LOIEZ, de Madame Françoise VAILLANT, chercheurs de 3ème cycle et de Mademoiselle Monique GOMBERT.

Nous remercions vivement Madame Monique BENAÏSSA pour sa précieuse et constante collaboration technique.

UNIVERSITE DE LILLE

FACULTE DES SCIENCES

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES

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

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie et Calcul Numérique
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	I.U.T. Lille
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques
M. DEDECKER Paul	Mathématiques
M. le Doyen DEFRETIN René	Directeur du Laboratoire de Biologie Maritime de Wimereux
M. DEHORS	Automatique
M. DELATTRE Charles	Géologie générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Animale
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique des Fluides

.../...

M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LIEBAERT	I.U.T. Lille
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. MORIAMEZ Michel	I.U.T. Valenciennes
M. MARTINOT LAGARDE	Mécanique des Fluides
M. PEREZ Jean-Pierre	Physique
M. PHAM MAU QUAN	Mathématiques
M. POUZET Pierre	I.U.T. Lille
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Mathématiques
M. TILLIEU Jacques	Physique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Minérale Appliquée E.N.S.C.I.
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WATERLOT Gérard	Géologie et Minéralogie
M. WERTHEIMER Raymond	Physique

#### PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

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

#### PROFESSEURS SANS CHAIRE

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

.../...

M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Minérale Appliquée
M. PROUVOST Jean	Géologie et Minéralogie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCE (et chargés des fonctions)

M. ABBAR	I.U.T. Amiens
M. AUBIN Thierry	Mathématiques Pures
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BILLARD Jean	Physique
M. BLOUCHE RUDOLPHE	Mathématiques
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Calcul Numérique
M. CHOQUET Marcel	I.U.T. Lille
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COULON Jean-Paul	Electrotechnique
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD de la MARNE Pierre	Calcul Numérique
M. JOLY	Biologie Animale
Mlle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie Générale
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANDAIS Jean	Chimie Organique
M. LAURENT François	Automatique
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	I.U.T. Lille
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Sciences Appliquées
M. MONSIGNY Michel	Chimie Biologique

.../...

M. MONTEL Marc	Physique
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
Mme MORIAMEZ BOULLET Claude	I.U.T. Valenciennes
M. NICOLE Jacques	E.N.S.C.L.
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mécanique des Fluides
M. PONSOLLE	C.S.U. Valenciennes
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY	Radioélectrique
M. ROOS Philippe	I.U.T. Lille
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SAADA Georges	Physique
M. SAIMER Georges	Electronique
M. SMET Pierre	Physique
M. SEQUIER Guy	I.U.T. Béthune
M. THOMAS Daniel	C.S.U. Valenciennes
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
Mme ZINN Justin Nicole	Mathématiques

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>GENERALITES</u>	5
<u>1° LES GLUCIDES LIBRES DE L'URINE</u>	5
I - <u>LES OSES</u>	5
II - <u>LES OSIDES</u>	7
<u>2° LES CONSTITUANTS GLYCOPROTEIDIQUES DE L'URINE</u>	8
I - <u>LES COMPOSES D'ORIGINE PLASMATIQUE</u>	10
A - <u>LES PROTEIDES PLASMATIQUES</u>	12
B - <u>LES HORMONES GONADOTROPES</u>	14
C - <u>LES SUBSTANCES SPECIFIQUES DE GROUPES SANGUINS</u>	14
D - <u>L'ERYTHROPOIETINE</u>	14
II - <u>LES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES</u>	15
A - <u>GENERALITES</u>	15
B - <u>PREPARATION ET FRACTIONNEMENT DES GLYCOSAMINOGLYCANNES URINAIRES</u>	17
1 - <u>IDENTIFICATION DES GLYCOSAMINOGLYCANNES</u>	18
a) <u>Identification d'après la mobilité électrophorétique</u>	18
b) <u>Identification par chromatographie sur colonne</u>	18
c) <u>Identification par des méthodes enzymatiques</u>	18
2 - <u>FRACTIONNEMENT DES GLYCOSAMINOGLYCANNES</u>	19
C - <u>LES GLYCOSAMINOGLYCANNES DES URINES</u>	22
1 - <u>Les acides chondroïtine-sulfuriques</u>	22
2 - <u>L'acide kérato-sulfurique</u>	24
3 - <u>L'héparine</u>	24
4 - <u>L'acide hyaluronique</u>	25

D - <u>CONCLUSIONS</u>	
III - <u>LES UROMUCOIDES</u>	26
IV - <u>LES GLYCOPEPTIDES</u>	29
A - <u>LES GLYCOPEPTIDES RICHES EN FUCOSE</u>	30
B - <u>LES GLYCOPEPTIDES RICHES EN ACIDE SIALIQUE</u>	30
C - <u>GLYCOPEPTIDES DIVERS</u>	31
V - <u>GLYCOPROTEINES URINAIRES ET CANCER</u>	36
A - <u>VARIATIONS QUANTITATIVES</u>	36
B - <u>VARIATIONS QUALITATIVES</u>	37
C - <u>CONCLUSIONS</u>	39
3° ISOLEMENT ET FRACTIONNEMENT DES GLYCOPROTIDES URINAIRES	
I - <u>TENTATIVES D'ISOLEMENT D'UN MUCOIDE PUR</u>	40
1°) <u>LA SUBSTANCE DE DONNAGIO</u>	40
2°) <u>LE MUCOPOLYOSIDE DE DI FERRANTE</u>	42
3°) <u>LE MUCOIDE D'ANDERSON et KAC LAGAN</u>	42
II - <u>TENTATIVES DE FRACTIONNEMENT</u>	43
1°) <u>TRAVAUX DE HAMERMAN ET HATCH</u>	43
2°) <u>TRAVAUX DE BOYCE, KING, LITTLE et ARTOM</u>	45
3°) <u>TRAVAUX DE BOURRILLON et KAPLAN</u>	45
4°) <u>TRAVAUX DE BERGGÅRD</u>	51
5°) <u>TRAVAUX DE DISCHE, KAWASAKI, ROTHSCHILD, DANILCHENKO et ZINSSER</u>	53
6°) <u>TRAVAUX DE KAO</u>	56
III - <u>CONCLUSIONS</u>	

<u>4° DOSAGE DES GLYCOPROTIDES TOTAUX URINAIRES</u>	59
I - <u>DOSAGE DES GLYCOSAMINOGLYCANNES</u>	59
II - <u>DOSAGE DES GLYCOPROTIDES TOTAUX</u>	60
1°) <u>TRAVAUX DE HAMERMAN, HATCH, REIFE et BARTZ</u>	62
2°) <u>TRAVAUX DE KING, BOYCE, LITTLE et ARTOM</u>	64
3°) <u>TRAVAUX DE BERGGÅRD</u>	66
4°) <u>TRAVAUX PERSONNELS ANCIENS</u>	66
5°) <u>TRAVAUX DE BOAS, de BJORNESJO et de KING</u> <u>et HYDER</u>	68
6°) <u>TRAVAUX DE SPIK et MONTREUIL</u>	68
<u>CONCLUSIONS</u>	69
TRAVAUX PERSONNELS	72
<u>1° - PREPARATION DU MATERIEL D'ETUDE</u>	73
A - <u>MISE AU POINT DE LA METHODE DE PREPARATION DES</u> <u>GLYCOPROTIDES</u>	73
I - <u>LA DIALYSE ET SES CAUSES D'ERREUR</u>	74
1 - <u>ERREURS DUES A LA CELLOPHANE</u>	74
2 - <u>ERREURS DUES A LA DIALYSE ELLE-MEME</u>	80
II - <u>LA PRECIPITATION ETHANOLIQUE</u>	85
1°) <u>LA LYOPHILISATION</u>	87
2°) <u>RECHERCHE DE LA CONCENTRATION EN ETHANOL</u>	88
3°) <u>ETUDE DU PRECIPITE</u>	90
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	93
III - <u>CHOIX DE LA METHODE D'ISOLEMENT QUANTITATIF DES</u> <u>GLYCOPROTEIDES URINAIRES ET DESCRIPTION DU PROCEDURE</u> <u>DE DOSAGE DE CES DERNIERS</u>	96

1 - <u>PREMIER PROCEDE</u>	96
a - <u>Préparation de l'urine</u>	96
b - <u>Précipitation éthanolique</u>	96
c - <u>La dialyse du précipité</u>	97
2 - <u>DEUXIEME PROCEDE</u>	100
B - <u>TECHNIQUE DE PREPARATION DES URINES</u>	101
<u>CONCLUSIONS</u>	102
<u>2° ETUDE DE LA FRACTION DIALYSABLE</u>	105
I - <u>DOSAGE COLORIMETRIQUE DES GLUCIDES TOTAUX DES URINES</u> <u>DE MAMMIFERES</u>	105
II - <u>ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE</u>	
A - <u>PURIFICATION DES SOLUTIONS GLUCIDIQUES ET</u> <u>CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER</u>	107
1 - <u>PRINCIPE</u>	107
2 - <u>MODE OPERATOIRE</u>	108
B - <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	
1 - <u>URINE HUMAINE</u>	108
a - <u>Les polyosides</u>	109
b - <u>Les monosaccharides</u>	111
c - <u>Origine des glucides urinaires</u>	111
2 - <u>URINES DE MAMMIFERES</u>	114
<u>3° ETUDE DE LA FRACTION ADIALYSABLE</u>	118
I - <u>FRACTIONNEMENT DU SUBSTRAT</u> <u>GLYCOPROTIDIQUE</u>	118

1 - <u>FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR</u> <u>DOWEX 1 X 4</u>	118
A - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	119
1°) <u>Préparation de la colonne</u>	119
2°) <u>Fractionnement de l'"adialysable" urinaire</u>	119
B - <u>RESULTATS</u>	121
1°) <u>Composition centésimale</u>	121
2°) <u>Composition molaire</u>	121
3°) <u>Etude électrophorétique</u>	125
4°) <u>Etude immunoélectrophorétique</u>	125
C - <u>CONCLUSIONS</u>	126
1 - <u>Fraction F<sub>3N</sub></u>	126
2 - <u>Fraction P<sub>7</sub></u>	127
D - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT DU PIC 7</u>	127
1 - <u>Chromatographie préparative</u>	127
2 - <u>Electrophorèse préparative en film liquide</u>	129
E - <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	130
2 - <u>FRACTIONNEMENT PAR L'ETHANOL</u>	130
A - <u>FRACTIONNEMENT</u>	130
B - <u>RESULTATS</u>	132
C - <u>CONCLUSIONS</u>	132
3 - <u>FRACTIONNEMENT PAR LE SULFATE D'AMMONIUM</u>	133
A - <u>FRACTIONNEMENT</u>	133
1° - <u>Méthode</u>	133
2° - <u>Etude des fractions</u>	133
3° - <u>Conclusions</u>	136

B - <u>SOUS-FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE</u> <u>DE LA FRACTION S<sub>9</sub></u>	136
C - <u>CONCLUSIONS</u>	138
4 - <u>FRACTIONNEMENT PAR GEL FILTRATION SUR SEPHADEX</u> <u>G-50</u>	138
A - <u>FRACTIONNEMENT</u>	138
B - <u>RESULTATS</u>	139
C - <u>CONCLUSIONS</u>	143
1° - <u>Le substrat de dosages est un mélange</u>	143
2° - <u>Problème de la nature des acides</u> <u>uroniques de l'"adialysable" urinaire</u> <u>et du dosage des glycosaminoglycannes</u>	143
5 - <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	150

II APPLICATIONS AU DOSAGE ET A LA COMPOSITION MOLLAIRE DES GLUCIDES GLYCOPROTIDIQUES DES URINES
---

152

1 - LES URINES HUMAINES
-------------------------

153

A - DOSAGE DES GLUCIDES TOTAUX

153

1° - ETUDE STATISTIQUE DES URINES NORMALES DE 24 HEURES

153

    a - Résultats

154

    b - Discussion

158

2° - INFLUENCE DE FACTEURS PHYSIOLOGIQUES SUR L'ELIMINATION  
    DES GLYCOPROTIDES URINAIRES

160

a - <u>Influence de l'âge</u>	160
1 - Urines d'enfants de 2 à 16 ans	160
2 - Urines de personnes âgées de plus de 60 ans	163
b - <u>Influence du cycle oestral chez la femme</u>	163
c - <u>Influence de l'alimentation</u>	166
d - <u>Influence de l'activité</u>	169

### 3° - CONCLUSIONS

#### B - IDENTIFICATION ET DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE 171

1° - <u>LES OSES NEUTRES</u>	172
2° - <u>LES OSAMINES</u>	175
3° - <u>LES ACIDES SIALIQUES</u>	179
4° - <u>LES ACIDES URONIQUES</u>	179
5° - <u>CONCLUSIONS</u>	179

#### 2 - LES URINES DE MAMMIFERES

 181

#### A - DOSAGE DES GLUCIDES TOTAUX 181

#### B - IDENTIFICATION ET DOSAGES CHROMATOGRAPHIQUES 183

1° <u>LES OSES NEUTRES</u>	183
2° <u>LES OSAMINES</u>	186
3° <u>LES ACIDES SIALIQUES</u>	186
4° <u>LES ACIDES URONIQUES</u>	189
5° <u>CONCLUSIONS</u>	189

#### CONCLUSIONS GENERALES

 192

### BIBLIOGRAPHIE

## INTRODUCTION

La présence de glucides dans les urines humaines est connue depuis longtemps. Plusieurs oses libres, en effet, ont été caractérisés il y a plus de cinquante ans par les méthodes classiques d'analyse des sucres. C'est par de tels moyens que furent mises en évidence les gluciduries, pathologiques ou physiologiques, qui se caractérisent par une élimination abondante de sucres, faciles à identifier.

Cependant, chez tous les individus normaux, il existe une faible élimination journalière de 1 à 2 g de glucides totaux représentés par des glucides "libres" (oses et polyosides) et par des glucides combinés à des protéines (ou glycoprotides). De nombreux travaux le prouvent. Mais à part la caractérisation de quelques oses et osides, les recherches des différents auteurs ne sont que partielles et les glycoprotides urinaires sont très mal connus. Il est donc impossible, avec les connaissances actuelles de faire un bilan complet des glucides libres et conjugués des urines. Il est vrai que le problème est délicat car l'urine est un milieu d'excrétion de composition très complexe. En outre, les substances excrétées, les glucides en particulier, libres et surtout conjugués, s'y trouvent à de très faibles concentrations (400 mg par litre environ). Ce qui explique la difficulté à les isoler et à les étudier. Pourtant les constituants de l'urine présentent un intérêt clinique certain. En effet, à la suite d'affections telles que les néphroses lipopéptidiques, on voit augmenter de façon sensible le taux d'orosomucoïde ou d'haptoglobine ; dans le cas de maladies du tissu conjonctif, comme par exemple le syndrome de Hurler ou de Marfan, il y a une augmentation massive des mucopolysaccharides acides dans les urines.

Avant d'entreprendre des recherches cliniques, il nous a donc semblé indispensable d'établir le bilan glucidique des urines normales, mais en raison de la complexité de composition de l'urine, déjà signalée, il est nécessaire de travailler sur un matériel de départ défini et partiellement purifié. C'est

.../...

pourquoi avant d'entreprendre l'isolement des glycoprotéines urinaires, nous avons travaillé à la préparation d'une fraction enrichie en ces constituants et débarrassée au maximum des substances étrangères.

Le but de notre travail était d'obtenir, en plus d'une étude des glucides libres, une telle fraction qui renfermerait la totalité des glycoprotéines urinaires, et de mettre au point un procédé précis et reproductible de dosage des "uromucoïdes totaux", prélude à leur fractionnement.

Dans le présent travail, nous avons d'abord fait le point des connaissances acquises par les différents auteurs.

Puis, nous avons exposé la mise au point du procédé de préparation des glycoprotides de l'urine ainsi que les tentatives de fractionnement de ce substrat de départ.

Dans une troisième partie, nous avons exposé les applications données au procédé de préparation tant aux urines humaines qu'aux urines de différents mammifères dans un but de biologie comparée.

## GENERALITES

- 1 - Les glucides libres de l'urine
- 2 - Les constituants glycoprotidiques de l'urine
- 3 - Isolement et fractionnement des glycoprotides urinaires
- 4 - Dosage des glycoprotides totaux des urines

GENERALITES

=====

Tous les individus normaux éliminent chaque jour 1 à 2 g de glucides totaux dans leurs urines. Ces glucides sont représentés par des glucides libres comprenant les oses et polysides, formant donc une fraction micromoléculaire, appelée couramment fraction dialysable (c'est-à-dire filtrable à travers les parois des membranes de dialyse, comme la cellophane par exemple), et par des glucides combinés à des protéines ou à des peptides et formant une fraction macromoléculaire glycoprotidique ou fraction adialysable.

1 - LES GLUCIDES LIBRES DE L'URINE

I - LES OSES

La présence d'oses dans les urines est connue depuis longtemps, voir à ce sujet, l'ouvrage de ELLINGER et coll (analyse des Harns) (1). Cependant, leur isolement et leur caractérisation furent considérablement simplifiés avec l'apparition de la chromatographie. C'est MONTREUIL et BOULANGER (2) qui, en 1953, appliquèrent les premiers à l'urine une méthode générale d'analyse chromatographique et de purification des fractions dialysables des urines humaines sur échangeurs d'ions.

De cette façon, les auteurs mirent en évidence la présence constante dans les dialysats de sujets sains, les sucres suivants :

- le glucose, le fructose, l'arabinose et le xylose à des taux variant de 30 à 50 mg/l
  - le fucose, le mannose et le saccharose (3 à 15 mg/l)
  - le rhamnose, le galactose en faibles proportions et des traces de ribose.
- .../...

Par contre ils n'arrivèrent pas à identifier un certain nombre de glucides : entre autres un dérivé cétosique migrant dans la région des pentoses, sous le fructose et deux osides dans la zone des disaccharides dont l'hydrolyse respective fournit de l'arabinose et du xylose (STRECKER) (3).

L'élué par l'acide formique dilué de l'échangeur d'anions fournissait la fraction acide renfermant des conjugués uroniques à acide glucuronique et des esters phosphoriques des oses. La fraction basique éluée de l'échangeur de cations était dépourvue de sucres aminés.

Utilisant la chromatographie bidimensionnelle sur papier, WHITE et HESS (4) identifiaient un peu plus tard le lactose, le galactose, le glucose, l'arabinose, le xylose, le L-fucose, le D-ribose et la D-glucuronolactone par le citrate d'aniline et le mannoheptulose, le sédoheptulose, le fructose, le xylulose et le ribulose par le réactif à l'orcinol.

FLEURY et EBERHARD (5) ont retrouvé également la plupart de ces glucides avec des fréquences variables. FLEURY, MALANGEAU et EBERHARD (6) étudiant les urines de prématurés ont mis en évidence du lactose, du glucose et du galactose dans la plupart des cas et parfois du saccharose et du fructose. Ils signalent aussi trois sucres inconnus dont l'un serait du xylulose.

Enfin FUTTERMAN et ROE (7) s'intéressant plus particulièrement aux pentuloses ont isolé de l'urine normale du L-xylulose (environ 4 mg par litre) et de L-Ribulose (1 mg par litre).

La question de l'identification des oses de l'urine humaine a été reprise en détail par STRECKER (8).

.../...

## II - LES OSIDES

Peu de travaux existent sur les osides de l'urine humaine et les résultats obtenus sont hétérogènes.

MONTREUIL (communication personnelle) avait en 1958, isolé 10 osides du dialysable urinaire dont il avait précisé la composition.

La même année DATE (9) travaillant sur l'urine de femme enceinte, avait mis en évidence six oligosaccharides identiques aux osides du lait isolés par KUHN (10) et MONTREUIL (11). Mais ces oligosaccharides n'ont pas été retrouvés dans les urines normales.

Plus récemment LUNDBLAD(12)(13) a isolé des urines de sujets de groupes sanguins A et B de type sécréteurs, deux oligosaccharides dont il a également déterminé la composition, mais qui sont sérologiquement inactifs. Par contre, BOURRILLON et GOUSSAULT (14) ont isolé un fucohétéropolysaccharide adialysable possédant une activité sérologique de spécificité O (H).

Par ailleurs, CORNILLOT et BOURRILLON (15) ont mis en évidence un triholoside adialysable composé de 2 résidus d'acide N-acétyl-neuraminique et d'un résidu de galactose.

HUTTUNEN et MIETTINEN (16) ont aussi isolé et précisé la structure d'un triholoside avec de l'acide N-acétyl-neuraminique (2 → 3) lactose. Poursuivant ces travaux, en 1966, HUTTUNEN (17) a montré la présence de 6 à 8 oligosaccharides renfermant de l'acide N-acétyl-neuraminique et a isolé 4 d'entre eux dont il a précisé la structure.

.../...

Il nous faut signaler aussi les travaux de BOURRILLON, CORNILLOT et DABAT (18) sur les constituants glucidiques de l'urine riches en fucose. De la fraction S50, surnageant de la précipitation de l'urine par 50 p 100 d'éthanol, après différentes chromatographies sur DEAE cellulose et filtration sur Sephadex, ils arrivent à séparer des fractions riches en fucose. Deux de ces fractions sont glycaniques. L'une d'elle est constituée uniquement de fucoglycoaminoglycannes de poids moléculaire variant de 1.000 à 6.000. L'autre renferme trois polysaccharides riches en fucose, différant entre eux essentiellement par leur pourcentage en fucose et acide sialique.

Mais là aussi, le problème a été repris en détail par STRECKER (19) qui a réussi à isoler une cinquantaine d'osides dont il a déterminé la composition et même pour certains d'entre eux, la structure (tableau I) (p 9 )

## 2 - LES CONSTITUANTS GLYCOPROTIDIQUES DE L'URINE

Les glucides conjugués de l'urine, désignés sous le terme général de glycoprotides, représentent la fraction adialysable des urines. La composition en oses des mucoïdes a été précisée pour la première fois par MONTREUIL et BOULANGER (20) dès 1953 (voir aussi MONTREUIL (21)). Leur étude chromatographique après hydrolyse avait permis à ces auteurs d'identifier, en quantités importantes, le galactose, le mannose, le fucose, des osamines et l'acide glucuronique, et en proportions moindres, le glucose et le xylose.

TABEAU I

Oligosaccharides des urines humaines d'après STRECKER (22)

O S I D E S N E U T R E S		
Non azotés	: (Glc → Fru) ; (Glc, 2 Fru) ; (Glc, 3 Fru)	
	: Glc ↔ Glc ; Gal ↔ Glc ( 3 isomères )	
	: Gal ↔ Gal ; Xyl ↔ Xyl ; Rib ↔ Rib	
	: Ara ↔ Ara	
	: (Gal, Fuc) → Glc	
	: (2 Gal, 2 Fuc) → Glc ; Fuc → Glc	
	: Xyl → Glc ; (3Glc) → Glc	
	:	
	:	
	:	
	Avec N - Acétyl- glucosamine	Avec N - Acétyl- galactosamine
azotés	: (2Man, Glc NAc) → Glc NAc	: (Fuc-Gal N.Ac) → Gal
	: (2Gal, Man, 2Fuc) → Glc N.Ac	: (Fuc, Gal) → Gal N.Ac
	: (2Gal, Man, Fuc, Glc N.Ac) → Gal	: (Gal, Fuc, Gal N.Ac) → Glc
	:	: (Gal, 2Fuc, Gal N.Ac) → Glc
	:	: (2Gal, Fuc, Gal N.Ac) → Glc
	:	: (2Gal, 2Fuc, Gal N.Ac) → Glc
	O S I D E S A C I D E S	
avec Acide N - Acétyl neuraminique		avec Acide glucuronique
ANAN → Gal ;		: (2 Glc AU) → Glc
ANAN → Gal - Glc (2 isomères)		: (Glc AU, Glc N.Ac) → Glc (2 isomères)
ANAN → Gal → Glc N.Ac (2 isomères)		: Glc AU → Glc
		: Glc AU → Glc N.Ac
		:
		:

BUS LILLE

Ultérieurement, des travaux d'ordre chimique, électrophorétique et immunologique ont permis de déterminer en partie la composition de cet adialysable, de la comparer à celle du sérum (voir tableau II) (p 11), et aussi de caractériser puis d'isoler quelques uns des glycoprotéïdes présents dans les urines de sujets sains.

Actuellement, quatre sortes de composés de nature glycoprotidique ont été caractérisés. Il s'agit :

- 1°) des composés d'origine plasmatique
- 2°) des mucopolysaccharides ou glycosaminoglycannes
- 3°) des uromucoïdes
- 4°) des glycopeptides

A cette étude nous avons jugé intéressant d'ajouter un chapitre. Il s'agit du problème des modifications apportées par le cancer au niveau des glycoprotides. Nous avons fait une très brève revue générale de la question sous la rubrique "glycoprotéïdes et cancer".

#### I - LES COMPOSES D'ORIGINE PLASMATIQUE

Ce sont surtout des travaux de nature électrophorétique et immunologique qui ont permis de mettre en évidence les protéines des urines normales. Ces études ont en commun de confirmer l'origine sérique de nombreux composants de l'adialysable urinaire (voir par exemple : GOTO, SEKINOTO, KIYOMIYA et YAMAZOE (24) ; GRANT (25) ; PATTE, BALDASSAIRE et LORET (26) ; FRANKLIN (27)).

Nous nous devons donc de faire l'exposé de nos connaissances actuelles sur ces constituants urinaires qui puisent leur origine dans le sérum.

TABEAU II

COMPOSITION DU SERUM ET DE L'ADIALYSABLE URINAIRE TOTAL

DE SUJETS NORMAUX

RESULTATS EXPRIMES EN POURCENTAGE DE POIDS SEC PAR LITRE

	Protéines	Hexose	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	-	-



Résultats publiés par KING et al (20 bis)

Nous décrivons successivement :

- 1° les protéines plasmatiques
- 2° les gonadotrophines
- 3° les substances à activité de groupe sanguin
- 4° l'érythropoïétine

#### A - LES PROTÉINES PLASMATIQUES

Il est reconnu depuis longtemps que les reins excrètent normalement de petites quantités de protéines. MORNER (28) fut l'un des premiers, à la fin du XIXème siècle à montrer les protéines liées à des sucres dans l'urine humaine normale, obtenant des valeurs de 22 à 78 mg par litre.

Plus de cinquante ans plus tard, RIGAS et HELLER (29) montraient que ces protéines avaient le même comportement électrophorétique que les principales protéines du sérum.

Par la suite, ces résultats furent confirmés par d'autres auteurs (BOYCE, GARVEY et NORFLEET (30) ; Mc GARRY, SEHON et ROSE (31) ; WEBB, ROSE et SEHON (32). A peu près à la même période, il était démontré que ces protéines urinaires contenaient bien plus de glucides que les fractions correspondantes du plasma (BERGGÅRD (33) (34)).

Mais ces dernières années, le développement des techniques d'immunologie, d'immuno-électrophorèse, d'ultracentrifugation et de diffusion libre a permis une identification plus précise des composants plasmatiques de l'urine (GRANT (35); PATTE, BALDASSAIRE et LORET (36) ; KEUTEL, HERMANN et LIET (37) BISERTE, HAVIZ et HAYEM-LEVY (38) ; HEREMANS, VAERMAN et HEREMANS (39).)

En particulier BERGGÅRD (40) (41) ; HAYEM-LEVY (42); VAERMAN et HEREMANS (43) ont bien éclairci le problème. En accord avec de nombreux auteurs, ils ont caractérisé :

- 1 - la pré-albumine de SCHULTZE (44) ; riche en tryptophanne
- 2 - la sérum-albumine qui semble identique à la sérum-albumine plasmatique ;
- 3 - des  $\alpha$ -globulines qui constituent la fraction la plus importante ;
  - 1'  $\alpha_1$  lipoprotéine ;
  - 1'  $\alpha_2$  séromucoïde ou orosomucoïde
  - la principale  $\alpha_3$  globuline (  $\alpha_3$  antitrypsine ) ;
  - la céruléoplasmine,
  - 1' haptoglobuline ;
  - $\alpha_2$  macroglobuline ;
- 4 - des  $\beta$ -globulines :
  - la sidérophiline ou transferrine ;
  - la  $\beta_{1A}$ -globuline ;
  - les  $\beta_{1A}$ -globulines (exemple :  $\beta_{2A}$ -globulines) ;
- 5 - le fibrinogène ; ne se trouve pas dans toutes les urines ;
- 6 - des  $\gamma$ -globulines
  - $\gamma_G$ -globulines (exemple :  $\gamma_{7S}$ -globulines) ;

En outre, CORNILLOT, BOURRILLON, MICHON et GOT (45) par fractionnement sur Séphadex (G-75 et G-100) ont isolé une  $\gamma$ -globuline de constante de sédimentation 3,5S, différente de la  $\gamma_{7S}$  par le poids moléculaire et ses caractéristiques immuno-chimiques. Son origine est encore hypothétique : les auteurs la rattachent cependant provisoirement aux globulines sériques en supposant qu'elle en est peut-être un produit de dégradation.

Enfin, BERGGÅRD (46) en 1964 continuant son exploration des protéines plasmatiques de l'urine a identifié cinq nouveaux constituants :

- la glycoprotéine  $\alpha_2$  - Ba
- la glycoprotéine  $\alpha_2$  - Zn
- le "group-spécific component" ;
- 1' hémopexine ;
- la  $\beta_{1E}$  - globuline.

## B - LES HORMONES GONADOTROPES

Les urines contiennent d'autres glycoprotéïdes qui viennent du sang. Ce sont par exemple les gonadotrophines. Il y en a une seule que l'on trouve en grande quantité dans les urines : c'est la gonadotrophine humaine du chorion, qui est présente dans les urines de femme enceinte. Elle a surtout été étudiée par GURIN, BACHMAN, WILSON (47) (48) (49) qui l'ont isolée par adsorption sur l'acide benzoïque suivie d'une extraction à l'alcool ou à l'acétone. La préparation la plus active est homogène en électrophorèse à pH 7 et sédimente en un seul composé à l'ultracentrifugation.

GOT et BOURRILLON (50), après avoir fait agir la neuraminidase sur la gonadotrophine postménopausale humaine, concluent que l'acide sialique est une partie essentielle de ces molécules.

## C - LES SUBSTANCES SPECIFIQUES DE GROUPE SANGUINS

Des substances spécifiques de groupes sanguins ont été isolées des urines (FREUDENBERG et EICHEL) (51). Leur activité, en particulier celle des substances se rapportant aux groupes A et B, a été mise en évidence par KING, FIELDEN et BOYCE (52) ; KING, FIELDEN, GOODMAN et BOYCE (53). Ce sont des glycoprotéïdes qui renferment jusqu'à 80 p. 100 de glucides totaux et qui sont essentiellement constitués de galactose, de fucose, de N-acétyl-glucosamine et de N-acétyl-galactosamine.

## D - L'ERYTHROPOLETINE

Dans le sang et l'urine d'hommes et d'animaux atteints d'anémie, il existe une substance qui stimule l'érythropoïèse. HODGSON et TOHA (54), furent les premiers à montrer l'activité érythropoïétique des urines. Ce résultat fut retrouvé par de nombreux chercheurs ; mais seuls, HODGSON, PERETTA, YUDILEVICH et ESKUCHE (55) ; HODGSON, FISHER, PERETTA, ESKUCHE, ARAYA et DINAMARCA (56) ont isolé, par extraction alcoolique une substance adialysable, qui possède une activité érythropoïétique et renfermant une hexosamine, de l'acide N-acétyl-neuraminique et des hexoses.

## II - LES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES

### A - GENERALITES :

L'urine renferme des mucopolyosides acides identiques à ceux qui ont été isolés, depuis une trentaine d'années, du tissu conjonctif. Il s'agit de polysaccharides constitués par une longue chaîne résultant de la "polymérisation" d'une unité disaccharidique composée d'une molécule d'osamine et d'une molécule d'acide uronique. A l'état natif, ces mucopolyosides acides sont conjugués à des protéines par des liaisons O - glycosidiques de la sérine et de la thréonine.

Le caractère acide est donné à ces osides par l'acide uronique et en plus, parfois, par l'acide sulfurique qui se trouve fixé sur les unités disaccharidiques. C'est ce qui explique que les mucopolysaccharides acides se trouvent presque toujours sous la forme de sulfate.

Jusqu'à présent, les mucopolyosides suivants ont été isolés du tissu conjonctif (voir tableau III page 16) :

- 1 - Les acides chondroïtine-sulfuriques : sont au nombre de trois. Deux d'entre eux sont composés d'acide D - glucuronique et de D - galactosamine et, suivant les modalités de liaison avec l'acide sulfurique, se subdivisent en :

- chondroïtine - 4 - sulfate ou chondroïtine sulfate A

- chondroïtine - 6 - sulfate ou chondroïtine sulfate C

Le troisième est l'acide chondroïtine-sulfurique B composé d'acide L-iduronique et de D-galactosamine. Il est encore appelé dermatane-sulfate et  $\beta$ -héparine.

TABEAU III

DENOMINATION ET COMPOSITION DES GLYCOSAMINOGLYCANNES

Ancienne dénomination	Dénomination de JEANLOZ	Composition
chondroïtine sulfate A	Chondroïtine - 4..sulfate	galactosamine, acide glucuronique, sulfate
chondroïtine sulfate C	Chondroïtine - 6..sulfate	galactosamine, Acide glucuronique, sulfate
chondroïtine sulfate B ou B Héparine	Dermatane sulfate	Galactosamine, Acide iduronique, sulfate
Héparitine monosulfate	Héparine monosulfate	Glucosamine, Acide glucuronique, Acétate, sulfate
Héparine	Héparine	Glucosamine, Acide glucuronique, sulfate
Acide hyaluronique	Acide Hyaluronique	Glucosamine, Acide glucuronique, Acétate
Kérato-sulfate	Kératane sulfate	Glucosamine, galactose, Acétate, Sulfate

ENC  
FILE

- 2 - L'acide kérato-sulfurique contient du D-galactose et de la D-glucosamine.
- 3 - L'héparine qui est formée de D-glucosamine et d'acide D-glucuronique conjugués avec de l'acide sulfurique.

A côté de l'héparine, on trouve l'héparitine dans laquelle la glucosamine est N-acétylée, tandis qu'elle est N-sulfurylée dans l'héparine.

4 - L'acide hyaluronique constitué de D-glucosamine et d'acide D-glucuronique.

#### B - PREPARATION ET FRACTIONNEMENT DES GLYCOSAMINOGLYCANNES URINAIRES :

La présence dans l'urine humaine d'acide chondroïtine sulfurique dans des complexes mucopolysaccharides-protéines semblables à ceux du cartilage fut démontrée dès 1895 par MORNER (57). Par la suite, de nombreuses méthodes de préparation des mucopolysaccharides acides furent mises au point (voir BOAS (58)) par exemple par l'acétate de plomb KOBAYASI (59) la benzidine chlorhydrique LSTRUP (60), par l'éthanol TAMM et HORSFALL (61), par l'acide benzoïque ANDERSON et MAC LAGAN (62). Mais les fractions obtenues faisaient partie d'un mélange et il était difficile d'en séparer les mucopolysaccharides. C'est ainsi que DI FERRANTE et RICH (63), SCOTT (64) et ANTONOPOULOS et coll (65) les ont précipités par les sels d'ammonium quaternaire, mais sans arriver à un résultat parfait puisque le kératane sulfate restait en solution.

C'est en combinant plusieurs procédés de précipitation que récemment, les auteurs sont parvenus à un isolement satisfaisant de la fraction mucopolysaccharidique, prélude à leur identification.

## 1 - IDENTIFICATION DES GLYCOSAMINOGLYCANNES

Ce sont les travaux les plus récents qui ont porté sur le problème de l'identification. Actuellement, on peut les classer en trois catégories.

### a) Identification d'après la mobilité électrophorétique

HEREMANS et VAERMAN (66) utilisent l'électrophorèse sur papier, MATHEWS (67) l'électrophorèse sur gel. SZABO et ROBOZ - EINSTEIN (68) ainsi que HANTO (69) ont de bons résultats en employant l'électrophorèse sur acétate de cellulose. Les révélations sont faites soit par le bleu alcian soit par le bleu de toluidine.

### b) Identification par chromatographie sur colonne

MEYER et al (70) ont introduit l'utilisation de la chromatographie sur échangeur d'ions avec la Dowex 1 X 4. Par la suite, la méthode fut reprise par de nombreux auteurs sur Ectéola-Cellulose et DEAE - Séphadex en utilisant des éluants (tels le chlorure de sodium avec ou sans acide chlorhydrique) de molarité ou de force ionique croissante (voir par exemple ANSETH et LAURENT (71), SCHMIDT (72) KELLEY et al (73), ANTONOPOULOS et al (74).

### c) Identification par des méthodes enzymatiques

Elles sont nombreuses, mais la plupart des auteurs utilisent la hyaluronidase et les chondroitinases.

1°) la hyaluronidase testiculaire : elle agit spécifiquement sur l'acide chondroïtine sulfurique A et C et sur l'acide hyaluronique.

2°) la hyaluronidase bactérienne : elle agit seulement sur l'acide chondroïtine sulfurique B et l'héparine LINKER et TERRY (75), LINKER et al (76)

3°) les chondroitinases spécifiques : elles agissent sur les acides chondroïtine sulfurique et sur l'acide hyaluronique. MAYES et HANSEN (77), BOWNESS (78).

Notons que les glycosaminoglycannes ne se présentent pas toujours sous forme libre mais sont souvent combinés à des protéines - VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (79) ; KAO, HIZER, DAWSON et MAC GAVACK (80).

Il faut alors les dissocier par un traitement à l'alcali dans des conditions douces. ANDERSON, HOFFMAN et MEYER (81)

## 2 - FRACTIONNEMENT DES GLYCOSAMINOGLYCANNES

L'association de ces différentes méthodes d'isolement et d'identification a conduit aux principales méthodes de fractionnement qui suivent :

a) KELLEY, PONCET et DI FERRANTE (82) ont repris la méthode de précipitation par le bromure de cétyle-triméthylammonium (ou cétavlon) de DI FERRANTE (83). Ils en ont montré l'hétérogénéité. Ils soumettent donc le mélange obtenu à la chromatographie sur Dowex 1 X 2 puis sur ECTEOLA - cellulose. Ils obtiennent ainsi 10 pics, susceptibles d'être sous-fractionnés selon le degré de sulfatation des produits.

b) VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (84) après élimination du mocoïde de TAMM et HORSFALL (85) associent la filtration sur Séphadex G-50, à la précipitation par les sels cuivriques et à la chromatographie sur Dowex 1 suivi d'un fractionnement par gradient de concentration en NaCl (voir figure 1; page 20).

Ils mettent ainsi en évidence dans les urines de sujets sains, avec leur répartition tous les glycosaminoglycannes du tissu conjonctif mammaire à l'exception de l'héparine (voir tableau IV; page 21). De plus les auteurs démontrent que l'acide chondroïtine sulfurique sous forme mono-sulfaté est formé de fragments de petite taille moléculaire dont certains sont liés par covalence à un peptide.

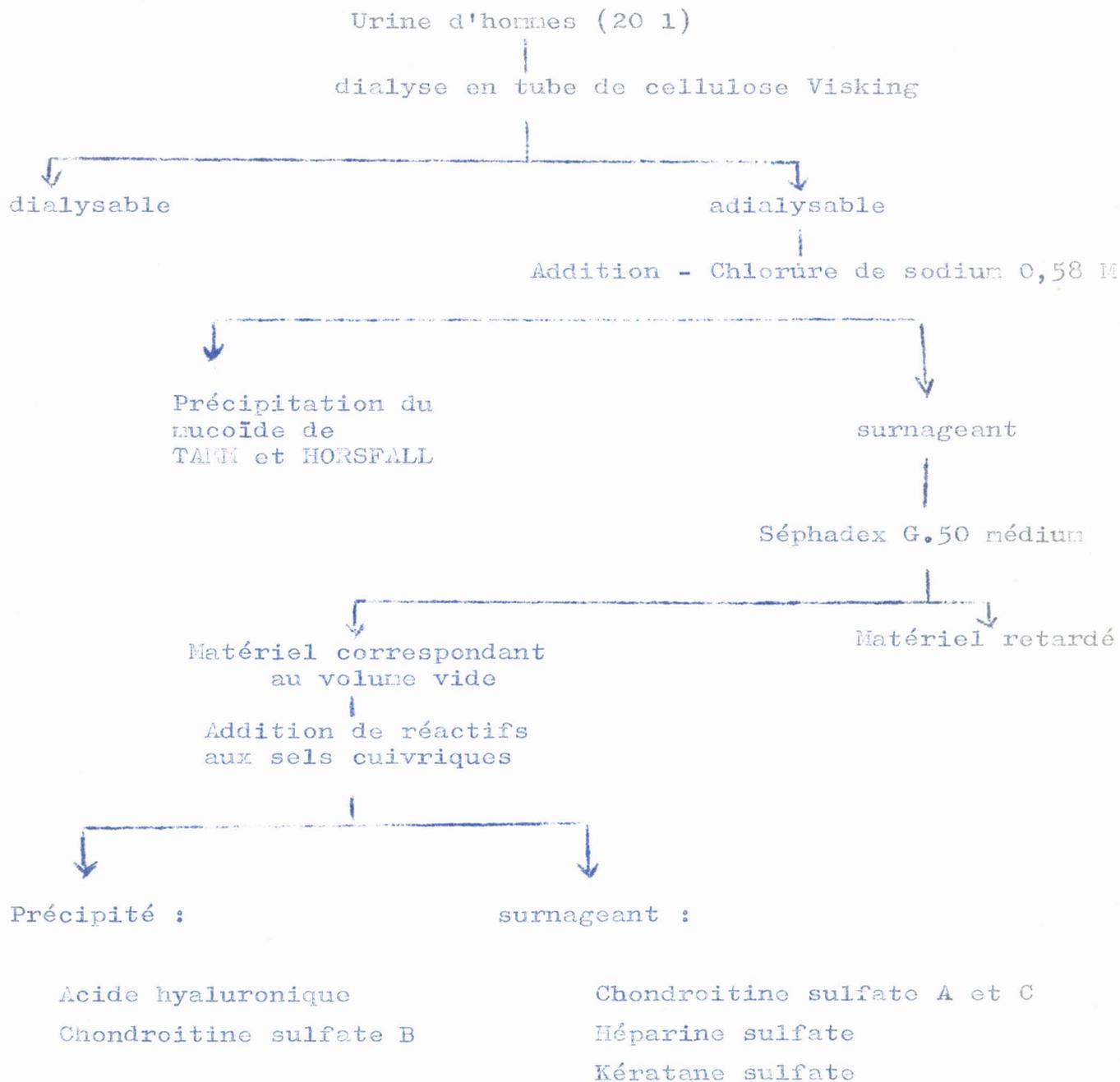


Figure 1

Procédé d'isolement des glycosaminoglycannes de l'urine normale  
d'après VARABI, CIPONELLI et DORFMAN (86)

TABEAU IV

COMPOSITION CENTESIMALE EN GLYCOSAMINOGLYCANNES URINAIRES  
D'après la méthode de VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (8,7)

GLYCOSAMINOGLYCANNES	POURCENTAGE DU TOTAL DES GLYCOSAMINOGLYCANNES
Acide chondroïtine sulfurique C	34
Acide chondroïtine sulfurique A	31
Acide chondroïtine	25
Héparitine monosulfaté	8
Acide chondroïtine sulfurique B	1
Acide hyaluronique	1
Kératane sulfate	1



c) Des résultats comparables avaient été obtenus précédemment par BERENSON et DALFERRES (88) mais ceux-ci ne donnaient pas la composition centésimale des glycosaminoglycannes mais seulement leur caractérisation qualitative. Leur fractionnement est basé sur la précipitation éthanolique et l'électrophorèse de zone. Il est schématisé dans la figure 2 (page 23).

d) Tous ces travaux sont également à rapprocher de ceux de SPRANGER, TODT et WIEDEMAN (89) qui précipitent les glycosaminoglycannes par le Cétavlon, les fractionnent sur Dowex 1 et parviennent à identifier les différentes chondroitines par action des hyaluronidases.

e) Enfin WESSLER (90) a proposé une méthode d'identification des glycosaminoglycannes sur de petites quantités d'urines. Il utilise la chromatographie sur ECTEOLA-Cellulose et parvient à séparer les composés sulfatés des composés non sulfatés. Les résultats sont comparables à ceux de DI FERRANTE & RICH (91). Mais une partie de glycosaminoglycannes est perdue au cours de la préparation.

## C - LES GLYCOSAMINOGLYCANNES DES URINES

### 1 - Les acides chondroïtine-sulfuriques

En 1916 SAHLSTED (92), fut l'un des premiers à signaler la présence de chondroïtine-sulfate dans les urines de cheval. Par la suite, en 1933, PARFENTJEV et PERLZWEIG - (93), puis en 1938, KOBAYASI (94) soupçonnent la présence de chondroïtine-sulfate dans les urines humaines. KERBY (95) en 1965, utilisant la méthode de précipitation de l'héparine d'ASTRUP (96) isole un composé, mais n'ose affirmer qu'il s'agit de chondroïtine-sulfate.

En 1959, HEREMANS, VAERMAN et HEREMANS (97) séparent de l'urine, par électrophorèse, trois composés. L'un d'entre eux est probablement le chondroïtine-sulfate. Mais ce n'est pas encore une certitude.

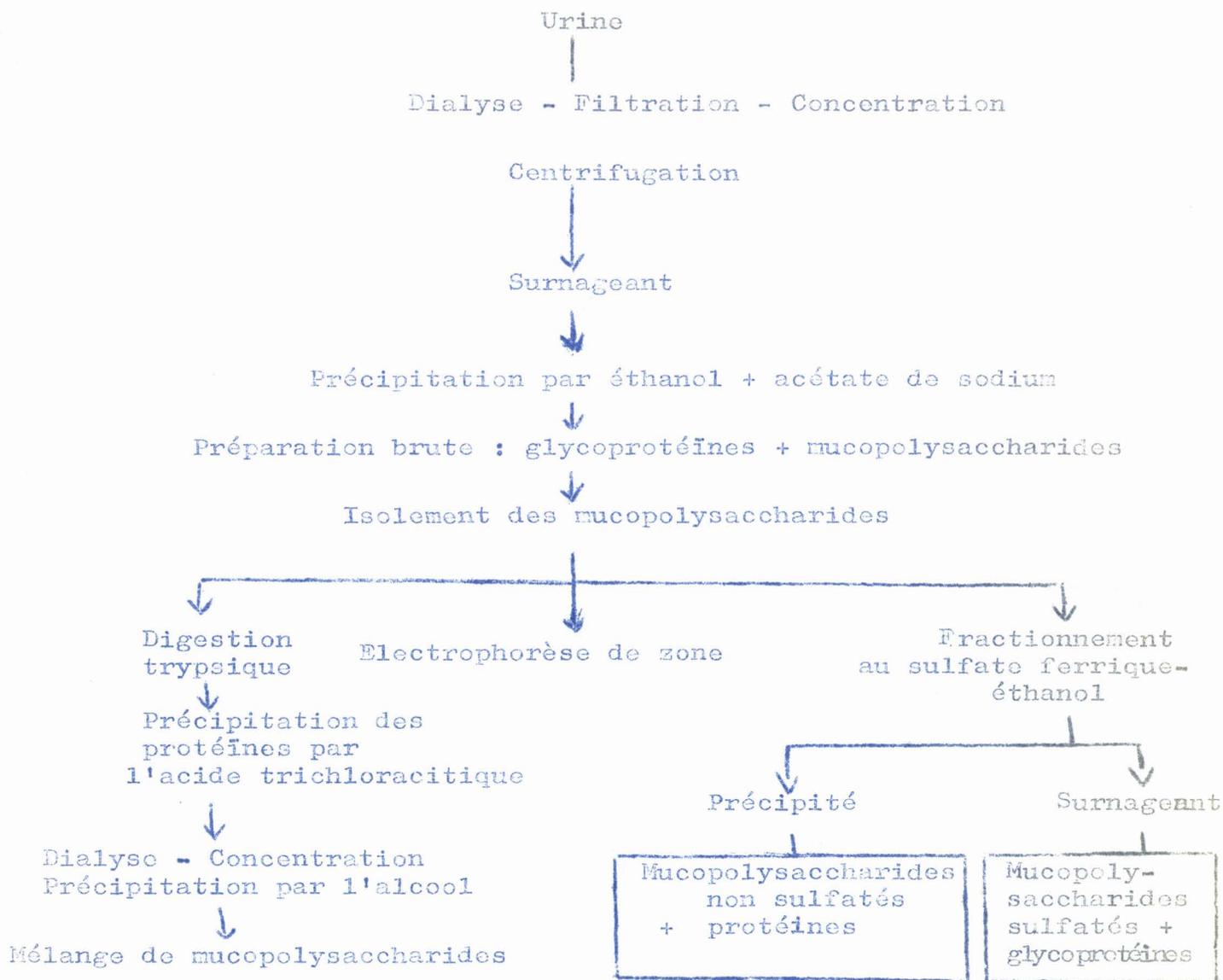


Figure 2

Procédé d'isolement des glycosaminoglycannes dans les urines selon BERENSON et DALFERRES (98)



Par contre en 1956, DI FERRANTE et RICH (9) isolent un mucopolyside acide qui serait identique au chondroïtine-sulfate du cartilage nasal du boeuf. Parallèlement des expériences prouvant que le chondroïtine-sulfate est excrété par les reins sont publiées par DZIEWIATKOWSKI (100) qui injectant à des rats du radiosoufre  $S^{35}$  lié au chondroïtine-sulfate le retrouve dans les urines. Des travaux similaires, menant aux mêmes conclusions, sont effectués par DOLHMAN (101) et RICH (102). D'autres auteurs mettent en évidence cette excrétion rénale en injectant par voie intraveineuse du chondroïtine-sulfate qu'ils récupèrent ensuite dans les urines (travaux de FOURMAN (103) ; SMITH et KERBY (104) ; KALLAN et MEYER (105)).

Enfin, récemment en 1967, VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (106) en accord avec les travaux de BERENSON et DALFERRES (107) mettent en évidence, du sulfate de chondroïtine A, B et C et également de chondroïtine non sulfaté ou faiblement sulfaté. Les mêmes résultats semblent être retrouvés par SPRANGER, TODT et WIEDEMANN (108). Il est bien démontré, à présent, que les urines renferment surtout des sulfates de chondroïtine A et C, et de faibles quantités de sulfate de chondroïtine B.

## 2 - L'acide kérato-sulfurique

BERENSON et DALFERRES (109) ; SPRANGER, TODT et WIEDEMANN (110) ; VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (111) ont signalé la présence, dans les urines, d'une faible proportion de kérato-sulfate.

## 3 - L'héparine

Jusqu'aux travaux de BERENSON et DALFERRES (112), il n'y avait aucune preuve certaine de la présence normale d'héparine dans les urines, bien que des substances anti-coagulantes aient été décrites dans les urines de lapin (REINERT et WINTERSTEIN) (113) et dans les urines humaines (ASTRUP) (114) ; (ROSENFELD, NEUHOF et MESTEL) (115).

D'ailleurs la mise en évidence d'héparine dans les urines est toujours liée à une injection intraveineuse (par exemple travaux de REINERT et WINTERSTEIN) (116) de COPLEY et SCHNEEDORT (117)).

L'excrétion urinaire de l'héparine est d'autant plus difficile à prouver qu'il a été démontré qu'elle pouvait être détruite "in vivo" par l'héparinase (JAQUES) (118). Si elle est excrétée, elle peut donc l'être sous la forme de ses métabolites (ASTRUP) (119). Un de ceux-ci d'ailleurs a été caractérisé comme étant l'urohéparine (BEST et JAQUES (120) ; JORPES et GARDELL (121) JAQUES, NAPKE et LEVY (122)).

Récemment, BERENSON et DALFERRES (123) ; SPRANGER, TODT et WIEDENMANN (124) ; VARADI, CIPCINELLI et DORFMAN (125) ont mis en évidence de faibles quantités de l'héparine-sulfate dans les urines. Leurs travaux sont en accord avec ceux de LINKER, TERRY et TELLER (126), ce qui semble confirmer la présence d'héparine-sulfate.

#### 4 - L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique existe peut-être dans les urines. En effet, DI FERRANTE et RICH (127) ont isolé des urines un composé mucopolysidique acide qu'ils avaient identifié au chondroïtine-sulfate. Mais la hyaluronidase agit sur ce composé (DI FERRANTE) (128). Et l'analyse chromatographique sur ECTEOLA des fractions obtenues semble prouver qu'il s'agit de l'acide hyaluronique (DI FERRANTE 1963)(129).

Par ailleurs, SPRANGER, TODT et WIEDENMANN (130) ; VARADI, CIPCINELLI et DORFMAN (131), par chromatographie sur Dowex 1, suivie d'une élution par NaCl, sont parvenus à caractériser aussi l'acide hyaluronique, mais en très faible quantité.

D - CONCLUSIONS

Tous les glycosaminoglycannes caractérisés dans le tissu conjonctif ont pu être mis en évidence et même dosés dans les urines. Ils existent en quantités variables et leur présence dans les urines est sans doute un reflet du métabolisme tissulaire.

L'importance des glycosaminoglycannes est donc indéniable du point de vue clinique car des troubles métaboliques au niveau du tissu conjonctif vont se répercuter dans les urines.

III - LES UROMUCCOÏDES

TAMM et HORSFALL (132) ont isolé des urines humaines par précipitation éthanolique, ou par relargage au chlorure de sodium 0,58 M ou encore par ultracentrifugation, un mucoïde de poids moléculaire très élevé ( $7 \times 10^6$ ). Il 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.

En 1952, ADA et GOTTSCHALK (133) ; GOTTSCHALK (134), utilisant une modification de la méthode de TAMM et HORSFALL, isolent une glycoprotéine qui inhibe la réaction d'hémagglutination du virus de l'influenza. Elle est donc assimilable au mucoïde de TAMM et HORSFALL.

La composition en acides aminés a été étudiée en particulier par MAXFIELD et STEFANYE (135) et précisée dans le tableau V (page 27).

La composition en glucides a été établie d'après les travaux de GOTTSCHALK (136) et ODIN (137). L'acide sialique a été identifié à l'acide N-acétyl - neuraminique par KLENK et coll (138). Les résultats ont été rassemblés dans le tableau VI (page 28).

TABLEAU V

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA GLYCOPROTEINE DE  
TAMM et HORSFALL d'après MAXFIELD et STEL NYE (139)

Composants	Résidus en %	Nombre de résidus par masse moléculaire minimum 28.100
Alanineé	3,05	12,1
Groupes amidés	0,60	10,5
Arginine	4,72	8,5
Acide aspartique	8,72	21,3
Cystine	1,42	3,9
Acide glutamique	7,06	15,4
Glycine	3,25	16,0
Histidine	2,46	5,0
Isoleucine	1,95	4,8
Leucine	5,98	14,9
Lysine	2,27	5,0
Méthionine	1,86	4,0
Phénylalanine	3,26	6,2
Proline	3,49	10,1
Sérine	4,78	15,4
Thréonine	5,31	14,8
Thryptophane	3,52	5,3
Tyrosine	2,89	5,0
Valine	4,37	12,4



TABLEAU VI

COMPOSITION CENTESIMALE EN OSES DU MUÇOÏDE DE

TAMM et HORSEFALL (140)

	GOTTSCHALK (141) 1952	précipitation éthanolique	relargage par ClNa 0,58 M	Ultra- Centrifuga- tion
	Préparation modifiée selon ADA et GOTTSCHALK (143)			
Oses "neutres"	8,1	6,8	8,4	9
Galactose	5,4	-	-	-
Mannose	2,7	-	-	-
Fucose	1	0,7	1,1	1,1
Xylose	traces (moins de 0,04)			
Hexosamine	7,6	6,4	9,4	7
Acide sialique	5	7,3(a) 8,2(b)	9,1(a) 9,2(b)	9,1(a) 9,4(b)

(a) Dosage par le réactif de BIAL d'après WERNER et ODIN (144)

(b) Dosage par le réactif d'EHNLIICH d'après WERNER et ODIN (145)



On voit qu'ils varient selon les auteurs, et l'on peut se demander s'il ne s'agit pas là d'un mélange. En effet, bien que cette glycoprotéine se comporte en électrophorèse (PELMANN, TAMM et HORSFALL) (146) et en ultracentrifugation (TAMM, BUGHER et HORSFALL) (147) comme une substance homogène, il apparaît fréquemment, en immunoélectrophorèse, deux arcs. Et à l'heure actuelle, on ne sait pas encore s'il s'agit de deux composés distincts ou simplement de formes polymères différentes.

Mais quel que soit le degré de pureté des préparations de TAMM et HORSFALL, l'immunoélectrophorèse montre qu'il n'existe, aucun groupement antigénique commun avec les sérumoïdes : le mucoïde de TAMM et HORSFALL provient du tractus urinaire (GRANT (148) ; VAERMAN et KIBREDEANS (149)).

C'est donc, jusqu'à présent la seule préparation glycoprotéinique isolée des urines qui mérite le nom d'uromucoïde.

#### IV - LES GLYCOPÉPTIDES

Les urines humaines renferment un nombre assez important de complexes glucidiques de poids moléculaire relativement faible (inférieur à 15.000), caractéristiques par leur grande richesse en glucides. De tels composés ont été appelés glycopeptides par les premiers auteurs qui les ont étudiés, tels BLIX (150) ; BOURRILLON, GOT, CORNILLOT (151) ; BOURRILLON, GOT et MICHON (152), HAKOMORI et al (153). Ils sont assimilables aux mucosaccharides de NIETTINEN (154 ; 155).

D'autres auteurs les appellent glycoprotéines mais ce terme est impropre étant donné la petite taille de ces composés. Ces produits sont ceux par exemple, de la fraction UFO de BOYCE, KING, LITTLE et ARTOM (156) au cours de leur tentative de fractionnement (voir figure 3; p 46) et des fractions B et C et BERGGÅRD (157) (voir figure 3'; p 52).

D'ailleurs de nombreux auteurs, au cours des diverses tentatives de fractionnements isolent des fractions riches en glycopeptides mais seulement quelques uns sont homogènes, les autres étant obtenus sous forme de préparations enrichies (par exemple : travaux de KAO et coll (15<sup>o</sup>) ; BOURRILLON et coll (15<sup>o</sup>; 160 ; 161 ).

Nous nous sommes donc limité à l'étude des glycopeptides qui ont été préparés dans un état de pureté suffisant pour être caractérisé chimiquement.

#### A - LES GLYCOPEPTIDES RICHES EN FUCOSE

Les complexes à fucose ont beaucoup retenu l'attention jusqu'à présent . LUNDBLAD ( 162 ; 163 ; 164) a mis en évidence en particulier dans la fraction C ultrafiltrable et non dialysable de BERGGÅRD (16<sup>o</sup>), par gel filtration et électrophorèse de zone, trois glycopeptides riches en fucose, qu'il appelle A<sub>3b</sub>, B<sub>3a</sub> et C<sub>Fb</sub>.

Ces fucoglycopeptides ont une composition proche des antigènes de groupe sanguin mais sont sérologiquement inactifs. Ils sont à rapprocher des fractions obtenues par KING et coll ( 165 ; 167) qui ont, par contre, une activité sérologique de groupe sanguin.

#### B - LES GLYCOPEPTIDES RICHES EN ACIDE SIALIQUE

Ils ont été beaucoup moins étudiés que les précédents et ont surtout été obtenus sous forme de fractions riches en acide sialique, après chromatographie sur DEAE - cellulose et filtration sur gel de dextran. C'est ce que mettent en évidence les travaux de BOURRILLON, CORNILLON et GOT (168), BERGGÅRD (169)

Plus tard, BOURRILLON, CORNILLOT et DABAT (170) sont arrivés à isoler deux fractions hétérogènes mais contenant essentiellement des glycopeptides. Ceux-ci sont riches en acide sialique mais pauvres en fucose. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les fucoglycopeptides isolés jusqu'à présent contiennent au contraire peu ou pas d'acide sialique.

Enfin récemment CARRION, BOURRILLON et CABEZAC (171) sont parvenus à isoler un sialoglycopeptide homogène soluble dans l'éthanol à 50 p 100 et de poids moléculaire situé entre 5 et 10.000. Il contient 30 p 100 d'acide N-acétyl-neuraminique qui est le composant majeur, 21 p 100 d'hexoses et 12 p 100 d'hexosamines. Sa composition glucidique est voisine des substances de groupe sanguin M et N. D'après les auteurs, une origine tissulaire serait la plus vraisemblable.

#### C - GLYCOPEPTIDES DIVERS

En dehors des deux catégories exposées précédemment, il existe de nombreuses préparations de glycopeptides. Parmi celles-ci, nous avons retenu les plus caractéristiques.

- 1 - En 1959, NASAMUNE et al (172) préparent par chromatographie à échange d'ions avec gradient d'éluion, dix complexes peptides-sucres, caractéristiques par leur richesse en glucides et leur faible poids moléculaire. Ils appellent ces composés mucopolypeptides. L'un d'entre'eux, très acide est appelé "K - mucopolypeptide" - on le trouve dans les urines de cancéreux et il semble en être une caractéristique essentiellement dans les cancers de l'estomac.
  
- 2 - HAKOMORI et al (173) procédant par précipitations à l'éthanol puis à l'acétate de plomb, suivies d'un fractionnement sur Dowex et purification sur Séphadex G.25, isolent trois glycopeptides appelés Ugp I, II et III.

Ils ne contiennent pas d'acide sialique. Deux d'entre'eux, n'ont pas d'osamines mais tous trois renferment du glucose (tableau VII ; p 33). Leur composition les rapproche de composés existant dans les tissus comme l'aorte.

- 3 - Plus tard, MAC GALE et JEVONS (174) obtiennent sept fractions glycopeptidiques par fractionnement sur Zéocarb 225 et filtration sur Séphadex G-25. Il semble qu'il y ait pour certains une association avec les pigments urinaires.

Puis par électrophorèses successives, ils arrivent à isoler deux glycopeptides riches en osamines, sans acide uronique. MAC GALE et JEVONS (175).

- 4 - D'autres composés de faible poids moléculaire à osamines ont été décrits par PECHAN (176), BRADA (177), VERMOUSEK et BRADA (178). Ce sont en fait des mélanges d'oligosaccharides et de glycopeptides qui dialysent pour la plupart de ceux-ci.

- 5 - CHERIAN et RADHAKRISHNAN (179) ont décrit un glycopeptide intéressant par sa richesse en acide uronique et par la présence d'hydroxyproline et de sarcosine. Ces deux amino-acides posent des problèmes sur son origine : la présence de proline et d'hydroxyproline semblerait indiquer qu'il provient du collagène, mais la présence de sarcosine, inexistant dans le collagène, serait en faveur d'un autre complexe glycoprotidique.

BOURRILLON et VERNAY (180) ont également trouvé deux glycopeptides à hydroxyproline, solubles dans l'éthanol à 50 p 100 de poids moléculaire situé entre 1.200 et 1.500 et contenant 35 p 100 de glucides.

TABEAU VII

Composition des glycopeptides de HAKOMORI (181)

	Ugp I	Ugp II	Ugp III
Amino-acides	Asp Glu Ser Gly Ala Thr His	même composition que Ugp I + Pro	même composition que Ugp II + Val Leu Hy Pro.
Sucres	Glc Gal L-Fuc	Glc Gal	Glc Man L. Fuc Gal NH <sub>2</sub> Glc NH <sub>2</sub>
Hexoses (a)	13,5	5,6	7,5
Méthyl pentoses (b)	5,6	0,2	2,5
Hexosamines (c)	0	0	3,5
Acides sialiques	0	0	0

- (a) en p.100 de glucose
- (b) en p.100 de L-fucose
- (c) en p.100 de glucosamine



6 - Enfin, tout récemment, BASU (182) a isolé un glycopeptide urinaire qu'il est parvenu à cristalliser. C'est, à notre connaissance, le premier composé urinaire qu'on ait pu cristalliser.

La partie glucidique renferme du galactose, du xylose, de l'acide glycuronique de la glucosamine. Les rapports sont les suivants :

acide glycuronique : 1

oses neutres : 10

osamines : 1

La partie peptidique renferme de la sérine, du glycocolle, de l'alanine, de l'acide aspartique et de l'acide glutamique.

L'auteur pense que ce glycopeptide pourrait tirer son origine des glycosaminoglycannes.

Avec ces travaux, se termine l'énumération des principales préparations glycopeptidiques rep'rées dans l'urine. Nous avons réuni dans un tableau récapitulatif les compositions des glycopeptides les plus caractéristiques (voir tableau VIII ; p 35).

Ces composés ne sont pas à négliger car ils représentent pondéralement la partie la plus importante des glucides conjugués de l'urine (60 à 70 p 100) ce qui laisse penser que la quantité de glycoprotéines urinaires est assez faible. Le problème de leur origine se pose donc avec de plus en plus d'acuité. Les auteurs les considèrent comme des produits du métabolisme soit des glycoprotéines soit des glycosaminoglycannes des tissus. On a pu noter, en effet, que les taux d'excrétion de certains glycopeptides augmentent dans les processus inflammatoires et néoplasiques MASAMUNE (183) ; DI FERRANTE (184)

TABEAU VIII

Tableau récapitulatif de la composition des glycopeptides urinaires

dénomination	en p.100 de poids sec										Rapports molaires		
	BOURRILLON (185)	LUNDBLAD (186)		HAKOHORI (187)		CHERLAN (188)	MAC GALE (189)	BASU (190)					
	C <sub>462</sub>	C <sub>463</sub>	A <sub>3b</sub>	B <sub>3a</sub>	C <sub>Tb</sub>	Ugpl	UgplII	UgplIII					
Osés "neutres"	20	14,6	73,8	51	67,1	-	-	-	1	1	10		
Hexoses	-	-	50,1	34,4	40,4	13,5	5,6	7,5	12,0	4,0	-		
	-	-	23,9	16,6	26,7	5,6	0,2	2,5	1,0	1,5	-		
Hexosamines	11,1	4,5	-	-	-	-	-	3,5	16,5	16,0	1		
Glucosamine	-	-	23,9	17,4	15,4	-	-	+	+	+	+		
Galactosamine	-	-	6,4	2,9	3,3	0	0	+	+	+	+		
Acide sialique			<1,0	3,6	<1,0	0	0	0	2,0	0	0		
Acide uronique	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1		
Acides aminés totaux			6,9	19,2	10,4								
Protéine	14,3 <sup>+</sup>	17,5 <sup>+</sup>											
Hydroxyprotéine	7,45	14,4											

(a) exprimées en N-acétyl-osamines

(b) en p.100 de partie peptidique.

185  
186

## V - GLYCOPROTEINES URINAIRES ET CANCER

L'étude des glycoprotéines urinaires a trouvé son intérêt primordial dans les cas pathologiques où d'importantes variations qualitatives et quantitatives, ont été mises en évidence. On peut, en effet, caractériser une élimination urinaire importante d'orosomucoïde chez des malades atteints de néphrose, d'haptoglobine chez des néphrotiques lipoidiques et d'érythropoïétine chez des sujets anémiés.

C'est pourquoi un certain nombre de travaux ont été effectués sur les urines de sujets atteints de cancer. Ceux-ci, peu nombreux, mettent néanmoins en évidence des modifications dans la structure et l'activité physiologique des glycoprotéines urinaires.

Nous avons résumé les principaux résultats obtenus.

### A - VARIATIONS QUANTITATIVES

Nous nous sommes heurtés à une première difficulté car jusqu'à présent aucune étude sérieuse sur le taux des glycoprotéines urinaires des sujets normaux n'avait été faite. Il est donc difficile de pouvoir déceler les variations chez les sujets cancéreux sans terme sûr de référence chez les individus sains.

De plus, les auteurs utilisent des techniques d'isolement très différentes.

Néanmoins nous avons retenu les travaux de BISERTE et al (191) qui ont comparé glycoprotides normaux et cancéreux préparés selon le procédé d'absorption benzoïque d'ANDERSON et MAC LAGAN (192). Ils ne trouvent pas de différences mais insistent sur le fait que la préparation des glycoprotides est à mettre au point.

PECHAN (193) confirme ces résultats mais LEYTON et al (194) mettent en évidence une diminution de 30 à 50 p 100 des glucides neutres et conjugués chez des sujets cancéreux.

MONTREUIL et coll (communication personnelle) par l'application de leur méthode d'isolement spécifique des glycoprotides totaux de l'urine (et que nous exposons plus loin dans ce travail) aux urines de cancé. ux ne trouvent pas de variations s gnificatives.

### CONCLUSIONS

Le dosage des glycoprotides urinaires, ne semble donc pas apporter de résultats intéressants pour permettre l'élaboration d'un diagnostic du cancer, but de toutes ces recherches.

### B - VARIATIONS QUALITATIVES

Les auteurs ont essentiellement cherché à mettre en évidence des glycoprotides spécifiques de l'état cancéreux ou une augmentation spécifique importante d'une glycoprotéine, trouvée à l'état normal.

C'est ainsi que BISERTE et al (195) trouvent davantage de fucose dans la fraction glycoprotidique isolée des urines de sujets cancéreux selon la méthode d'ANDERSON et MAC LAGAN.

Mais ce sont surtout des travaux d'auteurs japonais qui ont attiré notre attention :

- 1 - HAKOMORI et al (196) isolent de la préparation d'ANDERSON et MAC LAGAN une  $\gamma$  glycoprotéine anormale par rapport à la même fraction isolée d'urines normales.

- a - masse moléculaire 3 à 4 fois plus élevée
- b - degré de branchement (oses terminaux non réducteurs) 2 à 2,5 fois plus élevés.
- c - taux d'hexoses plus faibles, et diminution sensible du rapport  $\frac{\text{hexose}}{\text{hexosamine}}$

Ces résultats ont été confirmés expérimentalement par la suite par HAKOMORI et al (197).

2 - MASAMUNE et al (198) ont mis en évidence dans les tissus et l'urine normale et cancéreuse un ensemble de substances appelées par les auteurs toxohormone, qui inhibe l'action de la catalase hépatique. Une certaine proportion serait glycoprotidique et les toxohormones de sujets cancéreux auraient une inhibition plus élevée de la catalase.

3 - Par ailleurs MASAMUNE et al (199) ont isolé et caractérisé surtout dans les urines de malades atteints de cancer gastrique un mucopolypeptide spécifique : le Kappa-mucopolypeptide absent des urines normales. Il a été fractionné en K1 et K2 mais leur étude n'a pas été poursuivie. Elle est reprise actuellement au laboratoire.

Là s'arrêtent les travaux de japonais.

Nous avons relevé les travaux de WEICKER et al (200) qui ont caractérisé une glycoprotéine spécifique dans les urines de plasmocytose. Elle a la propriété de se combiner avec la protéine de BENCE-JONES (rapport 1-50) pour former un complexe thermo-stable sur lequel n'agit plus la N-acétyl-neuraminidase.

TUNIS et WEINFELD (201) ont travaillé, sur les urines de sujets sains et leucémiques. Par précipitation benzoïque, ils ont isolé deux fractions glycoprotéiniques F I et F II. La fraction F II est difficile à isoler des urines normales. Ces deux fractions ne sont cependant pas très différentes l'une de l'autre : elles se distinguent essentiellement par leur thermostabilité, celle de la fraction II étant plus élevée.

Enfin, KALLEE, SCHWICK et al (202) obtiennent par un fractionnement au sulfate d'ammonium d'urines de sujets atteints de leucémie myéloïde chronique une préparation glycoprotéinique différente de la préparation isolée d'urines normales par sa grande facilité de liaison avec la vitamine B 12.

### C - CONCLUSIONS

Tous ces travaux sont dispersés et n'apportent pas beaucoup de lumière au problème du cancer. Ils montrent cependant que l'apparition du cancer dans un organisme provoqué non pas une élévation importante du taux des glycoprotides urinaires mais soit une modification de la nature des glycoprotéines soit l'apparition de substances spécifiques.

C'est dans ce sens donc que les recherches doivent être poursuivies, mais elles seront longues et difficiles car on va se heurter un fois de plus à la complexité du milieu urinaire et à la faible quantité des produits isolés.

C'est pourquoi il était indispensable de mettre au point sur les urines normales une méthode reproductible d'isolement des glycoprotides permettant d'en faire un bilan total avant de s'attaquer au problème du cancer.

### 3° - ISOLEMENT ET FRACTIONNEMENT DES GLYCOPROTIDES URINAIRES

De nombreuses méthodes de préparation des glycoprotéides ont été décrites. La plupart fournissant des composés de haut poids moléculaire qui sont, en réalité, des mélanges plus ou moins complexes de protéides divers.

Les travaux les plus connus sur ce sujet sont ceux qui ont été effectués par les auteurs suivants :

- DONAGGIO (203)
- DI FERRANTE (204)
- ANDERSON et MAC LAGAN (205)
- HAMERMAN et al (206)
- BOYCE et al (207)
- BOURRILLON et al (208)
- BERGGARD (209)
- DISCHE et al (210)
- KAO et al (211)

soit dans l'espoir d'isoler une entité possédant des propriétés particulières, comme celles de l'orosomucoïde dans le sang ; soit dans le but de fractionner les différents constituants glycoprotéidiques.

#### I - TENTATIVES D'ISOLEMENT D'UN MUCCIDE PUR

Plusieurs ont cru avoir isolé des urines des entités bien définies dont ils ont décrit les principales propriétés, mais ces résultats n'ont pas résisté à des analyses poussées qui ont démontré l'hétérogénéité des préparations.

##### 1°) LA SUBSTANCE DE DONAGGIO

DONAGGIO (212 ; 213 ; 214) a décrit en 1931 une réaction de l'urine, désignée sous le nom de phénomène d'obstacle caractéristique de l'état de fatigue. Lorsqu'on ajoute à une urine normale des solutions de thionine et de molybdate d'ammonium, il apparaît après quelque temps un précipité violet, surmonté d'un liquide incolore.

La réaction ne se produit pas dans les urines de sujets fatigués ou malades : entre autres, dans le cas de typhoïde (DONAGGIO) (215), de cancer (TAYEAU et NIVET) (216) de rhumatismes (BRAUN) (217).

Le mécanisme de la réaction a été étudié par TAYEAU et al (218 ; 219 ; 220) qui ont démontré la nature glycoprotéidique de la substance qui fait obstacle à la réaction. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs qui ont également travaillé la question (KASHIWAGI (221), HEREMANS (222)).

La composition en glucides de la substance de DONAGGIO a été précisée par BISERTE et al (223).

La composition molaire en oses "neutres" est la suivante :

- Galactose	10
- Glucose	2
- Mannose	7
- Xyl se	7
- Fucose	11

Les auteurs en concluent que cette substance est différente des glycoprotéides urinaires décrites par TAMM et HORSPALL (224), ANDERSON et MAC LAGAN (225).

En fait, la substance est hétérogène : c'est un mélange de glycoprotéides.

D'ailleurs l'étude immunoélectrophorétique d'une dialysable d'urine de sujet fatigué montre l'apparition de l'arc de l'  $\alpha_1$ -glycoprotéine principale, d'un arc  $\beta_1$ , supplémentaire. Elle montre également une augmentation sensible de l'orosomucoïde de la  $\beta_{1S}$ -globuline et de la  $\beta_{2A}$ -globuline (HAYEM-LEVY) (226).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de TAYEAU, JENSEN et REISS (227) qui ont prouvé que le phénomène d'obstacle de DONAGGIO était dû uniquement aux variations quantitatives des glycoprotéides urinaires.

La substance de DONAGGIO, qui semble être d'origine sérique (NAKAYAMA) (228) ; SEKIMOTO (229) ne représenterait que l'ensemble des mucoïdes urinaires (HAYEM-LEVY) (230).

## 2°) LE MUCOPOLYOSIDE DE DI FERRANTE

Nous avons vu lors de l'étude des mucopolysaccharides acides de l'urine (ou glycosaminoglycannes) qu'en 1956, DI FERRANTE et RICH (231) avaient isolé un composé qui serait identique au chondroïtine-sulfate du cartilage nasal du boeuf. DI FERRANTE (232) avait, cependant, signalé l'action de la hyaluronidase sur ce composé qui serait donc un mélange de chondroïtine-sulfate et d'acide hyaluronique.

De plus, la galactosamine et l'acide glycuronique ne sont pas les constituants exclusifs de cette préparation. Elle renferme des oses comme le galactose, le mannose et le fucose.

MAXFIELD (233) a aussi démontré que le composé de DI FERRANTE a une activité biologique identique à celle du composé de TAMM et HORSFALL (234).

Selon cet auteur, du point de vue structural, le mucopolyoside de DI FERRANTE serait constitué de la moitié du mucoïde de TAMM et HORSFALL (MAXFIELD) (235) (236).

Par ailleurs, HAYEM-LEVY (237) par immunochimie met en évidence la parenté antigénique de ce composé avec l'orosomucoïde. Le bromure de méthyl-céthyli-ammonium précipite donc non seulement les mucopolysaccharides mais aussi le glycoprotéide de TAMM et HORSFALL et peut-être l'orosomucoïde.

## 3°) LE MUCCOÏDE D'ANDERSON et MAC LAGAN

ANDERSON et MAC LAGAN (238), ANDERSON (239), ANDERSON, LOCKEY et MAC LAGAN (240) ont décrit une méthode d'isolement d'un mucoïde urinaire par absorption sur l'acide benzoïque, puis dissolution de celui-ci dans l'acétone. Ce composé renferme 10,5 p 100 d'azote et 14,4 p 100 d'hexosamine, et il est hétérogène en électrophorèse. A pH : 8, 6, il migre sous la forme d'une bande diffuse entre les  $\alpha_1$  et les  $\alpha_2$  globulines (ANDERSON et MAC LAGAN) (241). A pH : 4, 6, les auteurs observent deux composants chargés négativement (ANDERSON, LOCKEY

et MAC LAGAN (242)). HAYEM-LEVY (243) identifie en plus à pH 3,9 un composant rapide, identique au mucopolysaccharide de DI FERRANTE.

Par immunoélectrophorèse, l'hétérogénéité est encore plus marquée. Elle permet de caractériser l'orosomucoïde, une  $\gamma_2$ -globuline, une  $\beta_1$  - et une  $\beta_2$ - globuline (HAYEM-LEVY) (244).

En outre, cette préparation renferme des substances à spécificité de groupe sanguin, des inhibiteurs de l'hémagglutination virale et des gonadotrophines (ANDERSON, LOCKEY et MAC LAGAN) (245).

Donc la méthode d'adsorption benzoïque ne permet pas d'isoler sélectivement un composé pas plus qu'elle ne permet d'isoler la totalité des glucides combinés de l'urine (ANDERSON (246) ; KAKETA (247) ; BISERTE, LEVY et HAYEM (248)).

## III - TEMPTATIVES DE FRACTIONNEMENT

### 1°) TRAVAUX D'HAMERMAN et HATCH (249)

HAMERMAN et HATCH ont étudié la fraction adialysable des urines et déterminé la composition en glucides de la fraction glycoprotéidique préparée par précipitation phosphotungstique.

Les résultats obtenus par les auteurs sont rassemblés dans le tableau IX (page 44). Toutefois, HAYEM-LEVY (250) n'a pu réaliser d'électrophorèse satisfaisante de cette préparation, ni pousser très loin son analyse.

TABIEAU IX

COMPOSITION CENTESIMALE DE LA FRACTION PHOSPHOTUNGSTIQUE DE L'ADIALLYCABLE  
URINAIRE PREPAREE PE HAMERMAN et HATCH (251) & ELIMINATION JOURNALIERE DE CETTE  
FRACTION

Nature de la fraction	Composition centésimale				Elimination journalière (en mg)			
	Hexoses (a)	Fucose (b)	Osamines (c)	Acides Urioniques (d)	Hexoses (a)	Fucose (b)	Osamines (c)	Acides Urioniques (d)
Fraction adiallycable					38,43	6,18	28,90	5,81
Fraction précipitée par l'acide phosphotungstique	36	-	48	-	14,14		14,04	

- (a) Méthode à l'anthrone de SCOTT et WELVIN (252)
- (b) Méthode de DISCHE et SCHEFFLES (253)
- (c) Méthode d'ELSON-MORGAN modifiée par SCHLOSS (254)
- (d) Méthode au naphtho-resorcinol - KANABROCKI (255)



2°) TRAVAUX DE BOYCE, KING, LITTLE et ARTOM (256)

Une méthode de fractionnement reproductible a été proposée par BOYCE et al (257) pour tenter, pour la première fois, d'effectuer la synthèse des résultats obtenus par différents auteurs.

Le mode opératoire est illustré par la figure 3 (page 46) et les résultats concernant l'analyse des différentes fractions sont rassemblés dans les tableaux X et XI (pages 47 et 48).

Les auteurs obtiennent trois fractions susceptibles d'être sous-fractionnées par d'autres méthodes. Une seule de ces fractions (fraction R<sub>1</sub>) est homogène. Elle correspond au mucoïde de TAMM et HORSFALL. Les deux autres fractions sont des mélanges : l'une (la fraction RS<sub>1</sub>) renferme les protéides plasmatiques, l'autre (fraction UF<sub>0</sub>) contient un groupe hétérogène de composés qui comprend, entre autres, des mucopolyosides. Cette dernière fraction, étant la plus abondante et s'identifiant le plus aux mucoïdes urinaires, a été sous-fractionnée (KING et BOYCE) (258) par le sulfate d'ammonium. Les auteurs obtiennent alors six sous-fractions dont certaines sont remarquables par leur teneur en acides uroniques. Elles seraient à rattacher aux mucopolyosides. Toutefois, aucune d'entre elles n'est une entité physico-chimiquement définie.

3°) TRAVAUX de BOURRILLON et KAPLAN (259)

En 1960, BOURRILLON et KAPLAN (260) ont décrit une méthode de fractionnement des glycoprotéides des urines humaines par précipitation éthanolique. Nous l'avons schématisée dans la Figure 4 (page 49). Ils obtiennent quatre fractions F<sub>50</sub>, F<sub>60</sub>, F<sub>80</sub> et F<sub>90</sub> qu'ils analysent qualitativement et quantitativement (tableau XII, page 50).

Urines de 24 heures

Dialysable sous agitation en tube de cellophane Visking

Ultracentrifugation à travers une membrane de collodion



RO

Traitement par un tampon véronal. Centrifugation



Fraction insoluble dialysée et lyophilisée

R<sub>1</sub>

Fraction soluble dialysable

RS<sub>1</sub>

Lyophilisation

UFO

Groupe hétérogène, renfermant "l'acide mucopolysaccharidique" de KERBY (261) et de DI FERRANTE et RICH (262)

Mucoïde de TAMM et HORSFALL (263)

Protéides plasmatiques

Figure 3

Schéma du fractionnement de BOYCE, KING, LITTLE et ARTOM (264)



TABEAU X

COMPOSITION CENTESIMALE EN OSES DE TROIS FRACTIONS OBTENUES PAR LE PROCÉDE DE  
BOYCE, KING, LITTLE et ARTOM (265)

Nature de la fraction	Hexoses p. 100		Hexosamines p. 100 (c)		Acides sialiques p. 100 (d)	Acide hexuronique p. 100 (e)
	Méthode à l'anthrone (a)	Méthode à l'orcinol (b)	Homme	Femme		
R <sub>1</sub>	13,52	8,03	6,24	4,14	3,52 ± 0,91	---
	± 0,76	± 0,53	± 0,23	± 0,33		
RS <sub>1</sub>	11,96	8,63	6,03	6,16	6,09 ± 1,23	---
			± 0,31	± 2,23		
UFO	21,59	15,20	10,41	8,66	10,55 ± 0,69	1,33 ± 0,18
	± 2,57	± 0,60	± 0,77	± 0,59		

- (a) Méthode à l'anthrone de SCOTT et MELVIN (266)
- (b) Méthode à l'orcinol de WEIMER et MOSHIN (267)
- (c) Méthode de SCHLOSS (268) modification de la réaction d'Elson Morgan
- (d) Méthode de WINZLER (269)
- (e) Méthode de DE FRATES et BOYDT (270) et de DISCHE (271)



TABIEAU XI

Taux d'excrétion (en mg par 24 heures) des constituants des trois fractions obtenues par le procédé de BOYCE, KING, LITTLE et ARTOM (272)

Nature de la fraction	Poids sec(*)	Hexoses (*)		Hexosamines (*)		Acides Sialiques	Acides Hexuroniques(*)
		anthrone	orcinol	homme	femme		
R <sub>1</sub>	89,6 ± 11,42	13,03 ± 2,08	7,23 ± 1,11	4,71 ± 0,70	4,5 ± 0,97	3,38 ± 0,31	-
				moyenne ±			
				3,63	0,55		
RS <sub>1</sub>	58,8 ± 7,34	7,70 ± 1,25	5,02 ± 0,67	3,11 ± 0,36	4,05 ± 1	3,38 ± 0,69	-
				moyenne ±			
				3,49	0,46		
UFO	264,5 ± 29,17	51,36 ± 7,63	39,94 ± 4,23	31 ± 2,83	17,20 ± 0,78	28,93 ± 4,49	3,55 ± 0,84

(\*) Ecart-standard



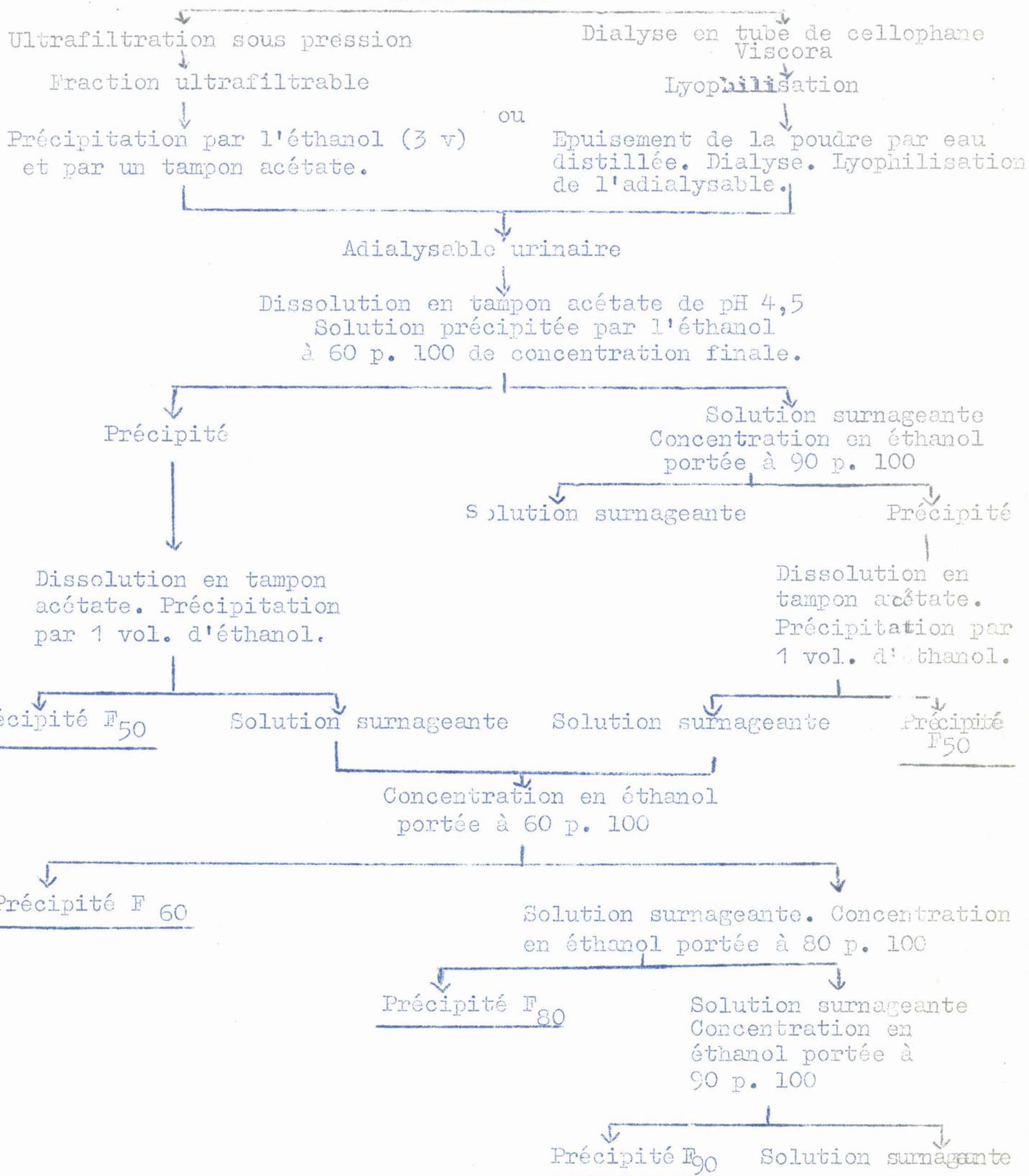


FIGURE 4

Fractionnement des glycoprotides urinaires selon BOURRILLON et KAPLAN (273)

TABEAU XII

COMPOSITION CENTESIMALE DES PREC PITES OBTENUS PAR FRACTIONNEMENT ENHAÏOLIQUE  
SELON LE PROCÉDE DE BOURRILLON et KAPLAN (274)

Tractions	Poids secs (en mg/l)	Hexoses p. 100 (a)	Fucose p. 100 (b)	N-acétyl-hexosa- mines p. 100 (c)	Acide Sialique p. 100 (d)
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)
F50	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)
F60	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)
F80	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)
F90	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)

(a) Méthode de SØRENSEN et de HAUGAARD (275)

(b) Méthode de DISCHE et SCHEFFLES (276)

(c) Méthode d'ELSON et MORGAN (277)

(d) Méthode WERNER et ODIN (278)



F<sub>50</sub> est la fraction la moins riche en glucides. Par immunoélectrophorèse, on y met en évidence sept protéines d'origine plasmatique. F<sub>60</sub>, F<sub>80</sub> et F<sub>90</sub> n'ont pas de caractère antigénique vis-à-vis de l'antisérum humain normal. Ces fractions tireraient leur origine de l'épithélium du tractus urinaire. Ce sont des glycoprotéides à forte teneur en glucides mais ne possédant pas de caractère antigénique, donc ne sont pas assimilables, au "mucopolysaccharide de DI FERRANTE et RICH".

Ces recherches ont été complétées par d'autres travaux (BOURRILLON, GOT et MICHON (279) ; BOURRILLON, GOT et CORNILLOT (280) mais sans amener de résultats plus précis. Toutefois la présence insolite d'un dérivé N-glycolyl-neuraminique est signalée par BOURRILLON, GOT et MICHON (281).

#### 4°) TRAVAUX de BERGGÅRD (282)

BERGGÅRD, pour fractionner l'urine, utilise l'ultrafiltration en tubes de cellophane Visking, suivie d'une dialyse effectuée en tubes de cellophane Visting également. En tirant parti de la porosité des cellophanes, l'auteur est parvenu à séparer trois fractions glycoprotéidiques, de poids moléculaire différent (Figure 3' ; page 52 ).

- la fraction A contient les molécules de PM 30.000 à 40.000 et renferme 22 à 28 mg par litre de glucides.
- la fraction B contient les molécules de PM 10.000 à 15.000 et renferme 26 à 35 mg par litre de glucides.
- la fraction C contient les molécules de PM 40.000 et renferme 46 à 69 mg par litre de glucides.

Le fractionnement est reproductible mais donne des fractions qui sont très hétérogènes.

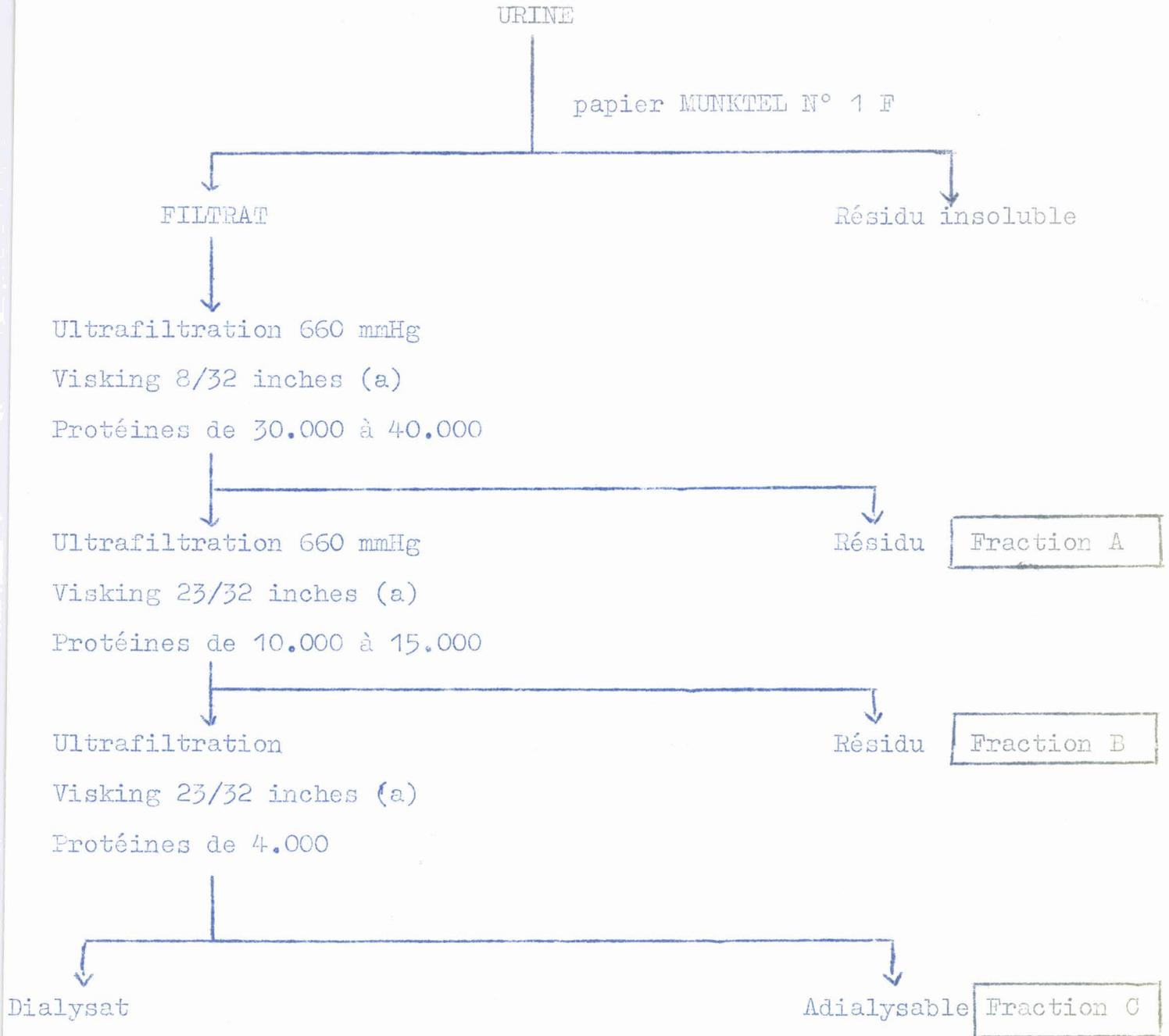


Figure 3'

Fractionnement de l'urine selon BERGGÅRD (283)  
(a) Visking : tube de cellophane de diamètre variable.

BERGGÅRD utilise un procédé semblable à celui de BOYCE et al (284), mais ces derniers n'avaient pas déterminé la taille de leur molécule. Leurs résultats sont donc difficilement comparables à ceux de BERGGÅRD (285). Cependant d'après leurs résultats quantitatifs, la fraction soluble non ultrafiltrable (R-S) correspondrait à la fraction A ou à une partie de la fraction A de BERGGÅRD. Nous avons précisé dans le Tableau XIII (page 54) quelques résultats significatifs choisis parmi les nombreuses données des auteurs.

#### 5°) TRAVAUX DE DISCHE (286)

Dans un important travail que nous pouvons résumer brièvement, DISCHE et al (287), ont appliqué, à la fraction ultrafiltrable de l'adialysable urinaire, un fractionnement par l'isopropanol, à quatre concentrations différentes : 67 : 75 : 83 : 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.

Les auteurs obtiennent, de cette manière, cinq fractions qui, soumises à l'analyse électrophorétique préparative en fil t continu, ont fourni quarante sous-fractions glycoprotéidiques (Tableau XIV page 55) qui sont toutes de nature hétérogène.

Dans leur discussion, les auteurs ont tenté de rapprocher leurs résultats de ceux de BOURFILLON, CERNILLOT et GOT (288) qui ont fractionné le précipité obtenu par le traitement d'urines d'enfants par l'éthanol d'une concentration de 65 p 100. Par chromatographie sur D.E.A.D. - cellulose et par électrophorèse en gel d'amidon, les auteurs ont ainsi obtenu vingt fractions glycoprotéidiques différentes qui ne peuvent être comparées avec ces fractions de DISCHE et de BERGGÅRD (289) car les procédés de fractionnement appliqués par les auteurs sont totalement différents. La seule conclusion tirée par DISCHE et al est que les fractions glycoprotéidiques isolées des urines humaines sont très hétérogènes et les auteurs proposent de les comparer avec les différents glycoprotéides tissulaires d'où ils tireraient leur origine.

TABLEAU XIII

COMPOSITION EN GLUCIDES, en mg par litre, DE FRACTIONS URINAIRES OBTENUES SUIVANT LE PROCÉDÉ DE BERGGARD (290)

Nature des fractions:	Hexoses (a)	Fucose (b)	Acide Sialique (c) (d)	Hexosamine (e)	Acide uronique (f)	Glucides totaux
A	6,8	1,4	6,6 (c)	6,0	0,8	21,6
B	11,2	3,1	8,3 (c)	9,7	1,7	34
C	21,8	2,7	10,4 (d)	9	4,7	48,6
Total	39,8	7,2	25,3	24,7	7,2	104,2
A	6,9	1,1	5,9 (c)	7,2	1,9	22,8
B	8,2	2,2	6,8 (c)	8,5	2,3	28,2
C	18,3	2,6	10,8 (d)	9,3	5,1	46,1
Total	33,4	5,9	23,5	25,0	9,3	97,1
A	6,3	1,6	6,1 (c)	6,1	1,5	21,6
B	10,1	2,5	7,9 (c)	8,8	2,1	30,8
C	29,4	4,1	16,5 (d)	12,4	5,2	68,6
Total	45,8	8,2	30,5	27,3	9,8	121

(a) Méthode à l'orcinol sulfurique suivant une modification de VASSEUR (291)

(b) Méthode à la cystéine sulfurique de DISCHE et SCHEFFLES (292)

(c) Réaction de BIAL suivant une modification de WERNER et ODIN (293) (294)

(d) Méthode à l'acide thiobarbiturique de WARREN (295)

(e) Méthode à l'ELSON-MORGAN modifiée par BLIX (296) suivant la description de SVENNERHOLM (297)

(f) Méthode au carbazol de DISCHE (298)

BIS LILLE

TABEAU XIV

RAPPORTS DE COMPOSITION EN GLUCIDES DES DIFFÉRENTES FRACTIONS OBTENUES PAR LE

PROCÉDE DE DISCHE et al (299)

Nature des Fractions	Glucides totaux en p. 100 de glycoprotéides	Gal	Man	Fuc	A.S.	Gluc NH <sub>2</sub>
A : 0 - 67 p. 100 Isopropanol	58 p. 100	0,69	0,56	0,41	0,37	4,3
B : 67 - 75 p. 100 Isopropanol	58 p. 100	0,74	0,70	0,33	0,44	5,2
C : 75 - 83 p. 100 Isopropanol	64 p. 100	0,76	0,65	0,28	0,51	4,4
D : 83 - 87 p. 100 Isopropanol	57 p. 100	0,79	0,78	0,27	0,90	2,3
E : 7 vol. Isopro- panol 8 vol. Ether	50 p. 100	1,11	0,72	0,50	1,58	1,3

Gal = Galactose ; H = Hexosamine ; Man = Mannose ; Fuc = Fucose ; A.S. = Acide Sialique  
 Gluc NH<sub>2</sub> = Glucosamine ; Gal NH<sub>2</sub> = Galactosamine.



6°) TRAVAUX DE KAO

Une méthode de fractionnement reproductible des composés adialysables de l'urine par le sulfate d'ammonium a été proposée par KAO et coll (300). Nous l'avons schématisée dans la figure 5 (page 57).

Les auteurs obtiennent trois fractions qu'ils analysent quantitativement (tableau XV; page 58). La première CPC I précipitée par le chlorure de sodium 0,58 M, correspond au mucoïde de TAMM et HORSFALL. Après dialyse et concentration, les auteurs, par addition de sulfate d'ammonium à 100 p 100 de saturation, obtiennent deux fractions. L'une contient un mélange comprenant les glycopeptides et les glycosaminoglycannes. Elle renferme 80 p 100 de glucides. L'autre, appelée CPC II contient les glycoprotéines. Elle est sous fractionnée par le sulfate d'ammonium à différentes concentrations (KAO - LESLIE - MAC GAVACK) (301) en trois précipités, de composition très différente les uns des autres. Cette façon de procéder permet de séparer les glycoprotéines en groupes de taille moléculaire décroissante. A ce titre, ces travaux sont à rapprocher de ceux de BERGGÅRD (302). Mais KAO et coll (303) estiment que leur méthode permet une meilleure séparation des groupes de composés.

Ce fractionnement est également à rapprocher de celui de BOYCE et coll (304). La fraction (R-1) de BOYCE est identique à la fraction CPC-I (mucoïde de TAMM et HORSFALL). Par ailleurs la fraction RS-1 de BOYCE correspondrait au précipité CPC II et au mélange des glycopeptides et des glycosaminoglycannes. KAO et coll (305) en concluent que leur méthode a l'avantage de séparer les glycosaminoglycannes et les glycopeptides de la fraction CPC II.

Addition de chlorure de sodium 0,58 M

Centrifugation

Surnageant I

Dialyse 1 semaine

Concentration sous  
pression réduiteAjusté à pH<sup>4</sup> (H Cl 0,1 M)

Addition sulfate d'ammonium à 100 p. 100

Centrifugation

Précipité CPC I

Précipité CPC - II

Surnageant II

Addition sulfate d'Ammonium à  
différentes concentrations

30 p. 100    60 p. 100    100 p. 100

CPC - I : Mucoprotéine de TAMM et HORSFALL + complexe carbohy-  
drateCPC - II : Complexe glucidique + mélange de protéines riches en  
sucres

Surnageant II : glycosaminoglycannes(MPA) et glycopeptides

FIGURE 5

Fractionnement de l'adialysable urinaire selon KAO et coll (306)

TABIEAU XV

COMPOSITION CENTESIMALE EN OSLS DES TROIS FRACTIONS OBTENUES PAR LE  
 PROCEDE DE KAO ; HIZER ; RICHARD ; DAWSON et MAC GAVACK (307)

Fractions	Hexoses	Fucose	Acide Sialique	Hexosamine	Acide Uronique	Protéines
CPG - I	14,25 <sup>±</sup> 0,53	1,01 <sup>±</sup> 0,10	4,73 <sup>±</sup> 0,34	7,58 <sup>±</sup> 0,30	0,85 <sup>±</sup> 0,11	77,20 <sup>±</sup> 1,29
CPG - II	13,45 <sup>±</sup> 0,81	1,09 <sup>±</sup> 0,15	6,47 <sup>±</sup> 0,91	10,02 <sup>±</sup> 1,08	1,01 <sup>±</sup> 0,15	68,28 <sup>±</sup> 9,30
MPA et Glycopeptides	37,21 <sup>±</sup> 2,30	3,79 <sup>±</sup> 0,42	9,31 <sup>±</sup> 0,62	22,14 <sup>±</sup> 2,22	7,23 <sup>±</sup> 0,46	94 <sup>±</sup> 1,07



### III - CONCLUSIONS

Les différentes méthodes de fractionnement des glycoprotéides que nous avons décrites ne permettent pas d'obtenir des glycoprotéides purs à l'exception de la muco-protéine de TAIM et HORSFALL (30).

#### 4°) DOSAGE DES GLYCOPROTIDES TOTAUX DES URINES

A notre connaissance peu d'auteurs se sont intéressés à la question du dosage des glycoprotides des urines. Nous avons vu, dans le chapitre précédent que les recherches s'étaient essentiellement orientées vers le fractionnement.

Cependant, une somme importante de résultats a été rassemblée, qui concerne une fraction bien définie de l'adialysable urinaire : celle des glycosaminoglycannes. C'est pourquoi nous verrons successivement :

- I - Le dosage des glycosaminoglycannes
- II - Le dosage des glycoprotides
- III - Les erreurs apportées dans les dosages centésimaux.

#### I - DOSAGE DES GLYCOSAMINOGLYCANNES

Les glycosaminoglycannes ont été beaucoup plus étudiés que le reste des glycoprotides de l'urine car ils sont physico-chimiquement mieux définis et surtout à cause de leur grande importance clinique. Leur quantité augmente, en effet, considérablement en cas de cancer et de leucémie (LOEWI (309) RICH et LYERS (310)) et dans des affections telles que la maladie de HURLER (MEYER et al. (311)) et le syndrome de MARFAN (BERENSON et SERRA (312)).

Nous ne nous sommes penchés que sur le cas d'individus sains et dans le tableau XVI (page 61) nous avons rassemblé les principaux résultats obtenus à propos des mucopolyosides acides des urines normales.

On voit que les valeurs obtenues présentent une grande dispersion puisque l'excrétion journalière varie de 2,5 à 17,2 mg selon les auteurs.

La plupart des méthodes de préparation dérivent de celle décrite par DI FERRANTE et RICH (313) qui utilisent le bromure de cétyl-triméthyl-ammonium (encore appelé Cétavlon). Mais DI FERRANTE (314) lui-même vient de faire paraître une étude critique de sa méthode décrite en 1956, en soulignant les causes d'erreur qu'elle entraîne

## II - DOSAGES DES GLYCOPROTIDES TOTAUX

Les travaux effectués sur les mucopolyosides acides, que nous venons d'évoquer rapidement, ne concernent toutefois qu'une partie des glycoprotides urinaires et les résultats intéressant les glycoprotides totaux restent rares.

Il nous semble en effet que quatre séries seulement de procédés aient été décrites :

- 1°) par HANDEMAN, HATCH, REIFE et BARTZ (315)
- 2°) par KING, BOYCE, LITTLE et ARTOM (316)
- 3°) par BERGGÅRD (317)
- 4°) et par nous-même qui avons rassemblé, en 1961, nos résultats dans un diplôme d'Etudes supérieures (318)

Il convient en outre, d'ajouter :

- 5°) quelques travaux partiels de BOAS (319) et BJORNESJÖ, WERNER et ODIN (320) sur les osamines
- et 6°) des résultats signés par SPIK et MONTREUIL (321) à propos de causes d'erreurs dans les dosages colorimétriques des oses.

EXCRETION JOURNALIERE DES MUCOPOLYOSIDES ACIDES DE  
L'URINE HUMAINE (Exprimée en mg d'acide glucuronique)

Auteurs	Procédé de précipitation	Résultats
KERBY (322)	Benzidine	H (a) 4,9 ± 1,3 F (b) 3 ± 0,6
DI FERRANTE & RICH (323)	Cétavlon	2,5(par litre)
DI FERRANTE et RICH (324)	Cétavlon	H (a) 6 ± 0,303 F (b) 3,77 ± 0,204
RICH (325)	Cétavlon	E (c) 2,5 ± 0,22
MEYER <u>et al</u> (326)	Cétavlon	6 à 10
LOEWI (327)	Cétavlon puis éthanol	H (a) 2,7 à 17,2 F (b) 2,5 à 12,9
KING <u>et al</u> (328)	Ultrafiltration et sulfate d'ammonium	8
CLAUSEN et ASBOE-CLAUSEN (329)	Cétavlon	3,7
TELLER (330)	Cétavlon puis éthanol	E (c) 4 ans 3,5 ± 1,6 14 ans 7,3 ± 2,6
KAO <u>et al</u> (331)	Sulfate d'ammonium	0 - 10 ans 13,1 ± 1,9 11 - 20 ans 17,8 ± 2,6 21 - 40 ans 9,2 ± 6 41 - 80 ans 11,1 ± 9
BERENSON et DALFERRES (332)	Cétavlon et électrophorèse de zone	4,4 à 5,5

- (a) H - Homme  
(b) F - Femme  
(c) E - Enfant



Nous allons donc examiner successivement les résultats obtenus par ces différents groupes d'auteurs.

1 - TRAVAUX de HAMERLIN, HATCH, REIFE et BARTZ (333)

Ces auteurs travaillent sur des urines de 24 h. Ils en dialysent la totalité pendant trois jours contre eau courante à 10°C. Après la dialyse, les urines sont réduites au tiers de leur volume initial par évaporation sous vide entre 30° et 40°C. Après concentration, elles sont de nouveau dialysées trois jours contre eau distillée changée deux fois, à 5°C. La dialyse est suivie d'une nouvelle concentration. L'adialysable est enfin lyophilisé. Les dosages sont effectués sur la poudre obtenue.

Les hexoses sont dosés par la méthode à l'anthrone de SCOTT et MELVIN (334). Le dosage est précédé d'une hydrolyse par HCl 4 N, en tubes scellés, à 100 ° C, pendant 6,5 h.

Sur le même hydrolysate, les auteurs dosent les osamines par une modification introduite par SCHLOSS (335) de la méthode d'ELSON-MORGAN (336).

Le dosage du fucose est réalisé par la méthode à la cystéine-acide sulfurique de DISCH et SCHETTLES (337) sur une solution obtenue en dissolvant quelques grammes de la poudre obtenue par lyophilisation dans de la soude 0,08 N.

La même solution sert également au dosage de l'acide hexuronique. Elle est, toutefois, d'abord hydrolysée par de l'acide chlorhydrique concentré à 100°C, pendant 1 h, puis dosée à l'aide d'un réactif au naphtrésorcinol suivant le procédé décrit par le "CORN PRODUCTS SALES COMPANY" (338).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XVII (page 63). Les auteurs signalent qu'ils n'ont pas dosé les acides sialiques car leur présence est considérée seulement comme possible et non comme certaine.

TABIEAU XVII

(a) Composition en glucides et excretion des glycoprotéides totaux présents dans la fraction de  
HAMERMAN ; HATCH ; REIFE et BARTZ (339)

Poids sec mg par l. : 24 h.	Hexoses		Fucose		Hexosamine		Acide hexuronique	
	p. 100	mg par 24 h.	p. 100	mg par 24 h.	p. 100	mg par 24 h.	p. 100	mg par 24 h.
436	15,6	47,58	2,4	7,32	9,8	29,9	1,3	3,9
349	14,0	47,04	2,6	8,73	9,8	32,8	1,3	4,36
151	13,7	29,86	3,1	5,76	10,3	22,45	1,3	2,83
Moyenne	14,43	41,47	2,7	7,6	9,96	28,38	1,3	3,69

(a) Pour les méthodes de dosages, voir le texte (page 62).

N.B. : Les résultats en mg par 24 h ont été calculés d'après les pourcentages publiés par les auteurs.



Ils font aussi des restrictions sur l'exactitude des valeurs données pour l'acide hexuronique car la méthode de dosage utilisée ne les satisfait pas.

2 - TRAVAUX DE KING, BOYCE, LITTLE et ARTON (340)

Les auteurs recueillent les urines de 24 h. Le volume total est réparti en fractions de 150 ml qui sont dialysées en tube de cellophane Visking de 2,8 cm de diamètre, sous agitation, contre eau distillée à 3° C. L'eau est changée chaque jour jusqu'à ce que la conductance spécifique de l'urine soit inférieure à  $9 \cdot 10^{-5}$  mhos. La fraction adialysable est alors lyophilisée. La poudre obtenue est séchée en dessiccateur avec du sulfate de calcium anhydre.

Les auteurs dosent alors les différents constituants glucidiques de l'adialysable. Les hexoses sont dosés à la fois par la méthode à l'anthrone de SCOTT et MELVIN (341) et par la méthode à l'orcinol de WEINER et MOSHIN (342) ; les acides sialiques par la diphenylamine, selon la méthode de WINZLER (343) les osamines selon la modification de SCELOSS (344) de la réaction d'ELSON - MORGAN (345).

Les résultats figurent dans le tableau XVIII (page 65)

Les auteurs signalent que les valeurs obtenues en dosant les oses, à la fois par l'anthrone et l'orcinol, sont concordantes. Le pourcentage de 9,7 p. 100 d'acide sialique leur paraît tout à fait convenable. De même, les quantités d'osamines sont dans les limites de celles trouvées par d'autres auteurs (HAMERMAN, HATCHE, REIFE et BARTS (346) ; BOAS (347) ; KING, WARNOCK (348)).

TABEAU XVIII

COMPOSITION EN GLUCIDES TOTAUX DE L'ADIALYSABLE DES URINES NORMALES SELON LE PROCÉDE  
DE KING, BOYCE, LITTLE et ARICOM (349)

Poids sec mg par 24 h	Pourcentage						en mg par 24 h (a)					
	Hexose		Acide Sialique		Hexosamine		Hexose		Acide Sialique		Hexosamine	
	Anthrone	Orcinol	Anthrone	Orcinol	Anthrone	Orcinol	Anthrone	Orcinol	Anthrone	Orcinol	Anthrone	Orcinol
413	24,9	22,4	10,2			102,84	91,95	42,12				
453	15,6	15,0	10,0	6,1		70,66	67,95	45,3			27,63	
497				6,7							33,30	
191	14,3	15,2	14,8	7,2		27,31	29	28,26			13,75	
508	15,2	17,0	8,2	5,9		77,21	86,36	41,66			29,97	
505	17,6	17,5	9,3			88,88	88,38	46,97				
392	19,7	16,8	8,6	6,1		77,22	65,85	33,71			23,91	
516	13,6	14,3	8,5	5,9		71,72	73,80	43,86			30,45	
427	16,0	14,8	7,6			68,82	63,20	32,45				
484	15,7	16,5	9,9	5,5		75	79,86	47,92			26,62	
Moyenne	16,95	16,6	9,7	6,2		73,35	72,6 + 19,1	40,7 + 7,5			26,65 + 6,1	

(a) Les résultats en mg par 24 h ont été calculés d'après les pourcentages publiés par les auteurs.



Par ailleurs, les auteurs expliquent la raison pour laquelle ils n'ont pas dosé les acides uroniques, bien qu'ils en aient décelé dans l'adialysable urinaire. En effet, après avoir appliqué le procédé d'hydrolyse le plus énergique décrit par HAMBERMAN, HATCH, REIFE et BARTE (350), ils n'ont plus retrouvé d'acides uroniques. En outre, ils ne parviennent pas à obtenir le pic d'absorption caractéristique décrit par DISCHE (351) après la réaction avec l'acide thioglycolique. En conséquence, comme la quantité en acides uroniques semble dépendre des conditions d'hydrolyse, les auteurs ont préféré ne pas doser ces composés.

### 3 - TRAVAUX de BERGGÅRD (352)

Nous avons déjà décrit le procédé de fractionnement proposé par l'auteur (page 51) . Le but poursuivi par BERGGÅRD était de fractionner l'adialysable urinaire, mais l'auteur en additionnant les résultats obtenus sur les trois fractions obtient la quantité de glycoprotéides urinaires totaux (tableau XIX page 67) que nous mentionnons, ici, à titre comparatif.

### 4 - TRAVAUX PERSONNELS ANCIENS (GOUBET) (353)

Nous avons nous-même travaillé la question du dosage des glucides totaux de l'adialysable des urines pendant plusieurs années.

Les urines étaient filtrées puis dialysées en fractions de 100 ml, dans des sacs de cellophane (référence 500 N) d'abord contre 300 ml d'eau distillée, renouvelée chaque jour pendant 3 jours, ensuite contre eau courante pendant 2 $\frac{1}{2}$  h. C'est sur l'adialysable ainsi obtenu et amené à une concentration convenable qu'étaient fait les dosages.

TABIEAU XIX

TABIEAU COMPARATIF DE LA COMPOSITION GLUCIDIQUE EN mg par 24 h DE DIFFERENTES PREPARATIONS D'ADIALYSABLES URINAIRES.

	Hexoses	Fucose	Acides Sialiques	Hexosamines	Acides Uroniques
HAMERMAN <u>et al</u> (354)	41,47	7,6	-	28,38	3,69
KING <u>et al</u> (355)	orcinol 72,6 ± 19,1 (91,95 à 29)	--	40,7 ± 7,5 (47,92 à 28,26)	26,65 ± 6,1 (33,30 à 13,75)	-----
BERGGÅRD (356) (a)	39,6	7,1	26,4	25,66	8,76
GOUBET (357)	66 (50 à 95)		30 (20 à 40)	20	20 (6 à 35)

(a) Les moyennes ont été calculées d'après les résultats obtenus par BERGGÅRD (tableau VI p. 28)



Nous avons dosé les oses totaux par l'orcinol selon la méthode décrite par TILLMANS et PHILIPPI (358) modifiée par RIMINGTON (359). Le dosage des acides sialiques a été effectué en mettant à profit les réactions colorées que donnent ces substances avec le réactif de DISCHE à la diphénylamine selon la méthode de NIAZI et STATE (360) modifiée par WERNER et ODIN (361). Nous avons utilisé le mode opératoire de BELCHER, NUTTEN et SANBROOK (362) qui est une modification de la méthode originale d'ELSON et MORGAN (363) pour doser les osamines. Enfin, les acides uroniques sont dosés selon la méthode au carbazol de DISCHE (364).

La moyenne des résultats obtenus est rapportée dans le tableau XIX page 67. On observe une grande dispersion des résultats (qui se remarque également dans les travaux de KING et al (365), notamment en ce qui concerne les oses et les acides uroniques.

5 - TRAVAUX de BOAS (366) ; de BJORNESJO et al (367) et de KING et HYDER (368)

Il nous faut ajouter à ces travaux les résultats sur les osamines conjuguées totales de BOAS ; BJORNESJO et al et de KING et HYDER qui trouvent respectivement  $42 \pm 6,0$  mg/24 h.  $36,5$  mg par 24 h. et  $32,4 \pm 7,2$  mg par 24 h. pour les hommes et  $25,9 \pm 5,8$  pour les femmes.

6 - TRAVAUX de SPIK et MONTREUIL (369)

Si les méthodes de dosages colorimétriques sont au point sur des produits purs, il convient de prendre certaines précautions quand on les applique à des solutions plus complexes.

Les travaux de SPIK et MONTREUIL (370) et de MONTREUIL et SPIK (371) montrent :

- a) qu'à quantités égales les différents oses donnent des colorations dont les absorbances varient dans de larges proportions.

- b) que les acides uroniques donnent une coloration avec les réactifs à l'orcinol sulfurique et à l'anthrone sulfurique,
- c) que certains oses neutres donnent une coloration avec le réactif au carbazol sulfurique. Ils interfèrent donc dans le dosage des acides uroniques.

Les dosages colorimétriques des oses neutres totaux par l'orcinol sulfurique et par l'anthrone sulfurique nécessitent dans l'emploi de solutions témoins dont la composition en oses doit être identique à celle de la solution étudiée. En outre, la présence éventuelle d'acides uroniques dans les solutions d'oses neutres introduit une autre cause d'erreur que l'on évite en appliquant des formules de correction qui tiennent compte de la réactivité des acides uroniques avec les réactifs à l'anthrone et à l'orcinol d'une part, et des oses neutres avec le carbazol d'autre part.

En appliquant ces principes, on obtient des valeurs très diminuées et qui s'accordent parfaitement, qu'elles que soient les méthodes utilisées. Les résultats obtenus par SPIK et MONTREUIL (372) sont rassemblés dans le tableau XX (page 70). On remarque, cependant, que les valeurs oscillent entre de larges limites (45 à 117 mg d'oses neutres par litre). Cette dispersion dans les résultats nous incite à poursuivre les travaux dans le but de réduire l'écart-standard, en nous fondant sur l'hypothèse que le taux des glycoprotéides urinaires devait être, en principe, relativement stable. On verra plus loin que ce but a été atteint et que notre hypothèse de travail s'est trouvée vérifiée.

### CONCLUSIONS

L'examen des différents résultats donnés par les auteurs (tableau XIX; page 67) pour le dosage des composés glucidiques des glycoprotéides des urines humaines normales montre donc d'importantes variations.

TABIEAU XX

Variation de la composition en oses neutres de fractions adialysables d'urine humaine (mg d'oses neutres par litre d'urine) suivant la méthode de dosage utilisé, la composition en oses de la solution témoin et suivant que l'on effectue ou non la correction due à la présence d'acides uroniques (d'après SPIK et MONTEUILL (27)).

Composition de la solution témoin	Correction due à la présence des acides uroniques	Type de dosage	Echantillon d'urine				
			1	2	3	4	5
Gal (a) + Man (b) + (1 : 1)	non effectuée	orcinol	84	144	92	60	156
	effectuée	anthrone	88	155	97	67	147
Gal (a) + Man (b) + Fuc (c) (10 : 6 : 4)	non effectuée	orcinol	70	124	78	50	118
	effectuée	anthrone	85	149	93	62	136
erreux	non effectuée	orcinol	80	138	88	57	150
	effectuée	anthrone	8	122	73	48	118
erreux	non effectuée	orcinol	65	117	74	45	110
	effectuée	anthrone	65	118	69	44	111
erreux	non effectuée	orcinol	+29p. 100	+ 24p.100	+ 24p.100	+33 p.100	+ 42p.100
	effectuée	anthrone	+35p. 100	+ 31p.100	+ 40p.100	+52 p.100	+ 32p.100

(a) Gal = Galactose ; (b) Man = Mannose ; (c) Fuc = Fucose



Les travaux de SPIK et MONTREUIL (37<sup>4</sup>) nous ont dévoilé certaines causes d'erreur et nous ont confirmé qu'il était indispensable d'améliorer la technique d'isolement des mucoïdes urinaires.

C'est ce qui nous a déterminé à reprendre la question dès l'origine et de tenter d'abord de mettre au point une méthode d'isolement des glycoprotéides totaux des urines pour faire un bilan complet et statistique de la composition qualitative et quantitative des glucides libres et conjugués des urines. Parallèlement dans un but de biologie comparée, nous avons appliqué ce procédé d'isolement des glycoprotéides aux urines de différents Mammifères de façon à démontrer l'unité métabolique de l'excrétion chez les Mammifères.

TRAVAUX

PERSONNELS

Au cours de nos recherches, nous avons été amenés à appliquer des procédés désormais classiques de détermination de la composition centésimale et molaire en monosaccharides des glycoprotides.

Dans le but d'alléger le texte et de mieux dégager nos travaux personnels, nous les décrirons dans l'appendice technique qui figure à la fin de notre mémoire (voir p. 195).

Nos recherches nous ont conduite à la description d'un procédé d'analyse qualitative et quantitative des glycoprotides urinaires totaux. En outre, notre méthode fournit une fraction micromoléculaire qui renferme les glucides "libres" dont nous avons entrepris l'étude en collaboration avec G. STRECKER.

Notre mémoire personnel comporte, en conséquence, les deux chapitres suivants :

1. Dans le premier chapitre, nous décrirons le procédé de fractionnement des urines qui nous permet d'obtenir les glycoprotides totaux et de déterminer leurs caractéristiques chimiques (composition centésimale et molaire en monosaccharides, en particulier).
2. Dans le second chapitre, nous exposerons les résultats de l'application de cette méthode à l'étude des glucides libres et conjugués des urines humaines et des urines de différents Mammifères.

## 1° - PREPARATION DU MATERIEL D'ETUDE

### A - MISE AU POINT DE LA METHODE DE PREPARATION DES GLYCOPROTIDES

Les urines sont recueillies sur toluène et placées à 4°C. Après un séjour de 24 h, il s'y forme généralement un précipité constitué essentiellement d'urates que l'on élimine par filtration sur du papier Whatman n° 1.

## I - LA DIALYSE ET SES CAUSES D'ERREUR

L'urine, recueillie comme il est décrit ci-dessus, est dialysée sous cellophane. Pendant plusieurs années toutes nos dialyses ont été effectuées en feuille de cellophane (la cellophane française, référence : 500 N).

Des fractions de 100 ml d'urine étaient dialysées dans des sacs de cellophane contre 300 ml d'eau distillée, renouvelée chaque jour pendant 3 jours puis la fraction adialysable était soumise à une dialyse contre eau courante pendant 24 h. C'est cette fraction finale qui, amenée à 100 ml, servait de substrat aux différents dosages.

Nous pensions ainsi avoir réalisé un fractionnement de l'urine en glycoprotéides (adialysable) et en glucides libres de faible masse moléculaire (dialysable).

Cependant, les résultats obtenus n'étaient pas reproductibles. En outre nous avons été frappée par la présence de glucose et de xylose dans les hydrolysats de mucoides urinaires, ce qui n'avait jamais été signalé par d'autres auteurs. A ces observations, s'ajoutait la caractérisation chromatographique de quantités importantes de glycérol.

Ces résultats nous ont incité à rechercher systématiquement l'origine de ces composés "anormaux". C'est ainsi que nous avons entrepris une étude critique de la dialyse et d'abord des membranes de dialyse.

### 1. ERREURS DUES A LA CELLOPHANE

Ayant observé que certaines collophanes cédaient aux fractions adialysables et dialysables du glycérol et des formes combinée du glucose et du xylose, nous avons été amenée à l'expérimentation suivante :

a) Etude expérimentale

Nous avons effectué des dialyses d'eau bidistillée en procédant de la façon suivante :

100 ml d'eau bidistillée, additionnées de quelques gouttes de toluène, ont été introduits dans des sacs de cellophane et dans des tubes de cellophane. Toutes ces expériences ont été faites en double : une série de dialyse étant réalisée dans des feuilles et des tubes de cellophane préalablement lavés à l'eau courante pendant 24 h puis à l'eau distillée, l'autre série étant faite dans la cellophane non lavée. Toutes ces fractions étaient dialysées contre 300 ml d'eau bidistillée renouvelée chaque jour pendant 3 jours.

La teneur en oses totaux des fractions adialysables a été déterminée par la méthode à l'orcinol de TILLMANS et PHILIPPI (375).

L'analyse chromatographique des hydrolysats de cellophane et des fractions adialysables préalablement purifiés sur échangeurs d'ions a été effectuée par le système-solvant de PARTRIDGE (376). Les oses du chromatogramme ont été révélées par le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (377) et le glycérol par le réactif au nitrate d'argent de TREVELLYAN et coll. (378). Le glycérol a en outre, été caractérisé dans les résidus secs des hydrolysats par des réactions classiques : formation d'acroléine par chauffage en présence de bisulfate de potassium ; dissolution de l'hydroxyde cuivrique ; oxydation par les hypochlorites en déhydroxyacétone qui donne une coloration violette avec le résorcinol chlorhydrique.

b) Résultats

1°) Nos résultats, rassemblés dans le tableau XXI (page 76), montrent que la cellophane en feuille ainsi que la cellophane en tube non lavées cèdent à la fraction adialysable une quantité relativement importante de glucides de l'ordre de 1 à 1,5 mg pour 100 ml. Cette quantité de glucides introduit une erreur importante, de l'ordre de + 15 à 20 p.100, car dans le cas présent des urines, il s'agit de solutions faiblement concentrées en mucosides (5 à 7mg p.100 ml d'adialysabb).

TABEAU XXI

Quantités d'oses neutres et de glycérol libérées dans les fractions adialysables par la cellophane en feuille et en tube au cours de la dialyse (en mg pour 100 ml d'eau distillée).

	oses neutres totaux	glycérol
Feuille Cellophane non lavée	2,4 à 3	19,6
Feuille Cellophane lavée	0,250	0
Tube Visking non lavé	0,9 à 1,360	16,3
Tube Visking lavé	0 à 0,165	0



2°) Ces glucides sont des polysides formés de glucose et xylose qui tirent leur origine de la dégradation de la cellophane. L'hydrolyse acide de cette dernière fournit, en effet, du glucose et du xylose (Fig. 5 p. 78)

3°) Outre ces glucides, la cellophane en feuilles ou en tubes libère dans les fractions adialysables du glycérol en quantité non négligeable (voir tableau XXI; p 76). Or, le glycérol apporte une cause d'erreur au dosage des acides sialiques. Il donne, en effet, une coloration jaune avec le réactif au carbazol de DISCHE (379), une coloration verte avec le réactif à la diphénylamine de WERNER et ODIN (380) et interfère dans le dosage des oses neutres à l'orcinol sulfurique (MONTEUIL et SPIK) (381).

4°) A la suite de ces travaux, il nous a donc semblé indispensable de faire une étude systématique des différentes cellophanes mise à notre disposition.

Ces dernières sont au nombre de trois :

- la cellophane en feuille (la cellophane française réf. 500 N)
- les cellophanes en tubes : réf. Nojax (Sophyc)  
réf. Visking

a- Nous avons effectué des dialyses de 100 ml d'eau bidistillée dans les différentes sortes de cellophane non lavées et lavées pendant 24 h contre eau courante puis rincées à l'eau bidistillée. Les fractions adialysables après hydrolyse ont été chromatographiées. Le lavage à l'eau courante élimine la quasi-totalité du glycérol. Ce résultat est valable pour toutes les cellophanes. Par contre les glucides ne sont jamais éliminés totalement. Les feuilles de cellophane en particulier, même lavées, continuent à apporter une proportion non négligeable de glycanes et xylanes. Les tubes de cellophane au contraire ne cèdent que des traces infimes de xylose après lavage (Fig. 6 ; page 79).

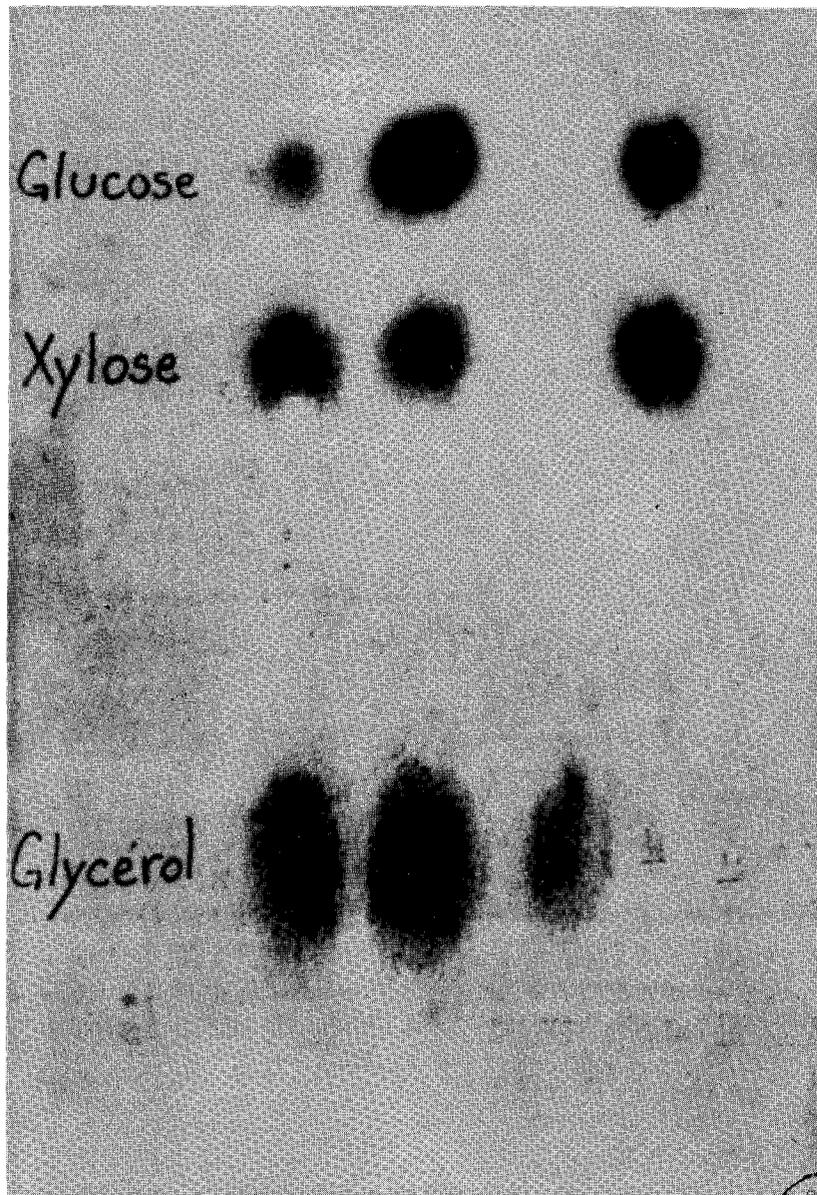


Figure 5

Chromatographie des oses provenant de l'hydrolyse acide de la  
cellophane. Système solvant : n-butanol/acide acétique/ eau  
( 4 : 1 : 5 )

Révélation par le réactif au nitrate d'argent.

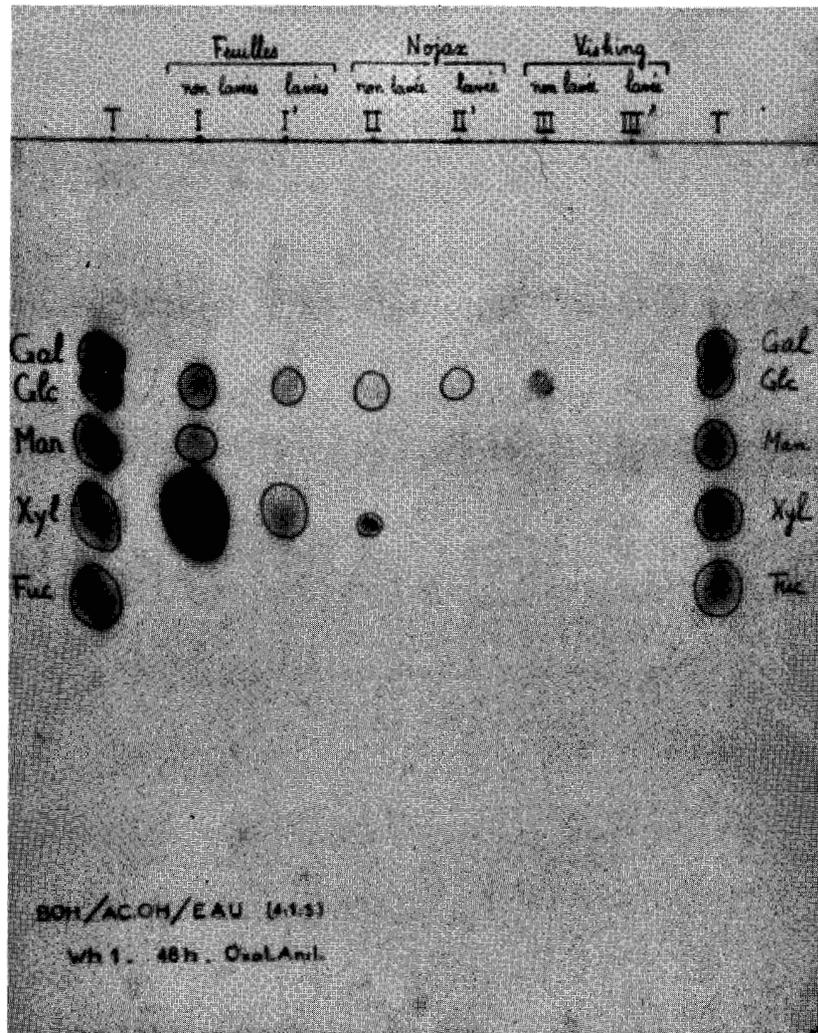


Figure 6

Chromatographie des oses provenant des feuilles et des tubes de cellophane avant et après lavage.

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

Migration : 48 heures. Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

b- Nous avons également dialysé des fractions de 100 ml d'urine dans des sacs confectionnés à partir de feuilles de cellophane non lavées et lavées et dans des tubes de cellophane lavés et non lavés.

La dialyse en feuille (surtout non lavée) est plus lente et donne des résultats en oses totaux très inconstants et supérieurs à ceux que donne la dialyse en tubes (tableau XXII ; p. 81). Au contraire le taux des oses neutres totaux constituant la fraction adialysable dans le cas de dialyses effectuées en tubes de cellophane lavés est assez constant : 70 mg ( $\pm$  10) par litre d'urine.

Nous avons donc adopté la dialyse en tube de cellophane après avoir fait subir à cette dernière, un lavage de 24 h à l'eau courante, suivi d'un rinçage soigneux à l'eau distillée. Mais, malgré ce traitement de la cellophane, nos résultats présentaient encore une instabilité trop importante. C'est pourquoi nous avons entrepris une étude critique de la dialyse elle-même.

## 2. ERREURS DUES A LA DIALYSE ELLE-MEME

Pour fixer le temps de la dialyse contre eau distillée nous en avons entrepris son étude pendant des temps variables.

Dans une expérience dont les résultats sont rassemblés dans le tableau XXIII (p. 82), nous avons dialysé des fractions de 100 ml d'urine pendant 3 jours contre 300 ml d'eau distillée renouvelée chaque jour. Nous avons prolongé la dialyse de certaines fractions de 4 à 9 jours.

Les taux d'oses neutres et plus encore d'acides uroniques décroissent régulièrement pour devenir stables dès le 7ème jour en ce qui concerne les oses, tandis que le taux des acides uroniques continue à décroître.

Nous avons donc fixé assez arbitrairement le temps de la dialyse à :

TABLEAU XXII

Comparaison en mg p. litre de la dialyse  
en cellophane en feuille et en tube, lavé et non lavée

	Oses neutres	Acides Sialiques	Osamines	Acides Uroniques
Feuille cellophane non lavée	85,8	57,1	22,9	33,6
Feuille cellophane lavée	63,5	55,7	21	31,9
Tube Visking non lavé	72	61	31,6	30,4
Tube Visking lavé	60,3	51,5	21	23,4



TABLEAU XXIII

Influence de la durée de la dialyse (résultats en mg p. 1.)

Durée de la dialyse	Oses neutres	Acides uroniques
3 jours	116,5	53,48
4 jours	86,85	36,64
5 jours	76,75	30,5



3 jours contre 300 ml d'eau distillée, renouvelée  
chaque jour,

1 jour contre une grande quantité d'eau distillée.

Nous ne pouvons, en effet, dialyser pendant 7 jours car on peut craindre, même en prenant des précautions, des altérations de la membrane de cellophane et des fermentations.

Malgré cette dialyse prolongée les taux d'acides uroniques et d'acides sialiques restaient élevés et inconstants. Nous avons démontré que la cellophane était encore à l'origine de cette cause d'erreur. On considère, en effet, que la dialyse est liée à la masse moléculaire et à la taille des molécules. En réalité, il intervient en outre les charges des molécules: si ces dernières sont des anions, les charges négatives qu'elles portent sont repoussées par les charges négatives des membranes de cellophane.

L'expérience suivante est, à cet égard, démonstrative :

Dialyse de la glucuronolactone et de l'acide glucuronique

La glucuronolactone est un composé apolaire. L'acide glucuronique, au contraire, est chargé négativement. Si on soumet à la dialyse de la glucuronolactone et de l'acide glucuronique, avec, comme produit de comparaison, le glucose, on voit d'après le tableau XXIV (p. 84) que le glucose est éliminé totalement de la fraction adialysable en 2 jours, ainsi que la glucuronolactone. Au contraire, il faut attendre 6 jours pour que l'acide glucuronique soit éliminé.

TABLEAU XXIV

Vitesse de dialyse du glucose, de la glucuronolactone  
et de l'acide glucuronique.

	Quantités présentes dans la fraction adialysable		
	glucose	glucuronolactone	acide glucuronique
Quantité intro- duite dans le sac de dialyse (100ml):	110 mg	100 mg	100 mg
1er jour	77 mg	74 mg	46,2 mg
2e jour	32 mg	19 mg	23,8 mg
3e jour	0	3 mg	11,2 mg
4e jour	0	0	7 mg
5e jour	0	0	3,5 mg
6e jour	0	0	1,75
TOTAL	109 mg	96 mg	93,45 mg



Or les adialysables urinaires renferment des quantités élevées d'acides uroniques. Une partie est, certes, conjuguée sous la forme de mucopolysides acides mais elle ne devrait représenter qu'une proportion infime, de l'ordre de 4 à 10 mg d'acide uronique p. litre. Or les taux atteignent 30 mg p. litre. Il devait donc subsister dans nos fractions adialysables des quantités élevées de glucurono-conjugués de faible poids moléculaire rendus adialysables par la charge électro-négative qu'ils portent.

D'autres conjugués semblent ne pas être éliminés au cours de la dialyse. Ce sont des sialo-conjugués de faible poids moléculaire. BOURRILLON (382) a mis en évidence ce phénomène en isolant un trisaccharide adialysable composé de 2 résidus d'acide sialique et d'un résidu de galactose. L'idée nous est donc venue de vérifier par chromatographie sur papier s'il restait des micromolécules.

Nous avons donc fait passer un adialysable de 100 ml d'urine sur des échangeurs d'ions. Nous avons recueilli l'effluent et l'avons chromatographié dans le système-solvant de PARTRIDGE (383). Le chromatogramme a été révélé par le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (384). Normalement, la révélation devait être négative. Or le chromatogramme montre outre la présence de polysides, du lactose, saccharose, glucose, arabinose, xylose, ribose et fucose (figure 7 ; p. 86).

La dialyse est donc loin de réaliser un fractionnement parfait de l'urine. Elle est incomplète. Pour cette raison nous avons essayé d'isoler la fraction macromoléculaire de l'urine par la précipitation alcoolique.

## II - IA PRÉCIPITATION ÉTHANOLIQUE

Les causes d'erreur apportées par la dialyse expliquent que nous ayons tenté d'isoler les glycoprotéides par précipitation éthanolique.

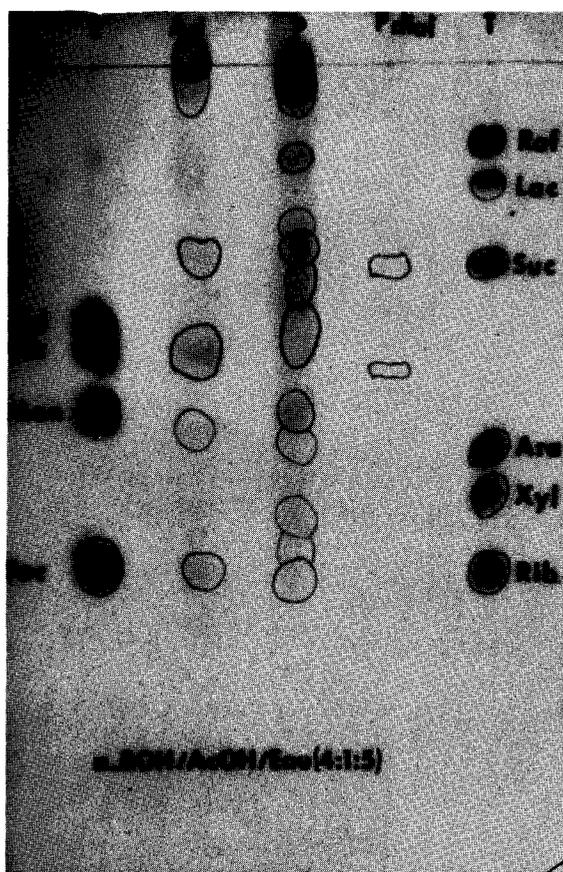


Figure 7

Chromatographie sans hydrolyse préalable de la fraction adialysable (Ad) de l'urine, d'un précipité éthanolique ( P ), et du même précipité dialysé ( P. dial.)  
Système solvant : n-butanol/acide acétique/eau ( 4 : 1 : 5 ).Papier Whatman n°3.  
Durée de la chromatographie : 48 heures.Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

Cette technique, nous l'avons vu, est utilisée par de nombreux auteurs. Mais les modalités, variant de l'un à l'autre, nous avons dû faire une étude systématique des différentes façons de procéder.

Le premier problème qui s'est posé a été celui de la concentration des urines, afin d'éviter l'emploi de volumes élevés d'éthanol.

### 1. LA LYOPHILISATION

La concentration des urines sous vide avec un évaporateur rotatif dégrade trop les protéides. Nous avons adopté la lyophilisation. Dans ces conditions, nous évitons en outre, les fermentations bactériennes ou enzymatiques. Le mode opératoire est le suivant :

Les urines sont recueillies sur toluène. Après un séjour de 24 h à 4°C, elles sont filtrées, puis dégazées pendant 30 mn avec une pompe à vide, en présence d'alcool octylique. On vérifie que le pH est voisin de 6 et on introduit l'urine dans des flacons à plasma de 500 ml à raison de 200 ml d'urine par flacon. On ajoute 1 goutte de toluène et 1 goutte d'alcool octylique par flacon. On congèle rotativement de façon à ce que le liquide recouvre d'une couche uniforme les parois. On lyophilise à - 70°C.

Quand la lyophilisation est terminée, on obtient une poudre jaune qui est reprise par de l'eau distillée et amenée à pH 8 avec de l'ammoniaque pour faciliter sa dissolution.

Mais il reste toujours une fraction insoluble qui est recueillie par centrifugation et lavée deux fois de suite. Les trois surnageants sont mélangés et amenés à une concentration égale au dixième du volume d'urine initial. Cette solution est, dans un second temps, précipitée par l'éthanol.

Nota :

- 1 - Nous avons étudiée la composition du résidu insoluble (650 mg environ p. litre d'urine) afin de vérifier qu'il ne contenait plus de glucides.

Des dosages nous ont montré que la quantité de glucides qu'il renfermait était négligeable (2 mg p. litre d'oses totaux, 0,5 mg p. litre d'acides uroniques) et qu'il renfermait essentiellement des sels minéraux. L'extraction aqueuse du produit lyophilisée est donc totale.

2. Nous nous sommes penchés, en outre, sur la question de savoir si la lyophilisation et la concentration au dixième ne causaient pas une précipitation différente de celle effectuée sur l'urine telle quelle.

En utilisant la méthode décrite plus loin, nous avons donc précipité par l'éthanol 100 ml d'une urine non lyophilisée et 10 ml de la solution provenant de la concentration au dixième de la même urine. Les résultats que nous avons obtenus ne révèlent pas de différences importantes, sauf dans le cas des acides uroniques (voir tableau XXV ; p. 89).

## 2. RECHERCHE DE LA CONCENTRATION EN ETHANOL

La lyophilisation étant donc le meilleur moyen de concentrer l'urine, il nous restait à déterminer la concentration en éthanol à utiliser pour précipiter l'urine reprise au dixième de son volume initial.

Nous avons procédé à une étude de gradient de concentration en éthanol, selon le procédé de BOURRILLON et al (385).

TABLEAU XXV

Influence de la concentration des urines sur la précipitation  
éthanolique

(résultats en mg p. I.)

	Oses neutres	Acides Sialiques	Osamines	Acides Uroniques
Urine non lyophilisée	63	30	27	6
Urine lyophilisée	67	30,5	28,5	14



3 l d'urine ont été lyophilisées et amenées au dixième du volume initial dans les conditions exposées ci-dessus. La solution finale est ajustée à pH 4. On l'additionne d'un volume égal d'éthanol refroidi à - 70° C. Après un temps de repos d'une heure à - 20° C on centrifuge. On obtient ainsi un précipité P<sub>50</sub> et une solution surnageante. Le surnageant est recueilli et sa concentration en éthanol est amenée à 60 p.100. On procède de la même façon que précédemment. On obtient ainsi successivement cinq précipités = P<sub>50</sub>, P<sub>60</sub>, P<sub>70</sub>, P<sub>80</sub> et P<sub>90</sub> dont la composition en glucides a été déterminée.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXVI (page 91) .

De plus chaque fraction a été étudiée en immunoélectrophorèse. La figure 8 (page 92) montre que la concentration en éthanol doit atteindre 90 p. 100 pour précipiter complètement tous les composés antigéniques. Pour cette raison, nous avons adopté la concentration de 90 p. 100 en éthanol.

Nota : Nous avons étudié l'action du pH sur la précipitation des glycoprotides urinaires et choisi pH 4 à partir duquel le taux de glucides ne varie plus. A pH 6, par exemple, pour une teneur identique en sucres, le précipité est plus abondant et souillé de sels minéraux.

### 3. ETUDE DU PRÉCIPITÉ

a - Dans un premier temps, nous avons précisé les conditions de purification du précipité éthanolique. Au pH et à la concentration en éthanol déterminés ci-dessus, nous avons précipité 100 ml d'urine concentrée au dixième.

TABIEAU XXVI

Composition centésimale en glucides de précipités obtenus par fractionnement éthanolique des urines

Précipités	Poids de poudre obtenue (en mg/l)	Oses "Neutres"	Acides Sialiques	Osamines	Acides Uroniques
P <sub>50</sub>	60	11,2	8,38	8,7	4,93
P <sub>60</sub>	21	13,9	10,15	8,1	3,44
P <sub>70</sub>	37	23,64	13,98	14,8	1,68
P <sub>80</sub>	31	17,62	13,21	10,8	2,57
P <sub>90</sub>	21	13,05	13,98	5,55	7,14



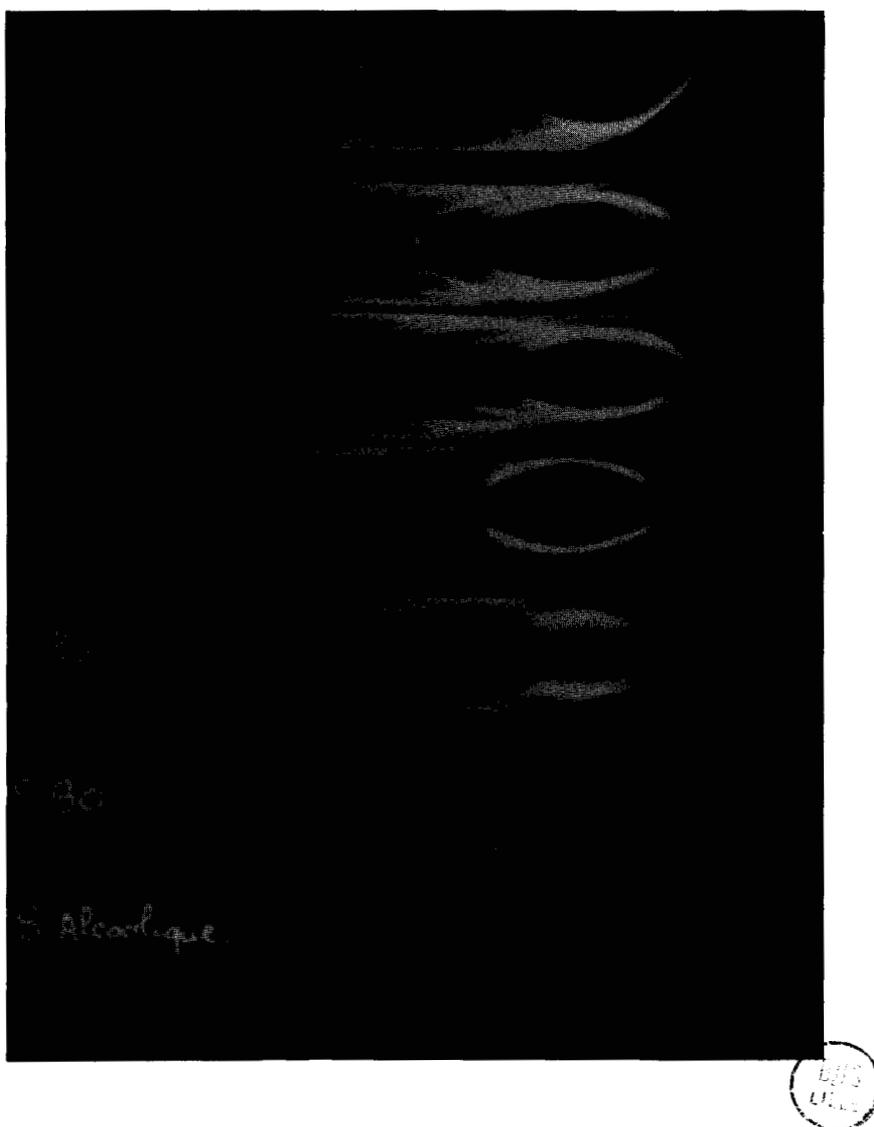


Figure 8

Immunoélectrophorèse des précipités urinaires P<sub>50</sub>, P<sub>60</sub>, P<sub>70</sub>,  
P<sub>80</sub>, et P<sub>90</sub> obtenus à - 20°C par l'éthanol refroidi à - 70°C.

Nous avons recueilli la première fraction surnageante et le précipité. Celui-ci, redissous dans 10 ml d'eau bi-distillée a été de nouveau précipité dans les mêmes conditions. Nous avons donc obtenu un second précipité et une deuxième fraction surnageante. En procédant encore une fois de la même manière, nous avons obtenu une troisième fraction surnageante et le précipité final. La composition en glucides des trois fractions surnageantes a ensuite été déterminée. Nous avons observé que la troisième fraction surnageante ne contenait pratiquement plus de glucides (voir tableau XXVII ; p. 94). Deux reprécipitations du précipité éthanolique initial sont donc nécessaires pour le purifier.

b - Dans un deuxième temps, nous avons dialysé et précipité la même urine pour comparer l'adialysable et le sédiment.

Nous avons observé que les résultats n'étaient pas du tout concordants et que la précipitation alcoolique donnait des résultats bien plus élevés que la dialyse (voir tableau XXVIII ; p. 95).

En outre, en effectuant la chromatographie sur papier du précipité, préalablement purifié sur échangeurs d'ions, nous avons observé qu'il était, comme l'adialysable, souillé de composés de faible poids moléculaire (Figure 7 ; p. 86). Le problème de l'isolement quantitatif des uromucoïdes n'était donc pas résolu par la précipitation éthanolique.

#### CONCLUSIONS GÉNÉRALES :

Le précipité éthanolique étant souillé d'oses et de polyosides, nous avons pensé qu'une précipitation suivie d'une dialyse éliminerait ces glucides en surcharge dans la fraction macromoléculaire. Par un raisonnement analogue, nous pouvions tout aussi bien tenter de purifier la fraction adialysable des urines en la précipitant par l'éthanol. Deux procédés s'offraient donc à nous. Il nous ont conduit à la description d'un protocole expérimental original.

TABLEAU XXVII

Composition en glucides des trois fractions  
surnageantes obtenues au cours de la précipitation éthanolique  
(en mg p. 1.)

	Oses Neutres	Acides Uroniques
Surnageant 1	658,6	469
Surnageant 2	28	14,5
Surnageant 3	20	8



TABLERAU XXVIII

Comparaison de la composition en mg par litre des glucides de l'adialysable et du précipité éthanologique d'une même urine.

	Oses Neutres	Acides Sialiques	Osamines	Acides Uroniques
Adialysable	106	102	45,8	49
Précipité éthanologique	165,6	118,5	59,75	74



III - CHOIX DE LA METHODE D'ISOLEMENT QUANTITATIF DES  
GLYCOPROTEINES URINAIRES ET DESCRIPTION DU PROCEDE  
DE DOSAGE DE CES DERNIERS

Nous avons à partir du même échantillon d'urine, appliqué les deux procédés, l'un constituant la contre-expérience de l'autre.

Nous exposerons d'abord en détail les différentes étapes du procédé que nous utilisons en travail de routine.

1. PREMIER PROCEDE :

a - Préparation de l'urine

Les urines recueillies sur un mélange chloroforme-toluène, après un repos de 24 heures à 4° C, sont filtrées sur papier WHATMAN n° 1. Un volume bien déterminé d'urine est alors dégazé sous vide, puis lyophilisé. La poudre obtenue est dissoute dans de l'eau distillée et amenée à pH : 8. Le résidu insoluble est éliminé par centrifugation après deux lavages successifs, afin d'en extraire totalement les substances glucidiques. Les différents surnageants sont réunis et amenés au dixième du volume initial.

b - Précipitation éthanolique

L'urine est ajustée à pH : 4 avec de l'acide chlorhydrique puis refroidie à 0° C. Le matériel macromoléculaire est précipité par 9 volumes d'éthanol absolu amené à la température de - 70° C. On laisse en repos 30 minutes à - 20° C. En effet, durant la précipitation, la température est toujours maintenue en dessous de - 20° C afin de limiter autant que possible l'action dénaturante de l'éthanol sur les glycoprotéines.

Puis on centrifuge à 2.800 tours-minute pendant 20 minutes. Le surnageant est soigneusement décanté. Le précipité restant, dissous dans une quantité d'eau correspondant au volume initial d'urine concentrée, est ajusté à pH : 4 et 9 volumes d'éthanol sont encore ajoutés afin d'extraire la totalité du matériel micromoléculaire.

La précipitation éthanolique est répétée trois fois.

### c - La dialyse du précipité

Le précipité final est dissout dans un volume d'eau distillée égal à deux fois la quantité d'urine concentrée. La solution obtenue est dialysée en tube de cellophane (type Nojax 16) lavé 24 h à l'eau courante et rincé abondamment à l'eau distillée. La dialyse est faite contre 10 fois son volume d'eau distillée, renouvelée chaque jour pendant trois jours, en présence de chloroforme-toluène et à 4° C.

On recueille la fraction adialysable qui est amenée à une concentration égale à la moitié du volume d'urine initial.

C'est sur cette solution finale que sont effectués les différents dosages : oses "neutres", acides sialiques, osamines, acides uroniques.

La figure 9 p. 98 illustre les diverses étapes de ce protocole.

Nous avons fait des dosages intermédiaires sur le précipité éthanolique.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau XXIX ; (p. 99).

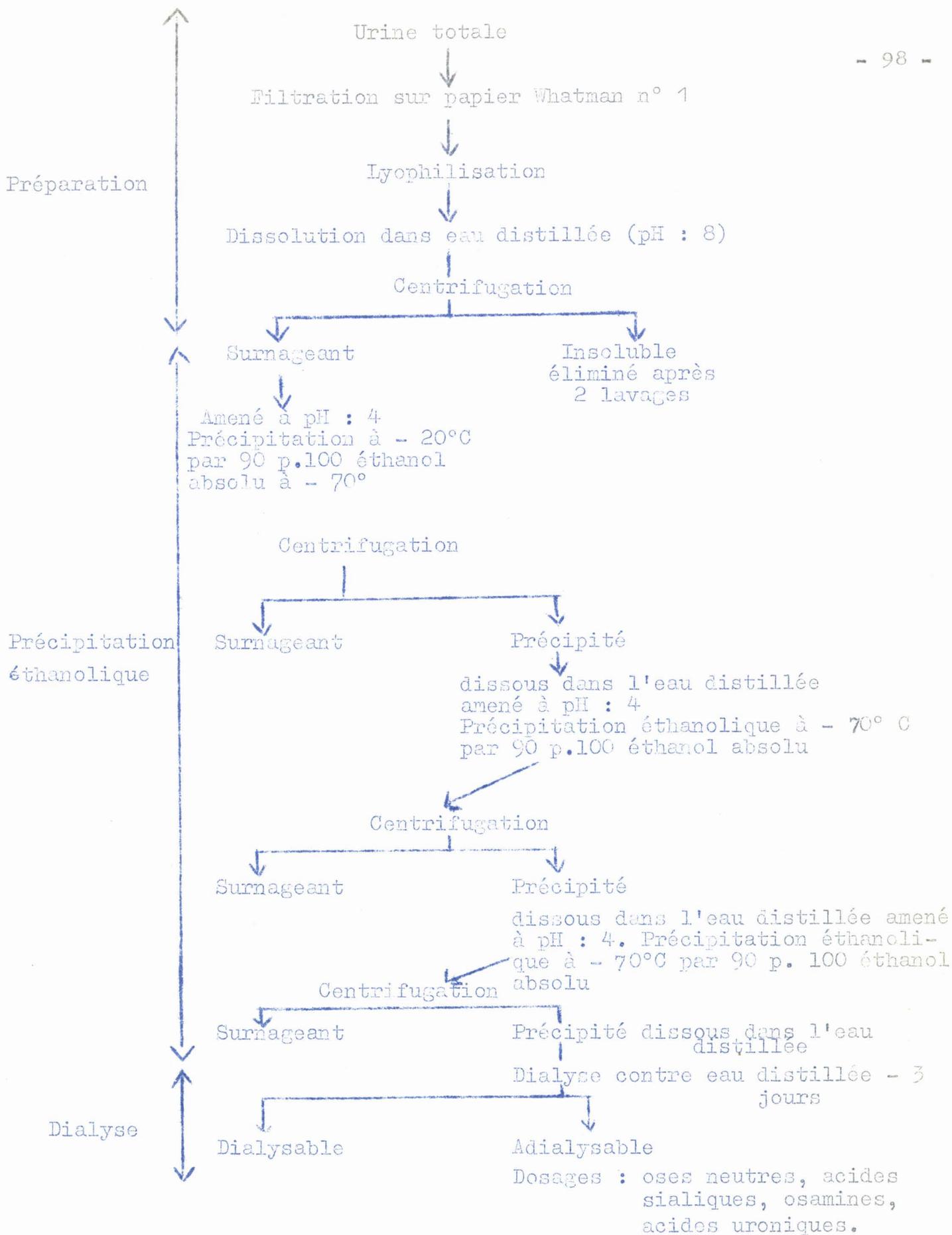


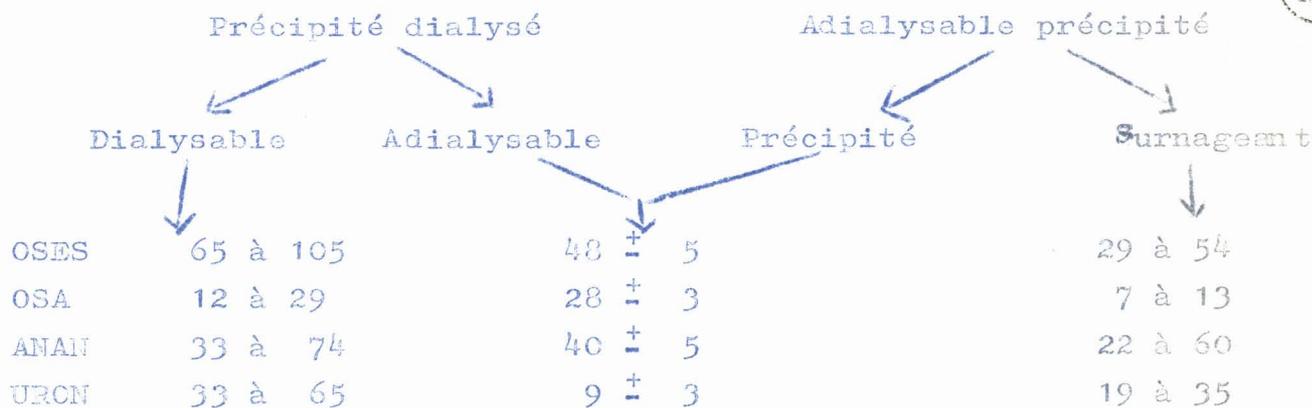
Figure 9

Schéma du protocole expérimental utilisé pour l'isolement des glycoprotides urinaires.

TABLEAU XXIX

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

	Procédé I	Procédé II
	Précipitation par l'éthanol (90 p. 100)	Adialysable
OSSES	115 à 160	70 à 117
OSA	35 à 60	31 à 46
ANAN	68 à 119	55 à 102
URON	43 à 74	25 à 49



OSSES/OSA 1,7 ± 0,1  
OSSES/ANAN 1,24 ± 0,06  
OSSES/URON 7 ± 3

## 2. DEUXIEME PROCEDE

Ce procédé constitue la contre-expérience du premier.

L'urine est d'abord dialysée. Puis la fraction dialysable (dont on garde une partie aliquote) après lyophilisation, est précipitée par l'éthanol dans les mêmes conditions que précédemment. On sépare le surnageant du précipité obtenu. Les dosages des glucides sont effectués sur les trois fractions: adialysable, précipité et surnageant. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXIX; (page 99.)

Par l'examen de ce tableau, on voit qu'en associant la précipitation à la dialyse ou la dialyse à la précipitation, la fraction macromoléculaire obtenue par les deux procédés présente des valeurs concordantes et d'une dispersion très réduite.

Ces résultats sont d'autant plus remarquables si on les compare à ceux obtenus par la dialyse seule ou la précipitation éthanolique seule. Non seulement les valeurs ne correspondent pas d'un procédé à l'autre, mais elles sont très dispersées. Par ailleurs, on peut remarquer la richesse en acides uroniques et en acides sialiques de la fraction alcool-soluble de l'adialysable, ce qui prouve bien que la dialyse seule n'est pas complète.

La même remarque est à faire en ce qui concerne la fraction dialysable du précipité éthanolique de l'urine. La précipitation seule entraîne donc dans le précipité des polysides alcool-insolubles mais dialysables et qui ne font pas partie du matériel glycoprotéidique proprement dit.

Mais en associant précipitation et dialyse, la fraction macromoléculaire obtenue par les deux procédés présente des valeurs concordantes et d'une dispersion très réduite. On arrive en particulier à une valeur en oses totaux à peu près constante de 48 mg  $\pm$  5.

Malgré la valeur égale des deux procédés, nous avons opté préférentiellement pour la précipitation alcoolique suivie de la dialyse, pour des raisons d'ordre technique :

- La précipitation de l'urine brute est très aisée. Il n'en est pas de même de la fraction adialysable qui, déjà très purifiée, précipite plus difficilement.

- la dialyse du précipité fournit un volume de dialysable moins important que dans le cas de la dialyse de l'urine totale. Il est donc plus commode de travailler avec des volumes de liquide relativement faibles d'autant plus que ceux-ci doivent être concentrés avant d'être dosés.

#### B - TECHNIQUE DE PREPARATION DES URINES

L'urine est traitée comme nous l'avons décrit p. 96 .

Un volume de 500 ml d'urines 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. L'opération est répétée trois fois au total. Les différents surnageants sont recueillis et mélangés pour chaque fraction de 10 ml. Le précipité final, dissous dans 20 à 30 ml d'eau distillée est dialysé 3 jours contre 200 ml d'eau distillée maintenue à + 4° C et renouvelée chaque jour.

Les fractions dialysables sont réunies et ajoutées aux différents surnageants pour constituer le dialysable, que l'on concentre par évaporation sous vide à un volume de 100 ml. La solution ainsi obtenue est utilisée pour effectuer l'étude chimique et l'analyse chromatographique.

Une fraction de 10 ml diluée 10 fois est utilisée pour les dosages des oses "neutres", et des acides uroniques. Les osamines nécessitent une concentration au quart de la solution utilisée pour les oses et une purification préalable sur Dowex 50 X 8 ("mesh" 200 - 400) forme acide.

Quant aux acides sialiques, l'interférence avec les oses est telle qu'il n'est guère possible de les doser en "routine" : on obtient une coloration bleue. Il est donc nécessaire de les isoler du substrat avant de les doser.

La fraction non dialysable du précipité forme l'adialysable. Il est amené à un volume de 50 ml et la concentration en oses "neutres", osamines, acides sialiques et acides uroniques est déterminée sur la solution obtenue.

Nous avons schématisée le processus d'obtention des fractions dialysable et adialysable dans la figure 10 (p. 103.)

### CONCLUSIONS

Par l'élimination systématique d'un certain nombre d'erreurs due à l'emploi de la dialyse, seule et sans lavage des membranes de cellophane, ou de la précipitation éthanolique seule, et des dosages colorimétriques, nous possédons maintenant une méthode reproductible d'isolement et de dosage des glycoprotides urinaires.

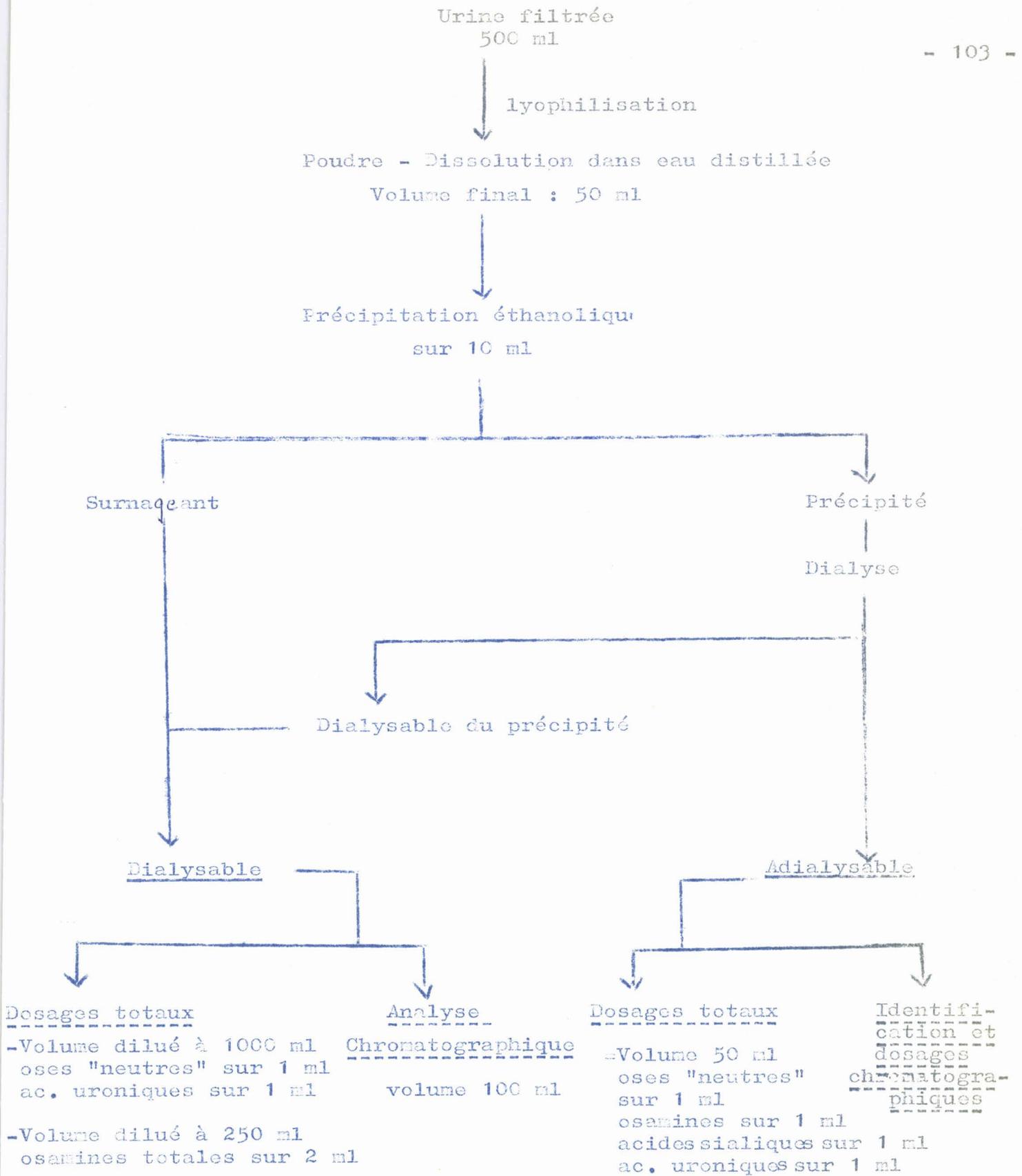


Figure 10

Schéma du protocole expérimental utilisé pour l'isolement, le dosage et l'identification des glucides libres et conjugués des urines.

Cette méthode a le double avantage de nous fournir séparément la fraction micromoléculaire des glucides ou fraction dialysable et la fraction macromoléculaire.

Ainsi, son application à l'étude des urines humaines, puis, dans un esprit de biologie comparée, à des urines de différents Mammifères nous a permis d'établir le bilan glucidique complet des urines.

Nous verrons donc successivement les résultats qu'elle nous a apportés dans l'étude :

- 1 - de la fraction dialysable.
- 2 - de la fraction adialysable.

2° ETUDE DE LA FRACTION DIALYSABLE

Cet exposé concerne l'analyse chimique quantitative et l'analyse chromatographique de la fraction dialysable des urines humaines et des urines de différents Mammifères que nous avons étudiées : le boeuf, le veau, le cheval, le mouton, le porc, le cobaye, le lapin et le rat.

I DOSAGE COLORIMETRIQUE DES GLUCIDES TOTAUX DES URINES DE MAMMIFERES

Nous avons dosé les oses "neutres" selon la méthode à l'orcinol de TILLMANS et PHILIPPI (386) décrite p. 195 et les acides uroniques selon la méthode au carbazole de DISCHE (387) décrite p. 197 .

Nos résultats sont exposés dans le tableau XXX (p. 106).

La teneur en oses totaux (oses et polysides) varie dans de larges limites quelque soit l'espèce. Ce résultat n'a rien de surprenant puisqu'il concerne essentiellement les oses et les oligosides (comme le saccharose et le lactose) qui prédominent dans la fraction dialysable et que leur présence - nous le verrons plus loin - est essentiellement liée à l'alimentation de l'animal.

La teneur en acides uroniques est généralement très élevée et dépasse même dans le cas du boeuf, du cheval, du mouton et du porc la teneur en oses totaux.

La nature des composés glucuroniques présents dans les urines n'a pas été précisée. Nous avons cependant caractérisé par chromatographie sur papier de l'acide glycuronique libre. Une autre fraction existe sous la forme de divers glucuronoconjugués, l'acide glucuronique étant un produit de détoxication de l'organisme.

Tableau XXX

Composition en glucides de la fraction dialysable des urines de différents Mammifères (en mg pour 1.000 ml d'urine).

Espèces	Oses "neutres"	Acides uroniques
Homme	593 (582 à 1.564)	442 (240 à 737)
Boeuf	1.235 (696 à 1.717)	1.646 (903 à 2.242)
Veau	324 (176 à 772)	196 (70 à 312)
Cheval	616 (279 à 872)	856 (447 à 1.144)
Mouton	547 (278 à 802)	667 (453 à 1.013)
Porc	814 (598 à 1.066)	1.234 (761 à 1.406)
Cobaye	410 (207 à 582)	279 (156 à 430)
Lapin	642 (340 à 1.092)	435 (215 à 751)
Rat	1.338 (841 à 2.415)	677 (318 à 1.005)



## II ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE \*

Nous avons appliqué les méthodes classiques d'analyse chromatographique des glucides à l'étude des oses et polyosides de la fraction dialysable des urines humaines et d'autres mammifères.

Cependant la chromatographie des sucres n'est pas applicable à l'analyse directe des urines à cause de la présence de nombreuses impuretés, l'acide urique en particulier, dont il est nécessaire de débarrasser au préalable les solutions glucidiques.

Nous exposerons d'abord très brièvement la méthode de purification que nous avons utilisée, les techniques de séparation chromatographique, les procédés de révélation et d'identification des glucides urinaires employés puis les résultats obtenus.

### A - PURIFICATION DES SOLUTIONS GLUCIDIQUES ET CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

#### 1. PRINCIPE :

La séparation chromatographique des oses pour être nette doit être effectuée sur des solutions purifiées. En effet, la présence d'ions minéraux provoque des "trainées" qui rendent difficile et même impossible la lecture des chromatogrammes. Il convient donc d'en débarrasser les solutions glucidiques.

\* Ces travaux ont été effectués en collaboration avec M. G. STRECKER.

Cette déminéralisation est réalisée par le passage successif sur des colonnes de résine à échange de cations (Dowex 50 X 8, "mesh" 25 ; 50 forme acide) puis d'anions (Duolite A - 102 D, "mesh" 25 - 50, forme formiate) MONTREUIL et BOULANGER (388).

## 2. MODE OPERATOIRE :

La fraction dialysable des urines correspondant à 100 ml d'urine brute est, nous l'avons vu, concentrée à 100 ml. En effet, l'urée est fixée d'une façon satisfaisante par les échangeurs d'ions à condition que les dialysats soient ramenés à un faible volume. La solution est alors purifiée par un passage successif sur le Dowex 50 X 8 (2 X 30 cm) puis sur la Duolite A - 102 D (2 X 30 cm). Le liquide effluent auquel on ajoute 50 à 100 ml d'eau de lavage des échangeurs d'ions est recueilli et évaporé à siccité.

Le résidu est repris par 1 ml d'eau distillée. Les substances insolubles sont éliminées par centrifugation et 10 à 30  $\mu$ l de la solution surnageante sont soumis à l'analyse chromatographique sur papier dans le système solvant de PARTRIDGE (389).

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

en papier Whatman n° 3 pendant 48 h

La révélation est effectuée à l'aide des réactifs suivants :

- urée chlorhydrique de DEDONDER (390)  
pour les cétooses
- orcinol de KIEVSTRAND et NORDAL (391)  
pour les cétoheptoses et cétohexoses.

## B -- RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. URINE HUMAINE :

L'application des méthodes d'analyse chromatographique sur papier et des techniques de révélation spécifiques des glucides que nous venons de citer, nous a permis de caractériser de très nombreux monosaccharides, oligosides et polyosides.

## c. Les polyosides

Nous ne nous sommes pas penchée sur l'étude de ces substances qui ont fait l'objet de travaux approfondis par STRECKER (392). La liste des polyosides identifiés a été établie au tableau 1 p. 9 . Nous en avons seulement montré l'existence en chromatographiant (figure 11, p. 110) les éluions par différentes concentration d'éthanol d'une colonne de charbon sur laquelle était passé un dialysable.

Ces composés sont néanmoins très importants puisque pour la plupart ils sont des produits du métabolisme de l'individu. En effet si certains sont alimentaires (lactose, maltose, saccharose, Ara  $\leftrightarrow$  Ara, Glc  $\leftrightarrow$  Ara, Xyl  $\leftrightarrow$  Glc, Xyl  $\leftrightarrow$  Xyl) Les autres sont d'origine glycoprotéinique car ils renferment en proportions variables du galactose, du mannose, du fucose, de la glucosamine, de la galactosamine et de l'acide sialique -

Par ailleurs, si on soumet des individus à divers régimes alimentaires ( surcharges glucidique ou protéidique régime végétarien et même régime de jeûne glucidique : eau et viande rouge pendant 3 jours) on ne constate aucun changement dans les osides d'origine glycoprotéiniques. Par contre ces mêmes osides varient qualitativement et quantitativement d'un individu à l'autre. Ces variations sont en particulier tion des groupes sanguins des individus. Cependant une certaine hétérogénéité est observée à l'intérieur du même groupe sanguin et d'autre part la composition en oses de ces osides ne correspond à aucune structure actuellement caractérisée chez antigènes de groupes sanguins ou tissulaires. Leur origine donc encore un problème. Par leur composition, ils pourraient se rattacher à certains gangliosides tissulaires ou à un groupe de glycolipide inconnu.

Néanmoins tous ces problèmes dépassent le cadre de ce travail et ne peuvent y être exposés en détail.

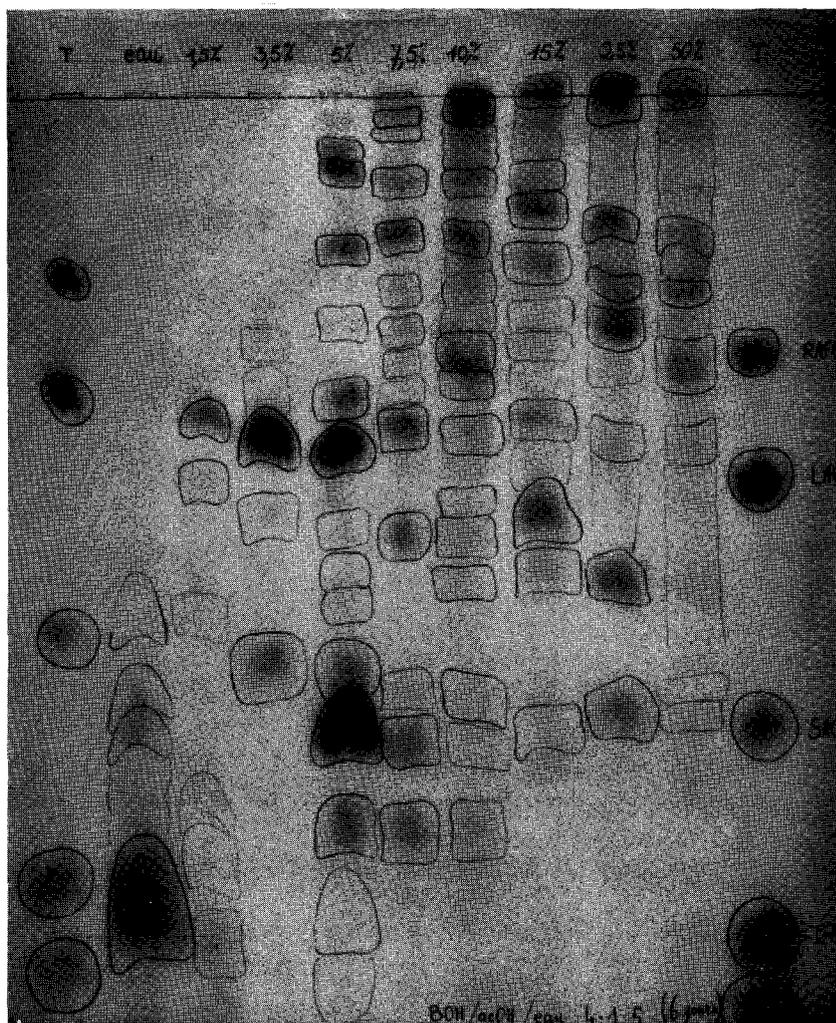


Figure 11

Chromatographie des polyosides de la fraction dialysable des urines humaines (élution par différentes concentrations en éthanol d'une colonne de charbon)

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

Papier Whatman n°3. Durée de la chromatographie : 6 jours.

Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

b- Les monosaccharides

Reprenant les travaux de MONTREUIL et BOULANGER (393) sur les oses neutres, nous avons achevé avec STRECKER (394) l'identification des oses "neutres" de la fraction dialysable. Nous en avons établi la liste dans le tableau XXXI ; (p 112) avec leur taux d'élimination journalière. Nous avons pu mettre en évidence tant par chromatographie, que par des critères physicochimiques, la présence de 6 aldoses et de 8 cétooses parmi lesquels figure le D (+) allulose STRECKER, GOUBERT et MONTREUIL (395) (Figures 12, 13, et 14 ; p. 113).

Certains de ces oses avaient déjà été mis en évidence dans l'urine. Comme nous l'avons déjà signalé, FURBERMAN et ROE (396) avaient isolé et caractérisé le ribulose et le D-xylulose, WHITE et HESS (397) par chromatographie bidimensionnelle sur papier ont montré qu'il existait 8 glucides qui fournissaient avec le réactif à l'orcinol les colorations spécifiques des cétooses. Parmi eux, les auteurs notaient la présence de deux substances inconnues qui correspondent aux glucides que nous avons isolés sous les dénominations de  $\beta$ -cétofructose et d'allulose.

Quant à MONTREUIL et BOULANGER (398), ils signalaient outre la présence de galactose, glucose, mannose, fucose, xylose et arabinose la présence d'un cétoose inconnu et qui a été identifié au D -allulose.

c- Origine des glucides urinaires :

La présence de certains oses dans l'urine humaine comme l'allulose posait des problèmes. Nous nous sommes penchés sur la question de l'origine des oses urinaires.

TABLEAU XXXI

Elimination journalière des monosaccharides des urines humaines d'après STRECKER (399)

	Elimination journalière
<u>ALDOSES</u>	
D - galactose	5 à 10 mg
D - glucose	10 à 50 mg
D - mannose	5 à 10 mg
L - fucose	5 à 10 mg
D - xylose	10 à 30 mg
L - arabinose	10 à 30 mg
<u>CETOSSES</u>	
L - xylulose	1,5 à 8 mg
ribulose	1,5 à 8 mg
D - allulose	15 à 30 mg
D - fructose	7 à 30 mg
3 - céto-fructose	< 10 mg
allo - heptulose	< 5 mg
D - manno-heptulose	5 à 10 mg
D - altro-heptulose (or sédoheptulose)	7 à 15 mg



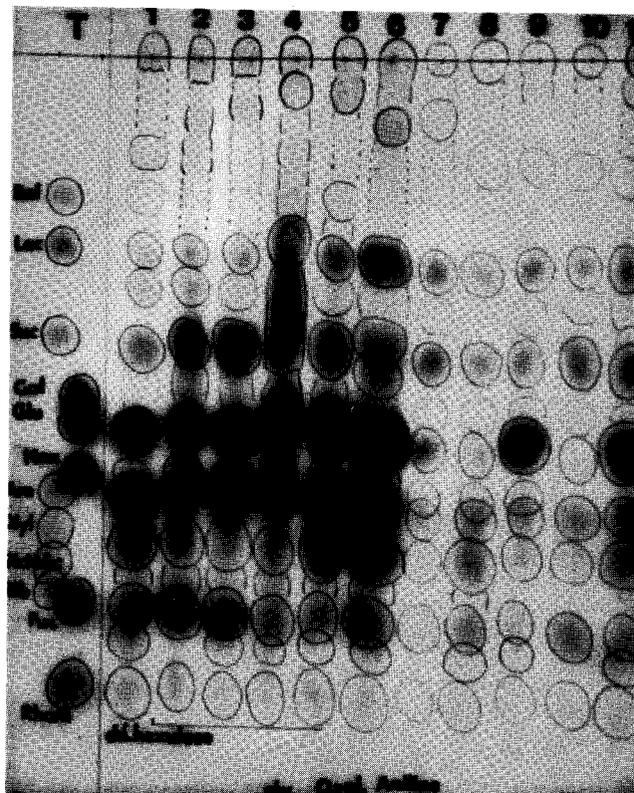


Figure 12

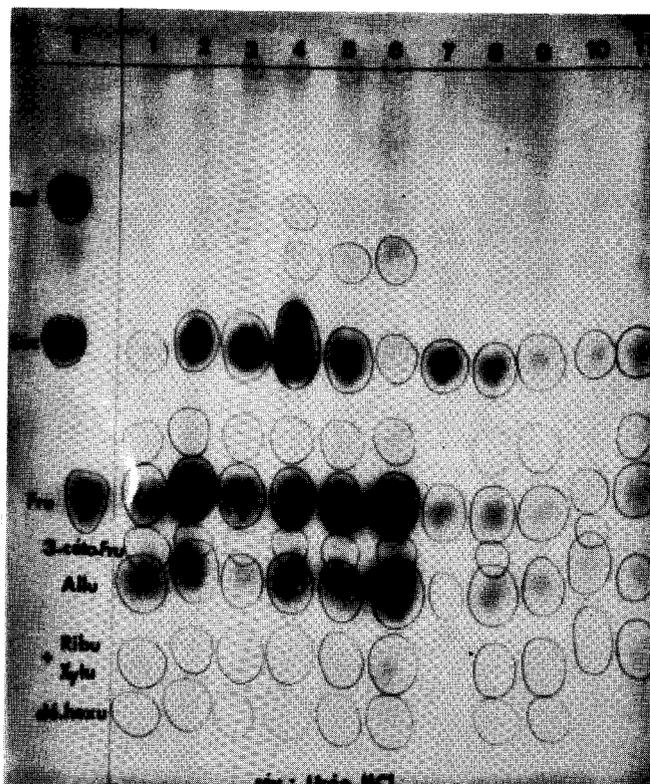


Figure 13

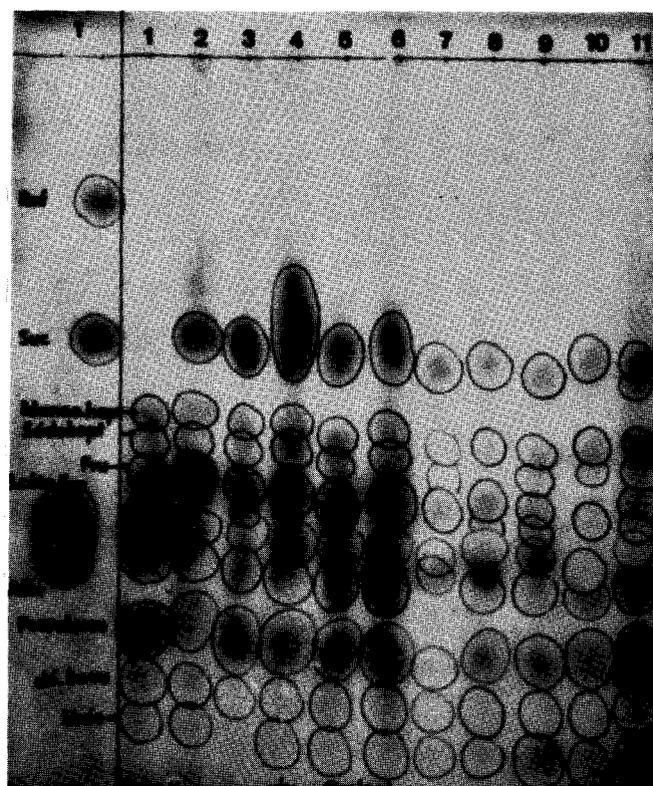


Figure 14

Figures 12 - 13 et 14

Chromatographie des oses "neutres" de la fraction dialysable des urines humaines.

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

Papier Whatman n°3. Durée de la chromatographie : 48 heures.

Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline ( figure 12 ), par le réactif à l'urée chlorhydrique ( figure 13 ) et par le réactif à l'orcinol (figure 14).

Pour cela nous avons soumis des individus sains à divers régimes alimentaires :

- 1 - un régime de surcharge glucidique
- 2 - un régime de carence glucidique avec alimentation protidique (viandes et oeufs)
- 3 - un régime végétarien (végétaux exclusivement)

Nous avons pu ainsi distinguer trois catégories de glucides (figures 15 et 16 ; p. 115).

- 1 - Certains ne disparaissent jamais de l'urine et restent constants : ils sont donc d'origine métabolique. Il s'agit d'une part du galactose, mannose et fucose liés au métabolisme des glycoprotéines et d'autre part du ribulose, xylulose et sédoheptulose liés au métabolisme des glucides libres.
- 2 - suivant les régimes alimentaires par contre, d'autres disparaissent ou augmentent : le glucose, l'allulose, le mannoheptulose, le saccharose et le  $\beta$  céto-fructose parmi les cétooses. On peut donc en déduire qu'ils ont une origine alimentaire.
- 3 - quelques uns enfin subsistent tout en subissant des variations. Il s'agit de l'arabinose, du xylose, du fructose, de l'alloheptulose. Ils auraient donc une double origine, métabolique et alimentaire.

## 2. URINES DE MAMMIFERES :

Nous avons fait la même étude sur les urines d'animaux courants, tels que le boeuf, le veau, le cheval, le mouton, le porc, puis le cobaye, le lapin, et le rat.

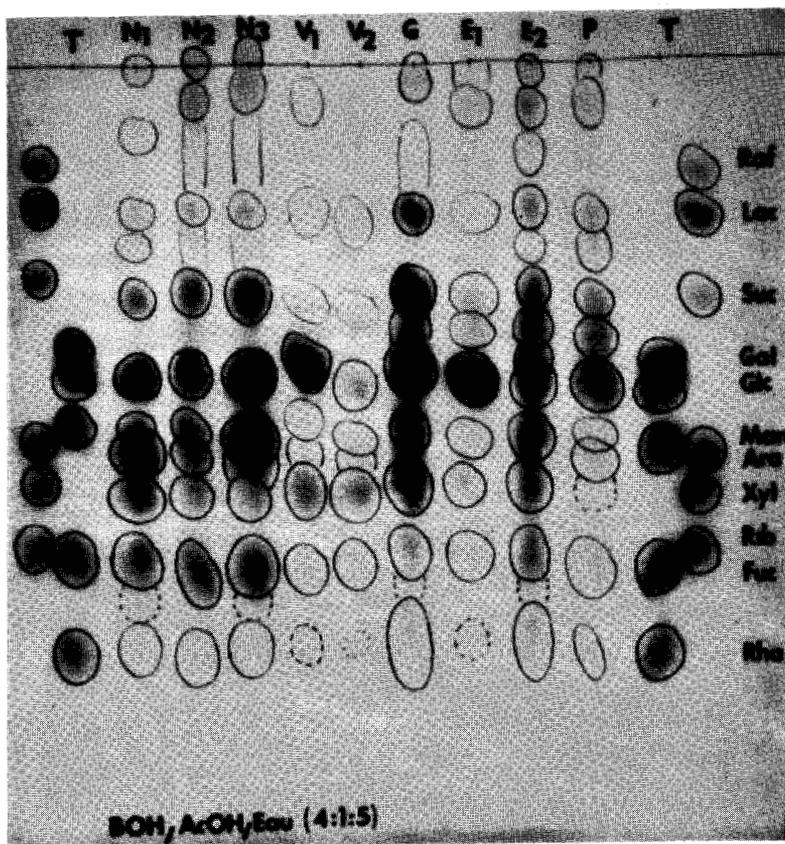


Figure 15

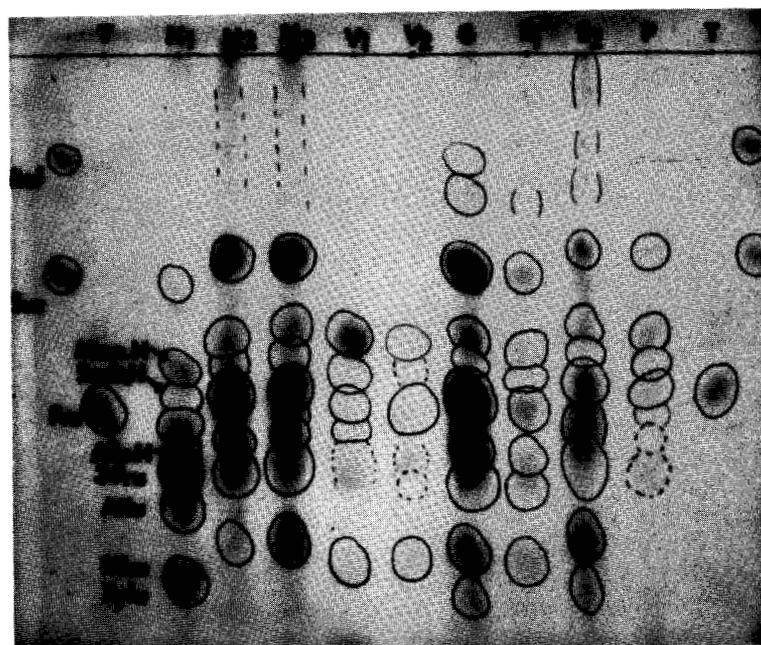


Figure 16

Figures 15 et 16

Chromatographie de la fraction adialysable des urines d'individus sains soumis à divers régimes alimentaires.

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

Papier Whatman n°3 . Durée de la chromatographie : 48 heures.

Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline ( figure 15 ) et par le réactif à l'urée chlorhydrique ( figure 16 ).

N<sub>1</sub> , N<sub>2</sub> , N<sub>3</sub> :urines normales. V<sub>1</sub> , V<sub>2</sub>: urines de sujets soumis à un régime végétarien  
G : urine d'un sujet soumis à une surcharge glucidique . E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> :urines de sujets soumis à un effort physique important. P : urine d'un sujet soumis à une surcharge protidique.



Les résultats obtenus sont illustrés par les figures 17 et 18 ; p. 117).

Le résultat le plus intéressant concerne la remarquable identité de composition en glucides des urines qui permet d'envisager l'existence de métabolismes communs aux différentes espèces de Mammifères. En effet, les monosaccharides des urines de Mammifères cités précédemment sont les mêmes que ceux qui ont été identifiés dans les urines humaines, (voir tableau XXXI ; p. 112 ). Cependant de petites différences existent : l'urine des principaux Mammifères ne renferme pratiquement pas de 3 - céto-fructose ni d'allulose, cétooses qui n'ont été mis en évidence que chez le cobaye et le rat, animaux de laboratoire recevant une nourriture glucidique préalablement traitée.

Ces observations confirment que le 3 - cétofructose et l'allulose ne préexistent pas dans l'alimentation mais qu'ils se forment en réalité durant la cuisson des aliments renfermant du glucose ou du fructose - ce qui explique leur présence dans les urines humaines.

### CONCLUSIONS

Cette étude nous montre que toutes les urines de Mammifères y compris celle de l'homme renferme des oses, des polysides et de l'acide uronique à raison de 1,5 g par litre.

Par ailleurs la nature des glucides est la même quelle que soit l'espèce. La physiologie des oses et oligosides présente donc une grande unité d'une espèce à l'autre.

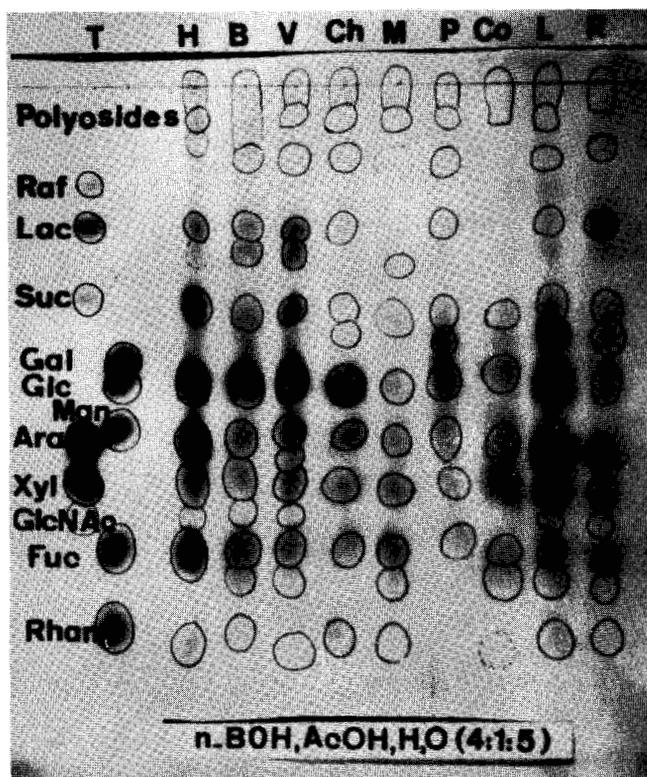
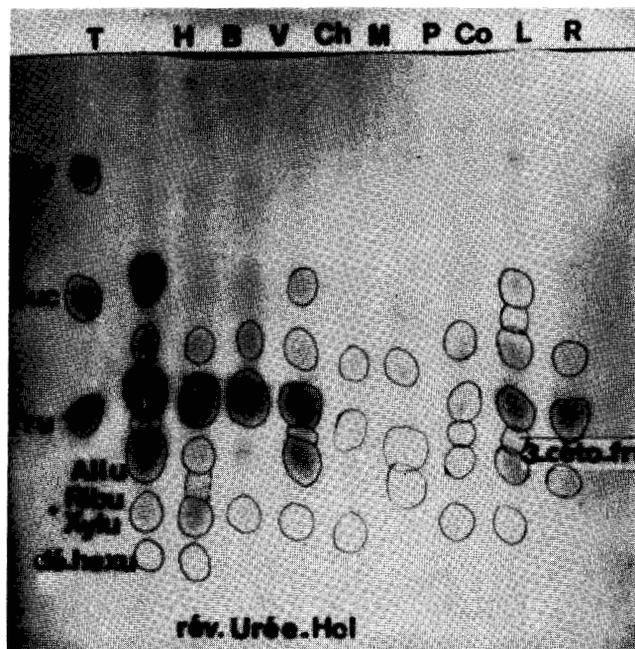


Figure 17

Figure 18



Figures 17 et 18

Chromatographie de la fraction dialysable des urines de différents Mammifères.  
 Système solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 /1/5)  
 Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline ( figure 17 )  
 Révélation par le réactif à l'urée chlorhydrique ( figure 18 )



H : homme; B : boeuf; V: veau; Ch : cheval; M : mouton; P: porc; Co : cobaye;  
 L : lapin; R : rat.

3° ETUDE DE LA FRACTION ADIALYSABLE

Cette étude revêt deux aspects. En effet, avant d'analyser la composition quantitative et qualitative des glucides glycoprotidiques des urines humaines et des urines de Mammifères, il nous a paru nécessaire de fractionner ces préparations dans le double but : 1) de parvenir à isoler des nouveaux composés et 2) d'acquérir quelques précisions sur la nature des substances qui constituent le substrat dont nous avons décrit précédemment les modalités de préparation.

Ces recherches ont donc fait l'objet des deux chapitres suivants :

- le fractionnement du substrat glycoprotidique
- applications au dosage et à la composition molaire des urines humaines et de Mammifères

I - FRACTIONNEMENT DU SUBSTRAT GLYCOPROTIDIQUE

Quatre méthodes ont été appliquées que nous allons décrire ainsi que les résultats qu'elles nous ont apportées :

- 1 - fractionnement par chromatographie sur Dowex 1 X 4
- 2 - fractionnement par l'éthanol
- 3 - fractionnement par le sulfate d'ammonium
- 4 - fractionnement par gel filtration sur Séphadex G 50.

I FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX 1 X 4\*

Nous avons utilisé une résine échangeuse d'anions : le Dowex 1 X 4, "mesh" 200 - 400, forme formiate.

\* Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Mademoiselle SPIK et Madame F. VAILLANT - DELACROIX.

## A - MATERIEL ET METHODES

### 1° Préparation de la colonne

Après activation de la résine par le procédé de COHN (400) la forme formiate de la résine est obtenue par les passages successifs de soude 3 N, d'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre, puis d'acide formique concentré, enfin d'eau distillée jusqu'à ce que le pH du liquide effluent ne soit plus acide.

La résine ainsi traitée est prête à être introduite dans la colonne (100 X 5 cm). Quand cette opération est terminée, la colonne est installée en chambre froide à + 4° C où se déroulent toutes les opérations ultérieures pour éviter les fermentations et la dénaturation des glycoprotides.

### 2° Fractionnement de l'"adialysable" urinaire

Une quantité de 1,3 à 1,6 g de la poudre obtenue par lyophilisation de l'adialysable (ce qui correspond à 10 l d'urine d'homme brute) est dissoute dans 20 ml d'eau distillée. La solution obtenue est amenée à pH 8,7 et déposée avec précautions au sommet de la colonne.

L'élution est réalisée successivement par :

- 1 l d'eau distillée, en une fraction unique désignée sous le nom de fraction neutre (FN)
- 5 l d'acide chlorhydrique 0,1 N recueillis par fractions de 20 ml par un collecteur automatique Technicon. Chaque tube est repéré en UV à 278 nm, et de cette façon on sépare les pics F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> et F<sub>7</sub> (voir figure 19 ; p. 120).
- 1,5 l d'acide chlorhydrique 3 N en une fraction unique pour décrocher de la résine les composés les plus acides. Cette fraction est désignée par l'abréviation F<sub>3N</sub>.

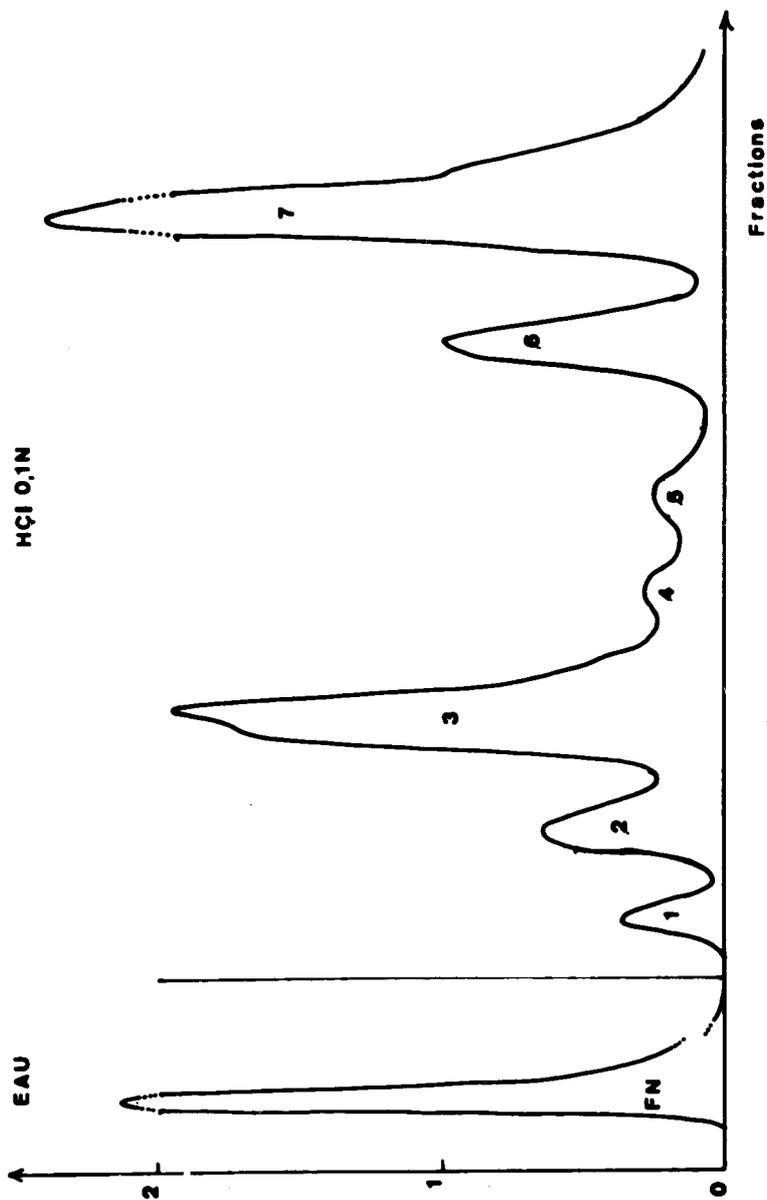


Figure 19

Courbe d'élution par l'acide chlorhydrique 0,1 N de l'adialysable urinaire . Chromatographie sur Dowex 1 x 4 ("mesh" 200 x 400, forme formiate ).



Les effluents chlorhydriques sont dialysés contre eau distillée et lyophilisée.

Toutes ces fractions sont ensuite analysées par voies chimique, électrophorétique et immunoélectrophorétique.

## B - RESULTATS

Nous examinerons successivement les compositions centésimale et molaire en glucides des différentes fractions, leurs analyses en électrophorèse puis en immuno-électrophorèse.

### 1° Composition centésimale :

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XXXII (p. 122). Les valeurs des pics P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub>, P<sub>6</sub> n'y figurent pas. En effet, P<sub>4</sub> et P<sub>5</sub> fournissent de très faibles quantités de produits et le pic P<sub>6</sub> a été identifié à l'acide uronique.

La plupart de ces fractions n'offrent pas de caractères très particuliers.

Le pic 7 est le plus important. Il est très riche en glucides totaux (60 p. 100), particulièrement en acide sialique et il renferme 2,5 p. 100 d'acides uroniques.

Ceux-ci sont surtout abondants dans la fraction F<sub>3N</sub>.

### 2° Composition molaire :

Nous avons rassemblé les résultats obtenus dans le tableau XXXIII (p. 123).

#### a - les oses neutres

Toutes les fractions contiennent du galactose, du glucose, du mannose et du fucose.

Seule la fraction F<sub>3N</sub> contient du xylose (il en existe aussi des traces dans la fraction P<sub>7</sub>) (voir figure 20 ; p. 124).

Tableau XXXII

Composition centésimale en glucides des fractions obtenues par chromatographie sur Dowex 1 X 4

fractions	Poids des fractions par l d'urine	glucides totaux	oses neutres	acides uroniques	acide sialique	osamines	oses neutres acide sialique	osamines	oses neutres acides uroniques
FIN	10 mg	43,16	22,56	traces	6,60	12,48	3,4	1,8	-
P <sub>1</sub>	4 mg	13,21	5,72	0,86	3,50	1,6	1,6	3,5	6,65
P <sub>2</sub>	8 mg	19,56	9,03	0,66	4,70	3,9	1,9	2,3	13,7
P <sub>3</sub>	15 mg	31,69	13,97	0,81	9,04	7,4	1,5	1,9	18,2
P <sub>7</sub>	20 mg	60,60	24,07	2,41	17,69	16,1	1,3	1,5	10
P <sub>3IN</sub>	15 mg	42,57	11,81	9,93	9,25	10,8	1,2	1,2	1,1



TABLEAU XXXIII

Composition molaire en glucides des fractions obtenues par chromatographie sur Dowex 1 X 4 (pour 10 résidus de galactose)

fractions	O s e s			N e u t r e s		O s a m i n e s			Acide Sialique	Acides Uroniques
	Gal*	Glc*	Man*	Fuc*	Xyl*	GlcNH2*	Gal NH2*	Glc NH2 Gal NH2		
FN	10	traces	5	7,5	-	10	2,51	4	3,5	traces
F1	10	-	6,6	3,3	-	8	2	4	5	2
F2	10	-	10	5	-	12	3	4	7	traces
F3	10	-	6,6	3,3	traces	8	3,5	2,3	8	traces
F7	10	-	6	1,6	traces	10	2,5	4	7	2
F3N	10	-	6	-	5	12	8	1,5	9	15



\* Gal = galactose, Glc = glucose, Man = mannose, Fuc = fucose, Xyl = xylose, Glc NH2 = glucosamine, Gal NH2 = galactosamine

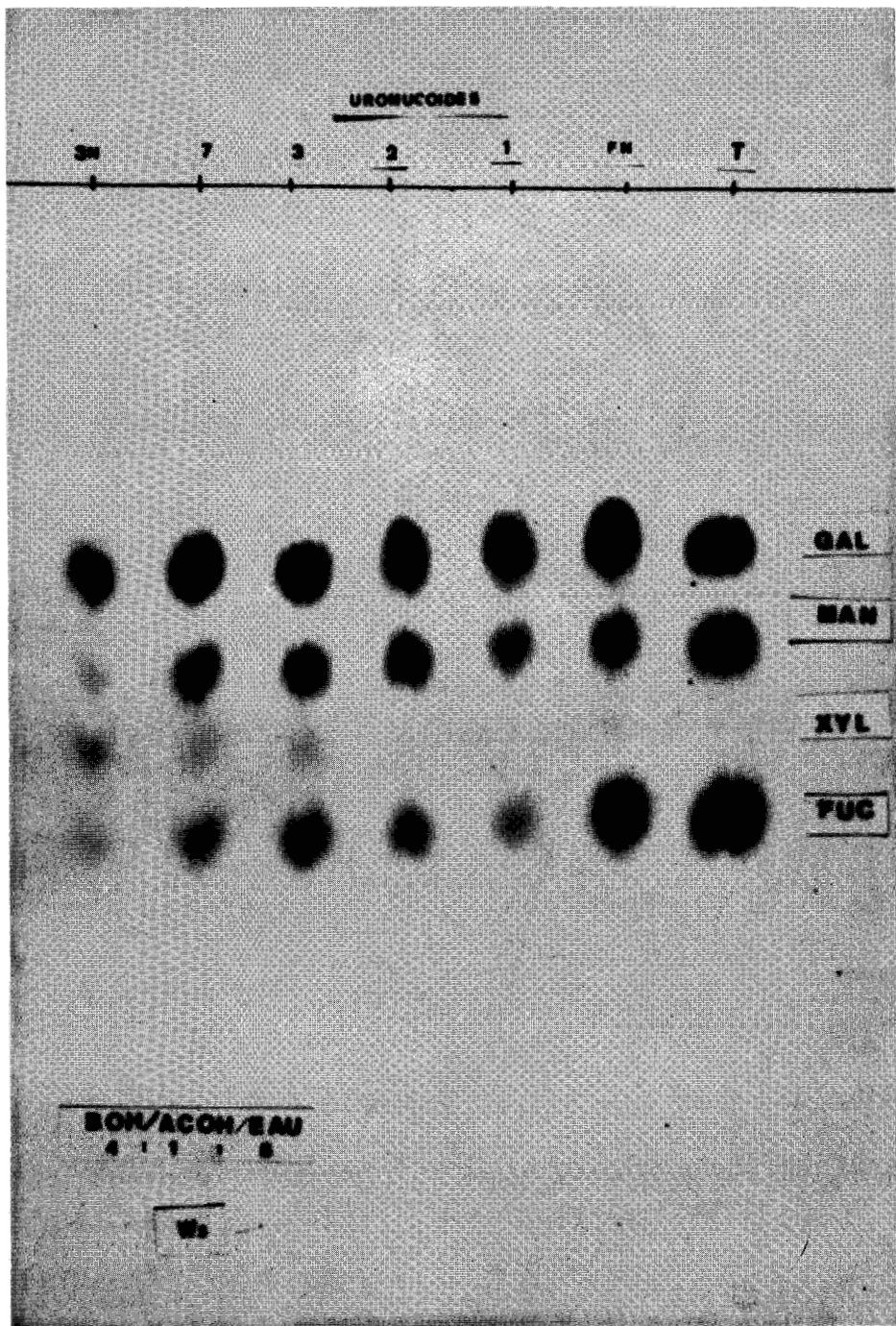


Figure 20

Chromatographie sur papier des oses "neutres" des hydrolysats des fractions obtenues par chromatographie sur Dowex 1 x 4 de l'adialysable urinaire.

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

Papier Whatman n°3. Durée de la chromatographie : 72 heures.

Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

T : témoin oses ; Gal. : galactose ; Man : mannose ; Xyl : xylose ;

Fuc : fucose.

b- Les osamines

Toutes les fractions contiennent des osamines qui ont été identifiées à la glucosamine, prédominante, et à la galactosamine.

c- L'acide sialique

L'acide N-acétyl - neuraminique est présent dans toutes les fractions, en proportions croissantes depuis la fraction FN jusqu'à la fraction F<sub>3N</sub>.

d- Les acides uroniques

La fraction 3N contient de l'acide iduronique identifié par électrophorèse en tampon borate.

3° Etude électrophorétique

Les deux fractions qui ont retenue notre attention sont les fractions P<sub>7</sub> et F<sub>3N</sub>, les autres étant très hétérogènes.

La fraction P<sub>7</sub>, en électrophorèse sur acétate de cellulose se sépare en 3 constituants protéidiques révélés par le réactif à l'amidoschwartz et en 6 constituants révélés par le réactif au bleu alcian. Il s'agit donc là soit de mucopolysaccharides acides soit de glycopeptides très acides.

La fraction F<sub>3N</sub>, est très intéressante car le bleu alcian révèle 3 bandes ayant le comportement de l'acide chondroïtine sulfurique A ou C (composé majeur), de l'acide chondroïtine sulfurique B et de l'acide hyaluronique. Trois autres bandes n'ont pas encore été identifiées.

4° Etude immuno-électrophorétique

La fraction P<sub>7</sub> a également retenu notre attention car elle révèle seulement l'existence de 5 constituants antigéniques.

C - CONCLUSIONS

L'étude précédente montre que deux fractions sont intéressantes : il s'agit du pic  $F_7$  et de la fraction  $F_{3N}$

1. La fraction  $F_{3N}$  nous a en effet apporté des renseignements précieux d'un triple point de vue :

- elle contient de l'acide iduronique, ce qui confirme l'existence dans les urines d'acide chondroïtine B.
- elle est acide et renferme une proportion élevée de mucopolysides.
- elle contient du xylose.

Ces deux derniers points sont étroitement liés et expliquent la présence du xylose dans les urines.

En effet, nos travaux sur la dialyse nous avaient montré que, malgré le lavage des membranes de cellophane qui éliminait entre autre le xylose qu'elles pouvaient contenir (voir p. 77) les adialysables urinaires continuaient à en renfermer.

Nous avons alors pensé que le xylose faisait bien partie des glycoprotéides et n'était pas un artefact. En effet, RODEN (401), (402), avait démontré que la séquence terminale des oses qui rattache les mucopolysides acides aux résidus de sérine de la fraction protidique est :



Par ailleurs deux séries d'expérience nous ont prouvé que le xylose urinaire était bien lié aux glycoprotéines.

1 - nous avons fait des injections de glucose marqué au  $^{14}\text{C}$  à des rats dont nous avons recueilli les urines. Celles-ci, après précipitation par l'éthanol et hydrolyse, ont été chromatographiées et les chromatogrammes ont été soumis à l'autoradiographie. A la révélation, nous avons pu voir que le xylose était radioactif (figure 21 ; p. 128) . Ceci nous prouve donc bien que le xylose est lié au métabolisme de l'organisme.

2 - nous venons de voir que la fraction  $F_{3N}$  obtenue au cours du fractionnement sur Dowex 1 X 4, après hydrolyse contient, outre de l'acide glycuronique et de la galactosamine, du galactose et du xylose. Ces résultats, liés au fait que cette fraction est acide et renferme des mucopolysides, sont bien en accord avec les travaux de ROSEN. Ils confirment que le xylose, loin d'être un artefact dû aux membranes de cellophane est bien d'origine mucopolysaccharidiques.

2. Quant à la fraction  $F_7$ , sa relative simplicité nous a incité à pousser plus loin son étude et à tenter de la sous-fractionner, espérant ainsi isoler les différents constituants qui la composent.

#### D - SOUS-FRACTIONNEMENT DU PIC 7

Nous avons tenté d'explorer la composition du Pic 7 de deux façons différentes :

- par chromatographie préparative
- par électrophorèse préparative

##### 1° Chromatographie préparative :

Différents supports ont été utilisés. Mais qu'il s'agisse de la gel filtration sur différents Séphadex (G.50, G.75, G.100 et G.200) ou de la chromatographie sur DEAE cellulose et ECTEOLA cellulose (méthode d'ANTONOPoulos et coll (403)), aucun résultat valable n'a été obtenu car les fractions séparées sont très hétérogènes aussi bien en analyse chimique qu'en immunoelectrophorèse.

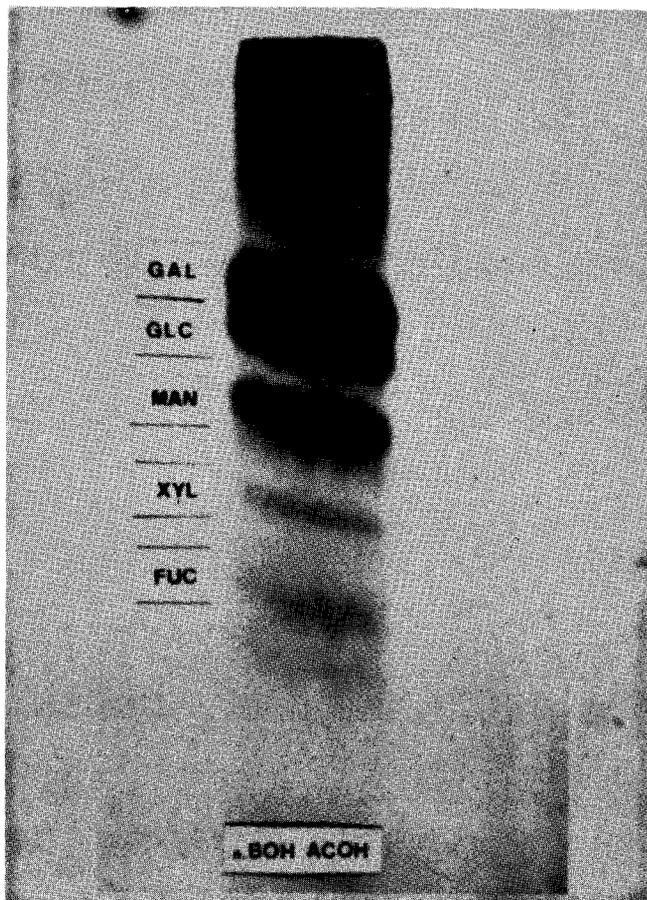


Figure 21

Autoradiographie de la chromatographie sur papier de l'hydrolysate d'adialysable d'urines de rat marquées au  $^{14}\text{C}$ .

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

Papier Whatman n°3 .Durée de la migration : 48 heures .

Durée du contact en autoradiographie / 1 mois.



Seule la chromatographie sur DEAE - Séphadex préconisée par ANDERSON (404) a donné quelques résultats. Elle a permis, en effet, d'isoler deux fractions intéressantes car :

- elles sont pondéralement importante (60 p. 100 de glycoprotides élués)
- elles ne contiennent pas d'acides uroniques, donc pas de mucopolysaccharides
- elles sont très riches en glucides et ne sont pas antigéniques
- elles ont la même composition en glucides que les glycoprotéides sériques

Il faudrait donc étudier leur composition en acides aminés et la nature du point d'attache du glycane avec la partie protidique. Ces travaux permettraient peut-être de préciser leur origine soit de glycoprotéines sériques (liaison asparagi-nyl - glucosamine) soit de glycoprotéines d'excrétion (liaison O-glycosidique).

Quant aux autres fractions obtenues, elles ne font que de montrer l'hétérogénéité du Pic 7. Il contient au moins 4 à 5 glycoprotides en plus des mucopolysaccharides acides.

## 2° Electrophorèse préparative en film liquide

Cette méthode a été réalisée avec l'appareil Elphor - Vap II. Elle ne nous a malheureusement donné aucun résultat exploitable car les fractions sont très mal individualisées et demeurent hétérogènes à l'immuno-électrophorèse.

## E - CONCLUSIONS GENERALES

La chromatographie sur Dowex 1 X 4 nous a donné peu de résultats satisfaisants.

Elle nous a néanmoins permis de résoudre définitivement la question du xylose urinaire en prouvant que sa présence était de nature mucopolysaccharidique.

Mais c'est là son intérêt principal car elle fournit des fractions très hétérogènes et même le Pic 7 qui nous semblait "exploitable" s'est révélé très complexe.

## 2 - FRACTIONNEMENT PAR L'ETHANOL

Dans la mise au point de notre méthode d'isolement des glycoprotides, nous avons utilisé un gradient discontinu de concentration en éthanol pour déterminer la concentration maximum à employer. Nous avons tenté d'appliquer à notre fraction glycoprotidique ce même procédé déjà décrit par BOURRILLON et coll (405) et MAC GALE et JEVONS (406).

### A - FRACTIONNEMENT

Nous sommes partie de la fraction glycoprotidique urinaire correspondant à 10 l d'urines brutes. Nous l'avons précipitée par un gradient discontinu de concentration en éthanol selon la figure 22 (p.131).

Chaque fraction obtenue est dialysée trois jours contre eau distillée puis lyophilisée.

"Adialysable" urinaire amené à pH 4 par HCl



éthanol (- 70°C)

Concentration en éthanol de 50 p. 100

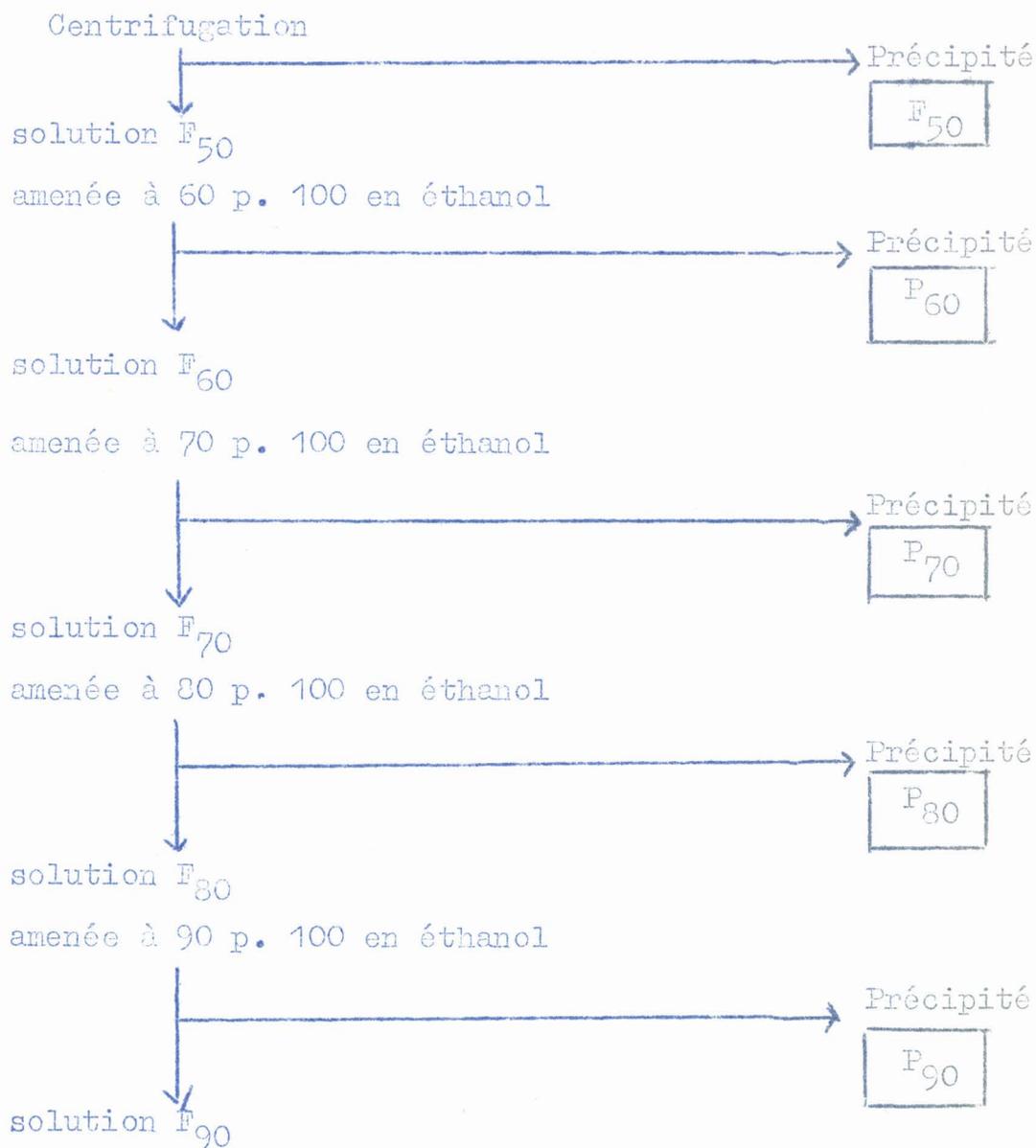


Figure 22

schéma du fractionnement de "l'adialysable" urinaire par l'éthanol.



## B - RESULTATS

La composition en glucides de toutes ces préparations a été déterminées par les méthodes décrites précédemment et les résultats sont réunis dans le tableau XXVI (p. 91). Une étude immunoelectrophorétique a également été faite sur chaque fraction (voir figure 8 ; p. 92).

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec G. SPIK et F. VAILLANT - DELACROIX.

Par examen de ces différents résultats nous voyons que toutes les préparations sont hétérogènes. Seule la fraction P<sub>90</sub> est plus simple puisqu'elle ne présente que 2 ou 3 arcs de précipitation.

Leur composition en glucides ne présente pas de caractère particulier sauf la fraction P<sub>90</sub> qui montre une teneur élevée en acides uroniques et en acide sialique.

Mais des essais de sous-fractionnement de cette fraction par chromatographie sur Dowex 1 X 4 se sont révélés décevants.

En effet, malgré son apparente simplicité en immunoelectrophorèse, elle renferme au moins 6 constituants glycoprotidiques.

## C - CONCLUSIONS

Le fractionnement éthanclique des glycoprotides urinaires ne nous a pas apporté de résultats nouveaux car les fractions obtenues sont trop hétérogènes.

Par contre il nous a montré que l'éthanol à 90 p 100 précipite à pH 4 la totalité des protéines urinaires. Ce procédé est donc une méthode de choix, nous l'avons vu dans le chapitre précédent, pour obtenir un bon matériel de départ pour l'étude des glycoprotides urinaires.

### 3 - FRACTIONNEMENT PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

Nous avons repris, pour l'appliquer aux urines, le fractionnement de MONTREUIL et al (407) au sulfate d'ammonium utilisé pour l'ovomucoïde.

Cette méthode permet l'isolement de fractions glyco-protidiques grâce à l'association d'un gradient discontinu de concentration en sulfate d'ammonium et de pH.

#### A - FRACTIONNEMENT

##### 1° Méthode

Le fractionnement a été effectué selon le mode opératoire schématisé dans la figure 23 (p. 134). On recueille ainsi 10 fractions : 9 précipités (de P<sub>1</sub> à P<sub>9</sub>) et un surnageant S<sub>9</sub>.

Toutes ces fractions sont dialysées contre eau distillée (de 3 jours à une semaine) et lyophilisées.

##### 2° Etudes des fractions

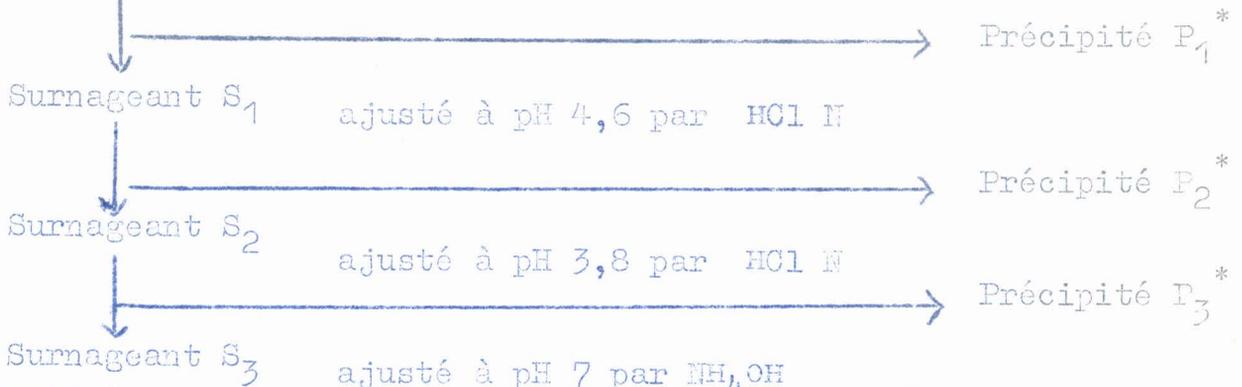
a- Chaque fraction a été étudiée en immunoelectrophorèse. Tous les précipités (P<sub>1</sub> à P<sub>9</sub>) se sont montrés très hétérogènes avec de nombreux arcs de précipitation. Au contraire le surnageant final S<sub>9</sub> ne donne qu'un seul arc de comportement  $\alpha_2$  avec le sérum de lapin anti-protéines urinaires (Figure 24 ; p. 135).

Ces recherches ont été effectuées en association avec G. SPIK et F. VAILLANT - DELACROIX.

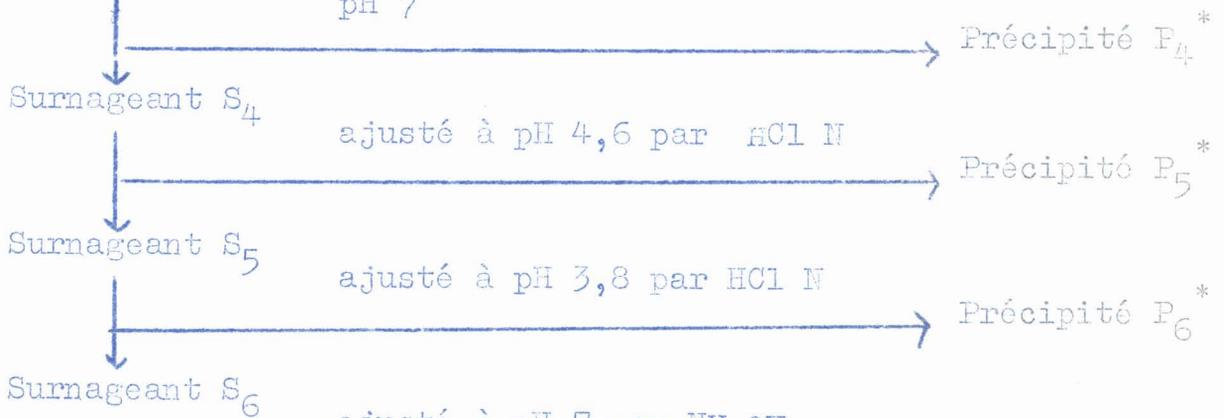
2 g Matériel de départ + 100 ml de Cl Na 0,15 M  
ajusté à pH 7  
+ 50 ml de solution  
aqueuse de sulfate d'ammonium  
saturé à pH 7

- 134 -

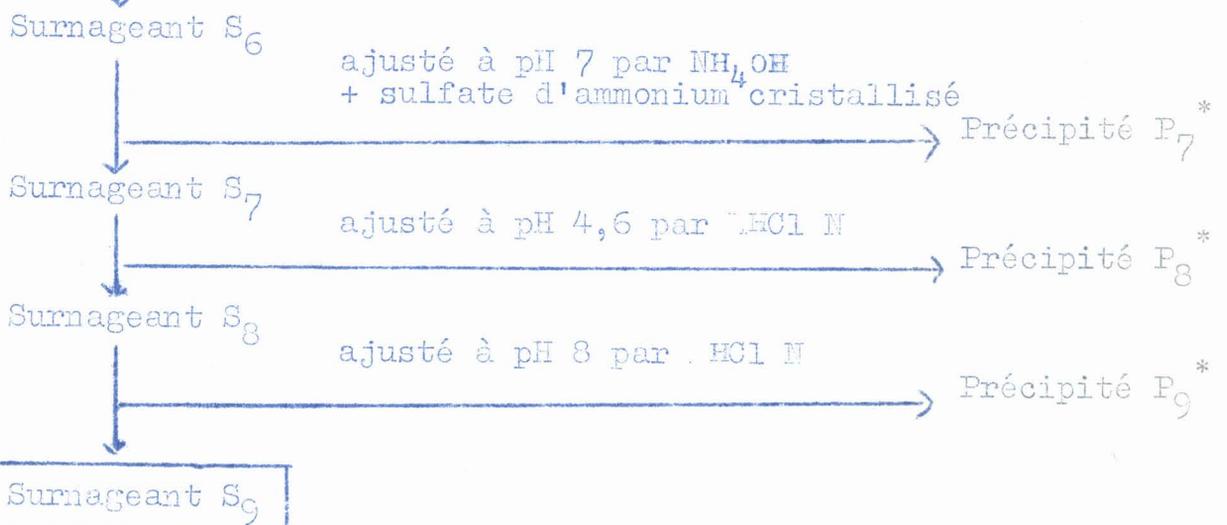
1/3 SATURATION



1/2 SATURATION



SATURATION  
COMPLETE



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

Figure 23

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

Composition centésimale en glucides  
de la fraction S<sub>9</sub>

glucides totaux	oses "neutres"	osamines	Acide sialique	Acide uronique	oses neutres	oses neutres	oses neutres
					Acide uronique	acide sialique	osamines
67,7	32,0	18,0	14,0	3,7	9	2,3	1,72

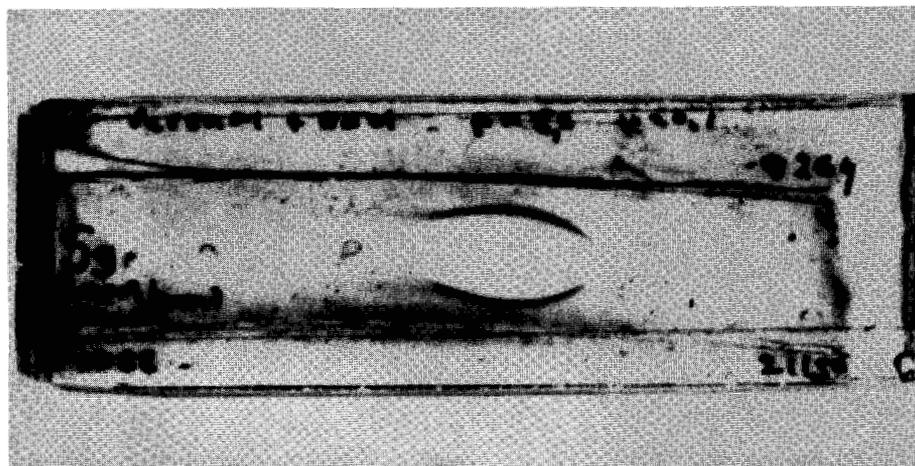


Figure 24

Immuno-électrophorèse de la fraction S<sub>9</sub> obtenue par relargage de l'"adialysable" urinaire par le sulfate d'ammonium.



b- C'est pourquoi nous avons poussé plus loin son analyse en étudiant sa composition centésimale en glucides. Les résultats ont été réunis dans le tableau XXXIV (p. 135). Ils nous montrent la richesse de cette fraction en glucides et particulièrement en acide sialique. La présence d'acide uronique en quantité non négligeable, a également attiré notre attention.

c- Nous avons donc soumis  $S_9$  à l'électrophorèse en acétate de cellulose à pH 3 en tampon pyridine/acide formique/eau (1 : 2 : 46). Elle nous a révélé la présence de trois bandes de vitesse analogue à l'acide hyaluronique et aux acides chondroitines A (ou C) et B (révélation au bleu alcian).

### 3° Conclusions

Le fractionnement par le sulfate d'ammonium fournit de nombreuses fractions, mais très hétérogènes sauf une : la fraction  $S_9$  que nous avons plus particulièrement étudiée. Devant son apparente simplicité, nous avons poursuivi l'étude de cette fraction en essayant de la sous-fractionner par des méthodes chromatographiques d'échangeurs d'anions

#### B - SOUS-FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPIQUE DE LA FRACTION $S_9$

La fraction  $S_9$  a été soumise à la chromatographie sur Dowex 1 X 4 ("mesh" 200 - 400 ; forme formiate) dans les mêmes conditions que celles décrites p. 118 et sur ESTEOLA-CELLULOSE (méthode d'ANTONOPoulos et al) (408).

La première méthode donne trois effluents différents, la deuxième en donne quatre. Toutes ces fractions sont soumises à l'analyse glucidique pour leur composition centésimale (tableau XXXV ; p. 137) à l'immunoélectrophorèse pour leur composition en mucopolysaccharides acides.

TABLEAU XXXV

Comparaison de la composition centésimale en glucides entre les fractions "eau" et "HCl" 0,02 N obtenues par chromatographie sur colonne d'Ectéola-cellulose et les fractions "eau" et "HCl 0,1 N" obtenues par chromatographie sur colonne de Dowex 1 X 4 de la fraction S<sub>9</sub>

	ECTEOLA - cellulose		Dowex 1 X 4	
	fraction eau	fraction HCl 0,02 N	fraction eau	fraction HCl 0,1 N
Oses "neutres"	28,16	28	31,5	30,6
Acide sialique	4,12	14,5	6,2	19,7
Osamines	16,40	17,1	31,5	17,1
Acides uroniques	0	0,2	0	0
<hr/> Oses	7	1,90	5	1,58
Acide sialique				
Oses	0,90	1,60	1	1,60
<hr/> Osamines				



Les différents résultats obtenus nous montrent que la fraction S<sub>9</sub> est hétérogène. Elle contient au moins trois constituants glycopeptidiques, outre les mucopolysaccharides acides qui sont élués de la Dowex 1 X 4 par l'HCl 3N. Ces différents procédés chromatographiques employés séparément permettent donc d'éliminer les mucopolysaccharides acides et d'obtenir deux fractions intéressantes dans chacun des cas, l'une pauvre en acide sialique (5 p. 100) l'autre riche (15 p. 100).

#### C - CONCLUSIONS

Le couplage de ces deux méthodes chromatographiques permettra peut-être dans l'avenir de mettre en évidence des entités physico-chimiquement bien définies.

#### 4 - FRACTIONNEMENT PAR GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G.50

Ce mode de fractionnement nous a été suggéré par la publication de travaux récents de VARADI, CIFONELLI et DORFMAN (409) sur les mucopolysaccharides acides de l'urine humaine. Nous l'avons appliqué à notre matériel de départ.

#### A - FRACTIONNEMENT

300 à 600 mg d'extrait urinaire sont passés sur une colonne de Séphadex G-50 (3 X 100 cm). Le déplacement des composés est effectué par passage d'une solution de chlorure de sodium 0,08 M - en fractions de 10 ml recueillies automatiquement sur un collecteur Technicon.

Chaque fraction est dosée pour déterminer sa composition en glucides totaux.

Ces travaux ont été effectués en association avec A. LOIEZ - HENNETTE.

## B - RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus peuvent se résumer de la façon suivante (voir tableau XXXVI ; p. 140).

1 - 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 dont l'un (pic A) coïncide avec le pic I et dont l'autre (pic B) se dissocie du pic II qui est plus rapide que ce dernier (figure 25 ; p. 141).

2 - L'étude de la composition du Pic I, qui coïncide avec le pic A, montre qu'il renferme une proportion de glucides assez 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.

L'analyse électrophorétique sur acétate de cellulose, montre la présence de mucopolysaccharides révélés par le bleu alcian.

3 - Le pic II renferme une proportion plus importante de glucides (50 p 100), il ne contient pas d'acides uroniques, donc pas de mucopolysaccharides acides. Sa nature est donc glycopeptidique.

4 - Le pic B ne contient pas d'osamines mais seulement des oses "neutres" et des acides uroniques. Mais aucun constituant n'étant révélé par le Bleu Alcian en électrophorèse, il ne doit pas s'agir de mucopolysaccharides acides.

Il renferme donc ou de l'acide glycuronique libre ou des glycuronoconjugués de faible masse moléculaire.

5 - Par ailleurs l'étude de la composition en oses des différents pics montre que les pics I et II sont constitués de galactose, de mannose et de fucose (voir figure 26 ; page 142). Ils sont donc bien de nature glycoprotéinique.

TABLEAU XXVI

Composition centésimale en glucides des fractions obtenues par chromatographie sur Séphadex G-50 des glycoprotéides urinaires.

	oses neutres	acide sialique	osamines	acide uronique	oses neutres acide sialique	oses neutres osamines	oses neutres acide uronique
1	10,1	13,1	3,6	3,6	0,77	2,8	3,6
2	16,4	13,7	12,9	16,4	1,2	1,3	1
3	18,4	14,9	9,8	18,4	1,2	1,9	1
4	4,6	0	traces	1,7	-	-	1,7

BUS  
LILLE

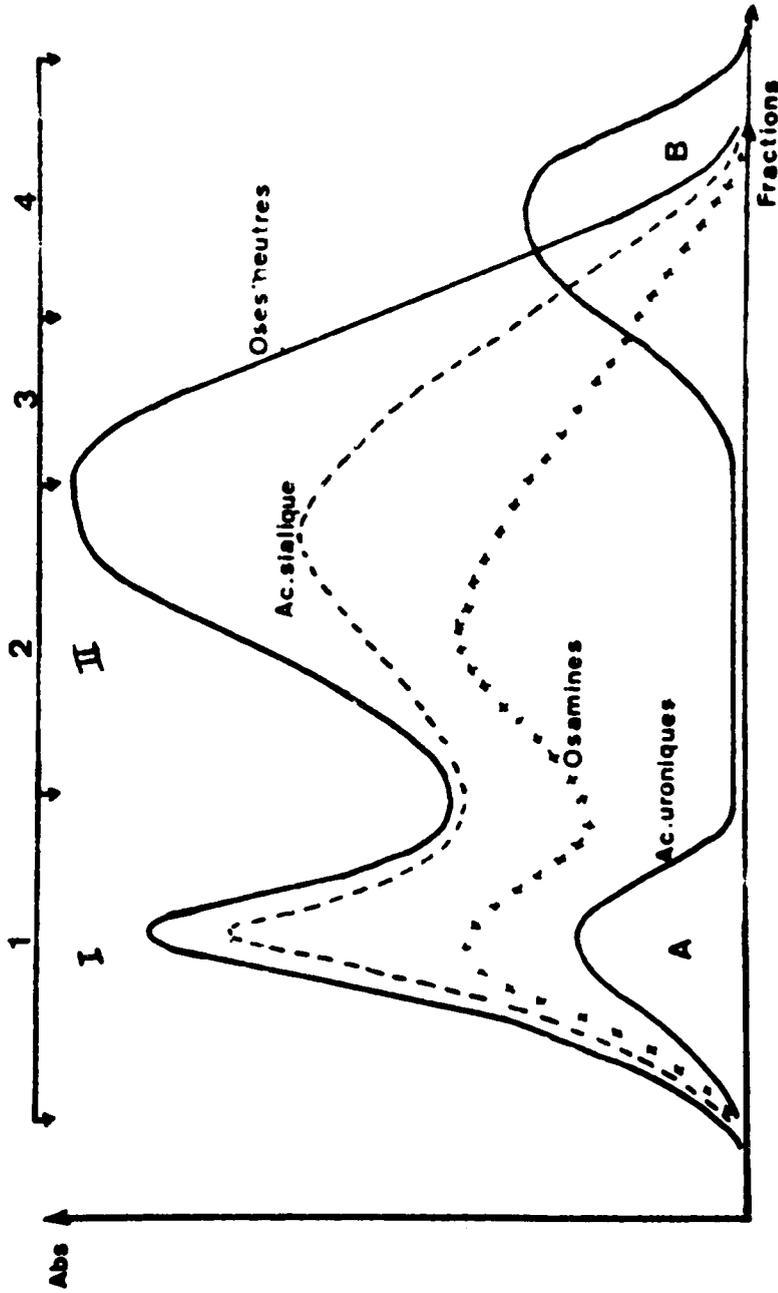


Figure 25

Courbes d'élution des glycoprotides urinaires au cours de la gel filtration sur Séphadex G - 50.

En abscisse : fractions obtenues

En ordonnée : absorbance des colorations données par les glucides.



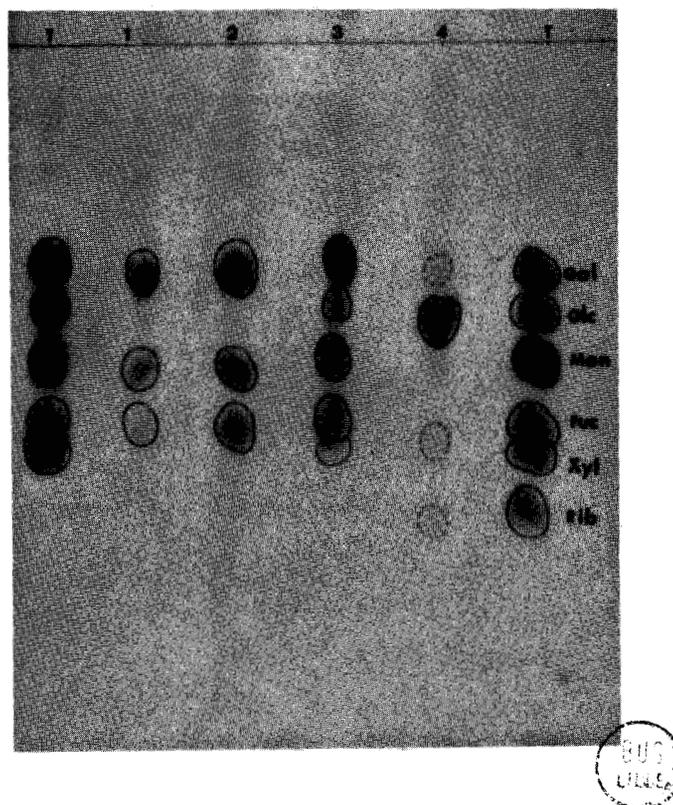


Figure 26

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques des fractions 1 à 4 désignées sur la figure 25.

Système solvant : pyridine/acide acétique/eau ( 1 : 2 : 2 ).

Papier Whatman n°1 . 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.

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

### C - CONCLUSIONS

Le fractionnement sur Séphadex, s'il ne nous a pas apporté d'entité pure, nous a apporté des renseignements très intéressants sur la composition de la préparation que nous avons mise au point pour doser les glycoprotéines urinaires.

1 - Le substrat de dosages est en fait un mélange de glycoprotéines et de glycopeptides, mais cette mise au point ne nous gêne nullement dans nos travaux de dosages car il s'agit de composés apparentés, dérivant probablement les uns des autres. Nous isolons donc les glycoprotides totaux de l'urine et non pas les glycoprotéines totales.

La nature glycoprotidique de notre fraction est encore confirmée par le fait que l'on trouve, à côté de proportions très importantes de galactose, mannose et fucose des quantités beaucoup plus faibles de glucose.

2 - Problème de la nature des acides uroniques de "l'adialysable" urinaire et du dosage des glycosaminoglycannes.

Le fractionnement sur Séphadex G-50 de l'adialysable urinaire a, de plus, permis de mettre un point final à la question restée en suspens, lors de la mise au point de notre méthode d'isolement des glycoprotides urinaires, de l'instabilité du taux des acides uroniques.

Nous avons pensé, en effet, que les acides uroniques adialysables étaient en totalité d'origine mucopolysaccharidique. Cette hypothèse nous paraissait fort séduisante car si elle s'avérait exacte, nous avons là une méthode de dosage des glycosaminoglycannes des urines.

Or, la quantité d'acides uroniques présente dans notre adialysable urinaire était bien supérieure aux quantités d'acides uroniques correspondant aux glycosaminoglycannes isolés par le bromure de cétyl triméthylammonium (ou Cétavlon) utilisé par DI FERRANTE (410) MAROTEAUX (411) et MEYER (412) (voir tableau XXXVII ; page 145).

Nous en avons déduit, surtout après l'étude critique de DI FERRANTE (413) sur sa propre méthode que le Cétavlon ne précipitait pas la totalité des mucopolysaccharides urinaires.

En effet la méthode au cétavlon de DI FERRANTE, appliquée à notre adialysable urinaire provoque une précipitation de 35 p. 100 environ des acides uroniques totaux, ce qui correspond aux valeurs du précipité de DI FERRANTE sur l'urine totale.

La fraction surnageante de ce précipité Cétavlon traitée par 9 volumes d'éthanol à - 70° C fournit un précipité renfermant une quantité d'acides uroniques adialysables au moins égale à celle contenue dans le précipité Cétavlon.

L'adialysable urinaire renferme donc à la fois des acides uroniques précipitables par le Cétavlon et des acides uroniques précipitables par l'éthanol mais pas par le Cétavlon.

Cette expérience nous avait suggéré l'existence de mucopolysaccharides acides sous deux formes :

- 1 - mucopolysaccharides liés à une séquence protidique précipitables par le Cétavlon et l'éthanol.
- 2 - mucopolysaccharides libres non précipitables par le Cétavlon.

Et c'est la méthode de fractionnement de gel filtration sur Séphadex G-50 qui nous a permis d'élucider le problème.

TABLEAU XXXVII

Excrétion des mucopolysaccharides acides de l'urine humaine d'après différents auteurs (exprimée en mg d'acide glucuronique)

Mode d'isolement	Auteurs	mg p.1	mg p.24 h
Précipitation par le Cétavlon	DI FERRANTE (414)	4,2 (1,2 à 6,9)	4,4 (1,7 à 6,8)
	MAROTEAUX (415)	2 à 2,5	-
	MEYER (416)	1,81 (0,94 à 2,44)	2 (1,1 à 2,6)
Précipitation par l'éthanol	"Adialysable" urinaire	9 (6 à 12 )	14 (11,9 à 16,5)



Pour cela nous avons soumis à la chromatographie

- un adialysable urinaire
- un précipité Cétavlon obtenu à partir de l'urine totale
- le surnageant du précipité Cétavlon après élimination des micromolécules par précipitation éthanolique.

### 1- Chromatographie de l'"adialysable" urinaire.

Nous avons vu précédemment qu'elle nous fournissait deux pics décelables en UV à 278 m $\mu$ , riches en acides uroniques et appelés A et B (figure 25 ; p. 144).

Le pic A traité par le Cétavlon donne un précipité qui renferme la totalité des acides uroniques du pic. En outre il contient des osamines (voir tableau XXXVIII ; p. 147) et l'analyse électrophorétique sur acétate de cellulose montre la présence de mucopolysaccharides révélés par le bleu alcian.

Le pic B, par contre, malgré sa richesse en acides uroniques, ne précipite pas par le Cétavlon, ne renferme pas d'osamines et ne donne aucune réaction avec le bleu alcian à l'électrophorèse sur acétate de cellulose.

### 2- Chromatographie du précipité Cétavlon.

Elle ne fournit qu'un seul pic détectable en UV à 278 m $\mu$ , correspondant au volume d'exclusion du gel et renfermant outre des oses "neutres" et des osamines, une quantité d'acides uroniques équivalente à celle du pic A de l'"adialysable" urinaire (voir tableau XXXVIII ; p. 147).

### 3 - Chromatographie du surnageant Cétavlon

Elle donne un diagramme de fractionnement comparable à celui de l'adialysable, avec deux pics A et B.

TABEAU XXXVIII

Composition centésimale des fractions obtenues par gel filtration sur Séphadex G-50 à partir des extraits urinaires préparés par précipitation éthanolique.

Fractions		oses "neutres"	acides uroniques	acide sialique	osamines
dialysable urinaire	pic A	10,88	3,43	10,19	4,11
	pic B	3,23	4,4	0	0
Précipité Cétavlon		4,7	3,1	7,0	6,5
Surnageant Cétavlon	pic A	14,25	0,6	12,1	4,36
	pic B	5,2	5,4	0	0



Mais le pic A est beaucoup moins important, il ne contient pas d'acides uroniques et le taux en osamines est très diminué (voir tableau XXXVIII ; p. 147).

Le pic B, par contre, a une composition équivalente : il renferme des acides uroniques mais pas d'osamines.

A titre comparatif, nous avons tracé les diagrammes d'élution des acides uroniques de l'adialysable, du précipité Cétavlon et du surnageant Cétavlon (figure 27 ; p. 149). En accord avec les résultats du tableau XXXVIII (p. 147), on voit que les acides uroniques précipités par le Cétavlon (correspondant donc aux mucopolysaccharides acides) sont retrouvés dans le pic A de l'adialysable urinaire. Quant au surnageant il ne contient que des acides micromoléculaire du pic B.

#### CONCLUSION

La chromatographie sur Séphadex G-50 nous a donc permis non seulement de confirmer la valeur, un instant contestée, de la méthode de précipitation des mucopolysaccharides acides par le Cétavlon de DI FERRANTE (417), mais aussi d'expliquer l'excès d'acides uroniques de l'adialysable urinaire.

A côté des acides uroniques mucopolysaccharidiques, qui existent en quantité constante, nous trouvons une quantité égale et même supérieure d'acides uroniques liés sous forme de glucuronoconjugués de nature micromoléculaire.

Ces derniers existent en quantité variable, ce qui nous donne les larges fluctuations rencontrées dans le dosage de ces composés.

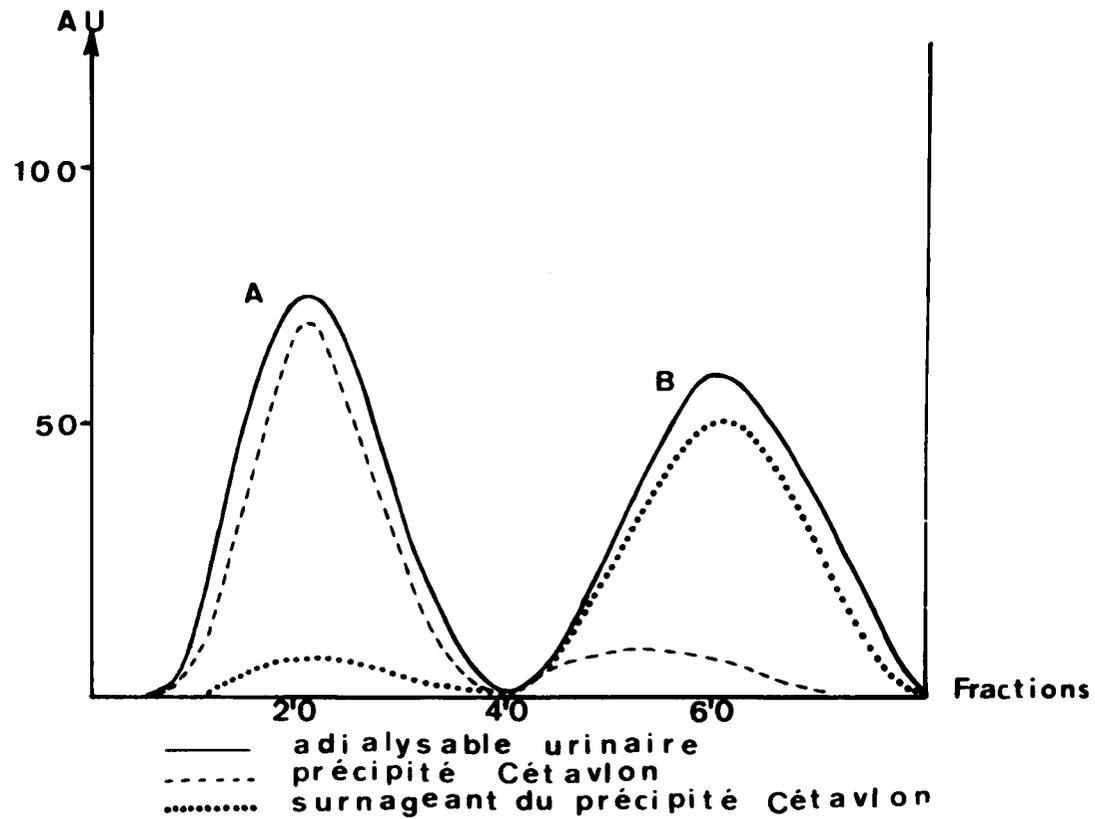


Figure 27

Comparaison des diagrammes d'acides uroniques obtenus avec l'adialysable urinaire du précipité alcoolique, le précipité Cétavlon et le surnageant du précipité Cétavlon.

En abscisse : absorbance des colorations données par les acides uroniques.

En ordonnée : quantité d'acides uroniques en  $\gamma$ /ml.



## 5 - CONCLUSIONS GENERALES

Par ces travaux exposés précédemment, nous avons vu comment a été mise au point une méthode reproductible de précipitation quantitative des "macromolécules" de l'urine. Ce matériel de départ a été soumis à diverses tentatives de fractionnement ; Elles ne nous ont pas donné de résultats bien satisfaisants en ce sens que nous ne sommes pas parvenue à isoler des entités pures comme nous l'espérions au départ.

1 - Ils nous ont permis d'isoler des fractions particulièrement riches en glucides et moins hétérogènes que les autres. Il s'agit du pic 7 obtenu par chromatographie sur Dowex 1 X 4, du précipité P<sub>90</sub> et du urnageant S<sub>9</sub> obtenus respectivement par le fractionnement à l'éthanol et au sulfate d'ammonium.

Les premières tentatives de sous-fractionnement de ces fractions nous laissent espérer que l'emploi combiné des procédés de fractionnement chromatographique et électrophorétique, nous donnera la possibilité d'identifier des entités glycoprotidiques bien définies dans les urines.

2 - La chromatographie sur Dowex 1 X 4 a permis d'apporter une solution définitive au problème du xylose urinaire. Il est d'origine mucopolysaccharidique, ce qui est en accord avec les travaux de RODEN. Il est donc bien rattaché au métabolisme des glycoprotéines.

3 - Enfin, la chromatographie sur Séphadex G-50 nous a fourni de précieuses précisions sur la composition de notre substrat de dosages. Il s'agit non pas uniquement de glycoprotéines urinaires mais d'un mélange de glycoprotéines et de glycopeptides, qui se sépare en deux fractions différentes au cours de la chromatographie.

Notre "adialysable" urinaire est donc de nature glycoprotidique.

Par ailleurs ce mode de fractionnement nous a appris que les acides uroniques que nous dosons ne sont pas seulement d'origine mucopolysaccharidique puisqu'une fraction importante (plus de 50 p. 100) est de nature micromoléculaire (pic B). C'est donc ce qui explique leur instabilité. De plus nous avons pu ainsi confirmer la valeur de la méthode d'isolement et de dosage des glycosaminoglycannes de DI FERRANTE (418).

Le grand intérêt de ces études de fractionnement a donc été de nous éclairer sur la nature des produits isolés par notre méthode de précipitation.

II APPLICATIONS AU DOSAGE ET A LA COMPOSITION MOLAIRE  
DES GLUCIDES GLYCOPROTIDIQUES DES URINES

Nous avons appliqué notre méthode reproductible d'isolement des glycoprotides urinaires à l'étude statistique des urines normales. En effet, nos propres résultats calculés en mg par litre d'urine présentaient, d'un individu à l'autre, une trop grande dispersion malgré toutes les améliorations apportées et exposées précédemment. Notre but était d'obtenir des résultats beaucoup plus constants qui puissent servir de point de comparaison dans l'étude des urines pathologiques. Nous avons donc pensé calculer le taux des glycoprotides des urines en  $\mu\text{g}$  par l'élimination par 24 heures.

Puis nous avons étudié l'influence que pourraient avoir des facteurs tels que le sexe, l'âge, l'alimentation et l'activité sur le taux des glycoprotides.

A cette étude de l'élimination quantitative des glycoprotides des urines de 24 h chez des individus sains, nous avons ajouté l'analyse chromatographique et la composition molaire des glucides glycoprotidiques isolés.

Enfin, dans un but de biologie comparée, nous avons également analysé quantitativement et qualitativement les glycoprotides des urines de différents Mammifères.

LES URINES HUMAINES

Cette fraction concerne, nous le rappelons, le précipité éthanolique dialysé (figure 10 ; p. 103).

I - DOSAGE DES GLUCIDES TOTAUX

A - ETUDE STATISTIQUE DES URINES NORMALES DE 24 HEURES

Pour les raisons exposées ci-dessus , nous avons étudié de façon statistique la composition en glucides glycoprotidiques des urines de 24 h. de sujets sains.

Pour réaliser ce travail, nous avons entrepris de doser les urines de 24 heures de 50 hommes et de 50 femmes âgés de 20 à 50 ans (c'est-à-dire à la période de plénitude physique). De cette façon nous avons pu étudier la constance de l'élimination des glycoprotides par 24 h.

Nous avons procédé de la façon suivante :

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

Toutes les urines sont recueillies sur un mélange de toluène - chloroforme et maintenues à 4° C.

Les oses "neutres" ont été dosés par la méthode colorimétrique à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPE (419) modifiée par REMINGTON (420) (voir p. 195) ; les acides uroniques par la méthode au carbazole sulfurique de DISCHE (421) (voir p. 197) en utilisant les formules de correction décrites p. 197 et p. 198 .

Les acides sialiques ont été dosés par la méthode colorimétrique à la diphenylamine de WERNER et ODIN (422) (voir p. 199), et les osamines par la méthode colorimétrique à la p. diméthylaminobenzaldéhyde d'ELSON et MORGAN (423), (voir page 200).

### 1 - RESULTATS

Nous avons rassemblé nos résultats dans les tableaux XXXIX (p. 155) et XL (p. 156), en calculant pour chaque lot de 50 urines les variations des valeurs moyennes des dosages et des écarts-type sur les cinq premiers cas, puis les dix premiers en allant ainsi jusqu'au cinquantième cas.

Leur examen nous montre que 1) la concentration des constituants glucidiques des glycoprotides urinaires est homogène quand on ramène les résultats à l'élimination par 24 h., surtout si l'on considère qu'il s'agit de substances biologiques.

L'élimination quotidienne des oses, de l'acide N-acétylneuraminique (ANAN), des osamines conjugués est assez régulière pour constituer une constante.

Hommes	: oses "neutres"	= 69,23	±	10,63	mg
	ANAN	= 51,94	±	7,32	mg
	osamines	= 37,64	±	5,02	mg
Femmes	: oses "neutres"	= 59,40	±	10,23	mg
	ANAN	= 43	±	7,82	mg
	osamines	= 31,43	±	5,08	mg

TABIEAU XXXIX

Elimination journalière en mg des glucides glycoprotidiques d'hommes  
âgés de 20 à 50 ans

(Moyennes et écarts-types)

Urines	Oses totaux	Acide Sialique	Osamines totales	Acides Uroniques	Ose AS.	Ose tot.	Ose AU.
1 à 5	65,73 ± 8,73	52,07 ± 8,97	38,60 ± 4,82	12,47 ± 3,2	1,27 ± 0,089	1,69 ± 0,5	5,42 ± 0,6
1 à 10	71,47 ± 10,81	53,68 ± 8,7	37,23 ± 4,44	12,73 ± 2,86	1,35 ± 0,114	1,90 ± 1,92	5,80 ± 1
1 à 15	71,73 ± 10,14	52,44 ± 7,35	36,04 ± 4,4	12,98 ± 2,27	1,36 ± 0,104	1,92 ± 0,264	5,68 ± 1,09
1 à 20	71,23 ± 9,96	53,12 ± 7,45	36,85 ± 4,85	13 ± 2,27	1,33 ± 0,108	1,92 ± 0,293	5,60 ± 1,03
1 à 25	70,4 ± 11,26	52,64 ± 7,18	36,95 ± 4,66	13,12 ± 2,89	1,33 ± 0,105	1,89 ± 0,226	5,52 ± 1
1 à 30	70,43 ± 10	52,90 ± 6,91	36,94 ± 5,29	13,30 ± 3,4	1,32 ± 0,108	1,90 ± 0,227	5,47 ± 1,2
1 à 35	70,28 ± 9,95	52,66 ± 6,92	37 ± 4,63	13,25 ± 3,53	1,32 ± 0,109	1,89 ± 0,214	5,43 ± 1,1
1 à 40	69,80 ± 9,41	52,61 ± 6,80	38,45 ± 5,35	13,75 ± 3,05	1,32 ± 0,105	1,88 ± 0,202	5,33 ± 1,25
1 à 45	69,18 ± 9,53	51,94 ± 6,87	37,48 ± 4,68	13,21 ± 2,86	1,32 ± 0,112	1,88 ± 0,202	5,35 ± 1,06
1 à 50	69,23 ± 10,63	51,94 ± 7,32	37,64 ± 5,02	13,12 ± 3,02	1,33 ± 0,106	1,87 ± 0,182	5,42 ± 1,08



TABLEAU XL

Elimination journalière en mg des glucides glycoprotidiques  
de femmes âgées de 20 à 50 ans.

Urines:	Oses totaux	Acide Sialique	Osamines totales	Acides Uroniques	Ose AS.	Ose tot.	Ose AU.
1 à 5	59,24 ± 5	39,14 ± 3,6	31,13 ± 3,78	8,55 ± 0,271	1,50 ± 0,087	1,89 ± 0,155	6,93 ± 0,75
1 à 10	60,92 ± 6,15	41,15 ± 3,91	33,17 ± 3,84	10,56 ± 2,13	1,47 ± 0,104	1,84 ± 0,165	6 ± 1,21
1 à 15	60,75 ± 10,96	42,4 ± 8,03	31,82 ± 5,79	11,60 ± 3,61	1,43 ± 0,116	1,90 ± 0,185	5,53 ± 1,22
1 à 20	61,8 ± 9,35	43,14 ± 6,66	31,79 ± 5,56	12 ± 3,71	1,44 ± 0,13	1,94 ± 0,19	5,41 ± 1,14
1 à 25	59,62 ± 11,4	43,24 ± 8,74	31,30 ± 5,62	11,3 ± 7,47	1,38 ± 0,174	1,90 ± 0,195	5,52 ± 1,09
1 à 30	58,52 ± 10,1	42,85 ± 8,07	31 ± 4,88	11,47 ± 3,33	1,37 ± 0,166	1,88 ± 0,186	5,4 ± 2,33
1 à 35	59,60 ± 10,20	43,35 ± 7,92	31,27 ± 5,12	11,60 ± 3,37	1,37 ± 0,14	1,94 ± 0,184	5,43 ± 0,99
1 à 40	59,84 ± 11,3	43,60 ± 7,95	31,48 ± 5,42	11,81 ± 3,40	1,366 ± 0,142	1,93 ± 0,18	5,34 ± 1,07
1 à 45	59,60 ± 10,50	43,24 ± 8,01	31,41 ± 5,13	11,52 ± 3,31	1,37 ± 0,13	1,92 ± 0,17	5,43 ± 1,07
1 à 50	59,40 ± 10,23	43, ± 7,82	31,43 ± 5,08	11,33 ± 3,26	1,376 ± 0,124	1,92 ± 0,17	5,48 ± 1,13

On peut cependant remarquer qu'il existe une légère différence suivant le sexe, les taux d'excrétion chez la femme étant plus bas que chez l'homme.

La constance est encore plus démonstrative au niveau des rapports entre glucides, notamment dans le rapport oses "neutres"

ANAN

$$\text{Hommes} = \frac{\text{oses "neutres"}}{\text{ANAN}} = 1,33 \pm 0,106$$

$$\frac{\text{oses "neutres"}}{\text{osamines}} = 1,87 \pm 0,182$$

$$\text{Femmes} = \frac{\text{oses "neutres"}}{\text{ANAN}} = 1,376 \pm 0,124$$

$$\frac{\text{oses "neutres"}}{\text{osamines}} = 1,92 \pm 0,171$$

La différence constatée entre homme et femme dans les taux des glucides devient très réduite dans les rapports.

Par contre, le taux des acides uroniques ainsi que le rapport  $\frac{\text{oses "neutres"}}{\text{acides uroniques}}$  reste soumis à d'assez grandes variations. Cette inconstance vient, nous l'avons vu p. 143, du fait qu'il subsiste dans la fraction macromoléculaire, malgré l'association de la dialyse à la précipitation éthanolique, des glycurono-conjugués non glycoprotidiques qui n'ont pas été éliminés.

- 2) Par ailleurs les calculs de l'écart-type nous montrent que les valeurs se stabilisent, même pour les acides uroniques, à partir du 15ème et 20ème cas.

## CONCLUSIONS

Nous pouvons donc conclure à la constance de l'élimination journalière des glycoprotides des individus sains âgés de 20 à 50 ans. Soulignons que ce travail n'a été possible que grâce à la mise au point de notre méthode d'isolement des glycoprotides.

Il était nécessaire car les résultats apportés par les différents auteurs qui ont travaillé le même sujet ne sont pas concordants, comportent des lacunes et portent sur trop peu de cas.

## 2 - DISCUSSION

1 - En ce qui concerne le dosage des hexoses, les valeurs trouvées par HAMERMAN et al (424) et BERGGÅRD (425) se recoupent mais sont très inférieures aux nôtres. Par contre celles trouvées par KING et al (426) sont similaires ( $77,6 \pm 19,1$  mg) mais leur étude ne porte que sur une dizaine de cas et la dispersion des résultats est très grande (de 29 à 91,95 mg par 24 h)..

2 - Etant donné l'imperfection des méthodes de dosage du fucose nous ne l'avons pas déterminé. Mais HAMERMAN et al (427) et BERGGÅRD (428) donnent les mêmes valeurs (7,6 et 7,1 mg par 24 h).

3 - Les résultats trouvés pour le dosage des acides sialiques sont aussi très différents suivant les auteurs. HAMERMAN et al (429) pas sûrs de leur présence ne les dosent pas.

Les autres auteurs ont des valeurs très différentes et très dispersées (BERGGÅRD) (430) 26,4 mg par 24 h ; (KING et al) (431)  $40,7 \pm 7,5$  mg par 24 h avec une variation de 28,26 à 47,9 mg ; nous-même dans nos anciens travaux de 20 à 40 mg par 24 h. (GOUBET) (432).

4 - Seules les hexosamines ont des valeurs cohérentes chez les différents auteurs (HAMERMAN et al.) (433), (KING et al.) (BOAS) (434), (KING et WARNOCK) (435), (BERGGÅRD) (436): 25 à 28 mg par 24 h). Mais là encore chez KING et al. (437) on constate une grande dispersion de résultats (13,75 à 33,30 mg par 24 h).

5 - Quant aux acides uroniques, les résultats sont très fantaisistes. Mais la plupart des auteurs ne les dosent pas, par exemple KING et al. (438) qui les trouvent en quantité très instable. HAMERMAN et al. (439) ne sont pas sûrs de leur méthode et avancent très prudemment la valeur de 3,69 mg par 24 h mais avec beaucoup de restriction. Nous-même, dans nos anciens travaux (GOUBET) (440)), avons une grande dispersion (de 6 à 35 mg par 24 h - valeur moyenne = 20 mg). Mais même dans nos travaux statistiques, nos résultats restent assez peu constants, comparés aux valeurs obtenues pour les autres oses.

Il est cependant à noter que, hormis dans nos derniers travaux, aucun auteur ne tient compte de l'interférence des acides/uroniques dans le dosage des oses "neutres" qui sont donc dosés par excès.

### CONCLUSIONS

Grâce à l'élimination de différentes causes d'erreurs dues aux dosages et aux méthodes de préparation des glycoprotides urinaires, nous sommes parvenue à doser correctement les différents composés glucidiques des glycoprotides urinaires. Cette expérimentation nous apporte des valeurs "statistiques" de référence que nous pourrions confronter avec d'autres résultats notamment en pathologie.

Cependant, nous avons voulu vérifier auparavant l'action de certains facteurs physiologiques comme l'âge, le sexe, l'alimentation et l'activité et voir s'ils affectaient les moyennes déterminées ci-dessus. C'est ce qui fait l'objet du paragraphe suivant.

B - INFLUENCE DE FACTEURS PHYSIOLOGIQUES SUR  
L'ELIMINATION DES GLYCOPROTIDES URINAIRES

Nous examinerons successivement les résultats que nous avons obtenu en dosant les constituants glucidiques des glycoprotides des urines de 24 h. en fonction de l'âge (urines d'enfants, urines de vieillards), du sexe (influence du cycle oestral chez la femme), de la nutrition et de l'activité.

1 - Influence de l'âge

Nous avons étudié précédemment les urines d'individus adultes et en pleine force physique. Nous avons donc examiné d'une part des urines d'enfants (2 à 16 ans) et d'autre part des urines de personnes âgées de plus de 60 ans.

a- Urines d'enfants de 2 à 16 ans

Nous avons procédé de la même façon que pour les résultats des urines d'adultes. Nous avons dosé les constituants glucidiques des glycoprotides d'environ soixante enfants des deux sexes âgés de 2 à 16 ans.

Les résultats sont consignés dans les tableaux XLI (p. 161), et XLII (p. 162).

Ils montrent que chez les enfants le taux des glycoprotides croît régulièrement avec l'âge et rejoint le taux des adultes à l'âge de la puberté (vers 12 ans). On n'observe pas de différences significatives entre les filles et les garçons.

Par ailleurs, si le taux des glycoprotides varient avec l'âge, les rapports entre les différents constituants glucidiques restent constants.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour la composition molaire en oses "neutres".

TABLEAU XLI

Elimination journalière en mg des glucides glycoprotidiques des urines de garçons âgés de 3 à 16 ans.

Age	oses "neutres"	Acide sialique	Osanines totales	Acides uroniques	$\frac{Osc}{A.S}$	$\frac{Osc}{OSA}$	$\frac{Osc}{A.U}$
3	28,88	22,55	17,61	6,98	1,28	1,64	4,30
4	37,64	28,70	23,19	6,96	1,31	1,63	4,60
5	46,53	36,33	25,80	10,86	1,28	1,82	4,30
6	46,18	34,36	28,06	11,73	1,34	1,63	4,00
7	42,86	31,90	24,48	9,77	1,33	1,75	4,71
8	46,23	35,82	27,02	11,13	1,29	1,71	4,11
9	44,94	32,75	28,32	10,54	1,36	1,59	4,33
10	59,37	47,78	34,38	14,32	1,25	1,73	4,18
11	63,02	48,64	35,92	13,17	1,30	1,76	4,83
13	65,44	48,10	39,58	11,33	1,36	1,68	4,61
14	59,70	50,49	36,13	14,71	1,19	1,68	4,13
15	66,83	48,79	42,93	14,09	1,35	1,57	4,61



TABLEAU XLIII

Elimination journalière en mg des glucides  
glycoprotidiques des urines de filles âgées  
de 2 à 15 ans.

Age	Oses 'neutres'	Acide sialique	Osamines totales	Acides uroniques	<u>Oses</u> AS	<u>Oses</u> Osamines	<u>Oses</u> AU
2	27,76	21,47	16,48	6,18	1,29	1,69	4,57
3	28,00	20,81	15,66	5,94	1,34	1,78	4,67
4	31,93	23,04	18,29	6,20	1,39	1,75	5,17
5	34,07	25,29	22,78	7,40	1,35	1,52	4,62
6	30,85	23,24	19,72	6,50	1,33	1,57	4,69
7	36,83	27,15	22,40	9,23	1,35	1,64	4,11
8	44,22	33,99	26,31	10,42	1,31	1,69	4,28
9	43,12	35,92	27,58	9,72	1,20	1,61	4,44
10	43,78	33,56	26,63	10,45	1,35	1,59	4,12
11	56,30	43,90	34,76	11,20	1,29	1,64	5,03
12	58,95	46,34	35,73	13,61	1,28	1,70	4,43
13	50,97	38,44	27,37	12,86	1,32	1,86	5,33
14	52,70	39,09	28,53	10,90	1,36	1,84	5,34

galactose	10
glucose	2,3
mannose	5,5
xylose	0,7
fucose	4,2

qui ne montrent pas de modifications importantes avec les résultats obtenus pour les adultes (voir plus loin p. 173).

b- Urines de personnes âgées de plus de 60 ans

Comme précédemment nous avons dosé les urines de 24 heures de personnes des deux sexes, âgées ici de 60 à 85 ans. Les résultats figurent dans le tableau XLIII (p.164 ).

On peut y voir qu'il n'y a pas de variations significatives du taux des différents glucides conjugués et que les limites des moyennes statistiques établies pour les individus sains et physiologiquement stables. Ces résultats sont également confirmés par l'étude de la composition molaire en oses "neutres" (tableau XLIII ; p. 164) seule la composition en glucose est modifiée fortement mais cela atteint plus les glycopeptides que les glycoprotéines qui ne renferment pas de glucose.

2 - Influence du cycle oestral chez la femme

Les urines de femme sont chargées d'hormones gonadotropiques en quantité variable selon le cycle oestral. Nous avons donc voulu vérifier si cette quantité d'hormones fluctuantes influait de façon importante sur la concentration en glycoprotides.

Pour cela, nous avons recueilli des urines de 24 h de trois femmes différentes de façon régulière pendant deux mois consécutifs et nous avons dosé les constituants glucidiques des glycoprotides. Les résultats de l'une de ces études sont consignés dans le tableau XLIV (p. 165).

TABIEAU XLIII

Elimination journalière en mg des glucides glycoprotidiques d'hommes et de femmes âgées de plus de 60 ans. Composition molaire en oses "neutres" (pour 10 galactose )

	H O M M E S					F E M M E S					
	60 ans	65 ans	70 ans	80 ans	Moyenne	60 ans	65 ans	70 ans	80 ans	85 ans	Moyenne
	Osés "neutres"	57	61,44	60,30	74,63	63,4	58,6	44,2	54,2	47,4	42,3
Acide sialique	42,84	48,30	51,86	61,7	55,5	50,66	31,9	46,0	40,1	37,7	40,7
Osemines totales	36,22	35,65	36	45	38,2	37,75	24,35	34,10	28,30	22,56	28,3
Acides uroniques	12,73	16,14	16,1	19,33	16,1	13,9	7,6	8,9	9,3	8,75	9,52
Osés	1,33	1,27	1,16	1,21	1,27	1,16	1,38	1,18	1,19	1,13	1,20
Acide sialique	1,58	1,72	1,67	1,66	1,66	1,60	1,81	1,60	1,67	1,77	1,73
Osemines totales	4,47	3,80	3,75	3,86	3,97	4,22	5,83	6,10	5,10	4,83	4,43
Acides uroniques											
Composition molaire		GAL 10	Glc 0,5	MAN 6,5		XYL 0,7	FUC 4,5				



GAL : galactose ; Glc : glucose ; MAN : mannose ; FUC : fucose ; XYL : xylose.

TABLEAU XLIV

Variations des glucides glycoprotidiques  
urinaires en fonction du cycle oestral chez la femme  
(exprimés en mg par 24 heures)

	Oses "neutres"	Acide sialique	Osaminos totales	Acides uroniques	$\frac{\text{Oses}}{\text{A.S}}$	$\frac{\text{Oses}}{\text{OSA}}$	$\frac{\text{Oses}}{\text{AU}}$
1er jour	47,83	32,00	27,35	6,90	1,49	1,74	6,89
5ème jour	52,17	38,00	31,45	8,40	1,35	1,70	6,23
7ème jour	49,80	33,63	28,35	7,20	1,48	1,74	6,90
9ème jour	43,72	31,90	28,10	5,12	1,37	1,74	7,90
1ème jour	54,20	37,48	15,73	5,63	1,40	2,05	9,14
3ème jour	55,27	32,00	28,29	7,95	1,41	1,95	6,95
5ème jour	53,49	36,53	35,22	7,23	1,46	1,78	7,40
7ème jour	46,82	27,97	24,88	6,61	1,38	1,88	7,08
0ème jour	52,33	39,30	32,60	7,69	1,33	1,85	6,81
2ème jour	52,95	34,30	33,23	6,95	1,44	1,82	8,25
5ème jour	56,10	38,86	31,56	6,85	1,45	1,79	8,27
7ème jour	51,70	82,48	27,75	5,80	1,49	1,87	8,91
MOYENNE	51,40	35,12	28,71	6,79	1,46	1,79	7,56

Ils montrent qu'il n'y a pas de variations significatives. On peut même noter au passage la constance assez remarquable de l'excrétion urinaire chez un même individu.

Nous pouvons donc conclure de cette étude que le cycle oestral n'intervient pas dans les variations que l'on pourrait enregistrer dans une urine de femme.

### 3 - Influence de l'alimentation

Nous avons voulu vérifier que, si l'alimentation influait fortement sur l'élimination des glucides libres (voir origine des monosaccharides de la fraction dialysable, p. 111 ) il n'en était rien en ce qui concerne les glucides conjugués des urines. C'est pourquoi nous avons soumis différents individus à divers régimes alimentaires :

- 1 - un régime à surcharge glucidique  
comprenant une ingestion massive de sucre, confitures, dattes, miel et bière.
- 2 - un régime à surcharge protidique  
comprenant exclusivement des oeufs, de la viande, du poisson et du fromage.
- 3 - un régime végétarien  
composé uniquement de fruits, tomate, carottes, salade et thé.

Nous avons rassemblé les résultats des dosages des glucides conjugués des urines de 24 h dans le tableau XLV (p. 167).

Nous avons établi également la composition molaire en oses "neutres" qui figure dans le tableau XLVI (p.168).

L'examen de ces résultats montre que l'alimentation n'a pas d'influence sur le taux d'élimination des glycoprotides des urines.

Elimination journalière en mg des glucides glyco-protidiques au cours de différents régimes alimentaires.

Régimes	Oses "neutres"	Acide sialique	Osamines totales	Acides uroniques	Oses AS	Oses OSA	Oses A.U
<u>Surcharge glucidique</u>							
avant régime	50,74	39,25	26,54	11,27	1,29	1,91	4,50
pendant régime	51,70	36,82	28,78	10,47	1,40	1,80	4,93
	55,7	40,4	30,25	11,90	1,37	1,84	4,68
après régime	58,6	43,25	30,72	12,41	1,35	1,91	4,72
	55	41,90	29,72	10,20	1,31	1,85	5,47
<u>Surcharge protidique</u>							
avant régime	65,10	54,60	36,55	13,85	1,19	1,78	4,7
pendant régime	57	41,50	30,20	10,20	1,23	1,79	5,00
	58,25	48,80	33,50	10,17	1,19	1,74	5,73
après régime	57,50	46,20	32,90	9,70	1,24	1,75	5,93
	61,40	49,5	35,80	11,90	1,24	1,72	5,17
<u>Régime végétarien</u>							
avant régime	63,22	50,17	35,51	16,80	1,26	1,78	3,76
pendant régime	50,95	43,54	28,60	13,85	1,17	1,78	3,61
	50,30	34,44	22,02	10,33	1,17	1,83	3,90
après régime	55,20	44,16	32,62	14,24	1,25	1,69	3,87
	56,04	44,13	29,62	14,28	1,27	1,79	3,90



TABLEAU XLVI

Composition molaire en oses neutres des urines  
de 24 h au cours de différents régimes alimentaires  
(pour 10 résidus de galactose)

Régimes	GAL	GLC	MAN	XYL	FUC
Surcharge glucidique	10	2,5	6,1	0,6	4
Surcharge protidique	10	1,7	6,5	0,5	4,2
Régime végétarien	10	2	6,3	0,5	4,4



#### 4 - Influence de l'activité

Nous avons recueilli des urines de 24 heures sous forme de fractions au cours de la journée. Un effort musculaire important y a été réalisé (course à pied de 10 kilomètres environ). Nous avons effectué les dosages glucidiques totaux sur chaque fraction et calculé pour chaque fraction le débit horaire.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XLVII (p. 170). Nous constatons, à l'examen de ce tableau, une augmentation du taux glucidique dans le débit horaire après l'effort, ce qui semble correspondre à une augmentation du taux des glycoprotides.

Mais l'urine totale de 24 heures reconstituée et dosée ne montre pas d'augmentation significative du taux des glucides conjugués.

Donc si l'effort musculaire intense semble provoquer une légère augmentation du taux des glycoprotides, cette augmentation s'inscrit dans les limites des constantes d'élimination.

Cette étude nous avait été inspirée par les travaux de TAYEAU, JENSEN et REISS (441) qui ont prouvé que le phénomène d'obstacle de DONAGGIO était dû uniquement à des variations quantitatives des glycoprotéides urinaires.

Quant à POORTMANS et VAN KERCHOVE (442) leur étude est très semblable à la nôtre mais leurs résultats ne portent que sur les fractions urinaires recueillies juste avant et après l'effort. De plus ils ne se sont intéressés du point de vue quantitatif qu'aux dosages des protéines. Il ne nous est donc pas possible de les comparer aux nôtres.

TABLEAU XLVII

Variations glucidiques (en mg par quantité d'urine éliminée dans chaque fraction) des glycoprotides urinaires à la suite d'un effort musculaire important.

URINE I

Fractions	Oses "neutres"	Débit horaire	Acide sialique	Débit horaire	Osamines	Débit horaire	Acides Uroniques	Débit horaire
F I + à 10 h	13,61	<u>3,89</u>	13,04	<u>3,73</u>	7,95	<u>2,27</u>	3,19	<u>0,91</u>
F II 10 - 14 h	18,62	<u>2,90</u>	16,42	<u>2,53</u>	9,13	<u>1,41</u>	5,61	<u>0,86</u>
après effort F III 14 à 16 h	5,18	<u>3,45</u>	5,46	<u>3,64</u>	2,95	<u>1,96</u>	1,43	<u>0,95</u>
F IV 16 à 20 h	19,36	<u>4,84</u>	17,66	<u>4,41</u>	8,12	<u>2,02</u>	4,73	1,18
F V 20 h à 7 h	18,47	<u>2,17</u>	14,91	<u>1,75</u>	10,58	<u>1,24</u>	3,71	<u>0,44</u>
Urine totale	80,8		70,5		43,22		20,96	

URINE II

après effort F I	9,28	<u>3,09</u>	7,37	<u>2,46</u>	4,82	<u>1,61</u>	2,23	<u>0,74</u>
F II	13,85	<u>3,46</u>	11,39	<u>2,85</u>	7,04	<u>1,76</u>	3,84	<u>0,96</u>
F III	8,23	<u>4,12</u>	7,60	<u>3,80</u>	4,01	<u>2,00</u>	2,19	<u>1,09</u>
F IV	10,93	<u>2,73</u>	9,61	<u>2,40</u>	6,75	<u>1,69</u>	2,32	<u>0,58</u>
F V	25,93	<u>2,36</u>	22,1	<u>2,01</u>	15,92	<u>1,45</u>	4,89	<u>0,44</u>
Urine totale	67,44		56,32		36,24		14,75	

## CONCLUSIONS

L'application du procédé original d'isolement des glycoprotides urinaires à l'étude systématique des urines de 24 h. d'individus sains de 20 à 50 ans nous a conduit à des valeurs constantes qui vont nous servir de référence en recherche appliquée. Nous avons, en effet, vérifié que des facteurs tels que l'âge (urines d'enfants et de vieillards), le sexe (variation du taux des hormones liées au cycle oestral chez la femme), l'alimentation et l'activité (influence de la fatigue) ne provoquaient pas de variations importantes dans le taux des différents glucides conjugués. Les légères différences que l'on peut enregistrer rentrent, en effet, dans les limites des moyennes statistiques établies pour les individus sains et physiologiquement stables.

## II IDENTIFICATION ET DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE

Nous avons procédé selon les méthodes décrites dans l'appendice technique (p. 201 à p. 209).

Nous rappellerons que l'hydrolyse des oses "neutres" et des osamines est quantitative, celle des acides uroniques et des acides sialiques est d'une part incomplète et d'autre part s'accompagne d'une destruction partielle de ces composés. La détermination de la composition molaire concerne uniquement les oses "neutres" et les osamines.

1 - LES OSES "NEUTRES"

Nous avons déterminé la composition molaire en oses "neutres" des préparations glycoprotidiques à partir de 300 mg d'"adialysable" urinaire lyophilisé, par le procédé de DATE (443) modifié. Nous avons également utilisé la méthode au ferri-cyanure de MONTREUIL (444) modifié. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XLVIII ; (p. 173) et illustrés par les figures 28 et 29 (p. 174).

Nous y voyons que les glycoprotides urinaires renferment du galactose, du glucose, du mannose du xylose et du fucose.

Ces résultats confirment ceux de MONTREUIL (445) (445 bis) MONTREUIL et BOULANGER et BISERTE et al (446). Cependant la présence du glucose et du xylose n'est plus une énigme. Le glucose provient des glycopeptides que l'on isole au cours de la préparation en même temps que les glycoprotéines (voir le fractionnement sur Séphadex G-50 (p. 138)).

Quant au xylose, nous avons vu (p. 126) qu'il était d'origine mucopolysaccharidique.

Cependant notre procédé d'isolement des glycoprotides a réduit considérablement la quantité de xylose trouvée par ces auteurs dans les urines humaines et surtout a permis de la stabiliser.

Par ailleurs, nous avons pu voir que la composition molaire en oses "neutres" n'est affectée ni par l'âge (voir p. 163 et p. 164) ni par le régime alimentaire (voir p. 168)

TABLEAU X VIII

Composition molaire en glucides des adialysables  
d'homme et de femme adultes (pour 10 résidus de  
galactose)

	Homme	Femme
GAL	10	10
GLC	2,5	2,55
MAN	5,5	5,7
XYL	0,7	0,77
FUC	4,3	4
A.U.	3,5	3,7
A.S.	8,8	8,9
Glc NH <sub>2</sub>	8,22	8,46
Gal NH <sub>2</sub>	2,74	2,80
<u>Glc NH<sub>2</sub></u>	3	3
Gal NH <sub>2</sub>		

GAL : galactose ; GLC : glucose, MAN : mannose, XYL : xylose

MAN : mannose

A. U : acide uronique

A. S : acide sialique (acide N-acétyl-neuraminique)

GlcNH<sub>2</sub> : glucosamine

GalNH<sub>2</sub> : galactosamine



Figure 28

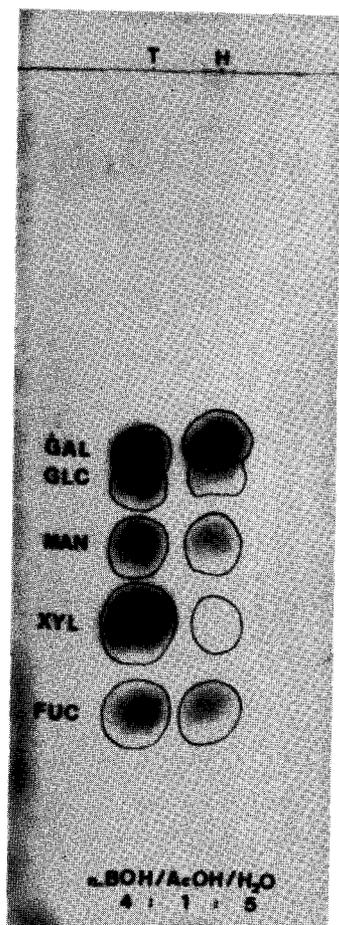
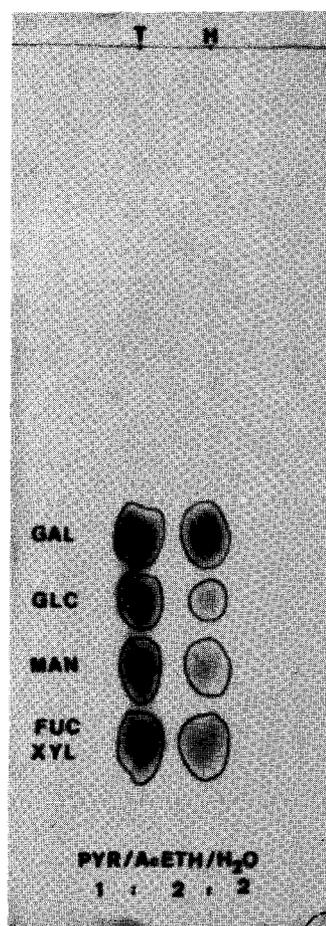


Figure 29



Figures 28 et 29

Chromatographie des oses "neutres" constituant les glucides glycoprotidiques des urines humaines.

Hydrolyse par HCl 1,5N à 100°C pendant 1 h 30.

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

Papier Whatman N°3 . Durée de la chromatographie : 48 heures.(figure 28).

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

Papier Schleicher etSchüll 2040 b. Durée de la chromatographie : 18 heures (figure 29).

Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

## 2 - LES OSAMINES

Les urines humaines renferment un mélange de glucosamine et de galactosamine.

L'identification de celles-ci ont été effectuées sur la base des résultats expérimentaux suivants :

1- la désamination oxydative donne de l'arabinose et du ~~xylose~~<sup>lyxose</sup> (figure 30 ; p. 176).

2- la chromatographie sur colonne de Dowex 50 selon GARDELL (447) fournit deux pics, le premier correspond à la glucosamine (et c'est le pic majeur dans toutes les urines que nous avons étudiées), le deuxième correspond à la galactosamine (figure 31 ; p. 177).

3- l'électrophorèse des osamines N-réacétylées qui seule permet de séparer la N-acétylglucosamine, la N-acétylgalactosamine et la N-acétylmannosamine, révèle la présence de N-acétylglucosamine et de N-acétylgalactosamine (Figure 32 ; p. 178).

Le rapport  $\frac{\text{glucosamine}}{\text{galactosamine}}$  a été calculé à partir de la chromatographie sur colonne selon GARDELL.

Il est égal à 3 chez l'homme et la femme adulte (tableau XLVIII ; p. 173).

### REMARQUE

Ce rapport subit des modifications en fonction de l'âge.

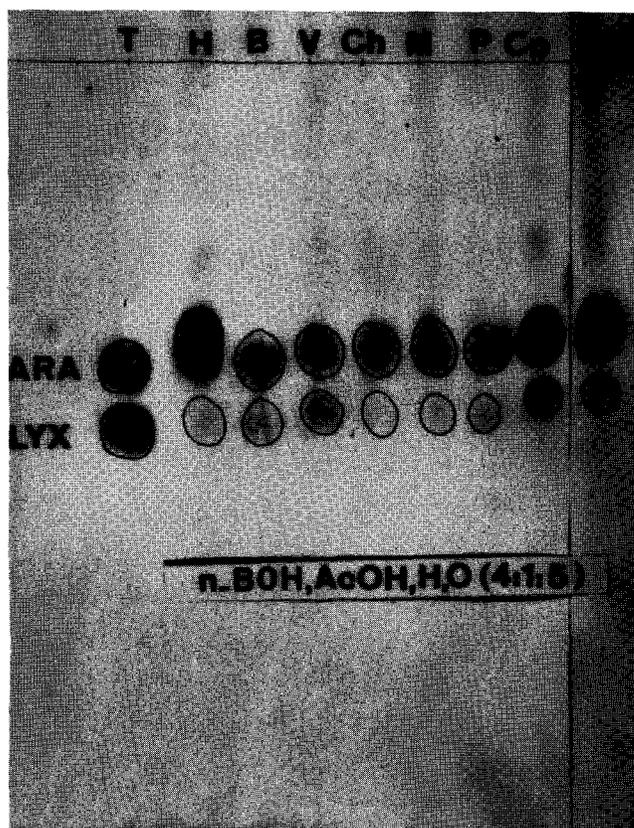


Figure 30

Identification par chromatographie sur papier des osamines de l'adialysable de l'urine humaine par désamination oxydative par la ninhydrine - méthode de GARDELL et coll. (448) .

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

Papier Whatman n°3 .Durée de la chromatographie : 48 heures.

Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

Ara : arabinose . Lyx : lyxose.

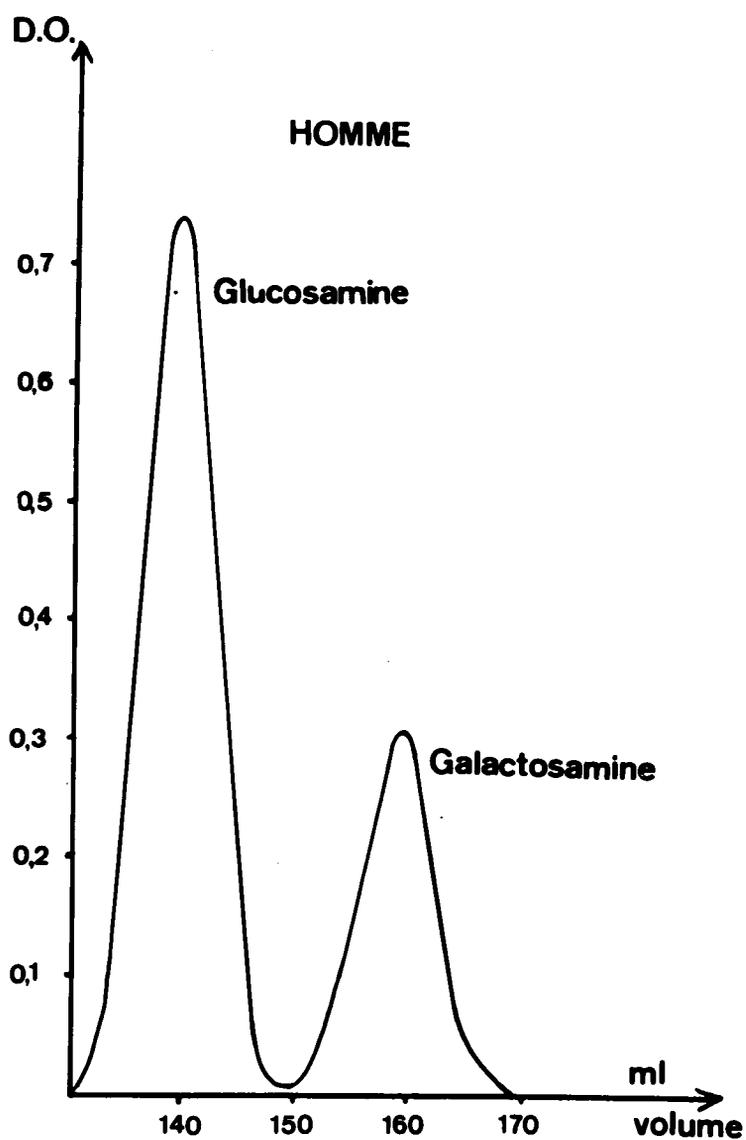


Figure 31

Chromatographie selon GARDELL (449) sur colonne de Dowex 50 des osamines de l'adialysable d'urine humaine.

En abscisse : nombre de fractions .

En ordonnée : absorbance des colorations données par la méthode d'ELSON et MORGAN.



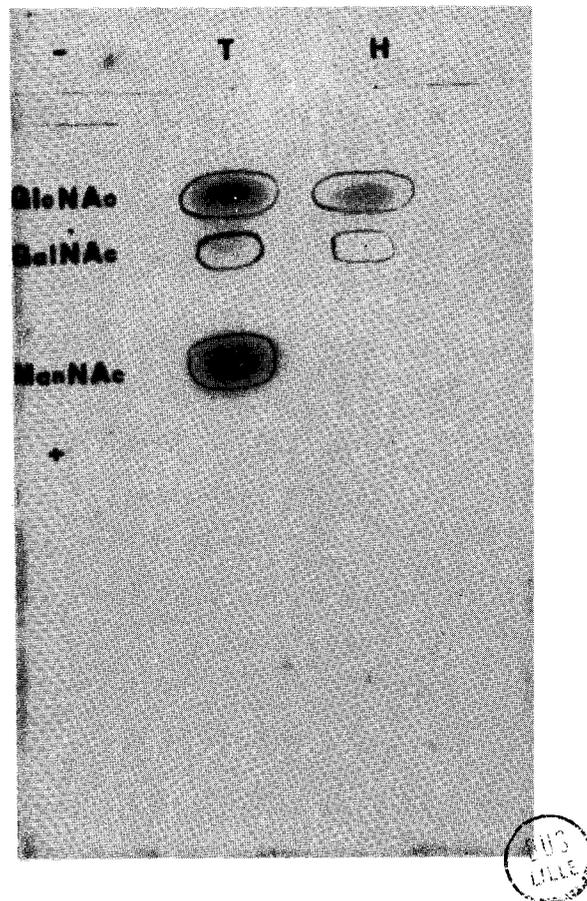


Figure 32

Comportement électrophorétique des N-acétylosamines obtenues par la N-réacétylation des osamines libérées par hydrolyse chlorhydrique (HCl 4N, 100°C, 4 heures) de l'urine humaine.

Electrophorèse réalisée en cuve en "toit" .Tampon borate de pH 9,2 à 10 V/cm pendant 4 heures.

Révélation par la réaction d'EHRlich "indirecte".

T : solution témoin de N-acétylglucosamine (GlcN-Ac), de N-acétylgalactosamine (GalN-Ac) et de N-acétylmannosamine (ManN-Ac) pures.

Chez les jeunes enfants, il diminue. Ce résultat s'explique par le fait d'une augmentation de la quantité de galactosamine accompagnée d'une diminution de la quantité de glucosamine, ce qui provoque un abaissement du rapport jusqu'à 1,80 (figure 33 ; p. 180).

Par contre, ce rapport augmente très sensiblement chez les vieillards jusqu'à atteindre la valeur de 4,33. Cette augmentation est due essentiellement à un abaissement du taux en galactosamine (figure 33 ; p. 180).

Ces variations sont probablement en relation étroite avec le taux des glycosaminoglycannes.

### 3 - LES ACIDES SIALIQUES

L'identification des acides sialiques par chromatographie sur papier montre que les urines humaines contiennent uniquement de l'acide N-acétyl neuraminique (figure 39 ; p. 190).

### 4 - LES ACIDES URONIQUES

Nous avons utilisé les méthodes décrites p. . Nos préparations glycoprotidiques, comme le montre la figure 41 (p. 191) contiennent uniquement de l'acide glucuronique.

Bien que les urines renferment de l'acide iduronique (lié au Dermatan sulfate ) nous n'avons pu le mettre en évidence directement. Il faut pour cela des fractions enrichies en ce glycosaminoglycane.

## CONCLUSIONS

Les glycoprotides des urines humaines renferment donc du galactose, du glucose, du mannose, du xylose et du fucose comme oses "neutres".

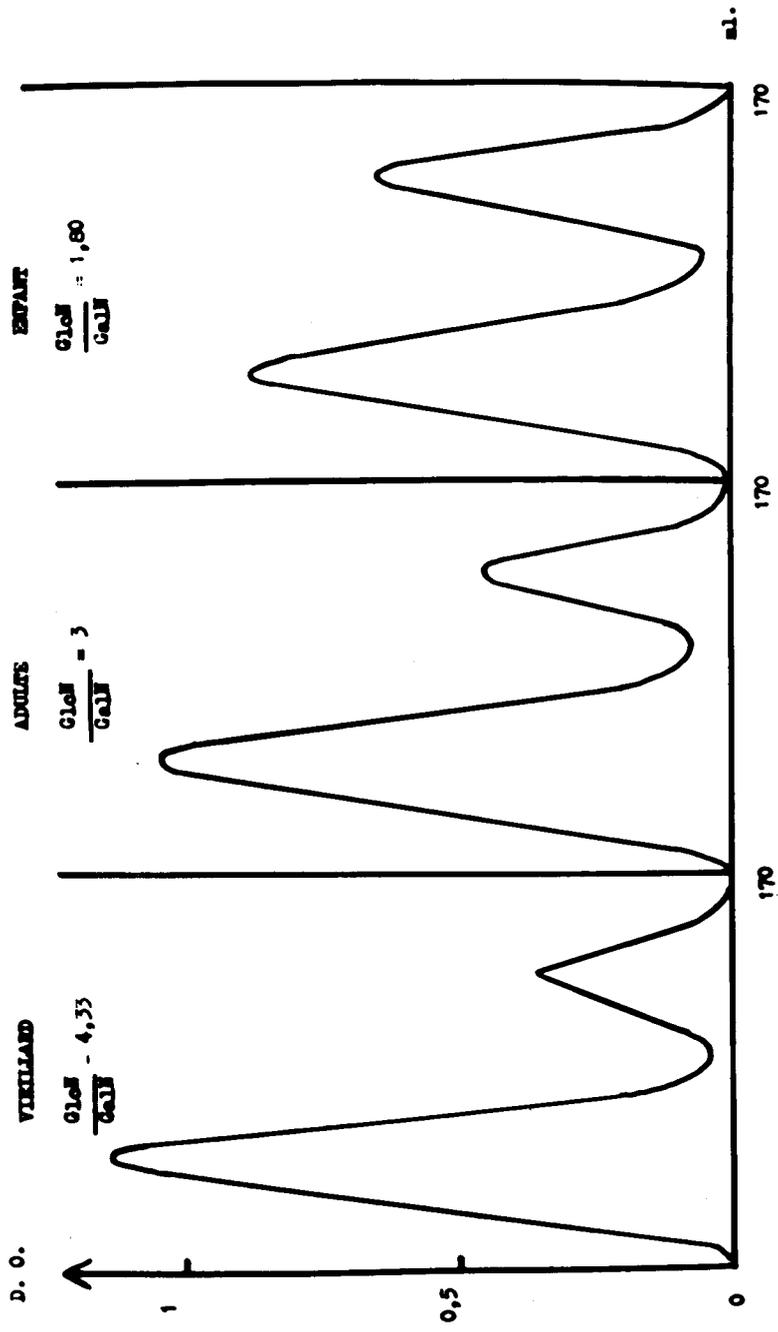


Figure 33

Comparaison des chromatographies selon GARDELL (450) des osamines de l'adialyisable d'urines humaines en fonction de l'âge.



Ils contiennent en outre des composés acides comme l'acide glucuronique et l'acide N-acétyl-neuraminique et des composés basiques comme la glucosamine et la galactosamine.

Les méthodes de dosage chromatographique nous ont permis de déterminer la composition molaire en oses "neutres" et en osamines.

Nous verrons dans les pages suivantes les résultats qu'elles nous ont données dans l'étude des urines de Mammifères.

## LES URINES DE MAMMIFERES

### A - DOSAGE DES GLUCIDES TOTAUX

Nous avons appliqué aux urines de mammifères les mêmes études que celles qui ont été faites à propos de l'étude statistique des urines normales humaines de 24 h. Mais dans l'impossibilité de recueillir les urines de 24 h. les résultats ont été calculés pour 1000 ml d'urine. Ils sont rassemblés dans le tableau XLIX (p. 182).

Ils nous montrent que :

1- les urines des Mammifères étudiées renferment, tout comme les urines humaines, des oses, des osamines, des acides sialiques et des acides uroniques à des taux de l'ordre du décigramme.

2- le taux de chacun des constituants glucidiques varient dans des limites assez larges comparées aux urines humaines. Mais les variations enregistrées viennent de l'impossibilité de calculer les éliminations par 24 h.

TABLEAU XLIX

Composition en oses de la fraction adialysable de l'urine de différents Mammifères (en mg pour 1000ml d'urine)

Espèces	"oses neutres"	Osamines	Acides Sialiques	Acide glucuronique	Oses Osamines	Oses Acides Sialiques	Oses Acides Uroniques
Homme	30 à 108	15 à 56,5	20 à 34,5	4 à 20	1,90	1,35	4,95 (3,35 à 8)
Boeuf	208 (134 à 310)	136 (89 à 182)	137 (92 à 188)	50 (18 à 91)	1,57 (1,50 à 1,70)	1,49 (1,43 à 1,64)	5,55 (4,54 à 7,17)
Veau	168 (60 à 285)	101 (35 à 169)	104 (44 à 167)	32 (19 à 74)	1,68 (1,62 à 1,75)	1,56 (1,44 à 1,70)	6,4 (3,10 à 5,3)
Cheval	102 (60 à 136)	63 (35 à 84)	84 (46 à 120)	36 (21 à 49)	1,66 (1,62 à 1,75)	1,23 (1,15 à 1,31)	2,85 (2,65 à 3,22)
Mouton	168 (113 à 217)	117 (78 à 157)	120 (81 à 154)	41 (26 à 58)	1,44 (1,37 à 1,48)	1,40 (1,34 à 1,44)	4,16 (3,74 à 4,80)
Porc	193 (132 à 200)	135 (91 à 180)	118 (28 à 163)	50 (32 à 64)	1,43 (1,35 à 1,54)	1,59 (1,56 à 1,62)	3,91 (3,10 à 4,95)
Cobaye	61 (92 à 182)	40 (24 à 62)	64 (28 à 132)	13 (9 à 12)	1,52 (1,49 à 1,61)	1,26 (1,30 à 1,61)	5,36 (2,92 à 9,3)
Lapin	132 (92 à 182)	64 (47 à 93)	96 (66 à 132)	23 (15 à 34)	2,06 (1,93 à 2,20)	1,39 (1,31 à 1,48)	5,61 (4,06 à 7,12)
Rat	199 (168 à 79)	110 (79 à 143)	165 (72 à 255)	28 (17 à 46)	1,80 (1,65 à 1,95)	1,17 (1,06 à 1,35)	6,55 (5,56 à 8,7)



Par contre, les rapports oses "neutres"/osamines et oses "neutres"/acides sialiques sont d'une constance satisfaisante quelque soit l'espèce. Seul le rapport oses "neutres"/acides uroniques présente des amplitudes beaucoup plus importantes.

Nous en arrivons donc aux mêmes constatations que pour les urines humaines.

3- Des différences semblent se manifester à l'étude des rapports oses "neutres"/osamines et oses "neutres"/acides sialiques d'une espèce à l'autre.

Elles montrent donc que la composition des glycoprotides et leur nature varient avec les espèces. C'est d'ailleurs ce que nous a confirmé l'étude chromatographique exposée ci-après .

#### B - IDENTIFICATION ET DOSAGES CHROMATOGRAPHIQUES

Nous avons procédé de la même façon que pour les urines humaines en appliquant les mêmes méthodes.

##### 1° LES OSES "NEUTRES"

Les résultats obtenus pour les différents Mammifères étudiés ont été rassemblés dans le tableau L (p. 184) et illustrés par les figures 34 et 35 (p.185).

On y remarque que quelque soit l'espèce, l'homme y compris, les glycoprotides urinaires renferme du galactose, du glucose, du mannose, du xylose et du fucose. Des métabolismes communs règlent donc la biosynthèse des glycoprotides urinaires chez les différents Mammifères.

TABIEAU I  
Composition molaire en glucides des "adialyrables" urinaires de différents Mammifères  
(pour 10 résidus de galactose)

Espèces	Nombre d'urines étudiées	GAL	GLC	MAN	XYL	FUC	A.U.	A.S.*	GlcNH <sub>2</sub>	GlcNH <sub>2</sub>	$\frac{Glc}{Gal}$ NH <sub>2</sub>
Homme	5	10	2,5	5,5	0,7	4,3	3,5	8,8	2,74	8,22	3
Boeuf	3	10	1,9	6	0,36	1,82	4,4	7,62	4,5	8,55	1,90
Veau	3	10	2,28	6,2	0,62	1,33	3,55	7,29	5,2	7	1,35
Cheval	3	10	3	6,3	0,5	2,1	7	10,4	3,36	10,1	3
Mouton	3	10	2,20	6	0,5	1,5	4,5	7,94	4,7	9,3	1,98
Porc	3	10	3,6	7,2	0,38	2,75	5,6	7,96	4,66	11,92	2,56
Cobaye	3	10	3,4	4,5	0,5	1,5	3,87	12,2	2,59	10,36	4
Lapin	3	10	3,8	5,7	0,5	1,6	3,28	8,64	1,63	8,80	5,4
Rat	5	10	8,5	8	1	2	3,80	13,44	1,47	14,7	10

\* A.S. : exprimé en acide N-acétyl-neuraminique  
 GAL : galactose - GLC : glucose - MAN : mannose - XYL : xylose - FUC : fucose -  
 A.U. : acide uronique - A.S. : acide sialique - Glc NH<sub>2</sub> : glucosamine - Gal NH<sub>2</sub> : galactosamine



Figure 34

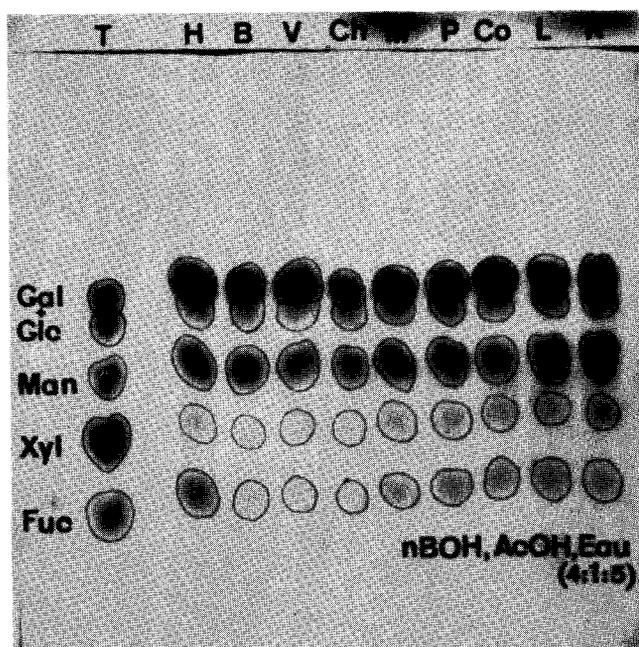
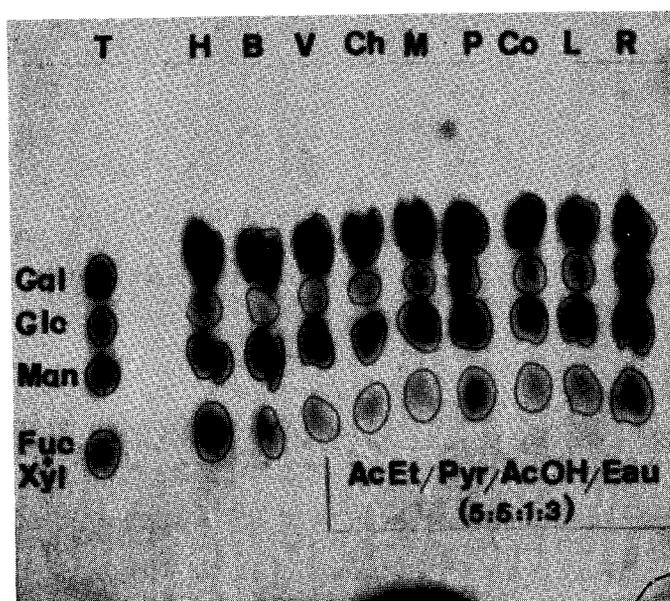


Figure 35



Figures 34 et 35

Chromatographie des oses "neutres" constituant les glucides glycoprotidiques (fraction adialysable) de urines de différents Mammifères.

Hydrolyse par HCl 1,5M à 100°C pendant 1h30.

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

Papier Whatman n°3 .Durée de la chromatographie : 48 heures ( figure 34 )

Système solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acétate d'éthyle/eau ( 5 / 5 / 1/ 3 )

Papier Schleicher et Schüll 2040b. Durée de la chromatographie : 18 heures.(figure 35)

Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

T : solution témoin d'oses purs. Gal : galactose . Glc : glucose. Man : mannose .

Xyl : xylose .Fuc : fucose.

Cependant la répartition des oses varie d'une espèce à l'autre tout en restant dans les mêmes rapports. Notons en particulier la richesse en fucose des urines humaines qui diffèrent en cela très fort des autres urines de Mammifères.

## 2° LES OSAMINES

Nous avons démontré que toutes les urines de Mammifères ici étudiées renfermaient de la glucosamine et de la galactosamine. Comme pour les urines humaines, leur identification ont été effectuée à partir des résultats expérimentaux suivants :

a- la désamination oxydative donne de l'arabinose et du ~~xylose~~<sup>lyxose</sup> (Figure 36 ; p. 187).

b- la chromatographie sur colonne de Dowex-50 selon GARDELL (451) fournit deux pics correspondant à la glucosamine et à la galactosamine (voir diagramme correspondant aux urines humaines p. 177).

c- l'électrophorèse des osamines N-réacétylées révèle la présence de N-acétyl-glucosamine et de N-galactosamine (Figures 37 et 38 ; p. 188).

Le rapport  $\frac{\text{glucosamine}}{\text{galactosamine}}$  a été calculé à partir de la chromatographie sur colonne de GARDELL. Les résultats figurent dans le tableau L (p. 184).

Comme dans les urines humaines, la glucosamine prédomine dans toutes les urines mais la répartition des osamines varie largement d'une espèce à l'autre.

## 3° LES ACIDES SIALIQUES

L'identification des acides sialiques par chromatographie sur papier donne des résultats fort intéressants.

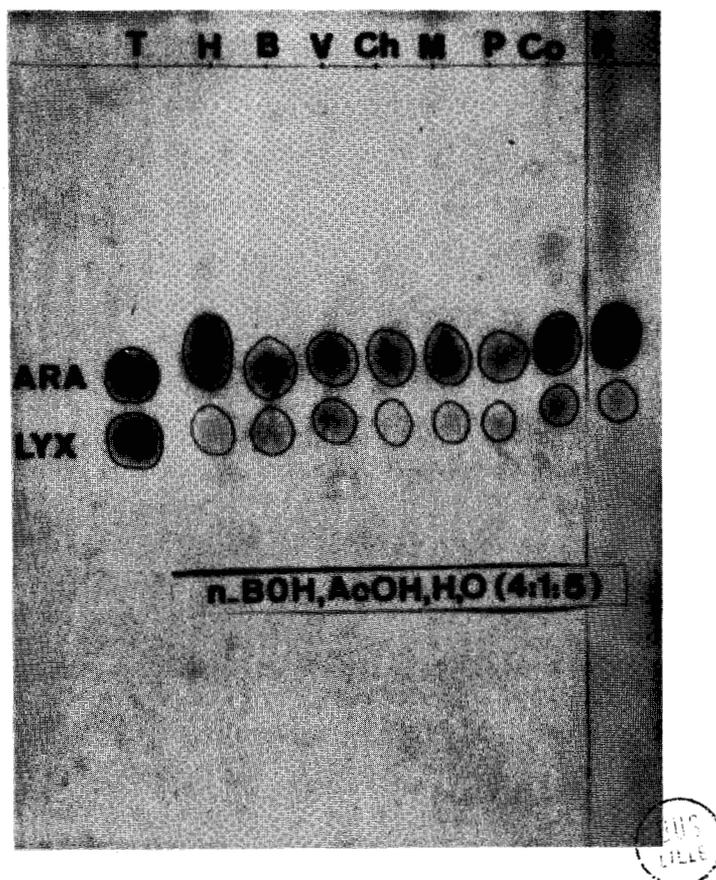


Figure 36

Identification par chromatographie sur papier des osamines des adialysable des urines de Mammifères par désamination oxydative par la ninhydrine (méthode de GARDELL et coll. (452) ).

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

Papier Whatman n°3 . Durée de la chromatographie : 48 heures.

Révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

Ara : arabinose. Lyx : lyxose.

Figure 37

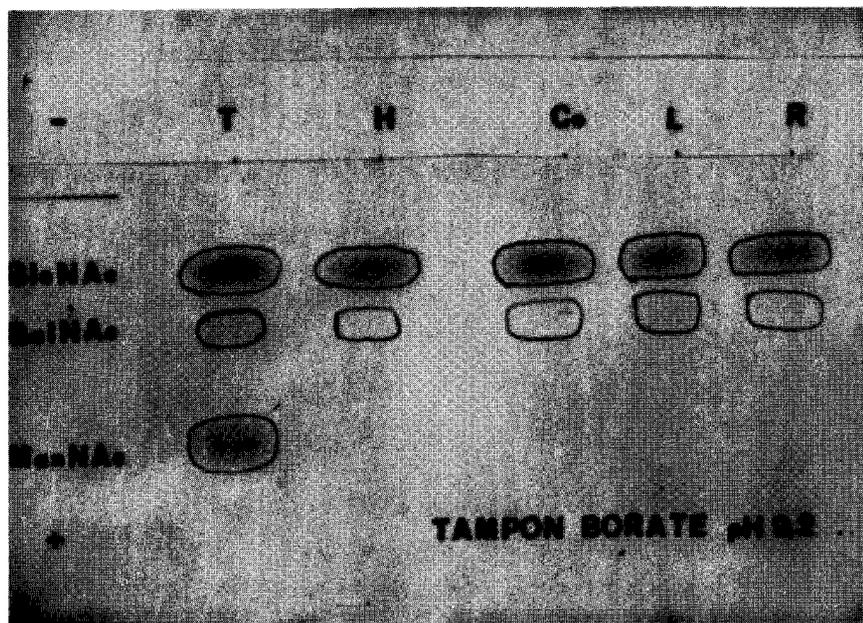
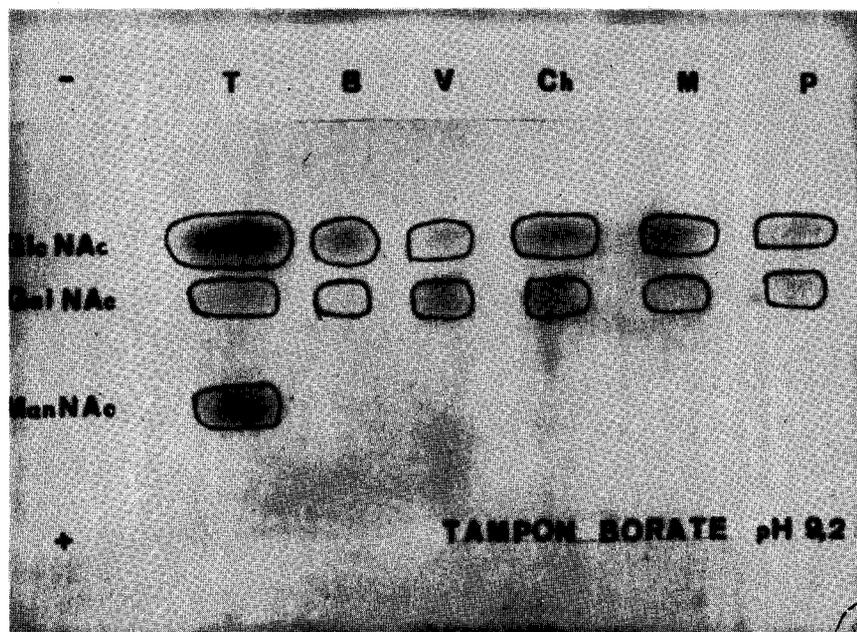


Figure 38



Figures 37 et 38

Comportement électrophorétique des N-acétylosamines obtenues par la N-réacétylation des osamines libérées par hydrolyse chlorhydrique (HCl 4N à 100°C pendant 4 h.) des adialysables des urines de Mammifères.

Electrophorèse réalisée en cuve en "toit". Tampon borate de pH 9,2 à 10 V/cm pendant 4 h. Révélation par la réaction d'EHRLICH "indirecte".

T : solution témoin de N-acétylglucosamine (GlcN-Ac), de N-acétylgalactosamine (GalN-Ac) et de N-acétylmannosamine (ManN-Ac) pures.

H : homme ; B : boeuf ; V : veau ; Ch : cheval ; M : mouton ; P : porc ; Co : cobaye ; L : lapin ; R : rat.

Les glycoprotides du cobaye, du lapin et du rat contiennent uniquement de l'acide N-acétyl-neuraminique comme l'urine humaine (Figure 39 ; p. 190).

Par contre celles du boeuf, du veau, du cheval, du mouton et du porc renferment dans des proportions variables non seulement de l'acide N-glycolyl-neuraminique et de l'acide N-acétyl-neuraminique mais aussi de l'acide N,O diacétyl-neuraminique et de l'acide N,O tri-acétyl-neuraminique (figure 40 ; p. 190).

#### 4° LES ACIDES URONIQUES

Toutes nos préparations glycoprotidiques comme le montre la figure 41 (p. 191) contiennent de l'acide glucuronique. Nous l'avons démontré par électrophorèse en tampon boraté (tampon de HAUGH et LARSEN (453)).

C'est le seul acide uronique que nous ayons pu mettre en évidence.

#### 5° CONCLUSIONS

L'étude des glycoprotides urinaires montre que le métabolisme de ces substances est le même chez toutes les espèces : la fraction adialysable des urines de Mammifères renferme toujours du galactose, du glucose, du mannose, du fucose, du xylose, des osarines, de l'acide N-acétyl-neuraminique et de l'acide glucuronique. Cependant la répartition de chacun de ces glucides varie d'une espèce à l'autre. Chaque espèce animale possède donc, en ce qui concerne les glycoprotides urinaires, une spécificité métabolique qui lui est propre.

Figure 39

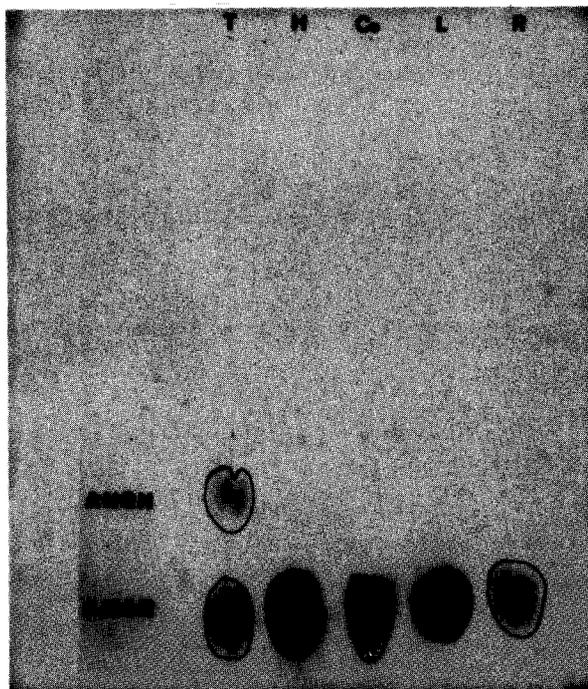
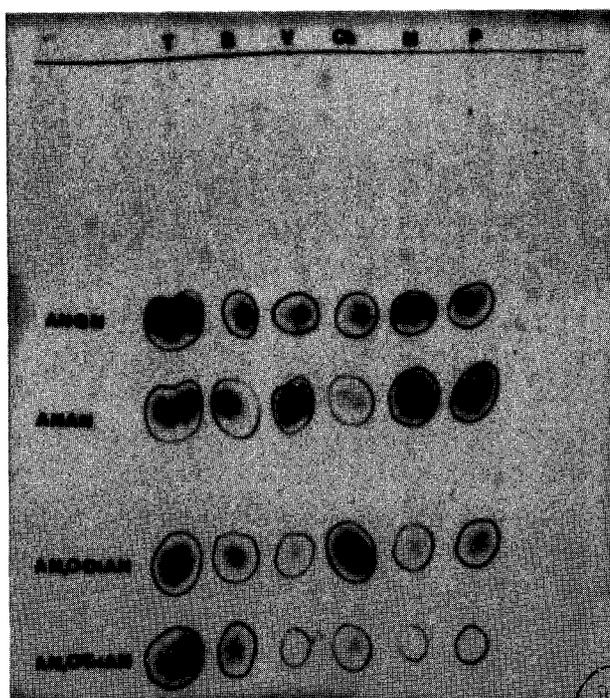


Figure 40



Figures 39 et 40

Comportement chromatographique des acides sialiques isolés des adialysables d'urines de Mammifères.

Système solvant : acétate d'éthyle/acide acétique/eau ( 3 : 1 : 3 )

Papier Whatman n°3 ; migration pendant 24 heures.

Révélation par le réactif d'EHRlich.

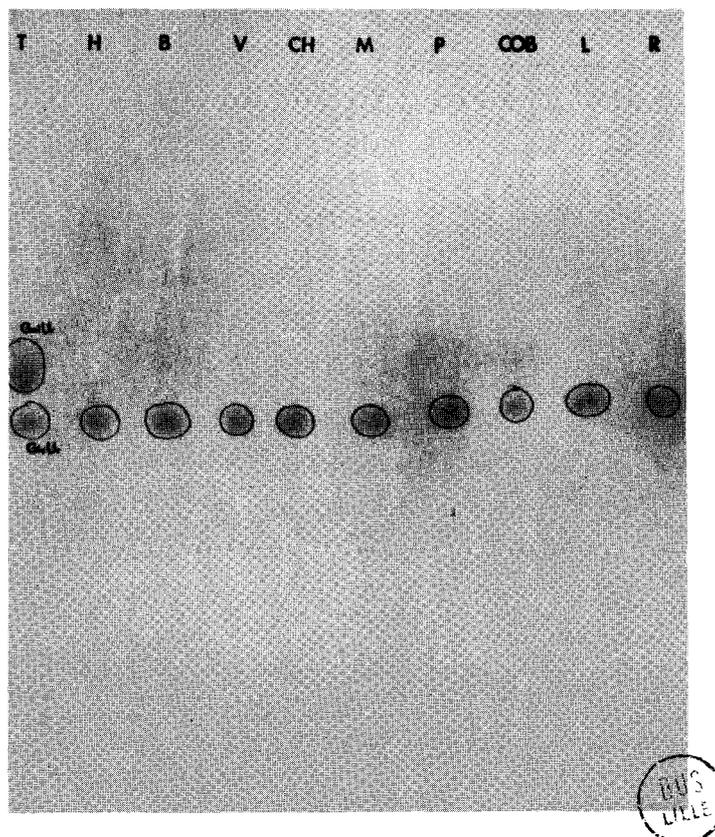


Figure 41

Identification par électrophorèse de l'acide uronique des adialysables des urines de Mammifères.

Cuve en "toit". Papier Whatman n°3. Tampon de HAUGH et LARSEN (454) de pH 9,2 , 7V/cm , pendant 15 heures.

Révélation par le réactif au naphtoresorcinol .

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'ensemble de ces travaux sont les suivantes :

1- par l'élimination systématique d'un certain nombre d'erreurs, nous sommes parvenue à mettre au point une méthode reproductible d'isolement des glycoprotides urinaires. Cette méthode nous a permis une exploration complète des glucides des urines humaines et de différents Mammifères en nous fournissant en deux fractions séparées les glucides libres et les glucides conjugués ou glycoprotides.

2- les tentatives d'exploration du matériel glycoprotidique par différentes méthodes de fractionnement chromatographique ne nous ont pas donné entière satisfaction en ce sens que nous ne sommes pas parvenue à isoler des entités bien définies. Ils nous ont cependant permis :

a -de confirmer l'origine mucopolysaccharidique du xylose urinaire

b- de préciser la composition du substrat en démontrant qu'il est en fait un mélange de glycoprotéines et de glycopeptides mélange qui se sépare d'ailleurs en deux fractions bien distinctes par chromatographie sur Séphadex G-50. La présence des glycopeptides permet ainsi d'expliquer la présence du glucose dans notre préparation.

c- d'isoler des fractions particulièrement riches en glucides : les fractions P<sub>7</sub> - P<sub>90</sub> et S<sub>9</sub>. Malgré leur hétérogénéité, les premières tentatives de sous-fractionnement de ces préparations nous laissent espérer que l'emploi combiné des procédés de fractionnement chromatographique et électrophorétique nous donnera la possibilité d'identifier des entités bien définies.

3- l'étude de la fraction dialysable des urines de l'homme, du boeuf, du veau, du cheval, du mouton, du porc, du cobaye, du lapin et du rat nous a montré qu'elles renferme des oses, des polyosides et de l'acide glucuronique à un taux voisin

de 1,5 g par litre. La nature de ces constituants glucidiques est la même quelle que soit l'espèce du Mammifère. La physiologie de l'excrétion des oses et oligosides dont la présence et le taux sont en grande partie liée à la nature de l'alimentation et des polyosides qui se rattachent au métabolisme des glycoprotéides, ne varie guère d'une espèce à l'autre.

4- l'étude des glycoprotides urinaires de l'homme et de différents Mammifères montre que le métabolisme de ces substances est le même chez toutes les espèces. Cependant une répartition des oses propres à chaque espèce animale lui donne une spécificité métabolique.

5- l'application de notre procédé d'isolement des glycoprotides aux dosages des glucides glycoprotidiques des urines de 24 heures d'individus en bonne santé nous a fourni des valeurs constantes statistiques. Nous avons vérifié que ni l'âge, ni le sexe, ni l'alimentation, ni l'activité n'influaient de façon sensible sur ces constantes.

Ces valeurs statistiques vont maintenant nous servir de référence dans l'étude des urines pathologiques et tout spécialement dans le problème de l'influence du cancer, un des buts essentiels de cet ensemble de travaux que nous avons entrepris.

## APPENDICE TECHNIQUE

### METHODES GENERALES D'ANALYSE

La bibliographie (p. 212) et la table des matières (p. 194) de l'Appendice technique sont indépendantes de la première partie du mémoire.

TABLE DES MATIERES

DES METHODES GENERALES D'ANALYSE

I - PROCÉDES DE DOSAGES DES GLUCIDES TOTAUX	195
A - <u>LES OSES NEUTRES</u>	195
1. <u>Principe</u> :	195
2. <u>Mode opératoire</u>	195
3. <u>Composition du témoin interne</u>	196
4. <u>Interférence des acides uroniques</u>	196
B - <u>LES ACIDES URONIQUES</u>	197
1. <u>Principe</u> :	197
2. <u>Mode opératoire</u>	198
3. <u>Interférence des oses</u>	198
C - <u>LES ACIDES SIALIQUES</u>	199
1. <u>Principe</u>	199
2. <u>Mode opératoire</u>	199
D - <u>LES OSAMINES</u>	200
1. <u>Principe</u>	200
2. <u>Mode opératoire</u>	200
a) <u>Hydrolyse chlorhydrique</u>	200
b) <u>Dosage</u>	200

II - DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLLAIRE

201

A - IDENTIFICATION ET DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE DES  
OSSES "NEUTRES" 201

1. Principe 201

2. Mode opératoire 202

a) Hydrolyse et révélations 202

b) Dosage 202

1°) Procédé de DATE modifié 203

2°) Procédé de MONTREUIL modifié 203

B - IDENTIFICATION ET DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE DES  
OSAMINES 203

1. Principe 203

2. Mode opératoire 204

a) Hydrolyse : 204

b) Identification des osamines et rapport molaire 204

1°) Méthode de désamination de GARDELL et coll 204

A - Principe 204

B - Mode opératoire 204

2°) Identification des N-acétylosamines 205

3°) Méthode chromatographique de GARDELL 206

C - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES SIALIQUES</u>	207
1. <u>Principe</u>	207
2. <u>Mode opératoire</u>	207
a) <u>Hydrolyse</u>	207
b) <u>Purification</u>	207
c) <u>Identification des acides sialiques</u>	208
D - <u>IDENTIFICATION DES ACIDES URONIQUES</u>	209
1. <u>Principe</u>	209
2. <u>Mode opératoire</u>	209
<b>III - ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE</b>	210
A - <u>PREPARATION DES IMMUN-SERUM</u>	211
B - <u>REALISATION DES IMMUNO-ELECTROPHORESES</u>	211
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	212

I PROCÉDES DE DOSAGES DES GLUCIDES TOTAUX

A - LES OSES NEUTRES

Nous avons dosé les oses neutres par la méthode colorimétrique à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (1) modifiée par RIMINGTON (2) en introduisant le terme de correction destiné à éliminer l'interférence des acides uroniques.

1. Principe :

Les aldohexoses et les méthylpentoses donnent, à chaud, et en milieu sulfurique une coloration jaune orangé intense, due à la condensation de l'orcinol avec les dérivés du furfural qui ont été caractérisés parmi les produits de dégradation des oses par l'acide sulfurique.

2. Mode opératoire :

On introduit successivement dans des tubes à essais très propres de même diamètre 1 ml de la solution à doser (100 à 400  $\mu$ g d'ose totaux) 2 ml d'une solution de 1,5 g d'orcinol pur dans 100 ml d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 30 p 100 (v:v) et 15 ml d'une solution aqueuse d'acide sulfurique pur à 60 p.100 (v:v).

Les solutions sont mélangées soigneusement à l'aide d'une tige de verre dont l'une des extrémités est aplatie et on maintient ensuite 20 minutes exactement dans un bain-marie à  $80^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Les tubes sont refroidis rapidement sous un courant d'eau et après un séjour de 45 minutes à l'obscurité, l'intensité de la coloration est déterminée à 510 nm. La coloration reste stable pendant 6 heures à la température du laboratoire et pendant 24 h à  $+ 2^{\circ}\text{C}$ .

### 3. Composition du témoin interne :

La réaction n'est pas rigoureusement reproductible et il est indispensable d'introduire dans chaque série de dosages un "témoin interne" renfermant 200  $\mu\text{g}$  de galactose, mannose et fucose dans les proportions respectives de 10 : 6 : 4. SPIK et MONTREUIL (3) ont en effet démontré que à quantités égales les différents oses donnent des colorations dont les absorbances varient dans de larges proportions. La solution de référence doit donc contenir les mêmes oses qui entrent dans la composition des glycoprotéides étudiés et dans des rapports de concentration identiques aux rapports molaires des différents oses préalablement déterminés par chromatographie sur papier selon le procédé de DATE (4).

### 4. Interférence des acides uroniques

Les acides uroniques donnent une coloration, non négligeable, avec le réactif à l'orcinoïl sulfurique, puisque, à quantités égales l'absorption des acides uroniques est la moitié de celle des oses (SPIK) (5). La présence d'acide glycuronique dans les urines nécessite donc l'introduction d'un terme de correction, grâce aux résultats fournis à la fois par l'existence d'une "solution témoin interne" d'acide glycuronique (50  $\mu\text{g}$  par ml) dans le dosage des oses neutres à l'orcinoïl sulfurique et par le dosage des acides uroniques par le carbazol sulfurique.

La teneur en oses neutres (en mg par ml de solution) est donnée par la formule suivante :

$$\frac{1}{1.000} \times \frac{4 \alpha_c - \beta d}{\frac{4 ac - db}{200}}$$

où

- $\alpha$  = absorbance de 1 ml de la solution à doser avec l'orcinol sulfurique,
- $c$  = absorbance de 50  $\mu$ g d'acide uronique avec le carbazol sulfurique,
- $\beta$  = absorbance de 1 ml de la solution à doser avec le carbazol sulfurique,
- $b$  = absorbance de 200  $\mu$ g d'oses avec l'orcinol sulfurique,
- $a$  = absorbance de 200  $\mu$ g d'oses avec l'orcinol sulfurique,
- $d$  = absorbance de 200 mg d'oses avec le carbazol sulfurique.

## B - LES ACIDES URONIQUES

Nous avons utilisé pour le dosage des acides uroniques la méthode au carbazol de DISCHE (6).

### 1. Principe :

Le dosage colorimétrique est fondé sur la réaction que donnent les acides uroniques avec le carbazol en milieu sulfurique : une coloration pourpre se développe, due comme pour les oses, à la réaction des dérivés furfuraliques formés par chauffage en milieu acide avec le carbazol.

2. Mode opératoire :

Dans des tubes à essais très propres on introduit 1 ml de la solution à doser (contenant au maximum 50 à 100 µg d'acide glycuronique) et 6 ml d'acide sulfurique concentré (en refroidissant dans un bain d'eau glacée). On mélange soigneusement et on maintient pendant 20 minutes exactement dans un bain-marie bouillant. On refroidit contre eau courante et on ajoute alors 0,2 ml d'une solution éthanolique de carbazol à 0,1 p 100 ml. Le mélange est de nouveau soigneusement agité.

Une coloration pourpre apparaît qui augmente d'intensité à l'obscurité. Après un séjour de 3 H à l'obscurité l'intensité de la coloration est mesurée à 535 nm.

3. Interférence des oses :

Les hexoses donnent avec le réactif au carbazol sulfurique une coloration jaunâtre. L'interférence des hexoses peut être éliminée en appliquant une formule de correction.

La quantité d'acide uronique total est donnée (en mg par ml de solution) par la formule :

$$\frac{1}{1.000} \times \frac{Ba - \alpha d}{\frac{4 ac - db}{200}}$$

où la signification des termes est identique à celle de la formule de correction des oses neutres.

C - LES ACIDES SIALIQUES

Les acides sialiques ont été déterminés par la méthode de NIAZI et STATE (7) modifiée par WERNER et ODIN (8).

1. Principe :

Les acides sialiques sous l'action des acides du réactif de DISCHE à la diphénylamine donnent un chromogène qui se condensant avec la diphénylamine fournit une coloration bleu-violacé.

2. Mode opératoire :

2 ml de la solution à doser (100 à 200  $\mu$ g d'acide sialique) sont introduits dans des tubes à essais et chauffés au bain-marie bouillant pendant 30 minutes exactement, en présence de 1 ml d'acide trichloracétique à 15 p 100 ml d'eau bidistillée et de 6 ml de réactif de DISCHE (diphénylamine: 1g, acide acétique glacial : 90 ml, acide sulfurique pur: 10 ml) après une soigneuse agitation.

On refroidit et les tubes sont maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes. La mesure de l'intensité de la coloration est effectuée à 530 nm.

Les dosages témoins sont faits avec une solution aqueuse contenant 100  $\mu$ g d'acide N-acétyl-neuraminique par ml.

La coloration est stable pendant 6 heures.



## D - LES OSAMINES

Les osamines ont été dosées suivant la méthode originale d'ELSON et MORGAN (9) modifiée par BELCHER et coll. (10).

### 1. Principe :

Les osamines, préalablement libérées de leur combinaison glucidique par une hydrolyse chlorhydrique, sont d'abord acétylées par l'action d'une solution alcaline d'acétylacétone. Il y a formation de plusieurs chromogènes que l'on condense ensuite avec le para-diméthylaminobenzaldéhyde. On provoque ainsi l'apparition d'une coloration rose-violacé.

### 2. Mode opératoire :

#### a) Hydrolyse chlorhydrique :

La solution à doses (500 à 1.500  $\mu\text{g}$  d'osamines totales) est d'abord évaporée à sec et hydrolysée pendant 4 heures en tubes scellés sous vide par de l'acide chlorhydrique. L'acide chlorhydrique utilisé est préalablement redistillé pour éliminer toute trace de sels de fer qui catalysent la destruction des osamines, surtout en présence d'oxygène.

Après refroidissement, l'hydrolysate est évaporé à siccité sous vide, ce qui élimine l'acide chlorhydrique. Le résidu sec est repris par une quantité d'eau bidistillée telle que la concentration en osamines ne dépasse pas 100  $\mu\text{g}$  par ml.

#### b) Dosage :

Dans des tubes à essais très propres à 1 ml de la solution à doser on ajoute successivement 1 ml d'une solution alcaline d'acétyl-acétone (2 ml d'acétyl-acétone pure pour 48 ml de solution de carbonate de sodium anhydre 1,25 N) et 2 ml d'eau bidistillée. Le mélange, bien agité, est maintenu bouché hermétiquement, au bain-marie bouillant pendant 10 minutes.

Il est ensuite refroidi, additionné de 5 ml d'éthanol absolu, agité et de nouveau placé au bain-marie à  $75^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes. 1 ml de réactif d'Ehrlich modifié (1,6g de para-diméthylaminobenzaldéhyde dissous dans 30 ml d'acide chlorhydrique concentré) est alors ajouté lentement et les tubes sont maintenus encore 30 minutes à  $75^{\circ}\text{C}$ .

Après refroidissement, ils sont de nouveau additionnés de 5 ml d'éthanol absolu. Après une dernière agitation soignée, ils sont laissés pendant 30 minutes à l'obscurité. Les absorbances sont mesurées à 520 nm. La coloration est stable pendant 24 h à l'obscurité.

Pour chaque série de dosage, on effectue un dosage de "témoin interne" sur 1 ml d'une solution contenant 50  $\mu\text{g}$  de glucosamine.

## II - DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLLAIRE

### A - IDENTIFICATION ET DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE DES OSES "NEUTRES"

#### 1. Principe :

Les oses "neutres" conjugués sont quantitativement libérés par une hydrolyse chlorhydrique. Les hydrolysats sont purifiés sur des échangeurs d'ions et les oses sont identifiés et dosés par chromatographie sur papier.

## 2. Mode opératoire :

### a) Hydrolyse et révélations

200 mg de glycoprotides urinaires sont hydrolysés à 100° C par 20 ml d'acide chlorhydrique 1,5 N pendant 2 h.

Après refroidissement, les hydrolysats sont dilués avec de l'eau distillée à 100 ml environ. Puis ils sont passés successivement sur des colonnes (2 X 40 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50 X 8, "mesh" 25-50 ; forme acide) et d'anions (Duolite A - 102-D ; "mesh" 25-50, forme formiate). Le liquide effluent auquel on joint les eaux de lavage des colonnes (500 ml) est concentré à 35°C sous vide à un faible volume (5 à 10 ml). L'évaporation à siccité est effectuée en dessiccateur en présence de soude, en ajoutant de temps en temps du méthanol pour éliminer les dernières traces d'acide chlorhydrique non retenu sur l'échangeur d'anions.

Le résidu sec est repris par 0,5 ml d'eau et soumis à l'analyse chromatographique sur papier dans les deux systèmes solvants suivants :

1. n-Butanol/acide acétique /eau (4 : 1 : 5) pendant 48 h sur papier Whatman n° 3 (PARTRIDGE)(11)
2. pyridine/acétate d'éthyle / eau (1 : 2 : 2) pendant 24 heures sur papier sleicher et schüll 2040 b (JERMYN et ISHERWOOD)(12).

La révélation des oses "neutres" est effectuée à l'aide du réactif au phtalate d'aniline de PARTRIDGE (13).

### b) Dosage

Les oses "neutres" sont dosés par deux procédés .

1°) Procédé de DATE (14) modifié :

Les tâches d'oses "neutres" révélées par le réactif au phtalate d'aniline sont traitées pendant 4 h à 20° par 10 ml d'une solution d'éthanol chlorhydrique (éthanol : 800 ml, acide chlorhydrique 1 N : 100 ml, eau : 100 ml) - procédé de HUGHES et JEANLOZ (15) et l'absorbance des solutions est mesurée à 400 nm. sur chaque chromatogramme, sont introduits des témoins internes contenant des quantités connues d'oses. La précision obtenue est de 1 p.100. (MONTREUIL, SPIK et KONARSKA) (16).

2°) Procédé de MONTREUIL (17) modifié :

Les rectangles de papier renfermant les oses, repérés grâce à des témoins latéraux que l'on révèle, sont élués avec de l'eau distillée et les oses sont dosés par une méthode réductimétrique au ferricyanure : les oses réduisent, en milieu alcalin le ferricyanure de potassium en ferrocyanure ; l'addition d'un sel ferrique provoque la formation de ferrocyanure ferrique (bleu de Prusse) que l'on maintient en solution par l'addition d'acide oxalique. Ce procédé est également précis à 1 p.100 près.

B - IDENTIFICATION ET DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE DES OSAMINES

1. Principe :

Les osamines sont d'abord libérées par une hydrolyse chlorhydrique. Elles sont ensuite identifiées :

- a) par désamination oxydative et identification du pentose formé
- b) par N-acétylation et identification des N-acétylosamines
- c) par chromatographie sur échangeur de cations

## 2. Mode opératoire :

### a) Hydrolyse :

Les hexosamines sont d'abord libérées du groupement polyosidique par une hydrolyse chlorhydrique réalisée dans les mêmes conditions que pour le dosage quantitatif (voir p. ) : acide chlorhydrique 4 N à 100° C pendant 4 h. L'acide chlorhydrique est ensuite éliminé par une évaporation prolongée en exsiccateur en présence de soude, en ajoutant de temps en temps 1 goutte de méthanol sur le résidu.

### b) Identification des osamines et rapport molaire

#### 1°) Méthode de désamination de GARDELL et coll (18)

##### A - Principe

La glucosamine (ou la mannosamine) et la galactosamine sont désaminées à chaud par la ninhydrine respectivement en arabinose et en lyxose.

##### B - Mode opératoire :

Le résidu sec de l'hydrolysate, repris par 25 ml d'eau distillée, est d'abord passé sur une colonne (2 X 10 cm) de Dowex 50 X 8 ("mesh" 25-50 ; forme acide) pour éliminer les oses "neutres". Les osamines sont ensuite déplacées par le passage de 100 ml d'acide chlorhydrique 1 N. Le liquide effluent est évaporé jusqu'à siccité.

Le résidu sec correspondant à 1 à 5 mg d'osamines est dissous dans 3 ml d'eau distillée. On y ajoute 1 ml d'une solution de ninhydrine (0,48 g de ninhydrine dans 100 ml de citrate de sodium 0,1 M de pH 4,7).

On maintient à 100°C pendant 30 minutes. La solution obtenue est filtrée et purifiée par un passage sur une colonne d'échangeur de cations (Dowex 50 X 8, "mesh" 25-50 - forme acide ; 2 X 10 cm) puis d'anions (Duolite A - 102 D, "mesh" 25-50 ; forme formiate ; 2 X 10 cm). Le liquide effluent, débarrassé de la ninhydrine et des produits de dégradation des acides aminés, est évaporé à siccité et le résidu est soumis à l'analyse chromatographique dans le système solvant de PARTRIDGE (19) (n-butanol/acide acétique/eau 4 : 1 : 5).

La révélation des taches de pentoses est effectuée à l'aide du réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (20) (coloration rose).

L'identification en est aisée puisque leurs valeurs de R-Glucose sont les suivantes :

Arabinose : 1,2

Lyxose : 1,4

## 2°) Identification des N-acétylosamines

La séparation électrophorétique des N-acétyl osamines est beaucoup plus facile que celle des osamines et elle permet l'identification des dérivés acétylés des trois osamines que les autres procédés, décrits ici même, ne parviennent pas à discriminer : la glucosamine, la galactosamine et la mannosamine. La réacétylation des osamines est très simple à réaliser et elle est quantitative.

La N-réacétylation est effectuée suivant le procédé de ROSEMAN et LUDOWIEG (21). Une partie aliquote de l'hydrolysate purifié sur échangeurs de cations et renfermant 2 mg d'hexosamines est dissoute dans 1 ml d'eau distillée. On ajoute à la solution 1,5 ml d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 0,5 g p. 100 ml puis 2 gouttes d'anhydride acétique. Le mélange est agité et laissé pendant 24 heures à la température du laboratoire.

On élimine ensuite les ions minéraux par un passage successif sur une colonne de Dowex 50 X 8 ; "mesh" 25 - 50 ; forme acide ; ( 2 X 15 cm ) puis de Duolite A - 102 D "mesh" 25 - 50 forme formiate ; ( 2 X 15 cm ).

L'éluat neutre, est lyophilisé et soumis à une analyse électrophorétique sur papier.

L'électrophorèse sur papier est réalisée avec une solution de borate de sodium à 1 g Pour 100 ml dans une cuve d'électrophorèse en "toit", sous une tension de 10 V/cm pendant 4 h. Les dépôts sont faits sur du papier Whatman n° 3. Après l'électrophorèse, les papiers sont immédiatement séchés à l'étuve à 105° C pendant 10 à 15 minutes et les chromogènes de KUHN formés en milieu alcalin par les N-acétyl-osamines sont immédiatement révélés par pulvérisation d'un réactif d'EHRlich modifié (22)

(p. diméthylaminobenzaldéhyde	1 g
Ethanol	30 ml
Acide chlorhydrique concentré	30 ml
n-butanol	180 ml

### 3°) Méthode chromatographique de GARDELL (23)

Le résidu sec d'une partie aliquote de l'hydrolysats chlorhydrique correspondant au minimum à 500 µg d'osamines totales est repris par 0,5 ml d'acide chlorhydrique 0,3 N. La solution est déposée au sommet d'une colonne d'échangeur de cations (Dowex 50 X 8, "mesh" 200 - 400 ; 0,7 X 40 cm), préalablement régénérée par l'acide chlorhydrique 4 N et lavée par 100 ml d'acide chlorhydrique 0,3 N. Après l'écoulement de la solution, les osamines sont déplacées par l'acide chlorhydrique 0,3 N. Des fractions de 0,5 ml sont recueillies toutes les 10 minutes à l'aide d'un collecteur automatique dans des tubes jaugés à 15 ml. Les osamines sont dosées dans chaque tube, après neutralisation par la soude 0,3 N, par la méthode de BELCHER, NUTTEN et SAMBROOK (24) précédemment décrite (voir p. ). Des courbes sont ensuite tracées : le premier pic qui apparaît est celui de la glucosamine (et (ou) de la mannosamine) et le second celui de la galactosamine.

Les quantités respectives de chaque osamine sont déterminées à  $\pm 5$  p 100 près en effectuant la somme des quantités dosées dans les tubes correspondant à chacun des pics.

Cette méthode permet donc à la fois l'identification et le rapport de la glucosamine et de la galactosamine.

## C - IDENTIFICATION DES ACIDES SIALIQUES

### 1. Principe :

Les liaisons des acides sialiques sont très labiles et ces composés sont libérés aisément par une hydrolyse sulfurique douce. Les acides sialiques sont ensuite purifiés sur échangeurs d'anions et soumis à l'analyse chromatographique sur papier.

### 2. Mode opératoire :

#### a) Hydrolyse :

L'hydrolyse des liaisons sialosyl est effectuée par l'acide sulfurique 0,1 N au bain-marie à 80°C (SVENNERHOLM)(25) pendant 1 heure. L'hydrolysate refroidi est amené à pH 6 par l'addition d'eau de baryte. Le précipité qui se forme est éliminé par filtration ou centrifugation et lavé plusieurs fois avec une solution aqueuse d'acide acétique à 1 p. 100.

#### b) Purification :

La solution est passée à 4°C successivement sur une colonne d'échangeur de cations (Dowex 50 X 8 "mesh" 25 - 50 ; forme acide ; 1 X 10 cm) puis sur une colonne d'échangeurs d'anions (Dowex 1 X 8 ; "mesh" 200 - 400 ; forme formiate 1 X 10 cm). Après un lavage soigneux, à l'eau distillée, les acides sialiques sont déplacés de l'échangeur d'anions par le passage de 150 ml d'acide formique 0,3 N (SVENNERHOLM)(26).

La solution d'élution est lyophilisée et le résidu sec est repris par de l'eau distillée pour être soumis à l'analyse chromatographique sur papier.

c) Identification des acides sialiques :

La chromatographie sur papier est réalisée dans les deux systèmes solvants :

- n-butanol/n-propanol/acide chlorhydrique 0,1 N (1 : 2 : 1) chromatographie descendante pendant 18 h, sur papier Whatman n° 1 (SVENNERHOLM et SVENNERHOLM) (27).
- Acétate d'éthyle/acide acétique/eau (3 : 1 : 3) chromatographie descendante pendant 18 à 24 h sur papier Whatman n° 3 (NORDAL et OISETH) (28).

Les acides sialiques sont révélés à l'aide d'un réactif au paradiméthylaminobenzaldéhyde (SVENNERHOLM et SVENNERHOLM) (29)

p. diméthylaminobenzaldéhyde	0,5 g
Acide trichloracétique	5 g
Ethanol/eau (v : v)	20 ml
n-butanol	60 ml

L'identification des acides sialiques par chromatographie sur papier ne présente aucune difficulté. Au contraire le problème de l'hydrolyse quantitative des liaisons sialyl, effectuée sans dégrader les acides sialiques libérés, reste entier, sauf en ce qui concerne le cas où le sialoconjugué ne renferme qu'un seul acide sialique. Dans l'état actuel de la question, l'analyse chromatographique n'est applicable qu'à l'identification des acides sialiques. Elle ne peut permettre de déterminer les rapports molaires dans lesquels sont répartis plusieurs acides sialiques dans un glycoprotide (SPIK) (30).

## D - IDENTIFICATION DES ACIDES URONIQUES

La détermination et la composition molaire en acides uroniques ne présente aucune difficulté lorsque ce dernier ne renferme qu'un seul type d'acide uronique. Au contraire, le problème devient insoluble quand plusieurs acides uroniques entrent dans sa composition. Il est en effet impossible de libérer quantitativement les acides uroniques sans les dégrader car les liaisons uronosidyl sont parmi les plus stables. Les méthodes chromatographiques et électrophorétiques de séparation sont donc essentiellement appliquées à l'identification de ces composés (SPIK) (31).

### 1. Principe :

Les acides uroniques sont identifiés dans la solution d'élution par l'acide formique de l'échangeur d'anion (Duolite A - 102 - D, "mesh" 25 - 50, forme formiate) utilisé pour la purification des hydrolysats chlorhydriques des glycoprotides (voir p. 108).

### 2. Mode opératoire :

Après le passage de l'hydrolysate sur les colonnes d'échangeurs de cations et d'anions (voir p. 108) la colonne de Duolite A - 102 D est soigneusement lavée à l'eau distillée. Les acides uroniques sont ensuite déplacés par le passage de 500 ml d'une solution aqueuse d'acide formique à 5 p.100 (v : v).

L'éluat est évaporé à siccité et le résidu est repris par de l'eau distillée à laquelle on ajoute 1 ou 2 gouttes d'ammoniaque de manière à obtenir les sels d'ammonium des acides uroniques par ouverture du pont lactonique.

La séparation des acides uroniques est plutôt obtenue par électrophorèse sur papier.

On effectue une première électrophorèse préparative à pH 3,9 en papier Whatman n° 1 dans une cuve en "toit" (tampon de MICHL (32) : pyridine/acide acétique/eau (3 : 10 : 487) ; 7 V/Cm pendant 15 h). On révèle une bande latérale de l'électrophorèse de façon à repérer l'endroit de migration des acides uroniques. Et par élution, on obtient la fraction pure des acides uroniques. Ceux-ci sont séparés par une seconde électrophorèse effectuée dans la même cuve, sur papier Whatman n° 3 dans le tampon boraté de HAUGH et LARSEN (33) (borate de sodium 0,01 M de pH 9,2 et 0,005 M en chlorure de calcium) pendant 15 h à 7 V/Cm.

La révélation est effectuée avec le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (34) après élimination des ions borate. Celle-ci est réalisée en pulvérisant sur les deux **faces** de l'électrophorégramme une solution de méthanol contenant 1 p 100 (v : v) d'acide acétique (SPIK) (35).

Après séchage des papiers à la température de la pièce, on pulvérise le réactif à l'oxalate d'aniline

La révélation peut être aussi effectuée avec le réactif au naphtorésorcinol de DEDONDER (36) (naphtorésorcinol 100 mg ; acide chlorhydrique 2 N : 20 ml ; éthanol absolu ou N - propanol q.s.p. 100 ml) qui révèle uniquement les acides uroniques. Ceux-ci apparaissent sous forme de tâches d'un bleu intense sur un fond rose.

### III - ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE

Les immuno-électrophorèses ont été réalisées selon les méthodes de SCHEIDEGGER (37) et de GRABAR et coll (38).

#### A - PREPARATION DES IMMUN-SERUM

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 d'huile de vaseline, 1 g de lanoline et 10 mg de BCG.

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

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

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

#### B - REALISATION DES IMMUNO ELECTROPHORESES

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

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

BIBLIOGRAPHIE

- BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.N., *Analyst.*, 1954, 72, 201 (10, 24)
- DATE J.W., *Scand. J. Clin. Lab., Invest.*, 1958, 10, 149 et *Scand. J. Clin. Lab., Invest.*, 1958, 10, 444 (4, 14)
- DEDONDER R., *Bull. Soc. Chim. France*, 1952, 19, 874 (36)
- DISCHE Z., *J. Biol. Chem.*, 1947, 167, 189 (6)
- ELSON L.A. et MORGAN W.T.J., *Biochem J.*, 1933, 27, 1824 (9)
- EHRlich modifié (réactif d') et PARTRIDGE S.M., *Biochem. Soc. Symp.*, 1950, 3, 52 (22)
- GARDELL S., *Acta, Chem. Scand.*, 1953, 7, 207 (23)
- GARDELL S., HEJKENSJOLD F. et ROCHNORLUND A., *Acta. Chem. Scand.*, 1950, 4, 97 (18)
- GRABAR P. et WILLIAMS C.A., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1955, 17, 65 (38)
- HAUGH A. et LARSEN B., *Acta. Chem. Scand.*, 1961, 15, 1395 (33)
- HUGHES R.C. et JEANLOZ R.W., *Biochemistry*, 1964, 3, 1535 (15)
- JERMYN M.A. et ISHERWOOD F.A., *Biochem. J.*, 1949, 44, 402 (12)
- MICHL H., *Monatsh. Chem.*, 1951, 82, 489 (32)
- NIAZI S. et STATE D., *Cancer Research*, 1948, 8, 653 (7)
- NORDAL A. et OISETH D., *Acta. Chem. Scand.*, 1951, 5, 1289 (28)
- PARTRIDGE S.M., *Biochem J.*, 1948, 42, 238 (11, 19)
- PARTRIDGE S.M., *Nature* 1949, 164, 443 (13)
- PARTRIDGE S.M., *Biochem. Soc. Symp.*, 1950, 3, 52 (20, 34)
- RIMINGTON C., *Biochem. J.*, 1940, 34, 931 (2)
- ROSEMAN S. et LUDOWIEG J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 300 (21)
- MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 1639 (17)
- MONTREUIL J., SPIK G. et KONARSKA A., *Méthodes chromatographiques de dosage des oses "neutres"*, Fasc. 3, Laboratoire de chimie biologique, Fac. Sci., LILLE ed., 1967, p. 66 (16)
- SCHEIDEGGER J.J., *Inter. Arch. Allergy. Appl. Immunol.*, 1955, 7, 103 (37)
- SPIK G., *Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. Diplôme d'études supérieures, LILLE*, 1964, p. 25 (5)
- SPIK G., *Deuxième mémoire Thèse Doctorat d'Etat, LILLE*, 1968 (30, 31, 35)
- SPIK G. et MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 50 (3)
- SVENNERHOLM L., *Acta. Soc. Med. Upsaliensis*, 1956, 61, 75 (25, 26)
- SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L., *Nature* 1958, 181, 1154 (27, 29)
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., *Biochem. Z.*, 1929, 215, 36 (1)
- WERNER I. et ODIN L., *Acta. Soc. Med. Ups.*, 1952, 57, 230 (8)

- ADA G. et GOTTSCHALK A., Austr. J. Science, 1952, 14, 160 (133)
- ANDERSON A.J., Biochem. J., 1954, 56, XXV (239)
- ANDERSON A.J., Biochem. J., 1967, 102, 719 (404)
- ANDERSON A.J., HOFFMAN P. et MEYER K., Biochem. Biophys. Acta 1963, 74, 309 (81)
- ANDERSON A.J., LOCKEY E. et MAC LAGAN N.F., Biochem. J., 1955, 60, XLI (240, 242, 245)
- ANDERSON A.J. et MAC LAGAN N.F., Biochem. J., 1955, 59, 638 (62, 192, 205, 225, 238, 241, 246)
- ANSETH A. et LAURENT T.C., Exptl. Eye Res., 1961, 1, 1, (71)
- ANTONOPOULOS C.A., FRANSSON L.A., HEINEGARD D. et GARDELL S., Biochem. Biophys. Acta, 1967, 148, 158 (74, 403, 408)
- ANTONOPOULOS C.A., GARDELL S. et HAMNSTROM B., J. Artheroscl. Res. Netherl., 1965, 5, 9 (65)
- ASTRUP P., Acta Pharmacol. Toxicol., 1947, 3, 165 (60, 96, 114)
- BASU D., Biochem. J., 1969, 112, 379, (182, 190)
- BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.N., Analyst, 1954, 79, 201 (362)
- BERENSON G.S. et DALFERRES E.R., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 101, 183 (88, 98, 107, 108, 112, 123, 332)
- BERENSON G.S. et SARRA M.T., Fed. Proc., 1959, 18, 190 (312)
- BERGGÅRD I., Acta Soc. Med. Upsalien., 1959, 64, 156 (33)
- BERGGÅRD I., Nature, 1960, 187, 776 (40)
- BERGGÅRD I., Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 413 (41)
- BERGGÅRD I., Arkiv Kemi., 1961, 18, 291 (157, 165, 169, 209, 282, 283, 285, 289, 290, 302, 317, 352, 356, 428, 430, 436)
- BERGGÅRD I., Arkiv Kemi., 1962, 18, 291 (34)
- BERGGÅRD I., CLEVE H. et BEARN A.G., Clin. Chim. Acta., 1964, 10, 1 (46)
- BEST C.H. et JAUQUES L.B., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1948, 49, 501 (120)
- BISERTE G., HAVAZ R. et HAYEM-LEVY A., Pathol. Biol. Semaine Hop., 1959, 7, 123 (38)
- BISERTE G., TAYEAU F., MONTREUIL J., HOLLEMAN J. et DAUTREVAUX M., Clin. Chim. Acta, 1956, 1, 115 (223, 446)
- BJORNESJO K B., WERNER I. et ODIN L., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1959, 11, 238 (320, 367)

- BLIX G., Acta. Chem. Scand., 1948, 2, 467 (296)
- BLIX G., Protides Of The Biological Fluids, 11ème colloque, Bruges, H Peeters ed. 1964 p. 303 (150)
- BOAS N.F., Proc. Soc. exp. Biol (N.Y) 1956, 92, 122 (347)
- BOAS N.F., in the amino Sugars, BALAZS E.A. et JEANLOZ R.W. ed. 1965 II A, 95 (319)
- BOAS N.F., in The amino Sugars, BALAZS E.A. et JEANLOZ R.W. ed. 1965, II A, 102 Acad. Press. New York and London (58, 366)
- BOURRILLON R., Communication personnelle (382)
- BOURRILLON R., CORNILLOT P. et DABAT M.T., Bull. soc. chim. Biol., 1965, 47, 1795 (18, 170)
- BOURRILLON R., CORNILLOT P. et GOT R., Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 506 (161, 168, 288)
- BOURRILLON R., GOT R. et CORNILLOT P., Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 730 (151, 160, 280, 392)
- BOURRILLON R., GOT R. et MICHON J., in Protides of the Biological Fluids, 8ème Colloque, Bruges, H. Peeters éd., 1960, p. 202 (159)
- BOURRILLON R., GOT R. et MICHON J., Clin. Chim. Acta., 1961, 6, 91 (279, 281)
- BOURRILLON R., GOT R. et MICHON J., Anal. Chem. 1961, 6, 91 (152, 392)
- BOURRILLON R. et GOUSSAULT Y., Carbohydrate Res. 1968, 8, 175 (14)
- BOURRILLON R. et KAPLAN J.C., Clin. Chim. Acta., 1960, 5, 732 (208, 259, 260, 273, 274)
- BOURRILLON R. et VERNAY J.L., Biochem. Biophys. Acta, 1966, 117, 319 (180, 185)
- BOYCE W.H., GARVEY E.K. et NORFLEET C.M., Jr, J. Clin. Invest. 1954, 33, 1287 (30)
- BOYCE W.H., KING J.S., LITTLE J.M et ARTOM C., J. Clin. Invest., 1958, 37, 1658 (156, 207, 256, 257, 264, 265, 272, 284, 304)
- BOWNESS J.M., Biochem. Biophys. Acta, 1965, 101, 27 (78)
- BRADA Z., Nature, 1963, 197, 592 (177)
- BRAUN S., Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris, 1959, 75, 17 (217)
- CARRION A., BOURRILLON R. et CABEZAS J.A., Clin. Chim. Acta, 1969, 25, 351 (171)

CHERIAN M.G. et RADHAKRISNAN A.N., Biochem. Biophys. Acta 1965, 101, 241 et Indian J., Biochem., 1966, 3, 101 (179, 188)

COHN W.E., in COLOWICK S.F. et KAPLAN N.O., Methods in Enzymology, Acad. Press éd., New York 1967, 3, 724 (400)

COPLEY A.L. et SCHEDORF J.G., Am. J. Physiol 1941, 133, 562 (117)

CORN PRODUCTS SALES COMPAGNY, Tech. Bull., Y 24-200 (338)

CORNILLOT P. et BOURRILLON R., Protides of the Biological Fluids, Elsevier ed. Amsterdam., 1964, 12, 320 (15)

CORNILLOT P., BOURRILLON R., MICHON J. et GOT R., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 71, 89 (45)

DATE J.W., Scand. J. Clin. Lab. Invest, 1968, 10, 149 et Scand. J. Clin. Lab. Invest, 1958, 10, 444 (9, 443)

DEDONDER R., C.R. Acad. Sci., 1950, 230, 997 (390)

DEFRATES J.S. et BOYDT M.J., Fed. Proc. 1953, 12, 194 (270)

DI FERRANTE N., J. Clin. Invest. 1957, 36, 1516 (128, 184, 232)

DI FERRANTE N., J. Lab. Clin. Med. 1963, 61, 633 (129)

DI FERRANTE N., Analytical Biochem, 1967, 21, 98 (314, 413)

DI FERRANTE N. et RICH C., J. Lab. Clin. Med. 1956, 48, 491 (63, 99, 204, 231, 324, 410, 414, 417, 418)

DI FERRANTE N. et RICH C., Clin. Chim. Acta. 1956, 1, 519 (83, 91, 127, 204, 262, 313, 323, 410, 414)

DISCHE Z., J. Biol. Chem. 1947, 167, 189 (271, 298, 351, 364, 379, 387, 421)

DISCHE Z., KAWASAKI H., ROTHSCHILD C., DANILCHENKO A. et ZINSSER H. H., Arch. Biochem. Biophys., 1964, 107, 209 (210, 286, 287, 299)

DISCHE Z. et SHETTLES L.B., J. Biol. Chem. 1951, 192, 579 (253, 276, 292, 337)

DOHLMAN C.H., Acta Physiol. Scand., 1956, 37, 220 (101)

DONAGGIO A., Atti R. Acad. Sc. Modena (Série IV) 1931, 4, 3 (203, 212)

DONAGGIO A., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1933, 8, 1456 (203, 213)

DONAGGIO A., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1934, 9, 184 (203, 214)

DZIEWIATKOWSKI D.D., J. Biol. Chem. 1956, 233, 239 (100)

ELLINGER, Analyse des Harns (NEUBAUER-HUPPER'S Lehrbuch) KREIDEL éd., Wiesbaden, 1910 (1)

ELSON L.A. et MORGAN W.T.J., Biochem. J. 1933, 27, 1824 (277, 336, 345, 363, 423)

- FLEURY P. et EBERHARD R., Ann. Biol. Clin. 1965, 23, 1175 (5)
- FLEURY P., MALANGEAU P. et EBERHARD R., Ann. Biol. Clin. 1960, 18, 115 (6)
- FOURMAN J., Brit. J. Exptl Pathol., 1960, 41, 536 (103)
- FRANKLIN E.C., J. Clin. Invest., 1959, 38, 2159 (27)
- FREUDENBERG K. et EICHEL H., Ann. Chem. 1934, 510, 240, Ann. Chem. 1935, 518, 97 (51)
- FUTTERMAN S. et ROE J.H., J. Biol. Chem. 1955, 215, 257 (7, 396)
- GARDELL S., HEJKENSJOLD F. et ROCHNORLUND A., Acta. Chem. Scand. 1950, 4, 97 (448, 452)
- GARDELL S., Acta, Chem. Scand., 1953, 7, 207 (447, 449, 450, 451)
- GOT R. BOURRILLON R., ~~Biochim. Biophys. Acta.~~ <sup>Nature 1961, 42, 505</sup> 1962, 58, 74 (50)
- GOTO S., SEKIMOTO H., KIYOMIYA H. et YAMAZOE S., Igaku to Seibutsugaku, 1955, 35, 202 (24)
- GOTTSCHALK A., Nature, 1952, 170, 662 (134, 136, 141)
- GOUBET B., Les glucides libres et combinés des urines de différents Mammifères, Diplôme d'Etudes Supérieures 1961, Faculté des Sciences, LILLE (318, 353, 357, 432, 440)
- GRANT G.H., J. Clin. Path., 1957, 10, 360 (25, 35, 148)
- GURIN S., BACHMAN C. et WILSON D.W., J. Biol. Chem. 1939, 128, 525 (47)
- GURIN S., BACHMAN C. et WILSON D.W., J. Biol. Chem., 1940, 133, 467, (48)
- GURIN S., BACHMAN C. et WILSON D.W., J. Biol. Chem., 1940, 133, 477, (49)
- HAKOMORI S.I., ISHIMODA T., KAWAUTI H. et EIDOH F., J. Biochem. (Tokyo) 1961, 49, 308 (196)
- HAKOMORI S.I., KAWAUCHI H. et ISHIMODA T., Nature 1961, 190, 265 (197)
- HAKOMORI S.I., KAWAUCHI H. et ISHIMODA T., Biochem, Biophys. Acta, 1962, 65, 546 (153, 173, 181, 187)
- HAMERMAN D. et HATCH F.T., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1955, 89, 279 (206, 249, 251)
- HAMERMAN D., HATCH F.T., REIFE A. et BARTZ KW., J. Lab. Clin. Med., 1955, 46, 848 (315, 333, 339, 346, 350, 354, 424, 427, 429, 433, 439)
- HAUGH A. et LARSEN B., Acta. Chem. Scand., 1961, 15, 1395 (453, 454)

- HAYEM-LEVY A., Cancer et glycoprotéides des liquides biologiques, Thèse de Pharmacie - LILLE, 1960 (42, 226, 230, 237, 243, 244, 250)
- HEREMANS J., Rev. Belge Pathol. Méd. Exptl., 1958, 26, 264 (222)
- HEREMANS J.F. et VAERMAN J.P., Clin. Chim. Acta., 1958, 3, 430 (66)
- HEREMANS M.T., VAERMAN J.P. et HEREMANS J.F., Protides of the 7 th Colloquium - Bruges, 1959, Elsevier, Amsterdam 1960, p. 396 (39)
- HEREMANS J.F., VAERMAN J.P. et HEREMANS M.T., Nature, 1959, 183 1606 (97)
- HODGSON G., FISHER S., PERETTA M., ESKUCHE I., ARAYA G. et DINAMARCA M., Blood, 1960, 16, 1398 (56)
- HODGSON G., PERETTA M., YUDILEVICH D. et ESKUCHE J., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1958, 99, 137 (55)
- HODGSON G. et TOHA J., Blood, 1954, 2, 299 (33)
- HUTTUNEN J.K., Ann. Med. Exptl. Biol. Fenniae (Helsinki) 1966, 44, suppl. 12, 3 (17)
- HUTTUNEN J.K. et MIETTINEN T.A., Analyt. Biochem., 1969, 29, 441, 458 (16)
- JAQUES L.B., Am. J. Physiol. 1939, 125, 98 (118)
- JAQUES L.B., NAPKE E. et LEVY S.W., Circulation Res. 1953, 1, 321 (122)
- JORPES J.E. et GARDELL S., Biol. Chem. 1948, 176, 267 (121)
- KAKETA H., Tohoku J. Exp. Med. 1958, 67, 319 (247)
- KALLEE E., DEBIASI S., KARYPIDIS C., HEIDE K. et SCHWICK H.G., Acta. Isotopica, 1964, 4, 103 (202)
- KANABROCKI, Communication personnelle (in HAMERMAN et HATCH Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1955, 89, 279), (255)
- KAO K.Y.T., HIZER C.A., DAWSON R.L. et MAC GAVACK T.H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1965, 119, 193 (80, 158, 211, 300, 303, 305, 306, 307, 331)
- KAO K.Y.T., LESLIE J.G. et MAC GAVACK T.H., Proc. Soc. Exp. Biol. and. Med., 1966, 122, 1129 (301)
- KAPLAN D. et MEYER K., J. Clin. Invest., 1962, 41, 743 (105)
- KASHIWAGI T., Igaku To Seibut sugaku, 1951, 18, 21 (221)
- KELLEY W.R., PONCET I.B. et DI FERRANTE N., Nature, 1963, 197, 1204 (73, 82)
- KERBY G.P., J. Clin. Invest. 1954, 33, 1168 (95, 261, 322)
- KEUTEL H.J., HERMANN G. et LIEHT W., Clin. Chim. Acta, 1959, 4, 665 (37)

- KING J.S. et BOYCE W.H., J. Clin. Invest., 1959, 38, 1927 (258)
- KING J.S. et BOYCE W.H., in High Molécular Weight Substances in human Urine, C. THOMAS éd., Springfield 111, U.S.A., 1963 p. 119 (166)
- KING J.S., BOYCE W.H., LITTLE J.M. et ARTCM C., J. Clin. Invest., 1958, 37, 315 (28 bis, 316, 340, 349, 354, 365, 426, 431, 433bis, 437, 438)
- KING J.S., FIELDEN M.L., et BOYCE W.H., Arch. Biochem. Biophys., 1960, 90, 12 (52)
- KING J.S., FIELDEN ML. et BOYCE W.H., Clin. Chim. Acta., 1962, 7, 316 (328)
- KING J.S., FIELDEN ML, GOODMAN H.O. et BOYCE W.H., Arch. Biochem. Biophys., 1961, 95, 310 (53, 167)
- KING J.S. et HYDER N., Proc. Soc Exptl. Briol. Med. 1955, 89, 42 (368)
- KING J.S., Jr et WARNOCK N.H., Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y), 1956, 92, 369 (348, 435)
- KLENK E., FAILLARD H. et LEMPFRID H., Zeit. Physiol. Chem., 1955, 301, 235 (138)
- KLEVSTRAND R. et NORDAL A., Acta. Chem. Scand., 1950, 4, 1320(391)
- KOBAYASI T., J. Biochem. Tokys 1938, 28, 31 (59)
- KOBAYASI T., J. Biochem. 1939, 30, 451 (94)
- KUHN R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 297 (10)
- LEYTON G.R., CONTRERAS E.G., BARRIGA R.B. et SCHLOTFELOT H.S., Clin. Chim. Acta., 1964, 9, 214 (194)
- LINKER A. et TERRY K.D., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1963, 113, 743, (75)
- LINKER A., TERRY K. et TELLER W.M., Fédération Proc. 1962, 21, 170. (76)
- LOEWI G., Ann. Rheum. Dis., 1959, 18, 239 (309,327)
- LUNDBLAD A. et BERGGÅRD I., Biochem. Biophys. Acta., 1962, 57, 129
- LUNDBLAD A., Biochem. Biophys. Acta., 1965, 101, 46 (162, 186)
- LUNDBLAD A., Biochem. Biophys. Acta., 1965, 101, 177 (163, 186)
- LUNDBLAD A., Biochim. Biophys. Acta., 1967, 148, 151 (12, 164)
- LUNDBLAD A., Biochim. Biophys. Acta., 1968, 165, 202 (13)
- Mc GALE E.H.F. et JEVONS F.R., Clin. Chim. Acta., 1966, 14, 528 (174, 406)
- MAC GALE E.H.F. et JEVONS F.R. Clin. Chim. Acta., 1967, 17, 441 (175, 189)

- Mc GARRY E., SEHON A.H. et ROSE B., *J.Clin. Invest.* 1955, 34, 832 (31)
- MAROTEAUX P. et LAMY M., *Rev. Franc. Etudes Clin. Biol.*, 1961, 6, 481 (411, 415)
- MASAMUNE H., HAKOMORI S.I. et SUGO T., *Tohoku J. Expl. Med.* 1959, 69, 383 (172, 183, 199)
- MASAMUNE H., TSUIKI S., KAMIYAMA S., KAKETA H., HAGA M., KAWASAKI H. et ABE S., *The Tohoku J. Exptl. Med.*, 1958, 67, 309 (198)
- MATHEWS M.B., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1961, 48, 402 (67)
- MAXFIELD M., *Science*, 1958, 128, 1087 (233, 235)
- MAXFIELD M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 85, 382 (235)
- MAXFIELD M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, 89, 281 (236)
- MAXFIELD M. et STEFANYE D., *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 2522 (135, 139)
- MAYES J. et HANSEN R.G., *Anal. Biochem.*, 1965, 10, 15 (77)
- MEYER K., DAVIDSON E., LINKER A. et HOFFMAN P., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1956, 21, 506 (70)
- MEYER K., GRUMBACH M., LINKER A. et HOFFMAN P., *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1958, 39, 664 (190, 311, 412, 416)
- MIETTINEN T.A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1962, 14, 380 et *Clin. Chim. Acta.*, 1963, 8, 693 (154, 155)
- MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 1639 (444)
- MONTREUIL J., *3e Coll. Hôp. St Jean-Brûges* 1955-209, (21)
- MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, 395 (11)
- MONTREUIL J. et BOULANGER P., *C.R. Acad. Sci.*, 1953, 236, 337 (20, 388, 393, 397, 398, 445 bis)
- MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R. et MULLET S., *C.R. Soc. Biol.*, 1960, 154, 732 (407)
- MONTREUIL J. et SPIK G., *Microdosage des glucides. Monographies Lab. Chim. Biol. Fac. Sci. LILLE*, 1968, 1 (371, 381)
- MORNER K.A.H., *Scand. Arch. Physiol.*, 1895, 6, 332 (28, 57)
- NAKAYAMA T., *J. Physiol. Soc. Japan*, 1956, 18, 553 (228)
- NANTO V., *Acta. Chem. Scand.* 1963, 17, 856 (69)
- NIAZI S. et STATE D., *Cancer Res.*, 1948, 8, 653 (360)
- ODIN L., *Nature*, 1952, 170, 663 (137, 142)
- ODIN L., *Acta., Soc. Med. Ups.*, 1959, 64, 25
- PARFENTJEV I.A. et PERLZWEIG W.A., *J. Biol. Chem.*, 1933, 100 551 (93)

- PARTRIDGE S.M., Biochem J., 1948, 42, 238 (376, 383)
- PARTRIDGE S.M., Biochem. Soc. Symp., 1950, 3, 52 (377, 384)
- PATTE J.C., BALDASSAIRE G. et LORET J., Rev. Franç. Etudes Clin. Biol., 1958, 3, 960 (26, 36)
- PECHAN Z., J. Chromatog., 1963, 10, 104 (176)
- PECHAN Z., Néoplasma, 1964, 11, 279 (193)
- PELMANN G.E., TAMM I. et HORSEFALL F.L. Jr, J. Exptl. Med., 1952, 95, 99 (146)
- POORTMANS J.R. et VAN KERCHOVE, Clin. Chim. Acta. (442) 1962, 7, 229
- REINERT M. et WINTERSTEIN A., Arch. Intern. Pharmacodyn., 1939, 62, 47 (113, 116)
- RICH C., J. Lab. Clin. Med., 1959, 54, 381 (101, 325)
- RICH C. et MYERS P.L., J. Lab. Clin. Med., 1959, 54, 223 (310)
- RIGAS D.A. et HELLER C.G., J. Clin. Invest., 1951, 30, 853 (29)
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1940, 34, 931 (359, 420)
- RODEN L., Fed. Proc., 1964, 23, 484 (401)
- RODEN L., Fed. Proc., 1966, 25, 409 (402)
- ROSENFELD L., NEUHOF H. et MESTEL A.L., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1961, 107, 317 (115)
- SAHLSTED A.V., Skand. Arch. Physiol., 1916, 33, 183 (92)
- SCHLOSS B., Anal. Chem., 1951, 23, 1321 (254, 268, 335, 344)
- SCHMIDT M., Biochem. Biophys. Acta., 1962, 63, 346 (72)
- SCHULTZE H.E., SCHONENBERGER M., et SCHWICK G., Biochem Z., 1956, 328, 267 (44)
- SCOTT J.E., in Methods of Biochemical analysis, D. GLICK ed., 1960, 8, 145 (64)
- SCOTT T.A. et MELVIN E.H., Anal. Chem., 1953, 25, 1656 (252, 266, 334, 341)
- SEKIMOTO H., The Gunma J. Med. Sci., 1956, 5, 126 (229)
- SMITH W.S., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1960, 103, 562 (104)
- SORENSEN M. et HAUGAARD G., Biochem. Z., 1933, 260, 247 (275)
- SPIK G. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 50 (321, 369, 370, 372, 373, 374)
- SPRANGER J., TODT H. et WIEDEMANN H.R., Clin. Chim. Acta., 1967, 17, 142 (89, 108, 110, 124, 130)
- STRECKER G., Thèse Doctorat es-Sciences LILLE, 1970 (3, 8, 19, 22, 392, 394, 399)
- STRECKER G., GOUBET B. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1965, 260, 999 (395)

- SVENNERHOLM L., Acta. Soc. Med. Ups., 1957, 61, 287 (297)
- SZABO M.M. et ROBOZ-EINSTEIN E., Arch. Biochem. Biophys., 1962, 98, 406 (68)
- TAMM I., BUGHER J.C. et HORSFALL F.L., J. Biol. Chem., 1955, 212, 125 (147)
- TAMM I. et HORSFALL F.L., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (N.Y) 1950, 74, 108 et J. Exptl. Med., 1952, 95, 71 (61, 85, 132, 140, 224, 234, 263, 308)
- TAYEAU F., Tunisie Med., 1951, 29, 664 (218)
- TAYEAU F., Exp. Ann. Bioch. Med., 1954, 16, 215 (220)
- TAYEAU F., BISERTE G. MONTREUIL J. et MARQUEVIELLE S., C.R. Acad. Sci., 1953, 237, 627 (219)
- TAYEAU F., JENSEN R. et REISS D., Bull, Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 585 (227, 441)
- TAYEAU F. et NIVET R., J. Med. Bordeaux, 1957, 134, 813 (216)
- TELLER W.H., BURKE E.C., ROSEVEAR J.W. et Mc KENZIE B.F., J. Lab. Clin. Med. 1962, 59, 95 (330)
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem Z., 1929, 215, 36 (358, 375, 386, 412)
- TREVELYAN W.E., PROCTOR D.P. et HARRISSON J.S., Nature 1950, 444, 166 (378)
- TUNIS M. et WEINFELD H., Cancer Res., 1962, 22, 764 (201)
- VAERMAN J.P., HEREMANS J.F., Expérimentia., 1959, 15, 226 (43, 149)
- VARADI D.P., CIFONELLI J.A. et DORFMAN A., Biochim. Biophys. Acta., 1967, 141, 103 (79, 84, 86, 87, 106, 111, 125, 131, 409)
- VASSEUR E., Acta. Chim. Scand., 1948, 2, 693 (291)
- VERMOUSEK I. et BRADA Z., Clin. Chim. Acta., 1966, 13, 757 (178)
- WARREN L., J. Biol. Chem., 1959, 234, 1971 (295)
- WEBB T., ROSE B. et SEHON A.H., Can. J. Biochem. Physiol., 1958, 36, 1159 (32)
- WEICKER H., GRASSLIN D. et ADELMANN B., Clin. Chim. Acta., 1965, 11, 92 (200)
- WEIMER H.E. et MOSHIN J.R., Amer. Rev. Tuberc., 1952, 68, 594 (267, 342)
- WERNER I. et ODIN L., Acta. Soc. Med. Ups., 1952, 57, 230 (144, 145, 278, 293, 294, 361, 380, 422)
- WESSLER E., Clin. Chim. Acta., 1967, 16, 235 (90)
- WHITE A.A. et HESS W.C., Arch. Biochem. Biophys. 1956, 64, 57 (4, 397)
- Winzler R., in Méthods of Biochemical Analysis. D. GLICK. Ed. New York. Interscience. 1955, Vol 2, p. 298, (269, 343)