

N° d'ordre : 264

50376
1973
21

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1973
21

MEMOIRE

présenté

à l'Université des Sciences et Techniques de Lille
pour l'obtention du grade de Docteur Es-Sciences Physiques

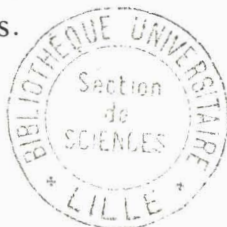
par

Bernard FOURNET

RECHERCHES SUR LA METHYLATION DES GLUCIDES

1° Etude critique des méthodes de perméthylation et mise au point de procédés d'identification des éthers méthyliques de monosaccharides neutres et de la glucosamine.

2° Application à la détermination de la structure d'oligosaccharides et de glycoprotides de diverses origines.



PRESENTE LE 5 JANVIER 1973 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M.M. J. MONTREUIL

Président

J.E. COURTOIS

Rapporteur

Z. GLACET

Mlle G. SPIK



D 030 177245 6

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I sous la direction du Professeur J. MONTREUIL. Il a bénéficié d'une aide du Centre National de la Recherche Scientifique (Equipe de Recherche Associée n° 320 : Structure et Métabolisme des glycoprotéines) auquel nous adressons nos vifs remerciements.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

Par ton travail incessant et ton abnégation tu m'as donné l'exemple du courage et de la continuité dans l'effort. Que cette thèse soit pour toi un témoignage de mon amour filial et de ma reconnaissance.

A MA FEMME

Tout au long de mes études tu as toujours été pour moi un soutien et un encouragement gardant sans cesse confiance. Ce travail en est l'aboutissement. Je te le dédie en témoignage de mon Amour.

A MES ENFANTS

A MA MERE

Tu as su, malgré ta lourde tâche d'épouse de Médecin et de mère, me guider et me conseiller. Ton courage et ta force de caractère ont été pour moi un exemple dont ce travail porte la marque. Je t'exprime toute mon affectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

Professeur de Chimie Biologique
à l'Université des Sciences et Techniques de Lille
Chef du Service de Biochimie Cellulaire
de l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille

Vous m'avez fait l'honneur de m'accueillir dans votre laboratoire où, au cours des années, vous m'avez accordé votre confiance et protigué vos conseils. C'est à votre contact et à travers votre exemple de pédagogue enthousiaste et de chercheur passionné que j'ai compris l'importance de notre travail d'enseignant et de chercheur.

Je vous exprime ici ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS

Professeur de Chimie Biologique
à la Faculté de Pharmacie de Paris

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites de siéger dans mon jury de thèse sachant l'intérêt que vous portez à la Chimie des sucres à laquelle vous avez consacré votre vie de chercheur.

Je tiens à vous assurer de toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Z. GLACET

Professeur de Chimie Organique
à l'Université des Sciences et Techniques de Lille

Vous m'avez marqué par votre enseignement du certificat de Chimie Organique et vous me faites l'honneur de juger ce travail.

Soyez assuré de la sincérité de mes remerciements.

A Mademoiselle G. SPIK

Maître de Conférences de Chimie Biologique
à l'Université des Sciences et Techniques de Lille

J'ai pu apprécier, à travers les sujets que nous exploitons ensemble, ta franche collaboration scientifique.

Je te suis très reconnaissant d'accepter d'examiner ce mémoire.

J'exprime mes plus vifs remerciements :

à Monsieur le Professeur J.K.N. JONES, de Kingston, qui m'a accueilli dans son Laboratoire et m'a fourni les témoins méthylés de l'arabinitol.

à Monsieur le Docteur H. MAYER, de Fribourg, qui a effectué les analyses en spectrographie de masse des éthers méthyliques du mannose.

à tous les membres de la souriante et enthousiaste équipe du Laboratoire et plus particulièrement à Mademoiselle G. SPIK, Messieurs B. BAYARD, S. BOUQUELET, P. CHARET et G. STRECKER dont la collaboration m'a été très précieuse.

à Monsieur L. GRIMMONPREZ qui m'a fourni les oligosaccharides du lait de Femme.

à Monsieur Y. LEROY qui m'a fait bénéficier de sa précieuse collaboration technique.

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, MM. LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE

DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

M. René DEFRETIN

Professeur de Biologie Marine
Directeur de l'Institut de Biologie
Maritime et Régionale de Wimereux

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	Physique
M. BLAYS Pierre	Géographie
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-chimie Industrielle

M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CAPET Marcel-Francis	Institut de Préparation aux Affaires
M. CELET Paul	Géologie
M. CONSTANT Eugène	Physique Industrielle-Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques Générales
M. DEFRETIN René	Biologie
M. DURCHON Maurice	Zoologie Générale et Appliquée
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radio-Electricité-Electronique
M. GEHU Jean-Marie	Institut Agricole
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. JOLY Robert	Biologie Animale
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Expérimentale
M. LOMBART Jacques	Sociologie
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. POUZET Pierre	Informatique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse supérieure
M. TILLEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. DELHAYE Michel	Chimie

M. FLATRES Pierre	Géographie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. PARREAU Michel	Mathématiques Appliquées
M. PRUDHOMME Rémy	Droit et Sciences Economiques
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANDAIS Jean	Chimie
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Mlle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. PANET Marius	I.E.E.A.
M. PROUVOST Jean	Minéralogie

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés de Fonctions)

M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques

M. AUBIN Thierry	Mathématiques
M. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	I.E.E.A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COULON Jean	I.E.E.A.
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique
M. DRIEUX Baudouin	I.E.E.A.
M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique
M. FONTAINE Jacques	Génie Electrique
M. FROELICH Daniel	Sciences Appliquées
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD de la Marre Jacques	I.E.E.A.
M. JOURNEL Gérard	Sciences Appliquées
Mlle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie Biologique
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie
M. LAURENT François	Automatique
M. LAVAGNE Pierre	Sciences Economiques et Sociales
Mlle LEGRAND Denise	Mathématiques
Mlle LEGRAND Solange	Mathématiques (Calais)
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LEROY Jean-Marie	Chimie

M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
Mme MAILLET Monique	Sciences Economiques
M. MAIZIERES Christian	I.E.E.A.
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques et Sociales
M. MANBRINI Jean	Biologie
M. MERIAUX Emile	Sciences de la Terre
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Chimie (Sciences Appliquées)
M. MUSSCHE Guy	Sciences Economiques
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. OLIVEREAU Jean-Michel	Biologie
M. OUZIAUX Roger	Technologie des Machines
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PERROT Pierre	Chimie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY Ladislas	Physique
Mme RENVERSEZ Françoise	Sciences Economiques et Sociales
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SALMER Georges	Radio-Electricité-Electronique
M. SEGUIER Guy	Electronique
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henri	Chimie
M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Chimie Biologique
M. THOMAS Daniel	Chimie Minérale Appliquée
M. TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
M. TREANTON Jean-André	Sciences Economiques et Sociales
M. VANDORPE Bernard	Chimie Physique
M. VILETTE Michel	Génie Mécanique
M. WATERLOT Michel	Géologie

TABLE DES MATIERES

	<u>INTRODUCTION</u>	I
	<u>GENERALITES</u>	4
	<u>LES PROCEDES DE PERMETHYLATION DES GLUCIDES</u>	5
I -	<u>PROCEDE DE PURDIE ET IRVINE</u>	5
II -	<u>PROCEDE DE HAWORTH</u>	9
III -	<u>PROCEDES DE METHYLATION DES GLUCIDES SOUS LA FORME DE COMPLEXES DU THALLIUM</u>	23
IV -	<u>PROCEDE DE METHYLATION EN PRESENCE DE SODIUM DANS L'AMMONIAC LIQUIDE</u>	25
V -	<u>PROCEDES DE METHYLATION PAR LE DIAZOMETHANE</u>	29
VI -	<u>PROCEDES DE KUHN ET COLL</u>	32
VII -	<u>PROCEDE DE HAKOMORI</u>	38
VIII -	<u>CONCLUSIONS GENERALES SUR LES METHODES DE METHYLATION</u>	43
	<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	45
	<u>INTRODUCTION</u>	46
	<u>MISE AU POINT DU PROCEDE DE PERMETHYLATION DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES</u>	48
	<u>CONTROLE DE LA PERMETHYLATION</u>	49
I -	<u>CONTROLE DE LA PERMETHYLATION PAR DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES</u>	49
A -	<u>ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE AVANT HYDROLYSE</u>	49
B -	<u>ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE APRES HYDROLYSE</u>	50
II -	<u>CONTROLE DE LA PERMETHYLATION PAR UNE METHODE SPECTROSCOPIQUE</u>	54

III - <u>CONTROLE DE LA PERMETHYLATION PAR DES METHODES CHIMIQUES</u>	59	
IV - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LE CONTROLE DE LA PERMETHYLATION</u>	65	
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;"> ETUDE CRITIQUE DES DIVERS PROCEDES DE PERMETHYLATION </td> </tr> </table>	ETUDE CRITIQUE DES DIVERS PROCEDES DE PERMETHYLATION	67
ETUDE CRITIQUE DES DIVERS PROCEDES DE PERMETHYLATION		
I - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	67	
A - <u>ORIGINE ET COMPOSITION DE L'OVOMUCOIDE</u>	67	
B - <u>PREPARATION ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES</u>	68	
C - <u>COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE DES GLYCOPEPTIDES</u>	69	
II - <u>ETUDE CRITIQUE DES DIFFERENTS PROCEDES DE PERMETHYLATION</u>	74	
A - <u>METHYLATION DES GLYCOPEPTIDES PAR LA METHODE DE HAWORTH</u>	74	
B - <u>METHYLATION DES GLYCOPEPTIDES PAR LES METHODES DE KUHN</u>	78	
C - <u>METHYLATION DES GLYCOPEPTIDES PAR LA METHODE DE HAKOMORI</u>	83	
D - <u>METHYLATION DES GLYCOPEPTIDES PAR LA METHODE DE HAKOMORI MODIFIEE</u>	84	
E - <u>CONCLUSIONS GENRALES SUR LA PERMETHYLATION DES GLYCOPEPTIDES ET DES OLIGOSACCHARIDES</u>	87	
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;"> MISE AU POINT DE PROCEDES DE FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS DE GLYCOPROTIDES PERMETHYLES IDENTIFICATION DES ETHERS METHyliQUES DES MONOSACCHARIDES LIBERES PAR HYDROLYSE OU METHANOLYSE DES GLYCANNES METHYLES </td> </tr> </table>	MISE AU POINT DE PROCEDES DE FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS DE GLYCOPROTIDES PERMETHYLES IDENTIFICATION DES ETHERS METHyliQUES DES MONOSACCHARIDES LIBERES PAR HYDROLYSE OU METHANOLYSE DES GLYCANNES METHYLES	89
MISE AU POINT DE PROCEDES DE FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS DE GLYCOPROTIDES PERMETHYLES IDENTIFICATION DES ETHERS METHyliQUES DES MONOSACCHARIDES LIBERES PAR HYDROLYSE OU METHANOLYSE DES GLYCANNES METHYLES		
I - <u>PROCEDES DE RUPTURE DES LIAISONS GLYCOSIDIQUES DES GLYCOPEPTIDES PERMETHYLES</u>	90	

A - <u>HYDROLYSE</u>	90
B - <u>METHANOLYSE</u>	93
C - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LES PROCEDES DE RUPTURE DES LIAISONS GLYCOSIDIQUES DES GLYCOPEPTIDES OU DES OLIGOSACCHARIDES PERMETHYLES</u>	96
II - <u>PROCEDES D'IDENTIFICATION DES MONOSACCHARIDES METHYLES PRESENTS DANS LES GLYCOPEPTIDES PERMETHYLES</u>	98
A - <u>METHODES D'ANALYSE DES ETHERS METHYLIQUES DES OSAMINES</u>	I00
I - Chromatographie en phase gazeuse	I0I
2 - Chromatographie en couche mince	II3
3 - Chromatographie sur papier	II3
4 - Chromatographie sur résine échangeuse de cations	II4
B - <u>METHODES D'ANALYSE DES ETHERS METHYLIQUES DES MONOSACCHARIDES NEUTRES</u>	II9
I - Chromatographie sur papier	II9
2 - Chromatographie en couche mince	I26
3 - Chromatographie en phase gazeuse	I27
C - <u>PROCEDE DE FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS DE GLYCOPEPTIDES PERMETHYLES EN VUE DE L'IDENTIFICATION DES ETHERS METHYLIQUES</u>	I38
I - Principe	I38
2 - Mode opératoire	I38
3 - Résultats	I42
4 - Discussion	I49
D - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LES PROCEDES D'IDENTIFICATION DES MONOSACCHARIDES METHYLES</u>	I50
III - <u>SYNTHESE DES ETHERS METHYLIQUES TEMOINS</u>	I5I
A - <u>PREPARATION DES ETHERS METHYLIQUES DE LA D-GLUCOSAMINE</u>	I5I

B - <u>PREPARATION DES ETHERS METHYLIQUES DU D-MANNOSE</u>	156
C - <u>PREPARATION DES ETHERS METHYLIQUES DU D-GALACTOSE</u>	176
D - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA PREPARATION DES ETHERS METHYLIQUES TEMOINS</u>	183
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> APPLICATION DE LA PERMETHYLATION A L'EXPLORATION DE LA STRUCTURE D'OLIGOSACCHARIDES LIBRES ET CONJUGUES </div>	184
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> STRUCTURES DES GLYCANNES DE L'OROSOMUCOIDE DE L'OVOMUCOIDE ET DE LA TRANSFERRINE </div>	185
I - <u>ETUDE DES GLYCOPEPTIDES TOTAUX DE L'OROSOMUCOIDE</u>	185
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	186
B - <u>RESULTATS</u>	189
C - <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	193
II - <u>ETUDE DES GLYCOPEPTIDES DE L'OVOMUCOIDE</u>	194
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	194
B - <u>RESULTATS</u>	194
C - <u>DISCUSSION</u>	194
III - <u>ETUDE DES GLYCOPEPTIDES ISOLES DE LA TRANSFERRINE HUMAINE</u>	195
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	196
B - <u>RESULTATS</u>	198
C - <u>DISCUSSION</u>	202
IV - <u>CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA STRUCTURE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES</u>	203
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> STRUCTURES D'OLIGOSACCHARIDES ISOLES DE DIVERS MILIEUX </div>	206

I - <u>STRUCTURES DES OLIGOSACCHARIDES ISOLES DES HYDROLYSATS</u> <u>PARTIELS DE L'OROSOMUCOIDE</u>	206
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	206
B - <u>RESULTATS</u>	208
C - <u>DISCUSSION</u>	209
II - <u>STRUCTURES D'OLIGOSACCHARIDES DE GROUPE SANGUINS ISOLES</u> <u>DES URINES DE SUJETS NORMAUX</u>	211
A - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	211
B - <u>RESULTATS</u>	213
C - <u>DISCUSSION</u>	217
III - <u>STRUCTURES DES OLIGOSACCHARIDES ISOLES DES ACETOLYSATS</u> <u>DE GLYCOPEPTIDES DE L'OVOMUCOIDE</u>	217
A - <u>MODE OPERATOIRE</u>	217
B - <u>RESULTATS</u>	219
C - <u>DISCUSSION</u>	226
IV - <u>CONCLUSIONS</u>	227
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	228
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	233
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u>	243

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

=====

Les glycoprotéines constituent une classe de composés biologiques, dont l'importance est maintenant bien établie. Elles résultent de la conjugaison d'une fraction glucidique appelée glycane avec une fraction protidique.

La structure moléculaire d'une glycoprotéine pose donc trois problèmes :

- celui de la structure du glycane,
- celui de la structure du groupement protidique,
- celui du point d'attache entre le glycane et la protéine.

C'est au premier problème que nous avons plus particulièrement consacré nos recherches, dans le cadre d'un travail réalisé, en équipe, au laboratoire sur la méthodologie de la structure des glycanes.

L'étude chimique des glycanes fait intervenir un grand nombre de techniques qui permettent de déterminer successivement leur composition en monosaccharides, le mode d'enchaînement de ces derniers et les points d'attache des liaisons glycosidiques.

L'étude de la composition en monosaccharides d'un polysaccharide ou d'un glycane d'une glycoprotéine est importante pour connaître la nature et les proportions molaires de ces monosaccharides, mais elle ne fournit aucun renseignement sur la structure de la molécule. Or, seule la détermination de la structure des groupements polysaccharidiques permettra de comprendre les activités biologiques de la glycoprotéine. Témoins, les nombreuses glycoprotéines qui entrent dans la constitution des membranes cellulaires où elles jouent un rôle important dans la cohésion tissulaire et dans les phénomènes immunitaires : la paroi des hématies humaines possède les antigènes spécifiques des groupes sanguins A, B et O qui sont de nature glycoprotéique et dont la spécificité est liée à la structure même de la séquence terminale des groupements polysaccharidiques. De même, STAUB et TINELLI (1) ainsi que HEIDELBERGER (2) ont permis de préciser que la spécificité immunologique des polysaccharides des Pneumocoques était liée à certaines séquences oligosaccharidiques comme la liaison acide glucuronique $-(1 \longrightarrow 4)-$ glucose, spécifique du Pneumocoque III.

Les résultats des recherches sur la structure des glycanes des glycoprotéines sont le fruit de l'application de nombreuses techniques complémentaires : l'oxydation périodique, l'hydrolyse acide partielle, l'acétolyse, l'hydrolyse enzymatique et la perméthylation. Bien que cette technique ait été largement décrite et appliquée à l'étude de la structure d'oligosaccharides ou de polysaccharides, nous nous sommes rendu compte très vite que sa transposition à des hétéropolysaccharides, comme les glycoprotéines, posait de nombreux problèmes. Ainsi, la protéine joue un rôle protecteur vis-à-vis des agents de méthylation. La présence d'une proportion élevée d'acides aminés provoque une consommation très importante de groupements méthylés qui se fixent préférentiellement sur les fonctions amines, hydroxyles et thiols des amino-acides et sur les liaisons peptidiques. En outre, la protéine diminue la solubilité dans les solvants utilisés. Nous nous sommes donc efforcé, dans un premier temps, de résoudre le problème de la substitution quantitative des fonctions hydroxyles des monosaccharides présents dans les glycanes des glycoprotéines. Puis, après avoir précisé les conditions du contrôle de la perméthylation et de l'hydrolyse du glycanne perméthylé, nous décrirons un procédé de fractionnement des monosaccharides méthylés libérés par hydrolyse du glycopeptide perméthylé. Ce fractionnement est réalisé en deux temps : séparation par électrophorèse préparative sur papier des monosaccharides méthylés neutres, basiques et acides, suivie d'un fractionnement des monosaccharides neutres méthylés selon leur degré de substitution, c'est-à-dire, en composés mono, di, tri et tétraméthylés. Enfin, pour terminer cette première partie, nous décrirons les techniques qui nous ont permis d'isoler et d'identifier les éthers méthyliques des monosaccharides neutres : galactose, mannose et fucose des osamines, en particulier la glucosamine.

Dans une deuxième partie, nous appliquerons les techniques que nous avons mises au point à la détermination de la structure des glycopeptides et à une série d'oligosaccharides, dans le cadre d'un travail d'équipe sur la structure des oligosaccharides de l'urine et de diverses glycoprotéines (ovomucoïde, orosomucoïde, transferrine).

Nous ferons précéder l'exposé de nos travaux par une revue générale exhaustive de la méthylation des glucides. En effet, de nombreuses méthodes ont été publiées et nécessitent leur description. Quant aux techniques de contrôle de la perméthylation de rupture des liaisons glycosidiques des polysaccharides perméthylés et d'identifications des éthers méthyliques décrites par les auteurs, elles seront reprises rapidement, en discussion, dans la

partie expérimentale.

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

- 1 - B. FOURNET, G. TAKERKART, J. BROHON et J. MONTREUIL; Etudes sur les glycoprotéines. XXXIV - Structure de mannobioses isolés des hydrolysats acides partiels de l'orosomucoïde et de l'ovomucoïde., Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 7-8, 1351.
- 2 - J. MONTREUIL, M. MONSIGNY, G. SPIK, N. DUQUESNE, A. CHERON, J. DESCAMPS et B. FOURNET - Etudes sur les glycoprotéines. XXXV - Procédés d'exploration de la liaison glucide-peptide dans les glycoprotides. Hypothèse d'un codage par les chaînes peptidiques du point de conjugaison des groupements glycaniques., Z. physiol. Chem., 1969, 350, 664.
- 3 - B. FOURNET et J. MONTREUIL ; Recherches sur les glycoprotéines. XLIV - Identification des monosaccharides présents sous la forme de dérivés O-méthylés dans les hydrolysats de glycannes perméthylés., C.R. 6ème Symp. Intern. Chromat. Electroph. Bruxelles, 1970, Presses Eur. éd., Bruxelles, 1971, p. 248.
- 4 - B. BAYARD, B. FOURNET et G. STRECKER - Partial hydrolysis and acetolysis of glycoprotides. Abstracts 7th Meeting FEBS, VARNA 1971, Bulgarian Biochemical and Biophysical Society éd., 1971, 219.
- 5 - B. BAYARD, B. FOURNET, S. BOUQUELET, G. STRECKER, G. SPIK et J. MONTREUIL ; Etude sur les glycoprotéines. XLIX - Isolement et structure des oligosaccharides de la fraction neutre des acétolysats de glycopeptides de l'ovomucoïde. Carbohyd. Res. (sous presse).
- 6 - B. FOURNET et J. MONTREUIL ; Procédé d'identification et de préparation en phase gazeuse des éthers di, tri et tétraméthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside. J. Chromatog., (sous presse).

GENERALITES

Nous exposerons, dans ce chapitre, nos connaissances actuelles sur la méthylation des molécules glucidiques.

LES PROCÉDES DE PERMÉTHYLATION DES GLUCIDES

I - PROCÉDE DE PURDIE et IRVINE (3)A - Principes

Les premiers travaux sur la méthylation ont été communiqués en 1902 par PURDIE et IRVINE à la British Association. Un an après, ces deux auteurs (4), sous le titre "The Alkylation of sugars", publiaient la première méthode de méthylation des sucres. Ces auteurs ont essayé, dans un premier temps, de transposer les conditions utilisées par IRVINE en 1901 (5) pour méthyler le salicylaldéhyde en utilisant l'oxyde d'argent et l'iodure de méthyle pour l'alkylation des oses. Les résultats obtenus par les auteurs ont été décevants. En effet, lorsque l'oxyde d'argent est ajouté à la solution méthanolique de glucose contenant l'agent de méthylation : l'iodure de méthyle, le monosaccharide est détruit par oxydation et les auteurs isolent parmi les produits de dégradation, de l'oxalate de méthyle. L'utilisation de l'iodure d'éthyle dans les mêmes conditions conduit aux mêmes résultats.

Pour éviter ces réactions d'oxydation, il fallait donc masquer la fonction réductrice et travailler sur le méthyl-glycoside. Dans ce cas, le méthyl-glucoside dissous dans le méthanol réagit rapidement avec l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent. Le sirop visqueux obtenu après élimination des réactifs est soluble dans l'éther, n'a pas d'action sur la liqueur de Fehling et distille sous vide sans se décomposer. Dans ces conditions, les auteurs obtiennent, principalement, un méthyl-tri-O-méthyl-glucoside. La quantité de méthyl-tétra-O-méthyl-glucoside est encore faible quand la méthylation est réalisée avec de larges quantités de réactifs. Cet échec dans la substitution quantitative de toutes les fonctions hydroxyles est dû au fait que la réaction se déroule constamment dans le méthanol. Or, en présence de l'iodure de méthyle, nous avons l'équilibre :



qui est déplacé vers la droite en présence d'oxyde d'argent et d'un excès d'iodure de méthyle. Au lieu de servir à la méthylation du méthyl-glucoside, une partie de l'iodure de méthyle est utilisée pour méthyler le solvant. Cette réaction concurrente impose une limite à la méthylation et constitue le principal facteur qui s'oppose, dès le départ, à une perméthylation du monosaccharide.

Cependant, la perméthylation peut être réalisée en tirant parti du fait que les glucosides, partiellement méthylés obtenus par ce premier cycle de méthylation, sont parfaitement solubles dans l'iodure de méthyle. La solution des éthers méthyliques dans l'iodure de méthyle réagit rapidement avec l'oxyde d'argent et le méthyl-tétra-O-méthyl-glucoside peut être préparé. Le sirop ainsi obtenu bout à 144-145° sous 17 mm de mercure. L'hydrolyse du produit obtenu fournit du perméthyl-glucose qui distille à 182-185°C sous 20 mm de mercure. Le distillat cristallise en longues aiguilles dont le point de fusion est de 81-83°C.

B - Protocole expérimental original de PURDIE et IRVINE

Il nous a paru intéressant, à titre historique, de décrire les méthodes originales des anciens auteurs, mais, afin d'éviter d'alourdir notre texte, nous le ferons figurer dans l'appendice technique (voir p.246). Cette technique de méthylation a permis aux auteurs de synthétiser le perméthyl-glucose qui constituait le premier monosaccharide méthylé pur, isolé à l'état cristallisé.

C - Applications de la méthode de méthylation

Dès cette époque, ces auteurs appliquèrent leur méthode de méthylation à l'étude de la structure des monosaccharides : structure cyclique de l'ose, anomérie α et β , et des oligosaccharides : détermination des points d'attache des liaisons osidiques.

C'est ainsi que dans le même mémoire original décrivant leur méthode de méthylation, PURDIE et IRVINE (6) appliquent leur procédé au sucre de canne. Les conditions opératoires étaient peu différentes de celles décrites pour la méthylation du méthyl- α -glucoside.

Une mole de sucre de canne dissoute dans 3 ml d'eau chaude est additionnée à 20 ml de méthanol. 20 moles d'iodure de méthyle et 10 moles d'oxyde d'argent sont ajoutées par petites portions à la solution. Lorsque tous les réactifs sont additionnés, le mélange réactionnel est chauffé quatre heures. Après refroidissement, on filtre et les sels d'argent sont lavés par du méthanol. La solution de sucres méthylés est évaporée et le résidu soumis à deux nouveaux cycles de méthylation dans les mêmes conditions. Enfin, la dernière réaction de méthylation est effectuée sans méthanol.

L'hydrolyse de l'oligosaccharide méthylé par de l'acide chlorhydrique à 1,5 p. 100 pendant 30 min fournit, après purification, des cris-

taux de tétra-O-méthyl-glucose, la partie non cristallisée contenant fort probablement le tétra-O-méthyl-fructose.

En 1904, PURDIE et IRVINE (7) étudient les propriétés optiques du méthyl-tétra-O-méthyl-glucoside et du tétra-O-méthyl-glucose. Ils démontrent que 70 p. 100 du méthyl-tétra-O-méthyl- β -glucoside sont formés par action du mélange méthanol/chlorhydrique sur le tétra-O-méthyl-glucose alors que la même réaction sur le glucose produit, préférentiellement, le dérivé méthyl- α -glucoside. De même, ces auteurs observent une différence dans les vitesses d'hydrolyse des dérivés méthyl-tétra-O-méthyl- α et β -glucosides, l'anomère β étant hydrolysé plus rapidement que l'anomère α .

La même année, IRVINE et CAMERON (8) publient les résultats qu'ils obtiennent sur la méthylation du galactose. Les conditions expérimentales (méthylation dans le méthanol à l'aide de l'iodure de méthyle et de l'oxyde d'argent) étaient identiques à celles utilisées pour perméthyliser le méthyl- α -glucoside. Les observations effectuées sur les dérivés méthyl-tétra-O-méthyl- α et β -galactosides comme les vitesses d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique, concordent avec celles décrites au sujet des méthyl-tétra-O-méthyl-glucosides.

En 1905, PURDIE et IRVINE (9) utilisent le tétra-O-méthyl-glucose comme monosaccharide de départ dans la synthèse d'un disaccharide octa-O-méthylé. La réaction est effectuée par chauffage du tétra-O-méthyl-glucose dans l'éther contenant 0,4 p. 100 d'acide chlorhydrique ou dans le benzène contenant 0,25 p. 100 d'acide chlorhydrique. Après purification, le résidu obtenu ne réduisait plus la liqueur de Fehling et contenait le mélange des disaccharides $\text{glc}(1 \longleftrightarrow 1)\text{glc}$ non réducteurs. Dans la même publication, ces deux auteurs décrivent la préparation de l'octa-O-méthyl-saccharose et de l'octa-O-méthyl-maltose à partir de ces deux disaccharides.

La même année, IRVINE et MOODIE (10) travaillant sur le manose signalent, dès cette époque, des différences de comportement entre ce monosaccharide, le galactose et le glucose. Ainsi, l'action du mélange méthanol/chlorhydrique sur le perméthyl-mannose fournit, presque exclusivement, le méthyl-tétra-O-méthyl- α -mannoside alors que le même traitement réalisé sur les dérivés perméthylés du glucose et galactose fournit le mélange des deux anomères.

IRVINE et ROSE (11) en 1906 appliquent le protocole de méthylation à un glucoside : la salicine (ou salicoside). Ils obtiennent une penta-

O-méthyl-salicine qui cristallise (point de fusion : 62-64°) et qui, par hydrolyse, fournit le perméthyl-glucose.

En 1907, PURDIE et PAUL (12) publient leurs résultats sur la méthylation d'un cétose : le fructose. Les méthodes de préparation de l'éther perméthylique sont identiques à celles appliquées par PURDIE et IRVINE (13) en 1903 au méthyl- α -glucoside. Cependant, les auteurs mentionnent la grande difficulté qu'ils ont rencontrée pour cristalliser le méthyl-tétra-O-méthyl-fructoside. Leur article est intéressant car il fait le point des connaissances sur les propriétés des méthyl-tétra-O-méthyl-hexosides synthétisés. Ainsi, les auteurs remarquent que la substitution des groupements hydroxyles des monosaccharides lors de la réaction de méthylation ne change pas considérablement le pouvoir rotatoire de ce dernier. Par exemple, le glucose a un pouvoir rotatoire de + 106°, l'anomère α du tétra-O-méthyl-glucose a un pouvoir rotatoire de + 101°. Cette remarque se vérifie dans le cas du fructose ; le cétohexose ayant un pouvoir rotatoire de - 104°, son dérivé perméthylé : - 124°. La deuxième remarque concerne le taux relatif de synthèse des anomères α et β lors de la méthylosidation. Ainsi, les dérivés perméthylés des hexoses et du fructose donnent préférentiellement l'anomère α lorsque la méthylosidation est effectuée avec le mélange méthanol/chlorhydrique alors qu'il se forme l'anomère β si la réaction est conduite dans les conditions de méthylation : iodure de méthyle et oxyde d'argent.

Il convient, enfin, de signaler l'utilisation de la méthode de PURDIE et IRVINE dans la méthylation des oligosaccharides ou des polysaccharides partiellement méthylés. Ce procédé est largement utilisé pour compléter la substitution des fonctions hydroxyles après un premier cycle de méthylation dans les conditions des auteurs précédemment cités ou après d'autres méthodes de méthylation comme dans le mode opératoire de KUHN, BAER et GAUHE (14) qui font suivre le premier cycle de méthylation dans la diméthylformamide, iodure de méthyle, oxyde d'argent de plusieurs cycles à reflux dans l'iodure de méthyle et l'oxyde d'argent. Le protocole expérimental est le suivant : le polysaccharide partiellement méthylé est dissous dans 1 à 4 fois son poids d'iodure de méthyle. On ajoute éventuellement de l'acétone ou du méthanol si le composé se dissout difficilement. La solution, additionnée de sulfate de calcium ou de sulfate de sodium anhydre pour assurer la déshydratation du milieu, est ensuite chauffée à reflux et sous agitation pendant 12 à 20 heures. Pendant cette période, quatre ou cinq additions d'oxyde d'argent, fraîchement préparé, correspondant à 2 à 4

fois le poids du produit de départ, sont effectuées toutes les trois à quatre heures. Le mélange refroidi est ensuite filtré et le filtre est lavé avec du chloroforme. Le filtrat est évaporé à sec et peut être redissous dans l'iodure de méthyle pour être soumis à un nouveau cycle.

D - Conclusions

En conclusion, nous pouvons dire, à propos de cette première méthode de méthylation, que si des monosaccharides ou des oligosaccharides ont pu être perméthylés, le rendement de la réaction est très faible. La cause de ce demi échec est l'utilisation du méthanol comme solvant de méthylation. Pour augmenter le degré de méthylation d'un monosaccharide ou d'un polysaccharide, il faut donc s'adresser à un solvant autre que le méthanol.

En 1915, HAWORTH a montré que la méthylation peut s'accomplir de manière satisfaisante en milieu aqueux en prenant le sulfate de méthyle comme agent méthylant.

II - PROCÉDE DE HAWORTH (15)

A - Principe

Le procédé original de méthylation des polysaccharides doit être attribué à DENHAM et WOODHOUSE (16) qui, en 1913, utilisèrent le sulfate de méthyle comme agent de méthylation de l'alcali-cellulose. Cette "prise de date" est mentionnée dans la revue générale sur la méthylation des polysaccharides publiée en 1922 par IRVINE, STEELE et SHANNON (17). Dans leur premier article, DENHAM et WOODHOUSE précisait que la méthylation de la cellulose pouvait être effectuée par le sulfate de méthyle après qu'elle ait été imprégnée dans une solution de soude à 15 p. 100. La cellulose méthylée gardait sa structure fibreuse, mais, suivant le degré croissant de méthylation, la substance séchée devenait de plus en plus rugueuse.

L'année suivante, ces mêmes auteurs (18), par hydrolyse de la cellulose méthylée, isolent un dérivé tri-méthylé du glucose qu'ils parviennent à cristalliser. Ce dérivé tri-méthylé unique est en faveur d'une structure "symétrique" de la cellulose. La structure exacte de ce triméthyl glucose n'a pas été élucidée. Les quatre structures possibles pour ce dérivé triméthylé sont données dans la figure 1 (p. 10). Le dérivé triméthylé isolé de la cellulose ne donne pas d'osazone, la structure I est donc exclue. Un dérivé tri-

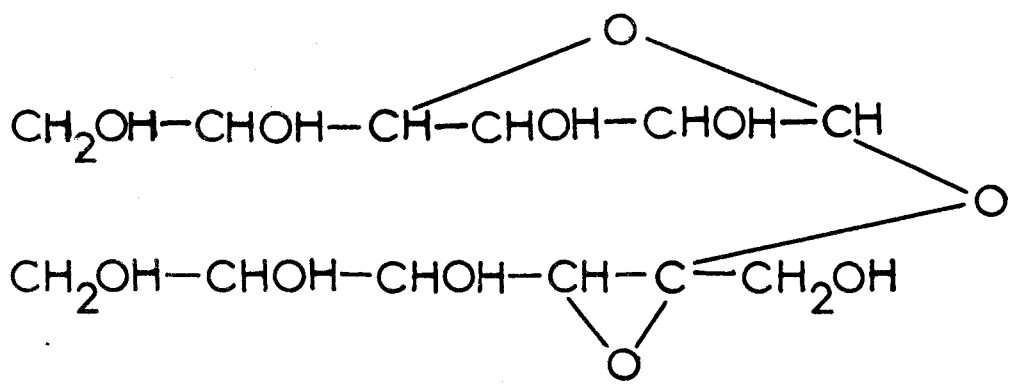
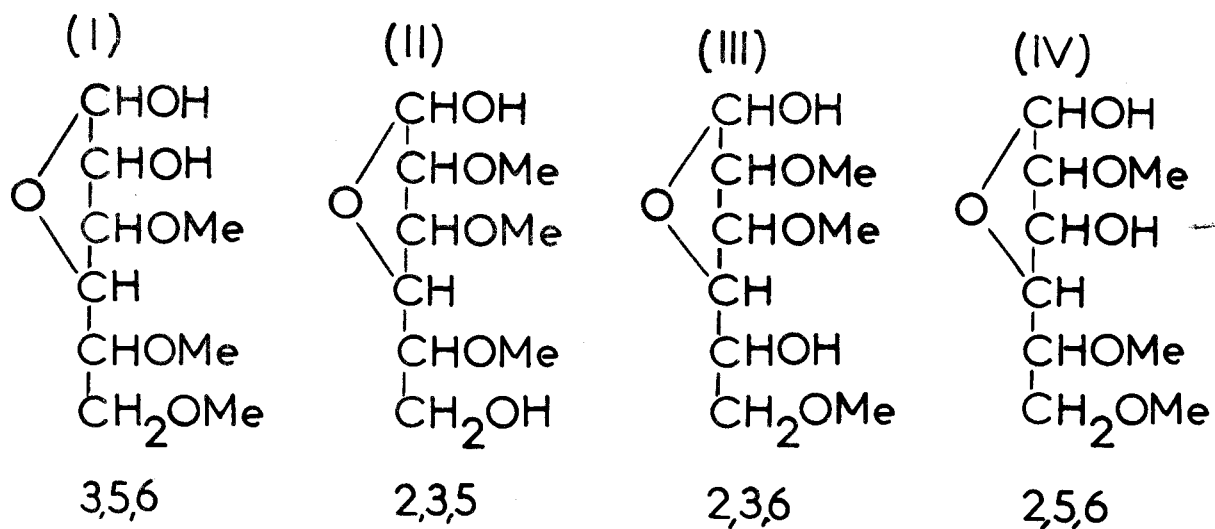


Figure 1

Structures des dérivés triméthylés du glucose selon DENHAM et WOODHOUSE (1914) (19) et du saccharose selon HAWORTH et LAW (1916) (20).



méthylé ayant la structure II préparé par IRVINE et DICK a des propriétés différentes du dérivé triméthylé isolé de la cellulose. Les deux structures proposées par les auteurs pour le dérivé triméthylé isolé de la cellulose sont donc les formules III et IV.

En 1915, HAWORTH (21) publia "A new method of preparing alkylated sugars". Le point important de cette méthode est que les sucres réducteurs, aussi bien les monosaccharides que les disaccharides lorsqu'ils sont dissous dans une base et traités avec le sulfate de méthyle, sont convertis dans un premier temps en leurs méthyl-glycosides. Dans un deuxième temps, commence la substitution des hydroxyles alcooliques. Ceci est extrêmement précieux lorsque l'on connaît les difficultés que l'on rencontre dans la préparation des glycosides de disaccharides, par exemple. C'est ainsi qu'à partir de cette date des disaccharides comme le lactose, le maltose et le cellobiose ont pu être étudiés.

B - Protocole expérimental original de HAWORTH

La technique originale de méthylation selon HAWORTH est décrite dans l'appendice technique (voir p.247). Dans cette publication, l'auteur appliquait son procédé à la méthylation du saccharose, du méthyl- α -glucoside, du méthyl-mannoside, du méthyl-galactoside et du mannitol. Dès cette époque, l'auteur constate que certains hydroxyles du mannitol sont préférentiellement substitués et qu'ainsi des produits intermédiaires, correspondant à des éthers sous-méthylés, peuvent être isolés et définitivement caractérisés. Pour ce qui est du saccharose, les conditions décrites plus haut permettent d'obtenir l'hepta-O-méthyl-saccharose, HAWORTH utilise alors le procédé de PURDIE et IRVINE à l'iodure de méthyle oxyde d'argent pour isoler l'octa-O-méthyl-sucrose.

Des modifications ont été apportées au procédé original de HAWORTH pour la méthylation des monosaccharides. Ainsi, WEST et HOLDEN (22) en 1934, dans leur publication sur la préparation du tétra-O-méthyl-glucose, proposent une méthode qui permet d'obtenir, avec de bons rendements, cet éther méthylique en 8 à 10 heures. Pour ce faire, les auteurs modifient, d'une part, le procédé de méthylation, et, d'autre part, les conditions d'hydrolyse du méthyl-tétra-O-méthyl-glucoside. Le glucose ou le méthyl-glucoside sont méthylés complètement et rapidement par traitement avec une solution de sulfate de méthyle dans le tétrachlorure de carbone et une solution de soude à 60 p. 100. Les conditions expérimentales sont les suivantes : 25 g de glucose sont dissous dans 15 ml d'eau et introduits dans un flacon muni d'un agitateur mécanique,

d'un condenseur et de deux ampoules renfermant les réactifs de méthylation et plongé dans un bain-marie réglé à 55°C. Rapidement et sous agitation énergique, 90 ml de sulfate de méthyle dans 125 ml de tétrachlorure de carbone sont alors additionnés à la solution de monosaccharide. Puis, 400 ml de soude à 60 p. 100 sont additionnés goutte à goutte jusqu'à ce que le tétrachlorure de carbone ait cessé de distiller ce qui est généralement réalisé en 20 mn , puis, plus rapidement pour les 70 à 90 ml de soude restants. La température monte alors rapidement et est maintenue à 70-75°C. 16 ml de sulfate de méthyle sont additionnés à raison de 3 à 4 gouttes par seconde. Après l'addition de tout le sulfate de méthyle, le bain-marie est porté à ébullition pendant 30 mn . Après refroidissement, le méthyl-tétra-O-méthyl-glucoside extrait par le chloroforme (4 fois 150 ml), est distillé sous pression réduite (0,15 mm) à une température de 88-90°C.

Cette modification à la technique originale de HAWORTH est intéressante car elle conduit en une seule étape à l'obtention du dérivé perméthylé. Elle a d'ailleurs été utilisée par CUTLER, HAWORTH et PEAT (23) pour préparer le méthyl-2-acétamido-2-desoxy-3,4,6-tri-O-méthyl-β-D-glucosaminide avec un rendement de 90 % par méthylation dans le tétrachlorure de carbone du méthyl-2-acétamido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-acétyl-β-D-glucosaminide.

C - Applications de la méthode de méthylation

La méthode de HAWORTH marque un progrès certain par rapport à celle de PURDIE et IRVINE, sur les points suivants :

- 1 - Comme nous l'avons précisé précédemment, elle est directement applicable aux monosaccharides et oligosaccharides.
- 2 - Le taux de méthylation est accru, ce qui se manifeste par l'apparition de monosaccharides perméthylés.
- 3 - Les réactifs utilisés sont moins onéreux.

Il n'en demeure pas moins que la perméthylation est loin d'être totale et qu'ainsi de très nombreuses modifications à la méthode originale ont été décrites pour essayer de réaliser une substitution totale. C'est ainsi que la méthode de HAWORTH est utilisée pour réaliser une méthylation partielle d'un oligosaccharide qui est ensuite parachevée à l'aide d'un cycle de méthylation suivant la méthode de PURDIE et IRVINE à l'iodure de méthyle, oxyde d'argent. Cependant, le procédé à la soude sulfate de méthyle permet d'effectuer la méthylation totale d'un oligosaccharide dans certaines conditions expérimentales qui varient avec la nature de la molécule. Nous décrirons, successivement, les

procédés de méthylation par le sulfate de méthyle des oligosaccharides, des polysaccharides et des glycoprotéides.

1 - Méthylation des oligosaccharides

Dans son mémoire original, HAWORTH (24) applique son procédé de méthylation au saccharose. Il remarque que l'utilisation de la soude et du sulfate de méthyle seuls ne permettent pas d'obtenir du saccharose perméthylé. Dans ce cas, la méthylation est portée à son terme à l'aide de l'iodure de méthyle et de l'oxyde d'argent.

En 1916, HAWORTH et LAW (25) publient la première d'une série de notes sur la constitution des disaccharides. Ils proposent une structure du saccharose (Fig. 1 ; p.10), dans laquelle les deux monosaccharides sont liés par leur fonction réductrice, le glucose ayant un pont oxydique de type "butylène oxyde" et le fructose un pont oxydique de type "éthylène oxyde".

En 1918, HAWORTH et LEITCH (26) publient les résultats concernant le lactose et le mélibiose. Les conditions expérimentales de méthylation du lactose sont les suivantes : 30 g de lactose sont dissous dans une quantité minimale d'eau chaude et introduits dans un flacon muni d'un agitateur mécanique et d'un condenseur. La solution est ensuite refroidie à 30°C. 114 ml de sulfate de méthyle et 111 g de soude dissous dans 210 ml d'eau sont additionnés suivant le protocole suivant : 14 ml de sulfate de méthyle puis 26 ml de la solution de soude sont introduits, goutte à goutte, sous agitation énergique pour éviter une concentration locale élevée d'alcali. La température est ensuite amenée à 40°C et une nouvelle addition de 14 ml de sulfate de méthyle est effectuée, suivie de celle de 26 ml de la solution de soude ajoutée goutte à goutte. L'agitation est ensuite maintenue une nuit à température ordinaire. Lorsque l'on reprend la manipulation, le lendemain, les propriétés réductrices du sucre ont disparu. La température est alors portée à 60°C et une nouvelle méthylation est réalisée avec 43 ml de sulfate de méthyle et 79 ml de la solution de soude. Le reste des réactifs est additionné à 70°C, dans le même ordre, l'agitation étant maintenue durant toute l'opération. Finalement, la température est montée à 100°C pendant une demi-heure pour décomposer l'excès de sulfate de méthyle. La solution refroidie est extraite par le chloroforme. La phase organique, séchée, est distillée sous pression réduite ce qui fournit quatre fractions. La fraction I passe à 160-190°C sous 0,2 mm de mercure, la fraction II distille à 193°C sous 0,22 mm de mercure, la fraction III passe à 204-210°C sous 0,38 mm de mercure, enfin, une fraction IV est obtenue à 217°C sous 0,63 mm de mercure. La troisième fraction donne à l'analyse des résultats correspondant au

méthyl-hexa-0-méthyl-lactoside.

Une nouvelle méthylation est donc nécessaire pour substituer complètement la molécule de disaccharide. Ceci est réslisé par deux nouvelles méthylations dans la soude et le sulfate de méthyle ou dans l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent. Le résidu obtenu après ces derniers cycles de méthylation est soumis à la distillation sous pression réduite. Une fraction majeure distille à 195°C sous 0,05 mm de mercure et cristallise dans l'éther de pétrole (point de fusion des aiguilles 77-82°C ; $\left[\alpha \right]_{\text{D}}^{20} = + 5,19^{\circ}$ dans l'eau).

La troisième publication concernant la structure des disaccharides paraît en 1919 (HAWORTH et LEITCH)(27) sur le maltose. Comme dans le cas du lactose, la méthylation est effectuée par le sulfate de méthyle dans la soude, suivie par une méthylation dans l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent.

Comme nous venons de le voir, la seule méthode de méthylation dans les conditions décrites par HAWORTH ne permet pas d'obtenir, en un temps, la perméthylation des oligosaccharides. C'est pourquoi, beaucoup d'auteurs réalisent, comme dans le cas des polysaccharides, plusieurs traitements par l'iodure de méthyle, en fin de réaction, pour réaliser la perméthylation des oligosaccharides.

Cependant KUHN, BAER et GAUHE (28) ont obtenu un dérivé perméthylé du lacto-N-fucopentaose II (*) en utilisant exclusivement, comme agents de méthylation, le sulfate de méthyle et la soude à 40 p. 100 à des températures inférieures à 4°C. Le protocole expérimental est le suivant : à une solution de 2 g d'oligosaccharide dans 30 ml d'eau, constamment maintenue à 0°C, on ajoute lentement, sous agitation douce, 30 ml de sulfate de méthyle puis, goutte à goutte et pendant 8 heures, sous agitation énergique, 45 ml d'une solution de soude à 40 p. 100 (p : v). On agite encore le mélange pendant 12 heures à 0°C. 72 ml de sulfate de méthyle sont de nouveau ajoutés en 2 à 3 heures puis, 100 ml de soude à 40 p. 100, goutte à goutte, en 9 heures à 0°C. Une dernière addition de 72 ml de sulfate de méthyle est réalisée en 3 heures en laissant la température remonter à + 3°C. On ramène ensuite à la température ordinaire en plusieurs étapes : 2 heures à + 5°C puis 7 heures à 17°C et

(*) Le lacto-N-fucopentaose II de KUHN ou oligosaccharide 9 de MONTREUIL est un constituant normal de la fraction glucidique du lait de femme.

enfin 12 heures à 20-22°C. Si le milieu réactionnel devient trop visqueux, on ajoute environ 10 ml de chloroforme. On extrait, ensuite, 8 fois par 150 ml de chloroforme. L'extrait chloroformique est lavé 2 fois à l'eau et les eaux de lavage réunies sont elles-mêmes lavées 4 fois par du chloroforme. Les solutions chloroformiques sont réunies, séchées sur carbonate de potassium anhydre et évaporées à siccité.

Cette méthode est assez longue et nécessite un contrôle sévère de la température ; cependant, elle ne provoque pas de dégradation de la molécule d'oligosaccharide.

On peut donc conclure que dans le cas des oligosaccharides, la méthylation par le sulfate de méthyle dans la soude constitue une première étape dans la substitution des fonctions hydroxyles. Ces dernières sont ensuite perméthylées par l'iodure de méthyle. C'est de cette façon que COURTOIS et Coll. (29) méthylent leurs galactosides de même WHISTLER et CONRAD (30) méthylent le galactobiose, isolé à partir de certains mucilages, par deux traitements successifs au sulfate de méthyle, suivis de deux "cycles" à l'iodure de méthyle.

2 - Méthylation des polysaccharides

Comme nous l'avons mentionné dans les généralités sur la méthylation par le procédé de HAWORTH, la méthode originale de méthylation des polysaccharides a été publiée par DENHAM et WOODHOUSE (31) en 1913. Ces auteurs, dès cette date, utilisèrent le sulfate de méthyle comme agent de méthylation de l'alcali-cellulose.

La méthylation des polysaccharides peut être effectuée en solution aqueuse ou en présence de solvants organiques.

a - Méthylation des polysaccharides en solution aqueuse

Le polysaccharide est dissous dans le minimum d'eau et la solution est placée dans un ballon à trois cols. Le col central reçoit l'agitateur indispensable pour réaliser une méthylation dans de bonnes conditions. Les deux cols latéraux reçoivent les ampoules ; une pour la solution aqueuse de soude, l'autre pour le sulfate de méthyle. L'agitation doit être réglée de telle façon que le liquide soit en turbulence et non en mouvement sur les parois du ballon. Pour ces raisons, la taille du récipient doit être choisie pour qu'à la fin de la réaction, celui-ci ne soit qu'à moitié rempli. Le flacon de

réaction est plongé dans un bain-marie réglé à des températures variant de 20 à 60°C. Enfin, pour qu'une légère basicité soit maintenue durant toute la réaction, la quantité de soude additionnée doit être stochiométriquement plus élevée que le sulfate de méthyle.

Cette méthode standard de méthylation en solution aqueuse a été utilisée en 1941 par WHITE (32) pour étudier la structure d'un arabo-galactane isolé de la sciure de mélèze par extraction aqueuse. Le mode opératoire est le suivant : 100 g d'arabo-galactane, dissous dans 100 ml d'eau sont méthylés, à 25°C, sous courant d'azote, par 285 ml de sulfate de méthyle et 855 ml de solution aqueuse de soude à 30 p. 100. Les réactifs sont additionnés, goutte à goutte, et, simultanément sous agitation vigoureuse pendant une période de 5 heures. Après neutralisation, le produit, débarrassé de ses sels par dialyse, est concentré sous pression réduite à 60°C. Quatre cycles de méthylation sont nécessaires pour obtenir une substitution totale des fonctions hydroxyles. Le polysaccharide perméthylé extrait par le chloroforme est précipité par l'éther de pétrole. Le précipité lavé et séché fournit une belle poudre blanche. Le polysaccharide perméthylé est, enfin, méthanolysé par le mélange méthanol/chlorhydrique à 2 p. 100 à 115°C pendant 6 heures.

ANDREW, HOUGH et JONES (33) ont utilisé cette technique pour méthyler un galactane. Dans ce cas, la façon d'additionner les réactifs diffère de celle pratiquée par WHITE (34). Le polysaccharide (2,5 g) dissous dans de la soude 2 N (100 ml) est congelé. Le sulfate de méthyle (10 ml) est alors additionné, goutte à goutte, durant 1 heure. Une deuxième addition de soude (10 g) et de sulfate de méthyle (12 ml) est effectuée, suivie d'une troisième de 20 g de soude et de 24 ml de sulfate de méthyle qui termine la méthylation. La solution est alors neutralisée par de l'acide acétique et dialysée contre eau courante. L'adialysable est concentré à 100 ml et un nouveau cycle de six méthylations est effectué par addition alternative de soude (40 g) et de sulfate de méthyle (95 ml). Le polysaccharide méthylé débarrassé de ses sels est extrait par le chloroforme. Le taux de groupements "méthoxy" reste constant, même après des méthylations par la soude et le sulfate de méthyle ou par l'iodure de méthyle dans l'ammoniac liquide ou enfin dans les conditions de PURDIE et IRVINE : iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent.

Généralement, la méthode de HAWORTH conduit à un polysaccharide partiellement méthylé que l'on soumet à un nombre variable de cycles identiques jusqu'à ce que le taux des groupements "méthoxy" déterminé par les

méthodes de ZEISEL (35) ou de VIEBÜCK et BRECKER (36) demeure constant ou en suivant la disparition des fonctions hydroxyles par spectrométrie dans l'infrarouge. ANDERSON, HIRST, MANNERS et ROSS (37) ont appliqué cette technique à l'étude de la structure d'un glucomannane.

D'autres auteurs terminent la méthylation en couplant la méthode de HAWORTH avec une autre technique :

1°) Méthylation du polysaccharide dans la soude et le sulfate de méthyle suivie d'un ou plusieurs cycles dans l'iodure de méthyle, oxyde d'argent : méthylation de glucomannane (ASPINALL, LAIDLAW et RASHBROOK (38)), méthylation de polysaccharides riches en acides uroniques (ANDERSON et DEA (39)).

2°) Méthylation du polysaccharide dans la soude et le sulfate de méthyle suivie d'un cycle de méthylation selon la technique de KUHN, LÖW et TRISCHMANN (40) : méthylation de galactomannane (LESCHZINER et CEREZO (41)), méthylation de glucomannane (GORIN et SPENCER (42)).

3°) Méthylation du polysaccharide dans la soude et le sulfate de méthyle suivie d'un cycle de méthylation selon la méthode de HAKOMORI (43) : méthylation de galactomannane isolé de graines de caesalpinia pulcherina (UNRAU et CHOY (44)).

Enfin, il faut préciser que de très nombreuses modifications ont été apportées à la méthode originale de HAWORTH en fonction de la nature du polysaccharide à substituer : utilisation de solutions de soude plus concentrées suggérée par WADMAN, ANDERSON et HASSID (45) et appliquée avec succès par HOUGH et JONES (46), température plus élevée pour des polysaccharides difficiles à méthyler (HAWORTH, HIRST, OWEN, PEAT et AVERILL (47) ; HAWORTH, MONTANNA et PEAT (48)).

b - Méthylation des polysaccharides en présence de solvants organiques

Quelques polysaccharides solubles dans l'eau deviennent insolubles durant le processus de méthylation, il est alors nécessaire d'ajouter de l'acétone, du dioxane, du benzène ou du tétrachlorure de carbone pour garder le matériel méthylé en solution.

C'est ainsi que de meilleurs résultats ont été obtenus par HAWORTH, MONTANNA et PEAT (49) en méthylant de l'alcali-cellulose en présence de dioxane. HIRST et JONES (50) ont méthylé la cellulose dans l'acétone. Le protocole expérimental est le suivant : 4,5 g de cellulose sont agités dans 350 ml d'acétone. 200 ml de sulfate de méthyle et 400 ml de soude à 30 p. 100

sont ajoutés, goutte à goutte, simultanément, en dix portions. Durant l'addition des réactifs, le flacon est agité vigoureusement. L'excès de sulfate de méthyle est décomposé et l'acétone déplacé en augmentant la température à 85°C. On filtre et on lave plusieurs fois le précipité de cellulose méthylée à l'eau chaude. Le polysaccharide est ensuite trituré dans l'acétone et extrait par le chloroforme. L'addition d'éther de pétrole à la solution chloroformique précipite la cellulose méthylée. Cette dernière est enfin soumise à un second cycle de méthylation dans les mêmes conditions.

Une amélioration aux techniques de méthylation en phase organique est introduite par HAWORTH et Coll. qui effectuent la réaction sur les polysaccharides acétylés, tels : l'acétate de cellulose (51) et l'acétate d'inuline (52). Les résultats obtenus sur ce dernier polysaccharide sont intéressants puisqu'en un seul cycle de méthylation ces auteurs isolent le polysaccharide perméthylé. Ce procédé a été appliqué notamment par HAWORTH et PERCIVAL (53) au glycogène et par HAMILTON et KIRCHER (54), BISHOP et COOPER (55) aux glucomannanes. Ce dernier procédé est décrit dans l'appendice technique (voir p. 247).

3 - Méthylation de la copule glycanique des glycoprotéines

La perméthylation de la copule glycanique des glycoprotéines pose des problèmes particuliers par suite, probablement, du rôle protecteur que joue la partie protéique de la molécule. Il a donc été admis très vite que la substitution quantitative des fonctions hydroxyles ne pourrait être réalisée que si la copule protéique était partiellement ou totalement hydrolysée.

La première tentative de perméthylation d'une glycoprotéine est attribuée à STACEY et WOLLEY (56) qui appliquèrent, en 1940, le procédé de HAWORTH à la méthylation de l'ovomucoïde. Dans leur publication, les auteurs précisent que la réaction d'alkylation est effectuée non pas sur la glycoprotéine native mais sur les chaînes glucidiques obtenues par action de l'hydroxyde de baryum sur l'ovomucoïde. Le résidu obtenu possédait outre les monosaccharides neutres (galactose et mannose), une osamine : la glucosamine, qui, dans les conditions d'hydrolyse de la protéine, était N-désacétylée. C'est pour cette raison que ces auteurs effectuent une peracétylation de la copule glucidique (10µg de dérivés glucidiques sont chauffés quelques minutes à 70°C, puis 24 heures à 15°C sous agitation avec 30 g d'anhydride acétique et 50 ml de pyridine) avant d'effectuer la perméthylation dans les conditions expérimentales décrites par HAWORTH, HIRST et WEBB (57) pour substituer l'amidon. La méthylation de la copule glucidique peracétylée par le sulfate de méthyle

et une solution de soude à 30 p. 100 en présence de tétrachlorure de carbone (WEST et HOLDEN (58)) donne un rendement de 10 p. 100 supérieur en dérivé méthylé, par rapport à la première méthode. Le mode opératoire de méthylation dans le tétrachlorure de carbone est le suivant : 10 g de copule glucidique peracétylée sont dissous dans 100 ml d'eau et 300 ml de tétrachlorure de carbone sont additionnés. 5 ml d'une solution aqueuse de soude à 35 p. 100 sont alors ajoutés suivis par 80 ml de sulfate de méthyle. La solution est maintenue à 50°C sous agitation vigoureuse. 160 ml d'une solution aqueuse de soude à 35 p. 100 sont versés, goutte à goutte, puis, 100 ml de sulfate de méthyle, 200 ml de soude à 35 p. 100 et 100 ml de tétrachlorure de carbone sont additionnés. Le mélange est alors agité pendant 2 heures à 65°C pour détruire l'excès de sulfate de méthyle. Ce premier cycle de méthylation est suivi d'un second dans la soude (200 ml de solution de soude à 35 p. 100) et le sulfate de méthyle (100 ml) en présence d'acétone (100 ml) à 45°C. Le dosage des radicaux "méthoxy" donne le chiffre de 31,5 p. 100 alors qu'avec la première méthode, ce pourcentage n'atteint que 19 p. 100.

Ce mémoire est intéressant à plusieurs points de vue : d'une part, il constitue la première adaptation des méthodes de méthylation à la copule glucidique des glycoprotéines, d'autre part, il nous fournit quelques renseignements sur la structure de la copule glucidique de l'ovomucoïde ; en effet, ces auteurs isolent, après hydrolyse, de la perméthyl-glucosamine, ce qui indique la présence de résidus de N-acétylglucosamine en position terminale non réductrice.

Deux ans après, STACEY et WOOLEY (59) publièrent un schéma de structure de la copule glucidique de l'ovomucoïde (Fig.2 ; p.20). Cette structure est fondée sur le dosage des éthers méthyliques obtenus par hydrolyse de la copule glucidique perméthylée : 7 moles de perméthyl-glucosamines, 2 moles de D-mannopyranoses, 1 mole de 3,4,6-tri-O-méthyl-D-mannopyranose et 1 mole de perméthyl-galactose. Pour arriver à ce résultat, les auteurs utilisèrent la technique de méthylation décrite dans leur première publication, complétée par un cycle de méthylation suivant PURDIE et IRVINE à l'iodure de méthyle, oxyde d'argent.

En 1961, BRAGG et HOUGH (60) reprennent les travaux concernant l'étude de la structure de l'ovomucoïde et en particulier la méthylation de cette glycoprotéine. Ils constatent que des méthodes de méthylation qui utilisent le sodium dans l'ammoniac liquide et l'iodure de méthyle (FREUDENBERG, PLANKENHORN et BOPPEL (61), HODGE, KARJALA et HILBERT (62)) ou des techniques de méthylation avec l'hydroxyde de thallium et l'iodure de méthyle (CAMPBELL,

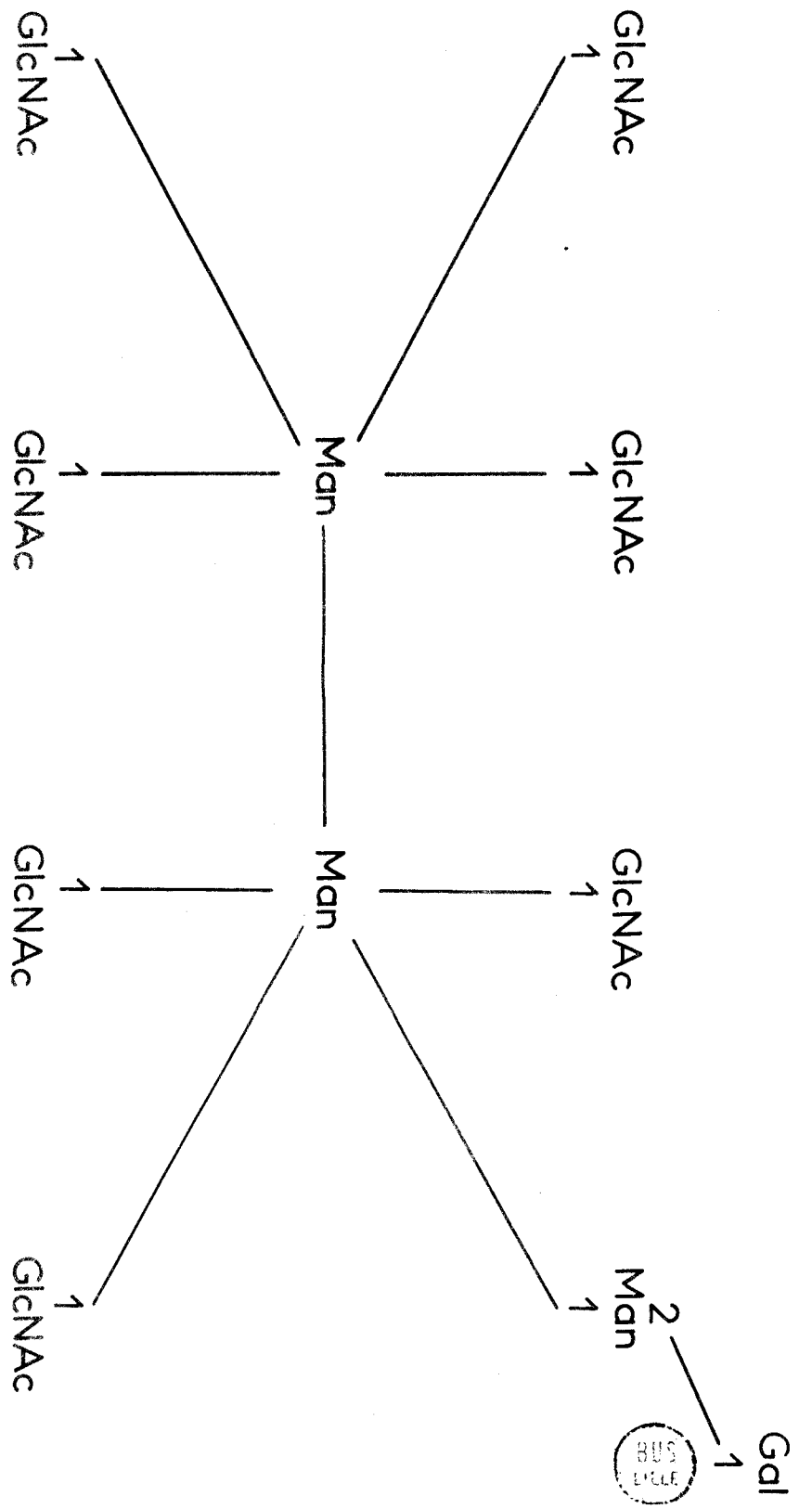


Figure 2

Schéma de structure de la copule glucidique de l'ovomucoïde selon STACEY et WOOLLEY(1942) (63)

HIRST et JONES (64)) ne sont pas applicables à une glycoprotéine comme l'ovomucoïde.

C'est pour ces raisons qu'ils se sont adressés à la méthode de méthylation, selon le procédé de HAWORTH, modifié par STACEY et WOOLLEY en 1940 (65) et 1942 (66) pour l'ovomucoïde. Dans ce cas, les auteurs travaillent sur la glycoprotéine native sans acétylation préalable. La méthylation est conduite dans les conditions suivantes : 25 g d'ovomucoïde dissous dans 100 ml d'eau et 300 ml de tétrachlorure de carbone sont méthylés par 100 ml de sulfate de méthyle et 200 ml de soude à 35 p. 100 additionnés, goutte à goutte, pendant une durée de 2 heures. Après 1 heure d'agitation, 100 ml de sulfate de méthyle et 200 ml de soude à 35 p. 100 sont additionnés simultanément pendant une durée de 2 heures. Le mélange réactionnel est agité durant 24 heures puis filtré. Le filtrat neutralisé par l'acide acétique est évaporé à siccité. Le résidu est extrait par le méthanol et la solution méthanolique évaporée est dissoute dans 400 ml du mélange eau:acétone (v:v) puis, méthylée deux fois comme précédemment. Après les extractions, lavages et séchages, le résidu donnait 19,3 p. 100 en radicaux "méthoxy", chiffre faible si on se reporte aux résultats de STACEY et WOOLLEY (67) qui obtenaient, sur la même glycoprotéine, 31,5 p. 100. Ce pourcentage n'augmente pas d'une façon significative après un cycle de méthylation dans l'iodure de méthyle, oxyde d'argent. L'hydrolyse de la glycoprotéine perméthylée leur a fourni du perméthyl-mannose et du perméthyl-galactose indiquant que ces deux monosaccharides occupent une position terminale non réductrice dans les chaînes glucidiques. Par contre, ils ne trouvent pas de résidus de mannose libre, comme l'avaient signalé STACEY et WOOLLEY (68) mais, un diméthyl-mannose qui ne fournit pas, par oxydation périodique, de formaldéhyde avant ou après réduction et qui, par conséquent, serait du 2,6-di-O-méthyl-mannose. Cependant, ils ne mirent pas en évidence de dérivés méthylés de la glucosamine.

Ces procédés de méthylation qui utilisent les réactifs de HAWORTH dans le tétrachlorure de carbone ont été appliqués avec succès à quelques glycoaminoglycannes. Ainsi, HIRANO, HOFFMAN et MEYER (69), par méthylation dans le tétrachlorure de carbone d'un kératosulfate de la cornée de Boeuf, par la soude et le sulfate de méthyle, ont pu donner la séquence de l'unité de répétition : (1 → 3)-O-β-D-galactopyranosyl-(1 → 4)-O-β-D-2-acétamido-2-désoxy-glucopyranosyl-6-sulfate (Fig. 3 ; p. 22). Ce procédé fut aussi appliqué à l'héparine (DANISHEFSKY, EIBER et WILLIAMS (70)) avec de bons résultats de méthylation (31, 91 p. 100 en radicaux "méthoxy" la valeur calculée étant de 35,63 p. 100) en travaillant sur de l'héparine dont le groupement carboxylique

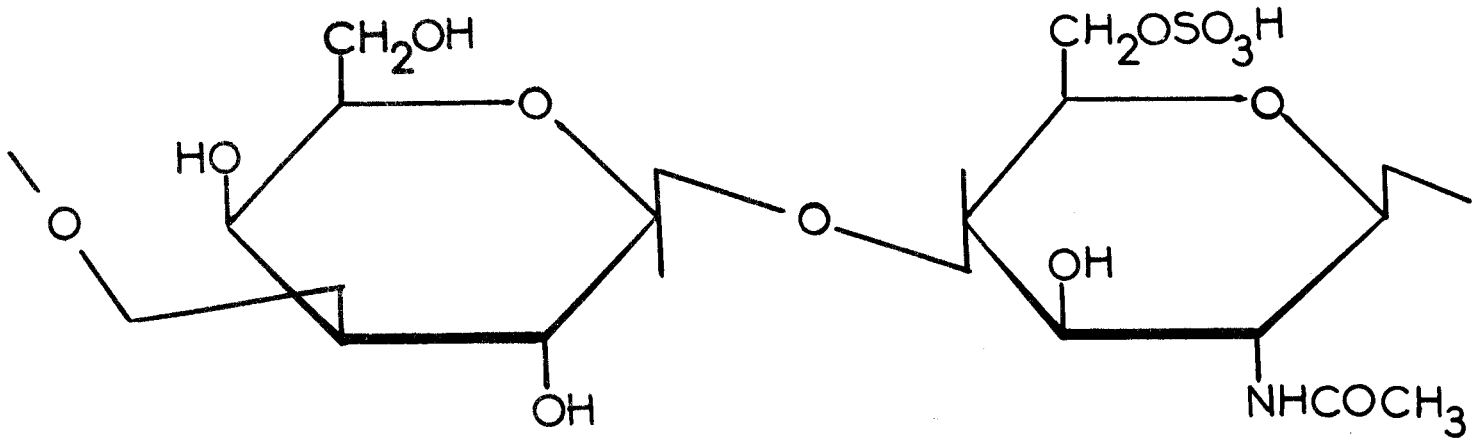


Figure 3

Schéma de structure de l'unité de répétition d'un
kératosulfate de la cornée de Boeuf. (HIRANO et al., (71))



de l'acide glucuronique était réduit. Dans ce cas, plusieurs cycles de méthylation dans le tétrachlorure de carbone, soude et sulfate de méthyle ainsi que dans l'iodure de méthyle et l'oxyde d'argent sont nécessaires pour obtenir ces résultats, c'est-à-dire : l'identification des 2, 3, 6-tri-O-méthyl-D-glucopyranose et de la 3, 6-di-O-méthyl-D-glucosamine ce qui permet de conclure à des liaisons glycosidiques faisant intervenir le carbone 4 de la glucosamine et de l'acide glucuronique.

Récemment, YAMAGUCHI, IKENAKA et MATSUSHIMA (72) ont méthylié le glycopeptide de la Taka-amylase A par le procédé de HAWORTH et après deux cycles d'alkylation ont obtenu un composé qui donnait une légère absorption en infrarouge à $3.200-3.700 \text{ cm}^{-1}$. Un an après, ces mêmes auteurs (73) donnent la structure complète du glycanne de cette glycoprotéine. La technique de méthylation utilisée est de nouveau la méthode de HAWORTH complétée par un cycle de méthylation dans la diméthylformamide suivant le procédé de KUHN (74).

D - Conclusions

En conclusion, sur la méthylation de la copule glycannique des glycoprotéines par le procédé de HAWORTH et à la vue des résultats obtenus par les auteurs et par nous-même au laboratoire, nous constatons les difficultés que l'on rencontre dans la méthylation directe des glycoprotéines. Ainsi, BRAGG et HOUGH (75) n'obtiennent que 19,3 p. 100 de radicaux "méthoxy" par méthylation directe de l'ovomucoïde et SEGARD (76) après dix cycles de méthylation directe sur l'ovomucoïde obtient encore des dérivés monométhylés et diméthylés du galactose. Ces résultats s'expliquent à la fois par une "déviation" de nombreux radicaux méthyle par les fonctions amines et amides présentes dans les molécules de protéines et par des empêchements stériques dûs à un effet protecteur de la protéine vis-à-vis de la copule glycannique. Il est donc indispensable d'opérer sur les glyco-amino-acides ou sur les glycopeptides comme d'ailleurs l'avaient constaté STACEY et WOOLLEY en 1940 et 1942 lorsqu'ils travaillaient sur de l'ovomucoïde préalablement traité par de l'hydroxyde de baryum. Actuellement, les auteurs utilisent, préférentiellement, les glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique qui permet d'obtenir, parfois, les glyco-amino-acides.

II - PROCÉDES DE METHYLATION DES GLUCIDES SOUS LA FORME DE COMPLEXES DU THALLIUM

A - Principe

La méthylation des composés hydroxylés sous forme de dérivés thalliques, avec l'iodure de méthyle, a été décrite par FEAR et MENZIES (77)

et modifiée pour l'alkylation des glucides. Les groupements hydroxylés des monosaccharides ou des polysaccharides sont relativement acides, ainsi, l'addition d'hydroxyde de thallium à une solution aqueuse de polysaccharides les précipite, généralement, sous la forme de sels de thallium. L'addition de l'hydroxyde de thallium sera poursuivie jusqu'à ce que la quantité équivalente aux groupements hydroxyles ait été ajoutée ou jusqu'à ce que la précipitation soit complète. Si les sels de thallium des polysaccharides ne précipitent pas, ceux-ci peuvent être isolés, soit par précipitation éthanolique, soit par évaporation à siccité en atmosphère inerte. La méthylation est alors effectuée sur le sel de thallium sec par l'iodure de méthyle à l'ébullition avec ou sans solvant tel le méthanol. Quand la réaction est très lente, on peut opérer à 100°C en tubes scellés. Cette méthode de méthylation est spécialement utilisée pour la substitution des polysaccharides comme les acides pectiques et alginiques qui ne sont pas stables en milieu trop basique et qui se méthylient difficilement par le sulfate de méthyle. La fin de la réaction est marquée par le virage de la coloration du milieu réactionnel, du brun au jaune clair, correspondant à la formation de l'iodure de thallium. Le polysaccharide méthylé précipite et on le recueille par filtration. Le résidu peut subir un second cycle de méthylation en présence d'hydroxyde de thallium et d'iodure de méthyle dans les conditions décrites précédemment ou, si le polysaccharide méthylé devient soluble dans l'iodure de méthyle, la méthylation peut être achevée par plusieurs cycles dans les conditions décrites par PURDIE et IRVINE (voir p. 5).

B - Applications de la méthode de méthylation

1 - Méthylation des monosaccharides

Dans leur publication originale FEAR et MENZIES (78) décrivent une méthode de méthylation du méthyl-glucoside dont le protocole expérimental est décrit dans l'appendice technique (voir p.248). Les auteurs obtiennent, à partir de 36,5 g de sel de thallium du méthyl-glucoside, 9,8 g d'un mélange des méthyl-tri-O-méthyl-glucosides sous forme de sirop.

2 - Méthylation des polysaccharides

La méthode de méthylation des glucides sous la forme de leur sel de thallium a surtout été utilisée pour la perméthylation des polysaccharides. En 1938, HIRST et JONES (79) travaillant sur un complexe arabane-acide pectique du Pois, montrent que cette technique de méthylation est la seule capable d'alkyler leur polysaccharide sans le détruire. La particularité de cette méthode est qu'elle conduit, directement, dans le cas des polyuronides, à la forma-

tion de l'ester méthylique du polysaccharide. Les conditions expérimentales des auteurs sont décrites dans l'appendice technique (voir p.249). Cette méthode a été appliquée par HIRST et JONES (80) et JONES (81) pour méthyler des gommes constituées d'arabinose, de galactose et d'acide glucuronique, par CAMPBELL, HIRST et JONES (82) pour méthyler un arabino-galactane isolé de bois de mélèze et par ASPINALL, LAIDLAW et RASHBROOK (83) pour méthyler un glucomannane isolé de sciure de sapin.

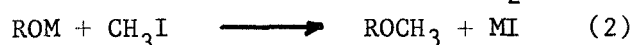
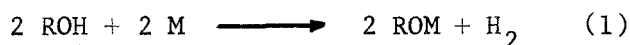
C - Conclusions

En conclusion, cette méthode de méthylation présente un grand intérêt dans le cas de polysaccharides instables en milieu alcalin (cas des polyuronides tels les acides pectiques et alginiques) ou difficilement solubles en milieu aqueux et qui peuvent être substitués par passage intermédiaire au sel de thallium

V - PROCÉDE DE METHYLATION EN PRESENCE DE SODIUM DANS L'AMMONIAC LIQUIDE

A - Principe

Cette méthode de méthylation des groupements hydroxyles comporte deux étapes schématisées par les équations 1 et 2 dans lesquelles ROH est un alcool et M un métal alcalin.



L'ammoniac liquide a été employé pour la première fois en 1923 par KRAUS et WHITE (84) pour réaliser la formation de l'alcoolate (réaction 1). Dans cette réaction, l'alcool, dissous ou suspendu dans l'ammoniac liquide, est traité par le métal alcalin dans l'ammoniac liquide. C'est ainsi que SCHMID et al. (85) préparèrent des mono-alcoolates de sodium ou de potassium à partir de monosaccharides et de polysaccharides. La réaction 2 qui constitue le procédé de WILLIAMSON (86) d'alkylation des alcools a été réalisée, pour la première fois, dans l'ammoniac liquide en 1924 par WHITE, MORRISON et ANDERSON (87).

Ces réactions dans l'ammoniac liquide ont été appliquées aux dérivés non réducteurs des monosaccharides par MUSKAT (88) et peuvent être réalisées simultanément (méthodes de FREUDENBERG et BOPPEL (89) et de HODGE et al. (90)). Cependant, une étude critique des étapes de la réaction avait conduit MUSKAT (91) FREUDENBERG et RAPP (92) ainsi que FREUDENBERG, PLANKENHORN et BOPPEL (93) à admettre l'éventualité d'une méthylation incomplète s'accompagnant de la formation d'iodure de tétraméthylammonium et d'iodure d'ammonium, prove-

nant d'une réaction secondaire plus rapide que la réaction 1 entre l'iodure de méthyle et l'ammoniac suivant les schémas de réactions donnés dans la figure 4 (p. 27). C'est pourquoi, MUSKAT (94) recommandait d'éliminer totalement l'ammoniac après la réaction 1 et de réaliser l'alkylation, par l'iodure de méthyle, dans un solvant inerte à la température ordinaire.

B - Applications de la méthode de méthylation

1 - Méthylation des monosaccharides

La méthode de méthylation dans l'ammoniac liquide a été appliquée par FREUDENBERG et HIXON (95) et par MUSKAT (96) pour alkyler les dérivés de substitution par l'acétone des monosaccharides. Dans sa note, MUSKAT décrit en détail les conditions de méthylation ainsi que l'appareil permettant de travailler dans l'ammoniac liquide (Fig. 5 ; p. 28). Cet appareil permet d'introduire aussi bien de l'ammoniac liquide ou gazeux que des solides tels les métaux alcalins.

a) Synthèse de l'alcoolate de potassium du 1, 2 : 5, 6-di-O-isopropylidène- α -D-glucose.

10,4 g de 1, 2 : 5, 6-di-O-isopropylidène- α -D-glucose sont introduits dans le vase de réaction A. La pièce F dans laquelle est introduit 1,56 g de potassium en petits morceaux est attachée en E de l'appareil. Le vase de réaction balayé par un courant de gaz ammoniac introduit par l'orifice C est plongé dans un DEWAR rempli du mélange réfrigérant carboglace-acétone. Une quantité suffisante d'ammoniac liquide pour dissoudre le dérivé glucidique est alors introduite tandis que l'on fait passer un lent courant de gaz ammoniac pour garder la solution sous agitation. Le métal alcalin est alors projeté, morceau par morceau, à l'aide de la pièce F. L'alcoolate est formé quand tout le métal est introduit et que la coloration bleue a disparu. L'ammoniac est enfin éliminé, tout d'abord, en retirant le DEWAR, puis en chauffant doucement le vase de réaction à l'aide d'un bain-marie. De l'éther sec est alors additionné par l'orifice C.

b) Alkylation de l'alcoolate de potassium du 1, 2 : 5, 6-di-O-isopropylidène- α -D-glucose

La solution étherée du sel de potassium du diacétone glucose est portée à reflux avec 5 ml d'iodure de méthyle. Lorsque la méthylation est complète (une aliquote dissoute dans l'eau doit donner une solution neutre) l'excès d'iodure de méthyle est distillé et le résidu extrait par l'éther. Cette méthode de méthylation a été utilisée avec succès pour perméthyliser les méthylglycosides tel le méthyl-mannoside (MUSKAT (97)). Dans ce cas, l'agent d'alky-

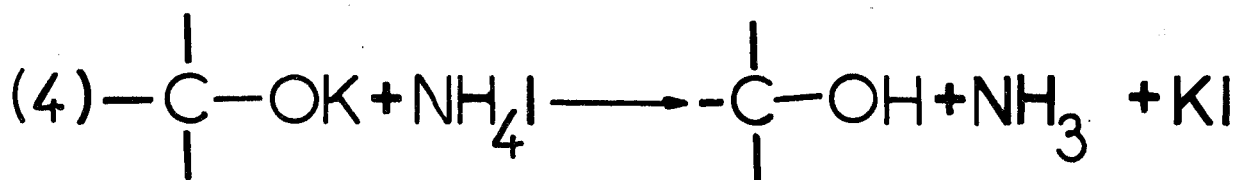
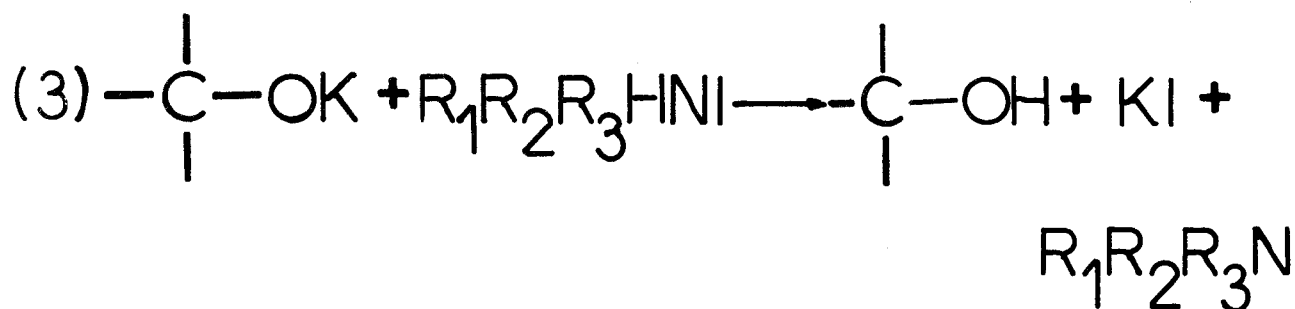
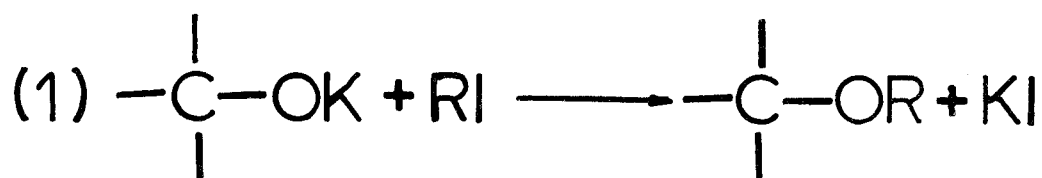


Figure 4

Schémas des réactions compétitives dans la formation de l'alcoolate selon MUSKAT (98)

($\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4$ peuvent être des groupements alkylés ou de l'hydrogène).



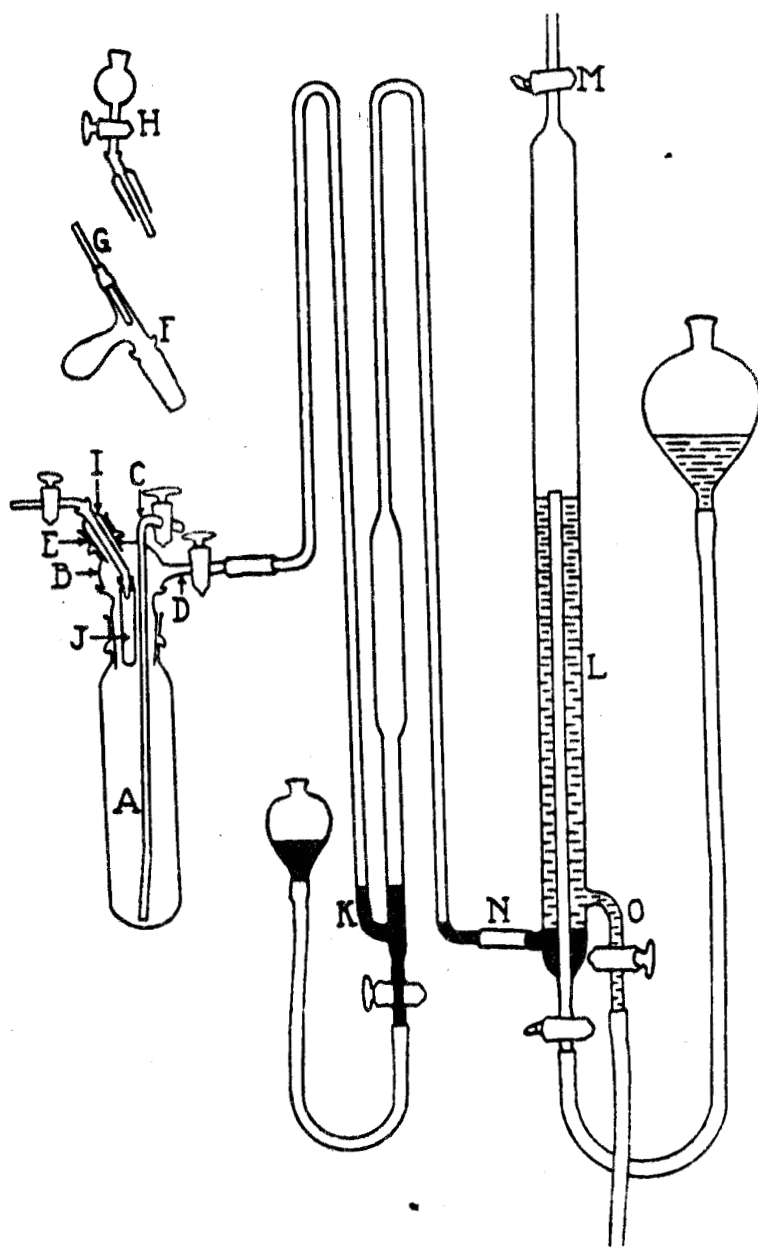


Figure 5

Appareil de MUSKAT (99)



lation est additionné directement dans le mélange réactionnel sans avoir pris le soin de se débarrasser de l'ammoniac liquide. Cette méthode de méthylation est remarquable du point de vue de sa rapidité d'une part, et, d'autre part, du point de vue rendement. Par cette technique, le méthyl tétra-O-méthyl mannoside est synthétisé avec un rendement de 92 p. 100.

2 - Méthylation des polysaccharides

FREUDENBERG et Coll. (100) ont appliqué ce procédé à la méthylation de la cellulose et de l'amidon. Ces auteurs obtiennent une méthylation totale de la cellulose et montrent que l'amidon peut être méthylé directement. BOURNE, FANTES et PEAT (101) considèrent cette méthode comme la plus satisfaisante pour substituer les polysaccharides et en particulier l'amidon. HODGE, KARJALA et HILBERT (102) ont décrit le procédé de méthylation de l'amylose et de l'amylopectine dans l'ammoniac liquide. Le protocole expérimental est décrit dans l'appendice technique (voir p.250).

En 1957, ISBELL et al. (103) publient une microméthode de méthylation des polysaccharides. Dans cette technique le polysaccharide est traité avec du sodium ou préférentiellement avec du potassium dans l'ammoniac liquide. L'alkylation est conduite dans un solvant inerte tel le 1, 2-di-méthoxy-éthane avec un excès d'iodure de méthyle. L'addition de terre de diatomée augmente la surface de réaction ce qui est favorable à la méthylation totale. A l'aide de cette technique les auteurs perméthylent des quantités de 2 à 10 mg de polysaccharides qui ne pourraient être alkylés par les techniques classiques. L'hydrolyse du polysaccharide perméthylé ne donne pas de produits non méthylés ou monométhylés ce qui est une preuve en faveur de la méthylation totale.

C - Conclusions

Ce procédé de méthylation donne d'excellents résultats. Il est à nos jours couramment utilisé pour perméthylé les polysaccharides tels les dextrans (BOURNE, SIDEBOTHAM et WEIGEL) (104). Son intérêt réside dans sa rapidité. En outre, les rendements de méthylation sont excellents.

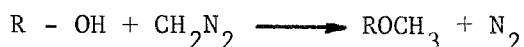
Enfin, grâce aux travaux de ISBELL et al. (105) il est possible de méthyler et d'analyser de faibles quantités de polysaccharides (2 à 10 mg).

7 - PROCÉDES DE METHYLATION PAR LE DIAZOMETHANE

A - Principe

La réaction de méthylation des hydroxyles par le diazométhane

(HOUGH et THEOBALD (106)) s'écrit :



Le diazométhane (*) méthyle préférentiellement les fonctions hydroxyles de composés à caractère acide ; les alcools neutres sont beaucoup moins réactifs. Cette technique de méthylation a été plus souvent utilisée pour estérifier les acides uroniques et également pour former les méthyl-glycosides des sucres réducteurs.

L'action d'un excès de diazométhane sur les polyuronides tels les acides alginiques (LUCAS et STEWART)(107) ou les pectines (DEUEL, HUBER et LEUENBERGER) (108) et VOLLMERT) (109) fournit une estérification quantitative et seulement une éthérification très limitée. Le réactif produit quelques dégradations, ce qui est minime par rapport à ce qui se produit avec d'autres procédés d'estérification. Cependant, NEUKOM et DEUEL (110) signalent que même à des températures de -20°C , il peut y avoir rupture de liaisons glycosidiques.

Les sucres non réducteurs et les polysaccharides sont méthylés partiellement et au hasard. La méthylation du méthyl- α -D-glucopyranoside (HOUGH et JONES) (111) par le diazométhane conduit à un mélange d'éthers méthyliques ; de même, il est impossible de perméthyliser un polysaccharide même avec de multiples traitements avec l'agent de méthylation. L'accessibilité des groupes hydroxyles du polymère est fondamentale : c'est ainsi que plusieurs cycles au diazométhane, appliqués au coton anhydre provoquent une méthylation maximale de 6,5 p. 100 seulement (CROON) (112) mais le coton mercerisé se méthyle dans les mêmes conditions, à 14,8 p. 100 (HEAD) (113). L'eau (SCHMID) (114), le méthanol (HOUGH et JONES) (115), le cuivre (NIERENSTEIN) (116), le bore amorphe (HERSIG et SCHONBACH) (117) sont des catalyseurs de la réaction. Actuellement, cette technique est couramment utilisée avec succès, pour méthyler les molécules glucidiques possédant des substituants très labiles en milieu alcalin. Dans ce cas, la réaction est catalysée par le trifluorure de bore (CASERIO et Coll. (118)).

B - Applications de la méthode de méthylation par le diazométhane

1 - Méthylosidation des monosaccharides et des oligosaccharides

(*) Le diazométhane est préparé extemporéement à partir de la N-nitroso-N-méthyl-urée, par le procédé de ARNDT (119) (voir l'appendice technique p.255).

Le diazométhane a été utilisé par KUHN et BAER (120) pour réaliser la méthylosidation de monosaccharides et d'oligosaccharides. Appliqué à la N-acétylglucosamine, le mode opératoire est décrit dans l'appendice technique (voir p.250). Les auteurs obtiennent à partir de 2 g de N-acétyl-D-glucosamine, 1 g de méthyl-2-acétamino-2-désoxy-β-D-glucosaminide cristallisé.

2 - Méthylation des monosaccharides substitués par des groupements alcali-labiles

La méthylation des sucres contenant des substituants alcali-labiles, groupement acétyl par exemple, par les agents classiques d'alkylation l'iodure de méthyle ou le sulfate de méthyle en présence de bases comme l'oxyde d'argent ou l'hydroxyde de baryum, n'est pas réalisable à cause de la mobilité des substituants en milieu basique.

En 1966, GROS et FLEMATTI (121) montrent que cette difficulté peut être surmontée en utilisant comme agent de méthylation le diazométhane dans l'éther en présence de trifluorure de bore ; réactif qui avait déjà été signalé par CASERIO et al (122) en 1958. Dans ces conditions acides, les substituants ne sont pas affectés alors que les hydroxyles libres sont rapidement méthylés. (NEEMAN et al. (123) (MÜLLER et RUNDEL) (124), MÜLLER et Coll. (125).

De très nombreuses applications de cette technique de méthylation sont citées dans la littérature. Ainsi, du 1,2,3,4-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranose méthylé par le diazométhane dans l'éther en présence de trifluorure de bore fournit le 1,2,3,4-tétra-O-acétyl-6-O-méthyl-β-D-glucopyranose (GROS et FLEMATTI) (126) alors que la méthylation de ce même dérivé acétylé du glucose avec de l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent fournit du méthyl-2,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranoside par déplacement du groupement acétyl du carbone 1 sur le carbone 6.

Cette technique a permis d'isoler les 2,4 et 6-O-méthyl-D-glucoses ainsi que le 2-mono-O-méthyl-D-galactose (MASTRONARDI et al.) (127), le 2-mono-O-méthyl-D-mannose (DEFERRARI et al.) (128), le 4 mono-O-méthyl-D-galactose et le 4,6-di-O-méthyl-D-galactose (GROS et MASTRONARDI) (129) et le 6-mono-O-méthyl-D-mannose (GROS et GRUNEIRO) (130). Le mode opératoire de méthylation appliqué au méthyl-2,3,4-tri-O-acétyl-α-D-mannopyranoside (GROS et GRUNEIRO) (131) est décrit dans l'appendice technique (voir p.251). Après O-désacétylation, les auteurs obtiennent le méthyl-6-mono-O-méthyl-α-D-mannopyranoside qui cristallise dans l'éthanol.

3 - Méthylation des polysaccharides

Nous avons vu dans les généralités sur cette méthode de méthy-

lation que le diazométhane permet des estérifications quantitatives mais que les étherifications sont toujours partielles. Cette méthode convient donc particulièrement bien à la méthylation des polysaccharides riches en acides uroniques. Elle a quelquefois été utilisée pour méthyler d'autres polysaccharides comme la cellulose (HEAD) (132). Le mode opératoire appliqué par cet auteur pour substituer la cellulose est le suivant : le coton est traité pendant 10 heures à reflux par une solution de soude à 2 p. 100. On le lave ensuite à l'eau et on le sèche sous pression réduite à température du laboratoire sur anhydride phosphorique. A un mélange maintenu à 0°C de 2,5 ml d'eau et 100 ml d'éther anhydre contenant du diazométhane à la concentration de 0,5 M, on ajoute 1 g de coton traité par la soude. Le flacon est bouché par un caoutchouc muni d'un tube capillaire court et maintenu pendant une semaine à 0°C. On lave ensuite le coton à l'éther sec et sous air sec. On le traite finalement pendant 1 heure par une solution d'acide acétique à 10 p. 100 et on le sèche sous pression réduite sur anhydride phosphorique. La méthylation est alors répétée en additionnant l'échantillon sec au mélange eau (2,5 ml) solution étherée de diazométhane à 0,5 M (100 ml) dans les conditions décrites précédemment. Six traitements identiques d'une semaine chacun à 0°C sont réalisés, pour obtenir finalement 14,9 p. 100 de groupes "méthoxy" soit un degré de substitution de 0,84 p. 100.

C - Conclusions

La méthode de méthylation à l'aide du diazométhane est intéressante car elle est la seule qui permette l'alkylation de molécules substituées par des groupements alcali-labiles. C'est donc une technique de choix pour méthyler des monosaccharides ou des polysaccharides contenant des groupements acétylés.

Cette méthode est encore appliquée pour synthétiser les méthylsides de monosaccharides ou pour méthyler les polysaccharides acides de type acide alginique. Dans ce dernier cas, si les fonctions acides carboxyliques sont généralement quantitativement estérifiées, il n'en va pas de même pour les hydroxyles alcooliques qui subissent une méthylation partielle.

VI - PROCÉDES DE KUHN ET COLL

A - Principe

Le peu d'efficacité des méthodes de méthylation que nous venons de décrire est dû à l'absence d'un solvant propre aux méthylations. On sait, par exemple, qu'une réaction qui se fait difficilement dans un solvant donné

peut devenir totale dans un autre solvant. KUHN et al. ont choisi la diméthylformamide (DMFA) ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme solvant de méthylation. Ces procédés de méthylation dans ces solvants ont fait l'objet d'une revue générale publiée en 1963 par WALLENFELS et al. (133). Plusieurs méthodes ont été décrites qui diffèrent par les agents basiques utilisés.

1 - Iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent

a) Dans la diméthylformamide (KUHN, TRISCHMANN et LÖW) (134) : méthylation du fructose et du lacto-N-tétrahydroxytol (obtenu par réduction du tétraose par le borohydrure de potassium).

b) Dans le diméthylsulfoxyde (BECHTLER) (135) : méthylation des polysaccharides tels l'amidon et les dextrans.

2 - Iodure de méthyle avec de l'oxyde de baryum ou de l'hydroxyde de baryum et iodure de méthyle avec le mélange oxyde de baryum, hydroxyde de baryum

a) Dans la diméthylformamide (KUHN, BAER et SEELIGER) (136), (KUHN et TRISCHMANN) (137) : méthylation du N-acétyl-glucosaminitol.

b) Dans le diméthylsulfoxyde (BECHTLER) (138)

c) Dans le mélange diméthylsulfoxyde, diméthylformamide (BECHTLER) (139).

3 - Sulfate de méthyle avec de l'oxyde de baryum ou de l'hydroxyde de baryum et sulfate de méthyle avec le mélange oxyde de baryum, hydroxyde de baryum.

a) Dans la diméthylformamide (KUHN et TRISCHMANN) (140)

b) Dans le mélange diméthylsulfoxyde, diméthylformamide (KUHN et TRISCHMANN) (141) : méthylation de l'inositol.

Le sulfate de méthyle est quelquefois plus efficace que l'iodure de méthyle. L'oxyde de baryum et l'hydroxyde de baryum séparément ou en mélange sont généralement préférés à l'oxyde d'argent, cependant, de meilleurs résultats sont parfois obtenus avec l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent (KUHN et EGGE) (142).

Des quantités de l'ordre de 50 mg à 20 g de sucres peuvent être méthylés avec ces méthodes.

Le choix du solvant de méthylation est fondé sur la solubilité du substrat à substituer. Ainsi des composés tels le mésoinositol, l'amidon soluble, les dextrans sont pratiquement insolubles dans la diméthylformamide ; aussi est-il préférable d'utiliser comme agent de méthylation, l'iodure de

méthyle en présence d'oxyde de baryum, le solvant étant le diméthylsulfoxyde ou le mélange diméthylsulfoxyde, diméthylformamide (méthode 2 b et 2 c). La méthode "passe partout" est la technique 3 b qui utilise le sulfate de méthyle dans l'oxyde de baryum et pour laquelle le solvant est le mélange diméthylsulfoxyde, diméthylformamide. Il faut encore préciser que l'utilisation du diméthylsulfoxyde pur peut induire des dégradations de la molécule glucidique car, dans ce cas, la réaction est très drastique. L'iodure de méthyle réagit sur le diméthylsulfoxyde pour donner de l'iodure de triméthylsulfoxonium (KUHN et TRISCHMANN) (143). En outre, le diméthylsulfoxyde cristallise à 18,7°C il ne peut donc être utilisé dans les méthylations avec le sulfate de méthyle, ces réactions s'effectuant à des températures voisines de 0°C. C'est pour toutes ces raisons que le diméthylsulfoxyde est dilué avec de la diméthylformamide (généralement dans le rapport 1 : 1).

Les conditions optimales de méthylation en ce qui concerne l'influence du temps, de la température, du volume de solvant et de la quantité d'agent alcalin ont été étudiées avec beaucoup de soin par KUHN et al. en 1960 (144). Des observations effectuées par ces auteurs on peut retirer que la réaction de méthylation est plus effective en solution concentrée et qu'une élévation de la température du milieu réactionnel augmente le taux de méthylation.

Généralement, ces méthodes de méthylation peuvent être utilisées sans un blocage préalable de la fonction réductrice du monosaccharide ou de l'oligosaccharide réducteur ainsi, KUHN et GAUHE (145) en 1962 méthylient directement le lacto-N-néotétraose et au laboratoire, nous appliquons ces différentes techniques à la perméthylation d'oligosaccharides réducteurs sans avoir observé de dégradation (voir travaux personnels p. 80). D'autres auteurs comme WALKER et Coll. (146) utilisent la méthode de méthylation à l'iodure de méthyle, oxyde d'argent dans la diméthylformamide pour préparer avec des rendements de 90 p. 100 des monosaccharides perméthylés à partir du sucre réducteur. Il faut cependant noter que la liaison en 3 sur le monosaccharide terminal réducteur est fragilisée dans le milieu alcalin de méthylation. Des études déjà anciennes sur la stabilité de ces liaisons glycosidiques avaient montré qu'au bout de 30 mn à la température de la pièce un milieu carbonate de sodium 0,025 N, la moitié du disaccharide β -D-galactopyranosyl-(1 \longrightarrow 3)-N-acétyl-D-glucosamine était détruit (KUHN et Coll.) (147)

Pour éviter ces ruptures de liaisons glycosidiques, la fonction hémiacétalique du monosaccharide terminal réducteur est réduite, soit par hydrogénation en présence de palladium (réduction du lacto-N-tétraose par KUHN et BAER) (148) soit par les hydrures de métaux alcalins : borohydrure de sodium (KUHN et WIEGANDT)(149) , borohydrure de potassium (KUHN et Coll.) (150) .

Enfin, la méthode de méthylation au sulfate de méthyle en présence d'oxyde de baryum, dans la diméthylformamide (méthode 3a de KUHN et TRISCHMANN) (151) s'adapte très bien à la méthylation de monosaccharides ou d'oligosaccharides peracétylés synthétisés par réactions d'acétylation classiques ou par acétolyse des saccharides eux-mêmes. C'est ainsi que ces auteurs préparent avec de bons rendements (90 p. 100) de la perméthyl-glucosamine à partir du penta-O-acétyl-D-glucosamine.

B - Applications de la méthode de méthylation.

Les méthodes de KUHN et al. ont fait l'objet de tant d'applications qu'il serait illusoire de toutes les citer. Nous nous contenterons donc de donner les détails des méthodes les plus couramment utilisées que nous avons pu nous-même soumettre à une étude critique (voir travaux personnels p. 67)

1 - Méthylation des monosaccharides

Comme nous l'avons mentionné dans les généralités, les méthodes de KUHN et al. sont précieuses pour la synthèse des dérivés perméthylés des monosaccharides. Les rendements de réaction sont intéressants (de l'ordre de 90 p. 100), la réaction s'effectuant sur le monosaccharide même ou sur son dérivé peracétylé.

Nous décrivons dans l'appendice technique le protocole expérimental de perméthylation de la peracétyl-glucosamine suivant KUHN et TRISCHMANN (152) (voir p.252). Les dérivés perméthylés des monosaccharides peuvent être encore synthétisés par action de l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent dans le diméthylsulfoxyde (méthode de BECHTLER) (153) ou dans la diméthylformamide (méthode de KUHN, TRISCHMANN et LÖW) (154).

2 - Méthylation des oligosaccharides

En 1956, KUHN, BAER et GAUHE (155) modifient la méthode originale de KUHN, TRISCHMANN et LÖW pour l'appliquer à la perméthylation d'oli-

gosaccharides isolés du lait de Femme, en particulier au lacto-N-fucopentaïol I, provenant de la réduction du lacto-N-fucopentaose I.

Le mode opératoire est le suivant : 2,1 g de fucopentaïol (obtenu par réduction du pentaose par le borohydrure de potassium) sont dissous dans 60 ml de DMFA anhydre : 20 ml d'iodure de méthyle et 20 g d'oxyde d'argent sont ajoutés en 20 mn, par petites portions, à la température ordinaire. On agite ensuite pendant une nuit. 5 ml d'iodure de méthyle et 5 g d'oxyde d'argent sont alors ajoutés au milieu réactionnel et on poursuit l'agitation pendant 8 heures. On décante, on filtre et on lave soigneusement le filtre (ou le précipité si on a centrifugé) par le chloroforme.

On abandonne ensuite pendant 18 à 24 heures à + 4°C : les sels d'argent colloïdaux et les formyl-dérivés cristallisent. On élimine les cristaux par filtration et on lave à l'eau la phase chloroformique pour éliminer les dernières traces des dérivés de la diméthylformamide. On sèche sur sulfate de sodium anhydre. On évapore ensuite sous vide. Le résidu brunâtre est alors repris deux fois par 20 à 30 ml d'iodure de méthyle, 5 g d'Ag₂O et 3 g de sulfate de calcium anhydre. On porte deux fois à reflux pendant 4 heures. Après filtration et lavage du résidu insoluble avec du chloroforme, l'oligosaccharide perméthylé est obtenu par évaporation à sec du filtrat et des extraits chloroformiques.

Cette méthode de méthylation des oligosaccharides est transposable à la substitution d'hétérosaccharides comme les glycopeptides isolés d'hydrolysats protéasiques des glycoprotéines.

Il faut toutefois noter que cette méthode de méthylation ne fournit pas, en un seul temps, l'oligosaccharide perméthylé. Ce résultat est obtenu après plusieurs cycles de méthylation dans les mêmes conditions, ou mieux, après un ou plusieurs cycles de méthylation suivant la méthode de HAKOMORI (156) ; dans ce cas, l'oligosaccharide partiellement méthylé peut être traité par des agents beaucoup plus drastiques (hydrure de sodium dans le diméthylsulfoxyde) sans être dégradé.

Les méthodes de KUHN et al. ont été adaptées aux différents substrats à méthyler. C'est ainsi que KABAT et al. (157) ont réussi à miniaturiser la technique de KUHN, BAER et SEELIGER (158) pour alkyler des oligosaccharides d'activité de groupes sanguins. Le mode opératoire est le suivant :

1 à 2 mg d'oligosaccharide sont dissous dans 150 ml de diméthylformamide. 75 ml d'iodure de méthyle et 100 mg d'oxyde de baryum sont additionnés. Le tube est alors scellé et agité pendant 2,5 h. 1 ml de chloroforme est ensuite ajouté et le précipité est éliminé par centrifugation. Après séchage, le résidu est soumis à un deuxième cycle de méthylation dans les mêmes conditions. Cette méthode nécessite l'identification des éthers méthyliques par chromatographie en phase gazeuse.

3 - Méthylation des polysaccharides

Les méthodes de KUHN et al. s'adaptent très bien à la perméthylation des polysaccharides si ceux-ci se dissolvent dans les solvants d'alkylation, c'est-à-dire, la diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde ou les mélanges DMFA, DMSO. Lorsque le polysaccharide ne se dissout pas dans ces solvants, il est méthylé partiellement par la technique de HAWORTH. Le résidu obtenu se dissout alors dans la diméthylformamide et peut être méthylé par une méthode de KUHN, la méthode de KUHN, LÖW et TRISCHMANN(159) à l'iodure de méthyle, oxyde de baryum, par exemple. Cette technique a été utilisée par LESCHZINER et CEREZO (160) ainsi que par GORIN et SPENCER (161) pour méthyler un galactomannane et un L-rhamno-D-mannane.

En 1963, SRIVASTAVA , HARSHE et SINGH(162) publient une méthode de méthylation qui rappelle la technique de BECHTLER (163) : méthylation à l'aide de l'iodure de méthyle et de l'oxyde de baryum dans le diméthylsulfoxyde. Cette technique a été utilisée par PARIKH et JONES (164) pour alkyler un polysaccharide riche en galactose et acide galacturonique isolé d'une gomme. Le mode opératoire est décrit dans l'appendice technique (voir p.252). Le polysaccharide méthylé, analysé en spectroscopie Infra-Rouge, ne montre plus de bande d'absorption dans la région $3400-3600\text{ cm}^{-1}$ ce qui permet de conclure à une méthylation totale de la molécule.

C - Conclusions

Les méthodes de KUHN et al. conduisent, dans le cas des monosaccharides et des oligosaccharides, à une forte proportion de dérivés perméthylés. Lorsque les molécules glucidiques sont soumises à un seul cycle de méthylation, des produits sous méthylés subsistent. Ceux-ci disparaissent lorsqu'on augmente le nombre de cycles à reflux dans l'iodure de méthyle en

présence d'oxyde d'argent. Ce progrès dans la perméthylation est à imputer au solvant et plus particulièrement à sa polarité. Il est juste de penser qu'un accroissement de la polarité du solvant conduira à une méthylation plus poussée. Ceci a été vérifié par SRIVASTAVA, HARSHE et SINGH (165) (méthylation dans le diméthylsulfoxyde par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde de baryum) et par KUHN et TRISCHMANN (166) (méthylation dans des mélanges de DMFA/DMSO par le sulfate de méthyle en présence d'oxyde de baryum ou d'hydroxyde de baryum).

Enfin, les méthodes de KUHN peuvent être couplées avec d'autres techniques plus efficaces mais plus drastiques comme la méthode de HAKOMORI (167). Elles permettent donc de stabiliser la molécule glucidique et en particulier de réaliser une méthylosidation de la fonction réductrice du monosaccharide ou de l'oligosaccharide réducteur.

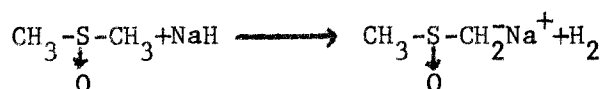
VII - PROCÉDE DE HAKOMORI

A - Principe

L'apparition du procédé de méthylation de HAKOMORI (168) est liée à l'étude des propriétés du méthyl-sulfinyle carbanion entreprise en 1962 par COREY et CHAYKOVSKY⁽¹⁶⁹⁾ et appliquée à l'alkoxylation des fonctions hydroxylées de composés aromatiques. Les auteurs avaient remarqué, sur ces composés, une réaction très importante de déprotonation en présence de ce carbanion. Il fut donc considéré que le principe de cette méthode pouvait être appliqué aux composés glucidiques de structure plus ou moins complexe. Le schéma de réaction est comparable à celui de la réaction des sucres dans l'ammoniac liquide en présence de sodium (voir p.25). Cette méthode est cependant plus avantageuse que la précédente en effet, elle est plus rapide et son efficacité est totale, elle peut être contrôlée plus facilement par la quantité de réactif que l'on additionne; enfin, elle s'effectue à la température du laboratoire et ne nécessite pas d'appareillage particulier.

La méthylation se déroule en trois temps :

1) Formation du méthyl-sulfinyle carbanion par action de l'hydrure de sodium sur le diméthylsulfoxyde :



2) Formation d'alcoolates par action du méthyl-sulfinyle carbanion sur les groupements hydroxylés :



3) Etherification par action de l'iodure de méthyle sur les alcoolates de sodium :



Cette méthode nécessite quelques précautions ; en effet, un monosaccharide ou un oligosaccharide est rapidement dégradé dans les conditions de la méthylation plus particulièrement en raison de l'extrême basicité du milieu ; de même, les liaisons glycosidiques alcali-labiles, comme la liaison O-glycosidique d'une N-acétylgalactosamine sur une sérine ou une thréonine, sont rapidement coupées. Il faut donc d'une part, bloquer les fonctions réductrices des monosaccharides ou des oligosaccharides par méthylosidation pour les premiers, ou méthylation partielle pour les seconds d'autre part, utiliser d'autres techniques de méthylation pour les glycoprotides à liaisons O-glycosidiques.

B - Protocole expérimental original de HAKOMORI (170)

HAKOMORI a conduit ses expériences de méthylation sur trois types de molécules glucidiques : un cérébroside, un polysaccharide : le glycogène et un glycoprotide : l'ovomucoïde. Le protocole expérimental original de méthylation d'un cérébroside est décrit dans l'appendice technique (voir p. 253). Après un cycle de méthylation, l'auteur n'observe aucune bande d'absorption à 3400, 3500 cm^{-1} .

En ce qui concerne la méthylation du polysaccharide, seules les conditions de temps diffèrent : dans ce cas, le glycogène est laissé en contact avec le carbanion pendant 6 h et l'alkylation est prolongée durant une nuit. Le produit perméthylé est isolé par dialyse et lyophilisation. Deux cycles de méthylation sont nécessaires pour faire disparaître la bande d'absorption caractéristique de la fonction hydroxylée.

Comme nous pouvons le constater, cette méthode permet de méthyler le glycogène en quelques jours avec moins de 100 mg de substrat, les procédés conventionnels réclamant quelquefois des mois pour arriver à une méthylation totale en partant de plusieurs grammes de substrat (HAWORTH, HIRST et ISHERWOOD) (171) (BACON, BALDWIN et BELL) (172).

Quant à l'ovomucoïde, l'auteur méthyle la glycoprotéine native dans les mêmes conditions que pour le glycogène et isole le produit méthylé par dialyse. Dans ce cas, les rendements sont assez faibles puisqu'il ne retrouve que 25 mg de glycoprotide méthylé sur 100 mg d'ovomucoïde natif. Ces pertes sont dues à la précipitation d'environ un tiers de la quantité de glycoprotide de départ durant la réaction de perméthylation.

C - Applications et modifications de la méthode de HAKOMORI

Comme nous venons de le mentionner dans le précédent paragraphe, la méthode de HAKOMORI s'adapte à de nombreux substrats aussi différents qu'un glycolipide, un glycoprotide et un polysaccharide. On peut donc utiliser cette technique avec succès sur de nombreux composés glucidiques. Cependant, le premier obstacle à l'application de cette méthode de méthylation est la difficulté de solubiliser certains polysaccharides ou glycoprotides dans le solvant, c'est-à-dire le diméthylsulfoxyde. A chaque fois que le composé glucidique forme une solution limpide dans le diméthylsulfoxyde, la réaction de méthylation est quantitative (SANDFORD) (173), (KOELTZOW, EPLEY et CONRAD) (174). Quand la solubilisation du polysaccharide n'est pas réalisable immédiatement, elle peut être augmentée par une lyophilisation suivie d'un passage sur un tamis de 100 à 120 "mesh". Enfin, la solubilité du matériel glucidique peut être accrue par chauffage à 60-80°C dans le diméthylsulfoxyde. Il est bien évident que le taux de méthylation est fonction de la solubilisation du substrat dans le solvant.

Un autre inconvénient de la méthode de HAKOMORI provient du milieu réactionnel extrêmement drastique. En effet, il ne fait pas de doute que le système hydrure de sodium, iodure de méthyle, diméthylsulfoxyde est beaucoup plus basique dans cette réaction (MARTIN, WEISE et NICLAS) (175) que la soude dans le procédé de méthylation de HAWORTH. ANDERSON et al. (176) ont montré que certains polysaccharides pouvaient subir des réactions de dépolymérisation comme les polysaccharides de Gomme d'Acacia qui perdent des résidus de L-rhamnose en position terminale non réductrice, et également de l'acide glucuronique. Dans ce polyuronide, le L-rhamnose étant lié en 4 de l'acide glucuronique, le détachement du L-rhamnose peut s'expliquer par une réaction de β -élimination en C₄ de l'acide uronique. Il faut cependant bien se garder de faire un parallèle entre les réactions de dégradation alcaline

en milieu aqueux et dans le diméthylsulfoxyde. Cette remarque est illustrée par la méthylation quantitative dans les conditions de HAKOMORI du disaccharide 3-O- α -D-glucopyranosyluronic acid -D-mannopyranose (GAHAN, SANDFORD et CONRAD) (177) et d'un polymère constitué d'unités de répétition tétrasaccharidique liées par des ponts phosphodiester (REBERS et HEIDELBERGER) (178).

Il faut enfin préciser que les acides uroniques sont méthyl-estérifiés dans des conditions de méthylation selon HAKOMORI (SANDFORD et CONRAD) (179), (GAHAN, SANDFORD et CONRAD) (180) et que les groupements "acétamido" des N-acétylosamines sont convertis en groupements N-méthyl-acétamido (STOFFYN, STOFFYN et ORR) (181).

De nombreuses modifications ont été apportées à la méthode originale de HAKOMORI (182). Ainsi ANDERSON et CREE (183) modifient les conditions d'addition des réactions. Le protocole expérimental de méthylation d'une gomme d'acacia est le suivant : 4,64 g de gomme sont dissous dans 250 ml de diméthylsulfoxyde et 2 g d'hydrure de sodium sont additionnés par petites portions sous agitation pendant 1 h. La solution devient jaune et se solidifie. 5 ml d'iodure de méthyle sont alors ajoutés, sous agitation, goutte à goutte, pendant 2 h. La réaction est poursuivie toute la nuit. Trois additions d'hydrure de sodium et d'iodure de méthyle sont effectuées selon les conditions décrites plus haut. Le mélange réactionnel est alors dilué avec de l'eau (1,5 l) pour précipiter le polysaccharide et l'excès d'iodure de méthyle est éliminé par aspiration. La solution surnageante est traitée avec le chloroforme et la phase organique combinée avec le précipité de gomme. La solution obtenue, lavée à l'eau pour éliminer le diméthylsulfoxyde, est séchée au sulfate de magnésium, puis concentrée à l'évaporateur rotatif. Enfin, le polysaccharide perméthylé est précipité par l'éther de pétrole et isolé par centrifugation. (rendement 85 p. 100, dosage des fonctions "méthoxy" : 40,8 p. 100). Nous constatons que les auteurs effectuent plusieurs cycles de méthylation en continu, alors que dans sa technique originale, HAKOMORI arrête la réaction par dialyse du polysaccharide partiellement méthylé et renouvelle une alkylation sur le produit sec.

Des variantes à la méthode de HAKOMORI ont été publiées et concernent l'intervention d'autres bases que le méthylsulfinyle carbanion

dans la formation de l'alcoolate. Nous citerons les méthodes de DINER, SWEET et BROWN (184) (action de l'hydrure de sodium sur le méthyl- α -D-glucoside dans la diméthylformamide ou le diméthoxy-1, 2-éthane, puis addition de l'iodure de méthyle) et de BRIMACOMBE et al. (185, 186, 187) (action de l'hydrure de sodium sur des monosaccharides plus ou moins substitués dissous dans la diméthylformamide ou la N-acétyl-2-pyrrolidone, puis addition d'un dérivé halogéné, généralement le bromure). Le tétrahydrofurane a été utilisé à la place de la diméthylformamide ou du diméthylsulfoxyde (LEMAL, PACTH et WOODWARD (188)). Cette technique donne des résultats moyens dans le cas des monosaccharides en raison de la faible solubilité de ces derniers dans le tétrahydrofurane : par contre, les monosaccharides substitués, plus solubles dans ce solvant, se méthylent d'une façon satisfaisante (EADES et Coll. (189)).

D - Conclusions

La méthode de HAKOMORI conduit à des rendements de méthylation quantitatifs aussi bien sur les monosaccharides que sur les polysaccharides. Il faut toutefois mentionner que, comme toute réaction en phase liquide, la réaction de méthylation sera quantitative si la molécule à alkyler est dissoute dans le diméthylsulfoxyde ; ce qui semble difficile avec les polysaccharides de haut poids moléculaire ou les hétéropolysaccharides comme un glycoprotide qui précipite durant la réaction. Nous verrons, dans nos travaux personnels, que la glycoprotéine peut être perméthylée correctement en travaillant sur le glycopeptide isolé par hydrolyse protéasique.

Quant aux monosaccharides et oligosaccharides, l'extrême basicité du milieu réactionnel oblige le blocage préalable de la fonction réductrice.

Cette méthode présente l'avantage d'être extrêmement rapide et de nécessiter peu de substrats. L'efficacité de cette méthode est à attribuer à la réactivité du méthylsulfinyle carbanion dans la formation de l'alcoolate ; l'éthérification se faisant alors très facilement grâce à l'iodure ou au sulfate de méthyle. Il faut noter que les méthodes de méthylation par l'iodure de méthyle dans l'ammoniac liquide en présence de sodium (voir p. 25) répondent au même schéma de réaction : formation de l'al-

coolate, puis éthérification. Toutefois, ces techniques sont d'un emploi plus difficile, nécessitent un appareillage sophistiqué et sont également plus longues et moins complètes.

VIII - CONCLUSIONS GENERALES SUR LES METHODES DE METHYLATION

Nous pouvons conclure au terme de cet historique que le nombre important de techniques proposées montre assez les difficultés que les auteurs ont rencontrées et sur lesquelles nous butons encore, dans la méthylation des glucides. Toutefois, cette étude nous conduit à reconnaître l'amélioration progressive des méthodes de perméthylation.

Les premières techniques faisaient agir directement l'iodure ou le sulfate de méthyle sur les fonctions hydroxyles ; ceci est difficile en raison de la faible mobilité des hydrogènes de ces fonctions (les alcools secondaires sont, en effet, des acides très faibles).

La méthode de HAWORTH marque sur ce point une nette amélioration et constitue la première technique qui utilise la formation intermédiaire de l'alcoolate dans le passage à l'éther. Cet alcoolate est formé en milieu aqueux par action de la soude concentrée. La réaction des alcoolates avec les halogénures d'alcoyle ou les sulfates d'alcoyle constitue ensuite la méthode générale de préparation des éthers (synthèse de WILLIAMSON). Ces alcoolates peuvent être synthétisés très facilement à partir de l'amidure de sodium ; cette technique est utilisée dans les réactions de méthylation décrites par FREUDENBERG et HIXON (190) et par MUSKAT (191) qui dissolvent la molécule glucidique dans l'ammoniac liquide puis font agir un métal alcalin, le sodium ou le potassium ; l'alkylation étant réalisée grâce à l'iodure de méthyle. Cette technique est intéressante car le rendement en produit méthylé est élevé ; toutefois, elle n'est pas d'utilisation facile.

La méthode de HAKOMORI, constitue le parachèvement actuel des procédés de méthylation. Le méthyl-sulfinyl carbanion formé par action de l'hydrure de sodium sur le diméthylsulfoxyde est une base extrêmement

forte qui réagit rapidement à température ordinaire sur les fonctions hydroxyles pour former les alcoolates ; l'éthérisation est réalisée par l'iodure de méthyle.

Dans cette conclusion, il faut évidemment mentionner les travaux effectués par KUHN et ses collaborateurs qui, avant HAKOMORI, apportèrent des techniques de perméthylation très efficaces des molécules glucidiques. Dans ce type de méthode, l'étape essentielle de la réaction de méthylation est la dissociation de l'halogénure CH_3I . Dans une telle réaction, la polarité du solvant favorise beaucoup l'apparition des charges. C'est pourquoi la méthylation dans la diméthylformamide fournit de hauts degrés de méthylation. L'oxyde d'argent, catalyseur de la réaction contribue notablement à la perméthylation de la molécule ; en effet, l'ion Ag^+ se comporte comme un accepteur d'électrons et favorise la dissociation de l'iodure de méthyle.

Enfin, des méthodes de méthylation déjà anciennes qui utilisent le diazométhane permettent d'alkyler des molécules glucidiques substituées par des groupements alcali-labiles comme les groupements acétylés. Dans ce cas, la réaction est effectuée dans le dichlorométhane et catalysée par le trifluorure de bore en solution dans l'éther.

TRAVAUX PERSONNELS

=====

INTRODUCTION

Nous avons rassemblé dans ce chapitre les résultats que nous a apportés l'application d'une série de méthodes et, en particulier, la perméthylation des glucides dont le but principal était de déterminer la structure de différents glycannes d'une même glycoprotéine et de glycoprotéines différentes. Les finalités de ces recherches sont multiples. Tout d'abord, l'étude comparée de la structure des glycannes des glycoprotéines nous apportera, peut-être, des renseignements précieux sur la manière dont ces polysaccharides sont biosynthétisés et, en particulier, s'il existe un codage de cette biosynthèse. Cette démarche rejoint celle de MONTREUIL (192) et de NEUBERGER (193) lors de leur comparaison des structures peptidiques au voisinage des points d'attache glycanne-protide. La présence constante d'un β -hydroxy-amino-acide en β du résidu d'asparagine leur avait fait émettre l'hypothèse que le branchement des groupements glycaniques est codé par ces hydroxy-amino-acides.

D'autre part, cette étude nous a permis d'affiner et de miniaturiser les techniques d'investigation de la structure des glycannes des glycoprotéines ce qui nous permettra, dans un proche avenir, de nous lancer sur des glycoprotéines de membranes de cellules normales et transformées.

Du point de vue purement technique, nous pouvons admettre que les méthodes de détermination de la composition en monosaccharides de ces glycoprotéines sont satisfaisantes. Il n'en est pas de même pour ce qui est des techniques d'exploration de la structure des glycannes et en particulier de la perméthylation de ces molécules. L'étude critique que nous nous sommes efforcés de réaliser nous a conduits à effectuer un choix parmi les techniques décrites dans l'historique de ce mémoire qui tient compte de la composition et du degré de complexité du substrat étudié. De plus, la pratique de l'analyse chromatographique des éthers méthyliques nous a posé le problème de la préparation et de l'identification de ces composés.

Le plan que nous avons adopté pour présenter nos travaux personnels comportera deux parties :

1 - Nous décrirons dans un premier temps, l'aspect technologique de nos

recherches sur la perméthylation des glycannes des glycoprotéines et des oligosaccharides.

Nous envisageons donc successivement :

a) L'application des techniques classiques de contrôle de la perméthylation aux glycannes méthylés.

b) Une étude critique des procédés de perméthylation des glycannes des glycoprotéines, ce qui nous amènera à effectuer un choix parmi les techniques utilisées.

c) L'identification des monosaccharides méthylés libérés par hydrolyse ou méthanolyse du glycanne perméthylé. Ceci nous amènera à préciser les conditions optimales de libération des monosaccharides méthylés présents dans le glycanne perméthylé et à décrire les procédés chromatographiques d'identification de ces dérivés méthylés ainsi qu'un procédé de fractionnement de l'hydrolysate des glycopeptides perméthylés. Enfin, nous exposerons les résultats que nous avons obtenus en ce qui concerne la synthèse des éthers méthyliques témoins du galactose, du mannose et de la N-acétylglucosamine.

2 - Nous exposerons, dans un second temps, les résultats qui ont été obtenus, en travail d'équipe, grâce à l'application à divers glycoprotides et oligosaccharides des protocoles expérimentaux décrits dans la première partie de notre mémoire :

a) Structure des glycannes isolés de glycoprotéines : ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule, transferrine humaine, orosomucoïde.

b) Exploration de la structure de plusieurs oligosaccharides isolés, d'une part, des hydrolysats ou des acétolysats de glycoprotides (ovomucoïde, orosomucoïde) et, d'autre part, des urines de sujets normaux.

1ère PARTIE

MISE AU POINT DU PROCÉDE DE PERMETHYLATION

DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES

- 1 - CONTRÔLE DE LA PERMETHYLATION

- 2 - ETUDE CRITIQUE DES DIVERS PROCÉDES DE PERMETHYLATION

- 3 - MISE AU POINT D'UN PROCÉDE DE FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS DE GLYCO-PEPTIDES PERMETHYLES. IDENTIFICATION DES MONOSACCHARIDES METHYLES LIBERES PAR HYDROLYSE DU GLYCANNE METHYLE. SYNTHÈSE DES ETHERS METHYLIQUES TEMOINS.

CONTRÔLE DE LA PERMETHYLATION

Avant d'appliquer les différentes techniques de méthylation aux glycanes des glycoprotéines, il nous fallait un moyen de contrôler cette dernière. C'est pourquoi, à la suite des travaux effectués au laboratoire par SEGARD (194), TAKERKART (195) et DUPONT (196) nous avons repris l'étude des divers procédés qui permettent, sans ambiguïté, de conclure à une substitution totale de toutes les fonctions hydroxyles de l'oligosaccharide, du polysaccharide ou du glycopeptide méthylés. Le problème est capital. En effet, une méthylation incomplète pourra être la cause de graves erreurs lors de l'interprétation des résultats en particulier l'identification de monosaccharides sous méthylés qui ne proviennent pas du point de branchement mais d'une méthylation partielle.

Le contrôle de la perméthylation peut s'effectuer par l'application de trois types de méthodes :

- des méthodes chromatographiques,
- une méthode spectroscopique,
- des méthodes chimiques.

I - CONTROLE DE LA PERMETHYLATION PAR DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

Les divers procédés de chromatographie peuvent être utilisés au contrôle de la perméthylation des oligosaccharides ou des glycopeptides. Les analyses chromatographiques peuvent être effectuées avant ou après hydrolyse ou méthanolyse de l'oligosaccharide méthylé.

A - ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE AVANT HYDROLYSE

1 - Principe

L'analyse chromatographique d'un oligosaccharide pur méthylé doit fournir un composé homogène si ce dernier voit toutes ses fonctions hydroxyles substituées. La méthylation sera poursuivie tant que plusieurs taches apparaîtront sur les chromatogrammes.

Les analyses peuvent être effectuées par chromatographie sur papier ou en phase gazeuse pour des monosaccharides ou par chromatographie d'adsorption sur couche mince dans le cas d'oligosaccharides de masses molé-

culaires faibles (hexasaccharide par exemple).

2 - Mode opératoire

L'oligosaccharide méthyle est soumis directement à la chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans le système-solvant : chloroforme/méthanol (9 : 1) (v : v). Les plaques de chromatographie (4 x 9 cm) sont préparées en coulant une suspension de 30 g de Silicagel G (MERCK) dans 60 ml d'eau distillée. Cette technique nous permet de préparer 38 plaques en une seule opération. Le solvant est éliminé par chauffage à 130°C pendant 5 h. Parmi les divers systèmes solvant que nous avons utilisés le mélange chloroforme/méthanol (9 : 1) (v : v) nous a donné les meilleurs résultats. La chromatographie est réalisée dans des cuves de verre à base rectangulaire (12 x 8 x 5 cm) contenant 15 ml du système solvant. La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant arrive au sommet de la plaque, ce qui est réalisé en 15 mn. Après élimination du solvant, on pulvérise sur la plaque une solution aqueuse d'acide sulfurique à 5 p. 100. Les composés organiques apparaissent sous forme de taches marrons, grises ou noires, après un chauffage de quelques minutes sur plaque chauffante.

3 - Résultats

La figure 6 (p.51) rassemble les résultats du contrôle de la méthylation d'un hexasaccharide isolé de l'urine humaine par STRECKER (197). Nous pouvons constater qu'après un cycle de méthylation suivant la technique de KUHN, BAER et GAUHE (198) plusieurs taches apparaissent sur la plaque de chromatographie ce qui est le reflet d'une méthylation partielle. Par contre, si à cette première étape de méthylation nous appliquons deux cycles suivant la méthode de HAKOMORI (199) nous n'observons plus qu'un seul spot.

4 - Discussion

Cette technique est extrêmement précieuse pour le contrôle de la méthylation d'oligosaccharides. En effet, elle nécessite très peu de produits et elle est très rapide puisque toutes les opérations peuvent être effectuées en 1 h.

B - ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE APRES HYDROLYSE

1 - Principe

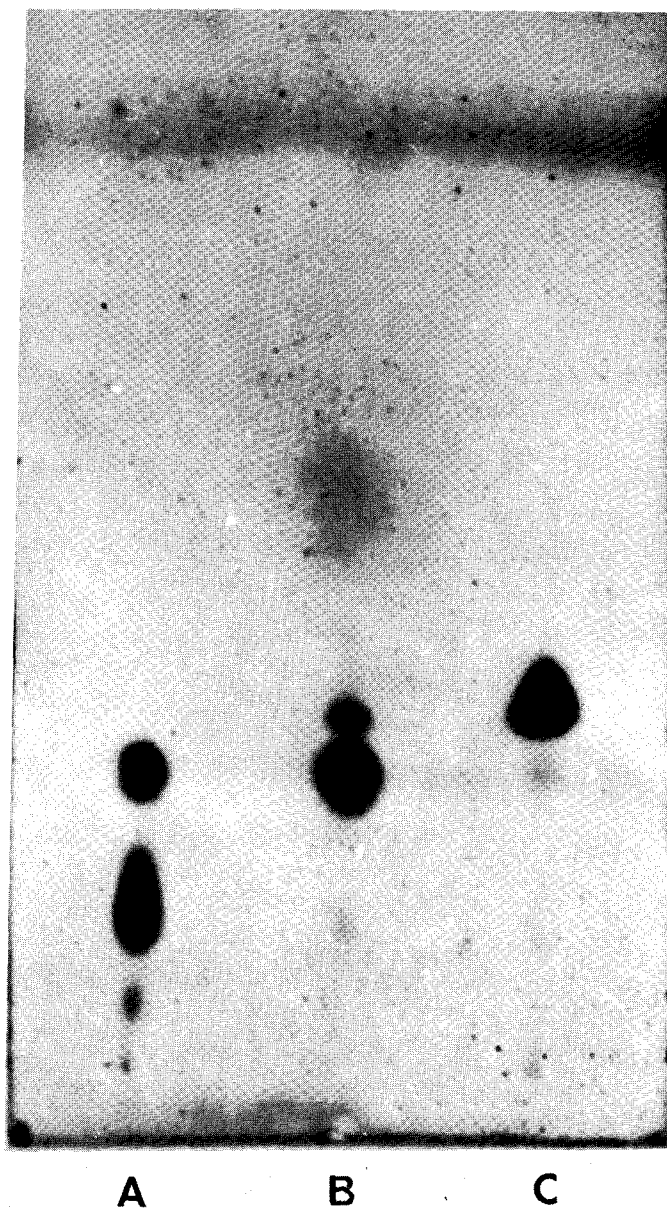


Figure 6

Chromatographie d'adsorption sur couche mince de Silicagel G (MERCK) dans le système-solvant : chloroforme/méthanol (9 : 1) (v : v) d'un hexasaccharide isolé de l'urine humaine perméthylé.

A : par un cycle de méthylation suivant la technique de KUHN, BAER et GAUHE (200)

B : par A + un cycle de méthylation suivant le procédé de HAKOMORI (201)

C : par A + 2 cycles de méthylation suivant le procédé de HAKOMORI



L'hydrolyse ou la méthanolyse d'un oligosaccharide ou d'un glycopeptide méthylé libère les monosaccharides substitués présents dans la molécule. Nous admettons que la perméthylation est atteinte lorsque les résultats des analyses chromatographiques après 1,2,3 ... n cycles de méthylation demeurent constants, c'est-à-dire, qu'il n'y a plus ni apparition ni disparition de dérivés méthylés sur les chromatogrammes. Pour ce faire, nous analysons les monosaccharides les plus difficiles à méthyler, en l'occurrence les N-acétylosamines.

2 - Mode opératoire

Une aliquote de glycopeptide perméthylé est hydrolysée suivant les conditions décrites plus haut (p.92). Les osamines méthylés ainsi libérés peuvent être analysés directement par chromatographie sur résine échangeuse de cations (voir p.114) ou après élimination des monosaccharides "neutres" méthylés (voir p.138) par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylsilylés sur une colonne de verre (180 x 0,3 cm) remplie de Chromosorb W ("mesh"100.120) à 3 p. 100 de silicone OV 17 (pour les conditions de la chromatographie, voir p.103).

3 - Résultats

La figure 7(p.53) nous montre les diagrammes de chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques de la glucosamine obtenus par hydrolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde méthylé par 1,2,3 et 4 cycles de méthylation suivant la technique de HAKOMORI (202). Nous pouvons constater qu'après le troisième cycle de méthylation, les chromatogrammes se stabilisent à deux pics qui correspondent à la 3,4,6-tri-O-méthyl-D-glucosamine et à la 3,6-di-O-méthyl-D-glucosamine.

4 - Discussion

Cette technique de contrôle de la perméthylation d'une molécule glucidique nous a donné de bons résultats au laboratoire, cependant, nous l'avons abandonnée au profit de la technique spectroscopique car elle nécessite des quantités importantes de glycopeptide (de l'ordre de 4 à 5 mg pour chaque aliquote hydrolysée) de plus, elle est très longue puisque chaque opération comprend une hydrolyse, un fractionnement des osamines méthylées et enfin une analyse de ces dernières en chromatographie de phase gazeuse après silylation.

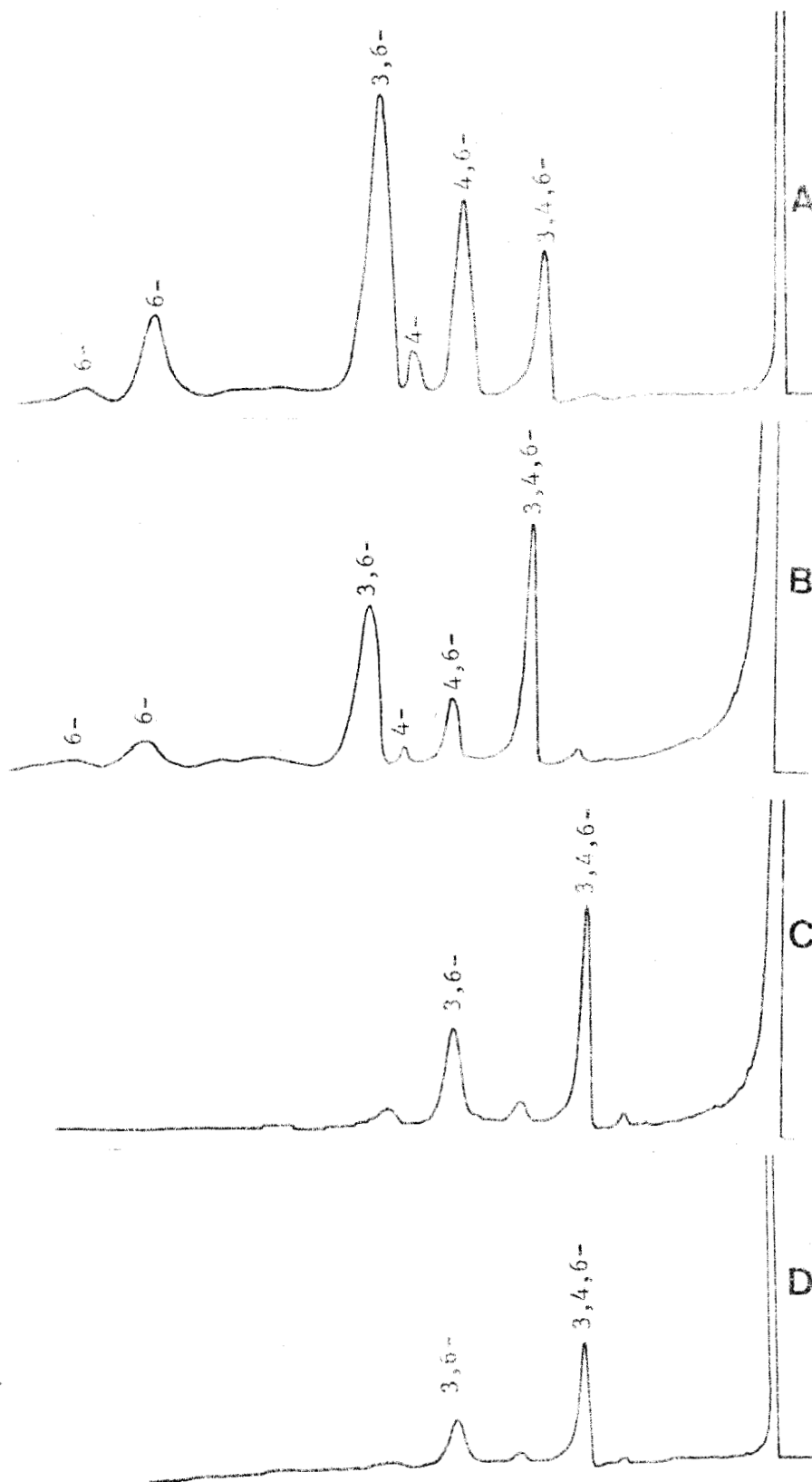


Figure 7



Chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés des O-méthyl-D-glucosamines obtenues par hydrolyse d'une aliquote de glycopeptide β de l'ovomucofide méthylé par 1 cycle (A), 2 cycles (B), 3 cycles (C) et 4 cycles (D) de méthylation suivant la technique de HAKOMORI.

Colonne de verre (0,3 x 180 cm) remplie de Chromosorb W AW. HMDS ("mesh" 100-120) à 3 p. 100 de silicone OV 17 ; température de la colonne : 120°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 20 ml/mn.

II - CONTROLE DE LA PERMETHYLATION PAR UNE METHODE SPECTROSCOPIQUE

A - PRINCIPE

Les molécules organiques ne résultent pas d'un assemblage rigide d'atomes, en effet, les liaisons qui unissent ces différents atomes peuvent être comparées à des ressorts plus ou moins forts dont les vibrations apparaissent à des fréquences déterminées. Quand une lumière Infra-Rouge de l'une de ces fréquences frappe la molécule, l'amplitude de la vibration s'accroît et de l'énergie est absorbée, ce qui se traduit dans le spectre par une bande d'absorption.

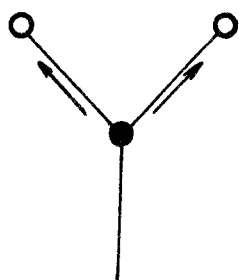
On distingue deux types de vibrations fondamentales dans les molécules :

- a) les vibrations de valence ou d'élongation ("stretching"), entre deux atomes considérés, dans lesquelles la distance entre les deux croît et décroît, ceux-ci restant dans l'axe de la liaison (Fig.8 ; p.55).
- b) les vibrations de déformation angulaire ("bending") dans lesquelles la position des atomes change par rapport à l'axe de la liaison originale (Fig.8 ; p.55).

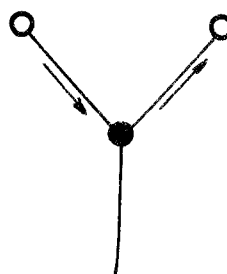
Les spectres Infra-Rouge des monosaccharides et plus encore des glycopeptides sont extrêmement complexes et leur interprétation complète n'est pas possible. Cependant, ils présentent un grand intérêt d'une part, pour identifier les sucres ; dans ce cas le spectre constitue une sorte de "carte d'identité", d'autre part, pour déceler la présence de groupements fonctionnels. C'est ce deuxième point qui nous intéresse pour le problème du contrôle de la perméthylation. En effet, la réaction de méthylation remplace les liaisons O-H, qui présentent une absorbance à 3500 cm^{-1} par des liaisons O-CH₃ qui ont un maximum d'absorbance à 1060-1150 cm^{-1} . La perméthylation totale d'un polysaccharide doit donc se manifester par l'absence de toute bande d'absorption à 3500 cm^{-1} et par l'apparition d'une bande vers 1060-1150 cm^{-1} .

(Les différentes fréquences d'absorption Infra-Rouge concernant la chimie des glucides sont réunies dans le tableau 1 (p.56).

Vibrations de valence ou d'élongation

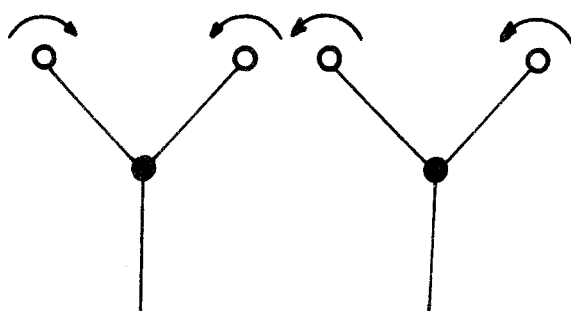


symétrique

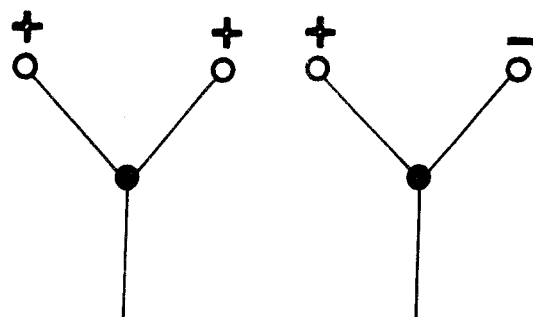


asymétrique

Vibrations de déformation angulaire



cisaillement rotation plane
dans le plan



balancement torsion
hors du plan

(les signes + et - symbolisent des vibrations perpendiculaires au plan du papier).

Figure 8



Types de vibrations fondamentales dans les molécules sous l'effet d'une radiation Infra-Rouge.

Tableau I

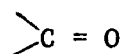
Quelques fréquences d'absorption Infra-Rouge caractéristiques

A - Liaison de type A-H

O-H (libre)	3500-3700 cm ⁻¹
OH (lié)	3100-3500 cm ⁻¹
N-H (libre)	3200-3500 cm ⁻¹
N-H (lié)	3100-3500 cm ⁻¹
NH ₂	3200-3300 cm ⁻¹
C-H	3200-3300 cm ⁻¹

B - Liaison C-O éther 1060-1150 cm⁻¹

C - Liaison du type A = B



- carbonyle	1760-1800 cm ⁻¹
-aldéhyde ou cétone	1650-1725 cm ⁻¹
- amide	1625-1700 cm ⁻¹



B - Mode opératoire

2 mg de glycopeptide perméthylé préalablement desséchés en dessiccateur sur anhydride phosphorique pendant 48 h, sont homogénéisés avec 200 mg de bromure de potassium, puis comprimés dans une presse à pastiller. On obtient ainsi une pastille que l'on interpose sur le faisceau de mesure en ayant soin d'introduire une pastille de bromure de potassium sur le faisceau de mesure témoin.

La manipulation peut être également effectuée en phase liquide, en dissolvant le glycopeptide perméthylé dans du tétrachlorure de carbone. (*).

C - Résultats

Nous avons appliqué la méthode au contrôle de la perméthylation des glycopeptides. La figure 9 (p.58) montre deux spectres Infra-Rouge du glycopeptide β de l'ovomucoïde. Nous pouvons constater qu'après un cycle de méthylation suivant la technique de HAKOMORI (203) il reste une bande d'absorption à 3500 cm^{-1} , ce qui indique la présence des fonctions O-H libres. Le deuxième diagramme Infra-Rouge qui correspond à l'analyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde méthylé par trois cycles de méthylation selon le mode opératoire de HAKOMORI, ne montre plus de bande d'absorption à 3500 cm^{-1} . La molécule est totalement substituée.

Nous voudrions préciser que le glycopeptide méthylé doit être débarrassé de toute trace de solvants de méthylation et en particulier de diméthylsulfoxyde. En effet, ce solvant retient l'eau ce qui, d'une part, fournit une cause d'erreur dans la lecture du spectre et d'autre part, rend difficile la confection de la pastille. C'est pour ces raisons que nous purifions le glycopeptide méthylé par chromatographie de gel filtration sur colonne de Séphadex LH 20 dans le système solvant chloroforme éthanol 1 : 1 (voir p. 84).

(*) Nous avons utilisé le spectrographe PERKIN-ELMER modèle 21, du laboratoire de Chimie Organique. Nous remercions Monsieur le Professeur GLACET et Monsieur COUTURIER, Maître-Assistant, qui nous ont permis d'effectuer nos mesures et qui nous ont initié à la spectroscopie Infra-Rouge.

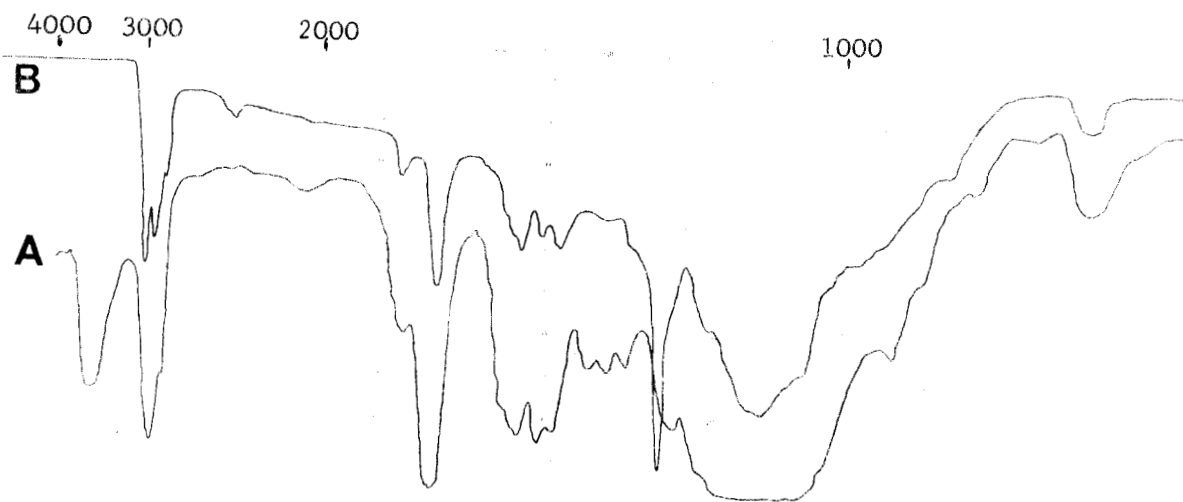


Figure 9

Spectres Infra-Rouge du glycopeptide β de l'ovomucoïde méthylié par 1 cycle de méthylation (A) suivant la technique de HAKOMO-RI et par 3 cycles de méthylation (B) suivant le même procédé.



D - Discussion

Cette technique est extrêmement précieuse pour le contrôle de la méthylation des polysaccharides ou des glycopeptides. En effet il suffit, après chaque cycle de méthylation, de lire le spectre Infra-Rouge d'une aliquote de molécule glucidique méthylée dans la région du spectre comprise entre 3000 et 4000 cm^{-1} . Cette méthode est précise et, de plus, très sensible : WALLENFELS et al. (204) ont pu calculer que moins de 1 p. 100 de matériel partiellement substitué peut être détecté.

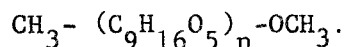
Enfin, cette technique nécessite peu de produits (1 à 2 mg) et est très rapide.

III - CONTROLE DE LA PERMETHYLATION PAR DES METHODES CHIMIQUES

A - Principe

Les méthodes chimiques de contrôle de la perméthylation d'un polysaccharide sont fondées sur le dosage des groupements "méthoxy". La constance du nombre des groupements "méthoxy" permet de conclure que la méthylation est maximale.

Les polysaccharides composés uniquement d'hexoses en chaîne linéaire répondent à la formule $\text{H}-(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n-\text{OH}$. Le polysaccharide perméthylé a donc pour formule globale :



Pour n très grand (> 300), les deux $-\text{CH}_3$ terminaux sont négligeables et le pourcentage de groupements "méthoxy" d'un oside perméthylé sera :

$$\text{p. 100 } \text{CH}_3\text{O} = \frac{93 n}{204 n} \times 100 = 45,6$$

La figure 10(p.60) nous donne la courbe représentant le taux de groupements "méthoxy" en fonction de la masse moléculaire du polysaccharide perméthylé. Lorsque le polysaccharide est ramifié et composé de plusieurs types de monosaccharides, ce qui est le cas pour les glycanes des glycoprotéines, il n'est plus possible de calculer, à priori, le taux de groupements "méthoxy". On admet alors que la méthylation est totale quand

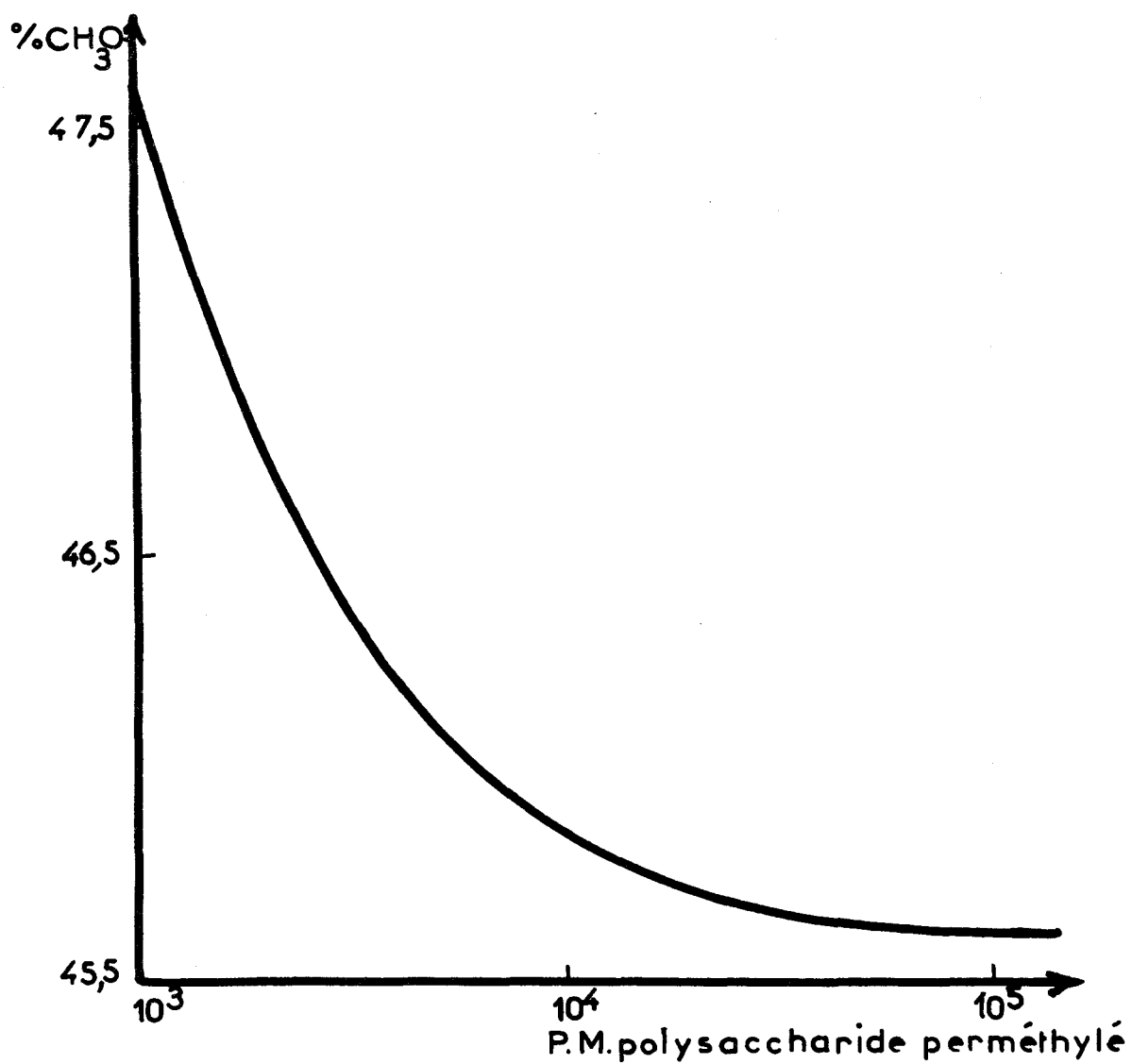


Figure 10

Courbe représentant le taux de groupements "méthoxy" en fonction de la masse moléculaire du polysaccharide perméthylé.



ce taux devient constant après n cycles de méthylation. Le dosage des groupements "méthoxy" est effectué par la méthode de ZEISEL (205) modifiée par VIEBÖCK et BRECKER (206) et par HOFFMAN et WOLFROM (207).

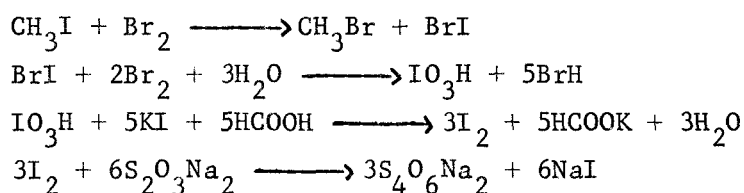
Cette méthode de contrôle par dosage des groupements "méthoxy" est fréquemment utilisée dans le cas de polysaccharides méthylés. Dans ce cas, la molécule est méthylée jusqu'à ce que le taux de groupement O-CH₃ atteigne 45,6 p. 100. Pour ce qui nous concerne, ce pourcentage ne pouvant pas être déterminé, à priori, la technique devient plus aléatoire. Seule la constance du nombre des groupements "méthoxy" permet de conclure que la méthylation est maximale. Pour cette raison, et surtout parce que la méthode réclame de l'ordre de 20 mg de polysaccharide méthylé, nous n'avons pas utilisé ce moyen de contrôle de la perméthylation. Nous donnerons toutefois dans le paragraphe suivant le mode opératoire.

B - Mode opératoire

Les groupements "méthoxy" sont réduits en iodure de méthyle par l'acide iodhydrique qui est ensuite dosé par l'un des procédés suivants :

1 - L'iodure de méthyle est entraîné par un courant de gaz carbonique et donne, par barbottage dans une solution de nitrate d'argent, un précipité d'iodure d'argent que l'on pèse.

2 - L'iodure de méthyle est entraîné dans une solution de brome et l'acide iodique formé est dosé par iodométrie. Les schémas des réactions sont les suivants :



Ce principe a été appliqué par VIEBÖCK et BRECKER (208) à la mise au point d'une microméthode de dosage des groupements "méthoxy".

Au laboratoire, SEGARD (209) et DUPONT (210) ont appliqué la méthode de HOFFMAN et WOLFROM (211).

1 - Matériel

L'appareil utilisé est celui de HOFFMAN et WOLFROM (212) décrit dans la figure 11 (p. 63).

2 - Réactifs

a) Solution d'acide iodhydrique redistillée (densité 1,7) (voir appendice technique p. 254).

b) Solution de lavage. La solution de lavage est obtenue en mélangeant, à parties égales, une solution aqueuse de sulfate de cadmium à 5 p. 100 et une solution aqueuse d'hyposulfite de sodium à 5 p. 100. Le précipité jaune qui apparaît n'altère pas les propriétés de la solution.

c) Gaz carbonique. Le gaz carbonique commercial doit passer sur une colonne de sulfate de calcium (Driérite) avant d'être introduit dans l'appareil.

d) Solution-piège. La "solution piège" est obtenue en dissolvant 35 g d'acétate de potassium dans 350 ml d'acide acétique glacial auquel on ajoute ensuite 7 ml de brome dépourvu d'iode. Pour stabiliser la solution il faut la conserver pendant une semaine environ à la lumière du jour.

3 - Mode opératoire

On vérifie d'abord l'étanchéité de l'appareil en appliquant une faible pression de CO_2 après avoir obturé le tube piège par un faible volume d'eau. Le niveau ne doit pas varier après plusieurs heures, une variation faible indiquant qu'une dissolution légère de gaz carbonique dans l'eau a eu lieu.

On fait ensuite passer pendant 10 mn, après avoir éliminé l'eau, un courant lent de gaz carbonique. On introduit alors l'acide iodhydrique dans le réacteur en faisant passer un lent courant de gaz carbonique. 3ml de la solution de lavage sont ensuite introduits par le robinet supérieur que l'on ferme dans la position indiquée dans la figure 11 (p. 63). On chauffe ensuite à reflux en maintenant le passage du gaz carbonique pendant 20 mn, après avoir ramené la solution à la température ordinaire.

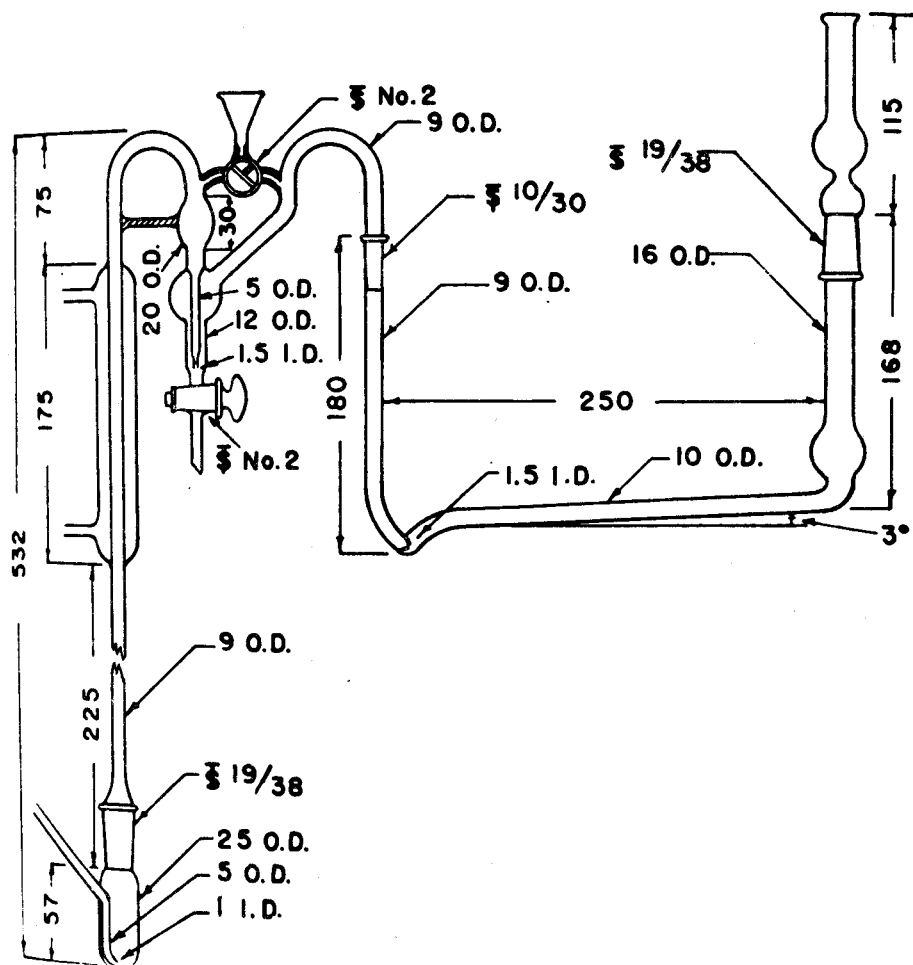


Figure 11

Appareil de HOFFMAN et WOLFROM pour la détermination des groupements "méthoxy".



L'échantillon à analyser est pesé. S'il est solide, on utilise des cupules d'acide tartrique comme support. S'il est liquide, on utilise une micropipette.

Quand l'acide iodhydrique est revenu à la température ordinaire, on arrête le passage du courant de gaz carbonique et on introduit 10 ml de la solution piège dans la partie terminale de l'appareil. On projette l'échantillon à doser dans le réacteur et on attend environ 20 mn pour obtenir une dissolution complète. On chauffe ensuite légèrement à reflux en maintenant un débit de gaz carbonique juste suffisant pour éviter les retours d'acide iodhydrique dans le tube d'arrivée.

Après une ébullition à reflux de 15 mn, le débit de gaz carbonique est réglé à raison de 2 bulles par seconde dans la solution de lavage. On modifie ensuite la position du piège en variant son inclinaison par rotation de l'ensemble sur son embout, de manière à prolonger pendant 5 à 7 secondes le contact des bulles avec la "solution-piège". Le chauffage est maintenu pendant 20 mn puis le passage de l'eau dans le condenseur est arrêté et le chauffage et le barbottage sont prolongés pendant encore 15 mn. La condensation doit se réaliser très nettement sur la partie du condenseur à air, ce qui correspond à un chauffage suffisant pour obtenir une réaction totale.

Après 15 mn de barbottage le piège est démonté, le réacteur est ramené à la température ordinaire et le passage du gaz carbonique est arrêté. L'acide iodhydrique du réacteur est conservé et peut être utilisé pour effectuer plusieurs dosages successifs.

La "solution piège" est introduite quantitativement dans un flacon de 250 ml. On ajoute 25 ml d'eau, 5 ml d'une solution aqueuse d'acétate de sodium à 25 p. 100, puis, goutte à goutte, de l'acide formique à 90 p. 100 (v : v) en agitant jusqu'à ce que la coloration du brome disparaisse. On bouche ensuite et on agite énergiquement pour augmenter la pression à l'intérieur du flacon, puis on ajoute 5 ml d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 10 p. 100 et environ 0,5 g d'iodure de potassium pur. L'iode libéré est dosé par une solution d'hyposulfite de sodium 0,1 N en présence d'empois d'amidon.

C - Discussion

Ce procédé de contrôle de la perméthylation d'une molécule glucidique est couramment utilisé en ce qui concerne les polysaccharides, comme les Gommés étudiées par ANDERSON et DEA (213); dans ce cas les auteurs méthylient de grandes quantités de substrat (10 g) ce qui leur permet d'utiliser cette technique.

En ce qui nous concerne, cette méthode n'a pas été appliquée au contrôle de la perméthylation des glycopeptides, d'une part, parce qu'elle nécessite des quantités importantes de produit (de l'ordre de 10 à 20 mg) et, d'autre part, parce qu'il n'est pas toujours possible de déterminer à priori le nombre de groupements hydroxyyles de la molécule.

IV - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LE CONTROLE DE LA PERMETHYLATION

Les conclusions que nous pouvons tirer de nos recherches sur les méthodes de contrôle de la perméthylation des molécules glucidiques sont les suivantes :

1 - La chromatographie d'adsorption sur couche mince de Silicagel G dans le système solvant chloroforme/méthanol 9 : 1 donne, dans le cas d'oligosaccharides méthylés, des renseignements extrêmement précieux sur leur degré de substitution. La méthylation de l'oligosaccharide sera poursuivie jusqu'à ce qu'une seule tache apparaisse après la chromatographie. Cette technique est de plus très rapide et ne nécessite que peu de produit.

2 - La comparaison des profils chromatographiques des osamines méthylées obtenues après hydrolyse d'une aliquote de glycopeptides méthylés après 1,2, n cycles de méthylation donne de bons résultats sans toutefois indiquer que la molécule soit substituée totalement. Nous l'avons cependant abandonnée car elle est très longue et surtout elle nécessite des quantités importantes de substrats.

3 - La spectroscopie Infra-Rouge est certainement la méthode la plus élégante pour déterminer avec précision si la molécule étudiée est totalement substituée. Cette technique est rapide (le temps de confection de la pastille et de déroulement du spectre) et elle ne neces-

site que peu de produits (1 à 2 mg de glycopeptide méthylé). Au laboratoire, nous vérifions en spectroscopie Infra-Rouge la disparition de la bande caractéristique des O-H après chaque cycle de méthylation.

4 - Le dosage des groupements "méthoxy" est une technique précise pour la détermination du taux de substitution des fonctions hydroxylées des molécules glucidiques en cours de méthylation. Toutefois, nous n'avons pas utilisé cette technique car elle réclame de grandes quantités de substrat. En outre, il n'est pas possible à partir des glycannes des glycoprotéines, de déterminer à priori le pourcentage de groupements "méthoxy" de la molécule perméthylée.

ETUDE CRITIQUE DES DIVERS PROCÉDES DE PERMETHYLATION

La présence dans les glycoprotéines d'une proportion élevée d'acides aminés est la cause principale des difficultés que l'on rencontre lors de la méthylation de ces hétéropolysaccharides. En effet, la présence de la protéine rend difficile la solubilisation de la molécule dans les solvants de méthylation ce qui se traduit par la précipitation de cette dernière durant la réaction. En outre, la présence des amino-acides provoque une consommation très importante de groupements méthyles qui se fixent préférentiellement sur les fonctions amines, hydroxyles et thiols des acides aminés. C'est pour toutes ces raisons que nous travaillons sur les glycopeptides obtenus par hydrolyses protéasiques des glycoprotéines. Nous obtenons ainsi des glyco-amino-acides ou des glycopeptides sur lesquels il est possible d'appliquer les méthodes de méthylation.

Les mises au point des procédés de perméthylation, de contrôle de la réaction et d'identification des monosaccharides méthylés libérés par hydrolyse ou méthanolyse ont été effectuées sur un glycopeptide isolé d'hydrolysats pronasiques de l'OVOMUCOÏDE. Les raisons qui nous ont guidé dans le choix de cette glycoprotéine sont de deux ordres. La première est que cette glycoprotéine du blanc d'oeuf présente des caractéristiques physico-chimiques voisines de composés étudiés au laboratoire tels : l'orosomucoïde, la transferrine, la lactotransferrine et les globulines immunes. La deuxième est que cette glycoprotéine se prépare facilement en quantités élevées et qu'elle représente donc un excellent matériau pour mettre au point des techniques dont l'application est ensuite étendue à d'autres substances et en particulier aux composés précédemment cités.

I - MATERIEL ET METHODES

A - ORIGINE ET COMPOSITION DE L'OVOMUCOÏDE

L'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule est préparé selon le procédé de FREDERICQ et DEUTSH (214). Il contient suivant les prépara-

tions 8 à 9 p. 100 d'oses "neutres" ; de 13 à 14,7 p. 100 de N-acétylglucosamine et de 0,85 à 0,9 p. 100 d'acide N-acétylneuraminique. Sa composition molaire est la suivante (pour une masse moléculaire de 24000): galactose 2, mannose 9, N-acétylglucosamine 20, acide N-acétylneuraminique 1. Toutes les préparations sont hétérogènes en immunoélectrophorèse et comportent 4 arcs de précipitation (voir à ce sujet, MONTREUIL, CASTIGLIONI, ADAM-CHOSSON, CANER et QUEVAL) (215).

B - PREPARATION ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES

Nous appliquons le procédé décrit par YAMASHINA et MAKINO (216), modifié par MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (217), pour obtenir des glycopeptides à partir de l'ovomucoïde.

1 - Hydrolyse pronasique

A une solution de 10 g d'ovomucoïde dans 1 litre d'acétate de calcium 0,01 M, on ajoute 200 mg de Pronase (CALBIOCHEM). L'hydrolyse est effectuée à pH 8 et à 40°C, sous agitation, pendant 48 h en présence de toluène. Le pH est maintenu constant par l'addition de soude 0,1 N, contrôlée par un titrateur automatique (pH-stat Radiometer) et la consommation de soude est régulièrement déterminée. L'hydrolysate est ensuite ajusté à pH 4,5 avec de l'acide acétique glacial puis concentré à 20 ml environ et traité par 10 volumes d'éthanol absolu. Le mélange est maintenu pendant deux heures à la température du laboratoire puis à 2°C pendant 18 h. Le précipité qui s'est formé est recueilli par centrifugation dissous dans 500 ml d'acétate de calcium 0,01 M puis soumis à une nouvelle hydrolyse pronasique dans les conditions décrites ci-dessus. Ce protocole expérimental est répété encore deux fois, à la différence près que le précipité obtenu à partir du 4ème hydrolysate est soumis à une purification selon le mode opératoire décrit ci-dessous.

2 - Isolement des glycopeptides

La fraction glycopeptide est dissoute dans 50 ml d'eau distillée et la solution obtenue est additionnée d'un volume égal d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 10 g p. 100 ml.

Le précipité formé est éliminé par centrifugation, après un repos de 18 h, à 2°C. La solution surnageante est purifiée par un passage successif sur des colonnes (2 x 35 cm) d'échangeurs de cations (Do-

wex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; H⁺), puis d'anions (Duolite A-102-D ; "mesh" 25-50 ; HCO₂⁻). Le liquide effluent, auquel on joint les eaux de lavage des colonnes est concentré à 20 ml, dans un évaporateur rotatif. Les glycopeptides sont isolés par addition de 10 volumes d'éthanol absolu. Cette fraction glycopeptidique (400 mg) est ensuite débarrassée des peptides qui n'ont pas été retenus sur l'échangeur d'ions, par une chromatographie sur colonne (2 x 35 cm) de gel de Séphadex G-25. La fraction Séphadex (350 mg) est soumise à la chromatographie sur colonne (2 x 40 cm) de Dowex 50 x 2 ("mesh" 200-400 ; H⁺) ; l'élu-tion de la colonne par 1 litre d'eau distillée fournit une première fraction (fraction α), et le déplacement des glycopeptides fixés sur la colonne est ensuite réalisé, à pH 3,0, à l'aide d'un gradient de concentration en formiate de pyridine (système de deux réservoirs contenant, le premier 8 ml de pyridine, 12,5 ml d'acide formique et 479,5 ml d'eau distillée ; le second 160 ml de pyridine, 250 ml d'acide formique et 90 ml d'eau distillée). On obtient de cette manière les fractions β et γ (Fig. 12; p.70). La fraction β qui constitue notre matériel pour les mises au point des techniques de méthylation est homogène en électrophorèse dans divers systèmes tampon.

C - COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLLAIRE DES GLYCOPEPTIDES

1 - Méthodes

a) Composition centésimale en glucides

La composition centésimale en glucides des glycopeptides β a été déterminée par MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (218) à l'aide des méthodes suivantes (voir la revue générale de MONTREUIL et SPIK (219).

- Les monosaccharides "neutres" ont été dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (220), modifiée par RIMINGTON (221).
- Les osamines ont été déterminées par la méthode de ELSON et MORGAN (222) modifiée par BELCHER et al. (223) après hydrolyse des composés par l'acide chlorhydrique 4N, redistillé et exempt de fer, à 100°C pendant 4 h, en tube scellé sous vide.
- Les acides sialiques ont été dosés par la méthode à la diphenylamine de WERNER et ODIN (224).

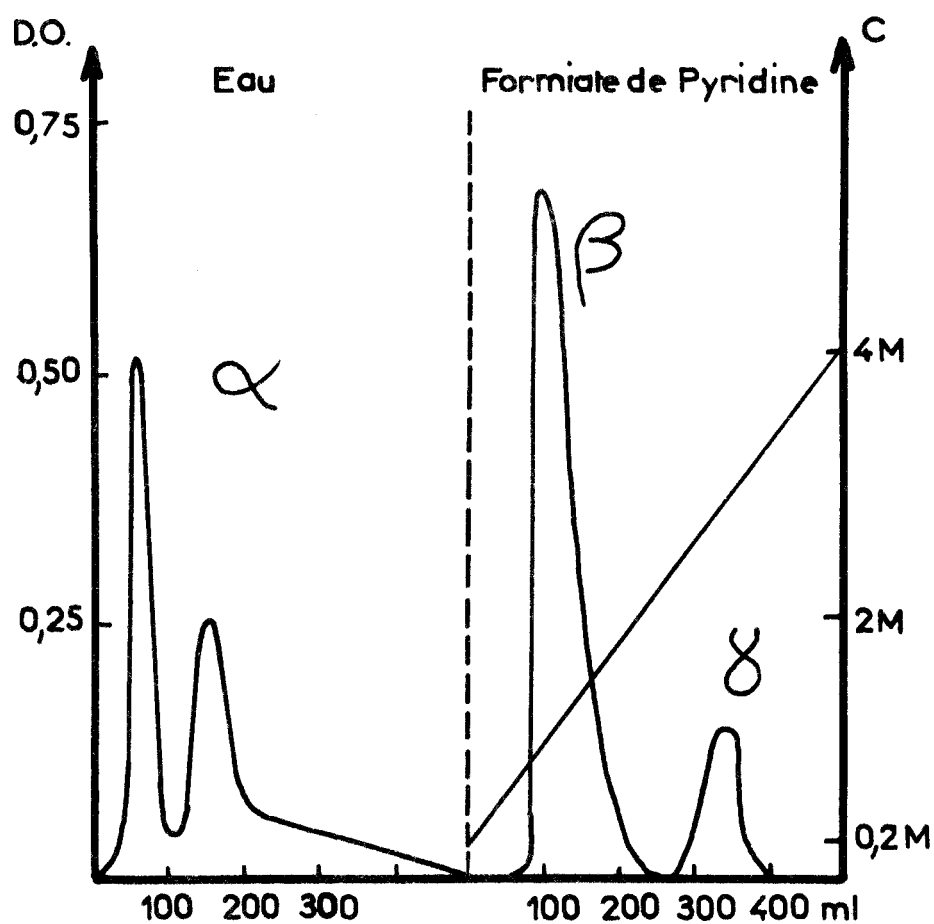


Figure 12



Diagramme de fractionnement des glycopeptides de l'ovomucoïde préalablement purifiés par chromatographie sur Séphadex G-25, sur colonne de Dowex 50 x 2 ("mesh" 200-400 ; H⁺) selon MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (225). Repérage des composés glycopeptidiques par la méthode colorimétrique au phénol-sulfurique de DUBOIS et al., (226). En ordonnée : D O = densité optique ; C = concentration en formiate de pyridine ; en abscisse = volumes d'élution.

b) Identification des glucides et composition molaire

Les monosaccharides "neutres" ont été identifiés et dosés par chromatographie sur papier (MONTREUIL, SPIK, DUMAISNIL et MONSIGNY) (227) et par chromatographie en phase gazeuse. Les oligosaccharides libres ou conjugués sont d'abord hydrolysés par l'acide chlorhydrique 1,5 N pendant 1,5 h à 100°C et les hydrolysats sont purifiés par un passage sur échangeurs d'ions : échangeur de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; H⁺) puis d'anions (Duolite A-102-D ; "mesh" 25-50 ; HCO₂⁻).

Les monosaccharides "neutres" ont été identifiés par chromatographie quantitative sur papier dans le système-solvant n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) de PARTRIDGE (228) et dosés par les méthodes de HUGHES et JEANLOZ (229) (élution par l'éthanol chlorhydrique des taches données par le réactif au phtalate d'aniline) et de MONTREUIL et SCHEPPLER (230) (élution des monosaccharides repérés par la révélation de témoins latéraux et dosage réductimétrique par le ferri-cyanure de potassium ou par chromatographie quantitative en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylsilylés (SWEETLEY et al.) (231) dans les conditions expérimentales suivantes : colonne de verre (180 x 0,3 cm) remplie de Chromosorb W ("mesh" 60 x 80) contenant 7 p. 100 de silicone OV 17 ; température de la colonne 148°C, de l'injecteur 200°C, du détecteur 210°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mn. (Fig. 13 ; p.72).

Les osamines préalablement libérées par une hydrolyse chlorhydrique (voir p.69), ont été identifiées et dosées par l'application des méthodes suivantes :

- Méthode de désamination de GARDELL, HEJKENSJOLD et ROCHNORLUND (232) :

Désamination à chaud par la ninhydrine de la glucosamine et de la galactosamine, respectivement, en arabinose et en lyxose qui sont aisément identifiés par chromatographie sur papier.

- Méthode de chromatographie sur colonne de GARDELL (233) :

Les osamines sont identifiées par chromatographie sur colonnes d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 200-400) : la glucosamine et la galactosamine donnent deux pics bien distincts.

- Méthode électrophorétique de FOSTER (234) :

Les osamines sont N-réacétylés par le procédé de LEVY et

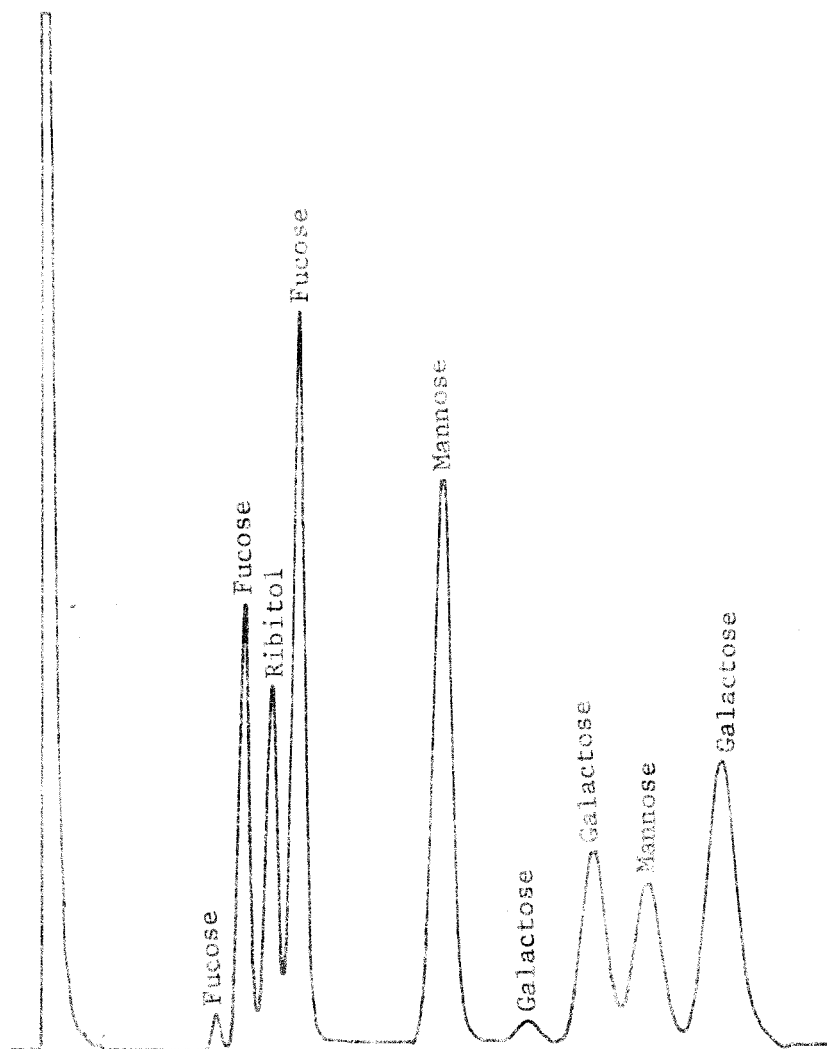


Figure 13

Chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides neutres (fucose, galactose et mannose) triméthylsilylés.

Colonne de verre (180 x 0,3 cm) remplie de chromosorb W ("mesh" 60-80) à 7 p. 100 de silicone OV 17 ; température du four 148°C ; du détecteur : 190°C ; de l'injecteur : 210°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/min ; Ribitol : témoin interne.



Mac ALLAN (235) (anhydride acétique en milieu alcalin) sous la forme de N-acétylosamines qui sont aisément séparées par électrophorèse sur papier (tampon borate 0,025 M de pH 9,2 ; 12 V/cm pendant 4 h) et dosées colorimétriquement par la méthode de REISSIG, STROMINGER et LELOIR (236).

Les acides sialiques préalablement libérés par une hydrolyse ménagée (acide sulfurique 0,1 N, à 80°C, pendant 1 h) sont purifiés sur des colonnes d'échangeurs de cations et d'anions (élution de ce dernier par l'acide formique 0,33 N) et identifiés par chromatographie sur papier dans le système-solvant de SVENNERHOLM et SVENNERHOLM (237) (n-butanol/n-propanol/HCl 0,1 N : 1 : 2 : 1)

Enfin, l'identification et le dosage des monosaccharides "neutres", des osamines et des acides sialiques présents dans les glycoprotides peuvent être effectués simultanément après méthanolyse de ce dernier par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylsilylés suivant un protocole expérimental voisin de celui de CLAMP, DAWSON et HOUGH (238). Les conditions opératoires sont les suivantes : une solution aqueuse de glycoprotide (250 à 500 µg de glucides totaux), à laquelle on additionne du ribitol (100 µg) comme témoin interne, est lyophilisée puis placée une nuit en dessiccateur sur anhydride phosphorique. Le résidu repris par 1 ml de méthanol chlorhydrique 1 N (préparé en dissolvant de l'acide chlorhydrique gazeux, préalablement séché, dans du méthanol anhydre) est placé à 80°C pendant 24 h. Le méthanolysat est ensuite refroidi, séché par passage d'un courant d'azote puis placé en dessiccateur en présence d'anhydride phosphorique et de soude en écailles. Les osamines et les acides sialiques sont N-réacétylés par la méthode de WHITE (239) (anhydride acétique (30 µl) dans le méthanol anhydre (90 µl) en présence d'acétate d'argent (2 mg). L'acétate d'argent est alors éliminé par filtration et le filtrat séché par un lent courant d'azote. Les méthylglycosides des monosaccharides "neutres", des N-acétylosamines et de l'acide N-acétylneuraminique dissous dans de la pyridine anhydre (200 µl) sont triméthylsilylés par le mélange hexaméthylidisilazane (40 µl), triméthylchlorosilane (20 µl) et chromatographiés sur colonne (300 x 0,3 cm en verre) de Chromosorb W AW

("mesh" 60-80) à 3 p. 100 de silicone OV 17 à la température programmée de 115°C à 200°C (0,5°C par minute), avec un débit de gaz vecteur azote de 20 ml/mn (Fig.14 ; p. 75).

2 - Résultats

Les résultats concernant la composition centésimale et molaire en glucides des fractions glycoprotidiques obtenues à partir des hydrolysats pronasiques de l'ovomucofde sont rassemblés dans les tableaux II (p. 76) et III(p. 77).

II - ETUDE CRITIQUE DES DIFFERENTS PROCEDES DE PERMETHYLATION

Nous avons étudié les caractéristiques des procédés de perméthylation dans le cas des glycopeptides et des oligosaccharides. Les produits de la réaction ont été analysés systématiquement par spectroscopie Infra-Rouge dans le cas des glycopeptides méthylés et par chromatographie d'adsorption sur couche mince dans le cas des oligosaccharides méthylés.

Afin de pouvoir réaliser un choix parmi les méthodes de méthylation existantes, nous avons appliqué les techniques suivantes :

- A : méthylation par la méthode de HAWORTH
- B : méthylation par les méthodes de KUHN
- C : méthylation par la méthode de HAKOMORI.

A - METHYLATION DES GLYCOPEPTIDES PAR LA METHODE DE HAWORTH

1 - Mode opératoire

Le glycopeptide β de l'ovomucofde est traité par le sulfate de méthyle en milieu alcalin dans les conditions suivantes : 100 mg de glycopeptide sont dissous dans 1 ml d'eau distillée dans un flacon de réaction à trois rodages. Le rodage central reçoit un condenseur, les deux rodages latéraux reçoivent chacun une ampoule : une pour la solution aqueuse de soude, l'autre pour le sulfate de méthyle. A la solution maintenue sous courant d'azote et sous agitation énergique, on ajoute 2 ml de sulfate de méthyle et 3,5 ml d'une solution aqueuse de soude (1,9 g pour 3,5 ml d'eau distillée) goutte à goutte pendant une période de 3 h.

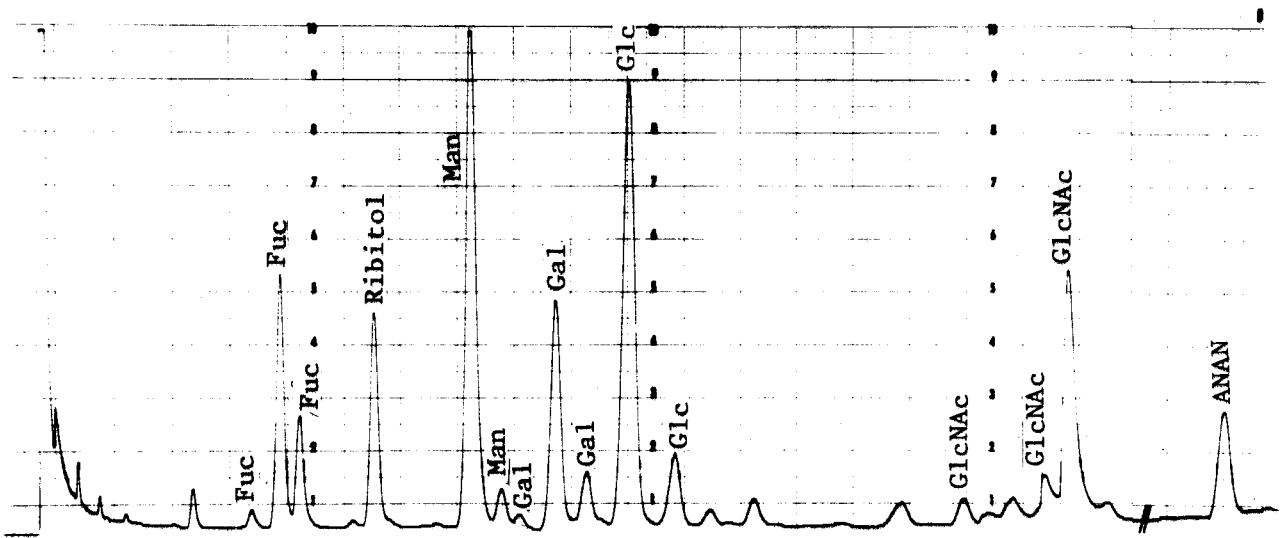


Figure 14

Chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides "neutres" (fucose, galactose, mannose et glucose), de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique méthyl-glycosilés et triméthylsilylés.

Colonne de verre (0,3X300cm) remplie de Chromosorb W AW ("mesh" 60-80) à 3p.100 de Silicone OV 17; température du four programmée de 115°C à 200°C à raison de 0,5°C/mn; de l'injecteur : 210°C; du détecteur : 240°C; débit du gaz vecteur (N₂) : 20ml/mn; ribitol : témoin interne.



Tableau II

Composition centésimale en glucides des glycopeptides α , β et γ isolés des hydrolysats pronasiques de l'ovomucoïde.

	Ovomucoïde natif	Glycopeptides		
		α	β	γ
Monosaccharides neutres	8,50	37,5	31,1	22,9
N-acétyl glucosamine	14,1	52,2	64,6	49,0
Acide N-acétyl neurami- nique	0,90	11,47	0	0

Valeurs exprimées en g d'oses pour 100 g de glycoprotides, obtenues par dosage colorimétrique par rapport à des témoins.



Tableau III

Composition molaire en glucides et en amino-acides des glycopeptides α , β et γ

	Glycopeptides		
	α	β	γ
	Galactose	1	1
Mannose	3	5	5
N-acétylglucosamine	4	10	10
Acide N-acétyl neuraminique	1	0	0
Acide aspartique	1,14	1,15	1,4
Thréonine	0,66	0,85	0,6
Sérine	0,29	0	0
Cysteine	0	0	1,4
Masse moléculaire (calculée d'après la composition molaire).	1958	3220	3543



Lorsque l'addition est terminée, la solution est encore agitée pendant 1 h.

La température est alors portée à 80°C pendant 20 mn pour décomposer l'excès de sulfate de méthyle.

La solution refroidie est neutralisée par l'acide sulfurique 2 N et extraite 5 fois par 5 ml de chloroforme. Les phases organiques rassemblées sont lavées 3 fois par 20 ml d'eau distillée et séchées sur sulfate de sodium anhydre. Après filtration, la phase chloroformique est évaporée à siccité à l'évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est soumis à un deuxième cycle de méthylation dans les mêmes conditions.

2 - Résultats

Les résultats de la méthylation du glycopeptide β de l'ovomucoïde par la méthode de HAWORTH ont été décevants. En effet, nous obtenons 18 mg de glycopeptide méthylé à partir de 100 mg du composé natif, de plus, le spectre Infra-Rouge indique clairement que la molécule est partiellement méthylée. (Fig. 15 ; p. 79).

3 - Discussion

Comme nous pouvons le constater, la méthode de HAWORTH méthyle partiellement les glycopeptides : les rendements faibles en produits substitués sont certainement dus à des réactions de dégradation d'une partie de la molécule glucidique. En outre, ce procédé ne peut être appliqué aux glycopeptides dont le glycanne est lié à la chaîne peptidique par une liaison O-glycosidique. En effet, dans les conditions de méthylation ce point d'attache serait rompu. Toutes ces raisons nous ont incités à utiliser d'autres procédés de méthylation, en particulier, les méthodes de KUHN.

B - METHYLATION DES GLYCOPEPTIDES PAR LES METHODES DE KUHN

1 - Principe

Le peu d'efficacité de la méthode de HAWORTH est dû à l'absence d'un solvant propre à la réaction de méthylation.

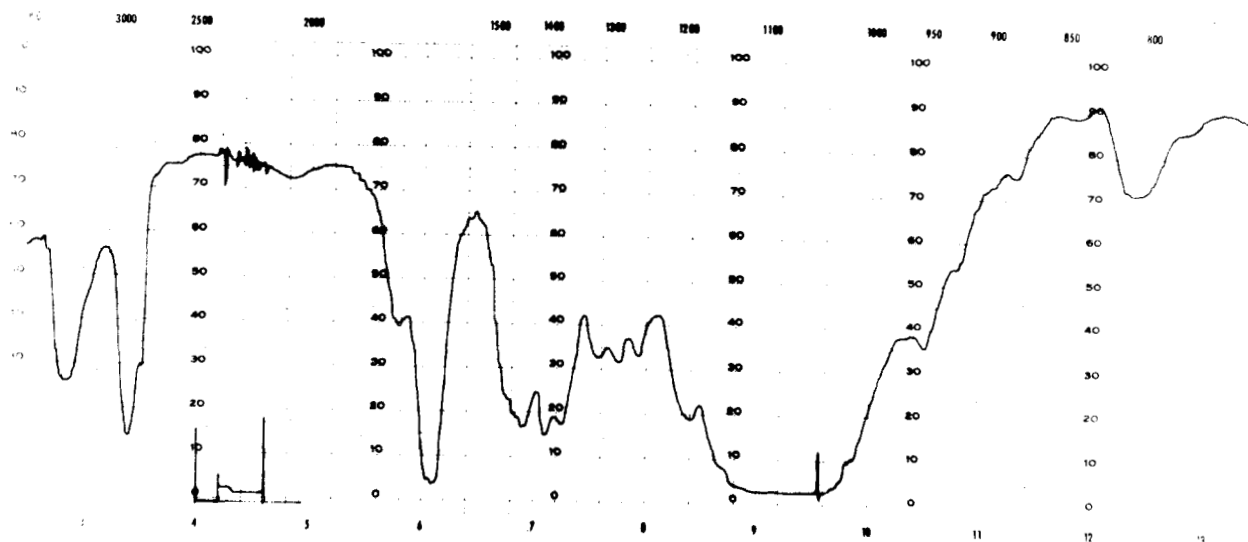


Figure 15

Spectre Infra-Rouge du glycopeptide β de l'ovomucor α de méthylé par deux cycles de méthylation suivant la technique de HAWORTH.



KUHN et Coll. ont introduit deux solvants très polaires pour réaliser la méthylation d'oligosaccharides, la diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde.

Ces méthodes de méthylation diffèrent les unes des autres par le solvant et par les agents basiques utilisés :

- $\text{ICH}_3/\text{Ag}_2\text{O}$ dans la diméthylformamide (240) ou dans le diméthylsulfoxyde (241).
- ICH_3/BaO et/ou $\text{Ba}(\text{OH})_2$ dans la diméthylformamide (242) ou dans le diméthylsulfoxyde (243).
- $\text{SO}_4(\text{CH}_3)_2$, BaO et/ou $\text{Ba}(\text{OH})_2$ dans la diméthylformamide (244) ou dans le diméthylsulfoxyde (245).

Nous avons appliqué les procédés de KUHN, BAER et GAUHE (246) ($\text{ICH}_3, \text{Ag}_2\text{O}$, DMFA) et de KUHN, BAER et SEELIGER (247) (ICH_3 , BaO , DMFA) à la méthylation des glycopeptides et des oligosaccharides.

2 - Modes opératoires

a) Méthode de KUHN, BAER et GAUHE

100 mg de glycopeptide $\frac{1}{b}$ de l'ovomucoïde sont dissous dans 15 ml de diméthylformamide. 2 ml d'iodure de méthyle et 2 g d'oxyde d'argent sont ensuite ajoutés en 30 mn par petites fractions à la température ordinaire. On agite pendant 24 h à l'obscurité, puis on procède à une nouvelle addition de réactifs : 0,4 g d'oxyde d'argent et 0,4 ml d'iodure de méthyle. L'agitation est poursuivie pendant encore 8 h. On filtre, on lave soigneusement le filtre avec du chloroforme. La solution obtenue est abandonnée à + 4°C pendant 18 à 24 h. Les sels d'argent colloïdaux et les formyl-dérivés cristallisent. On élimine les cristaux par filtration et on lave la phase chloroformique par trois fois 20 ml d'eau distillée pour éliminer les dernières traces des dérivés de la diméthylformamide. La solution chloroformique, séchée sur sulfate de sodium anhydre, est ensuite évaporée sous vide à l'évaporateur rotatif puis sous un courant d'air sec.

Au résidu brunâtre repris par 1 ml d'iodure de méthyle, on ajoute 250 mg d'oxyde d'argent et 150 mg de sulfate de calcium anhydre. L'ensemble est chauffé pendant 4 h à reflux.

On arrête alors le chauffage et on effectue une seconde addition de 1 ml d'iodure de méthyle, 250 mg d'oxyde d'argent et 150 mg de sulfate de calcium anhydre. Le reflux est poursuivi pendant 4 h.

Après filtration et lavage du résidu insoluble avec du chloroforme, le glycopeptide perméthylé est obtenu par évaporation à siccité du filtrat et des extraits chloroformiques.

b) Méthode de KUHN, BAER et SEELIGER

20 mg d'oligosaccharide sont dissous dans 3 ml de diméthylformamide. 1,5 ml d'iodure de méthyle et 1 g d'oxyde de baryum sont ensuite ajoutés. On agite pendant 60 h à la température du laboratoire. 10 ml de chloroforme sont additionnés. Le précipité est éliminé par filtration et lavé sur filtre par du chloroforme. Le filtrat et les phases chloroformiques de lavage sont rassemblés et séchés sous vide à l'évaporateur rotatif.

Le résidu obtenu est soumis à un deuxième cycle de méthylation dans les mêmes conditions.

Le filtrat et les phases chloroformiques de lavage obtenus par ce deuxième cycle de méthylation sont lavés par trois fois 10 ml d'eau distillée, séchés sur sulfate de sodium anhydre et évaporés sous vide à l'évaporateur rotatif.

3 - Résultats

La figure 16(p.82) donne le spectre Infra-Rouge dans le tétrachlorure de carbone du glycopeptide β de l'ovomucoïde méthylé par la méthode de KUHN, BAER et GAUHE (248). On constate la présence d'une bande d'absorption à 3500 cm^{-1} .

Par contre, les méthodes de KUHN nous ont donné de bons résultats en ce qui concerne la méthylation d'oligosaccharides. La chromatographie d'adsorption en couche mince du disaccharide O-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \longrightarrow 4)-D-mannopyranose perméthylé (oligosaccharide A isolé d'acétolysat de glycopeptide de l'ovomucoïde (Fig.16 ; p.82) fournit une seule tache, le résultat est obtenu aussi bien avec la méthode de KUHN, BAER et GAUHE à l'iodure de méthyle, oxyde d'argent dans la diméthylformamide, qu'avec la méthode de KUHN, BAER

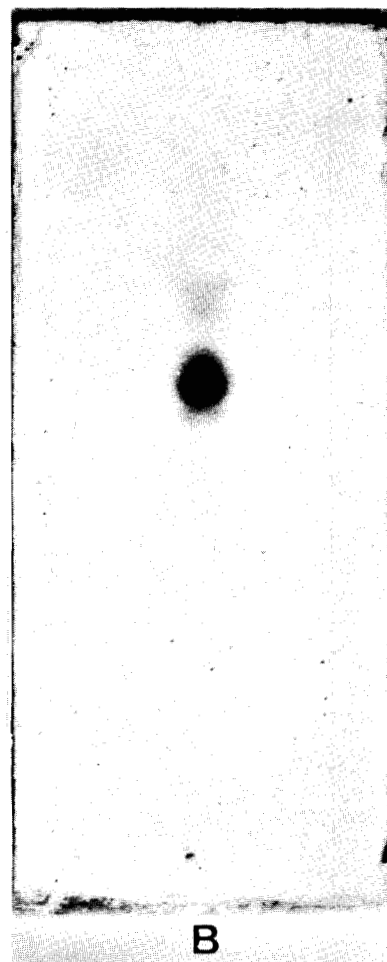
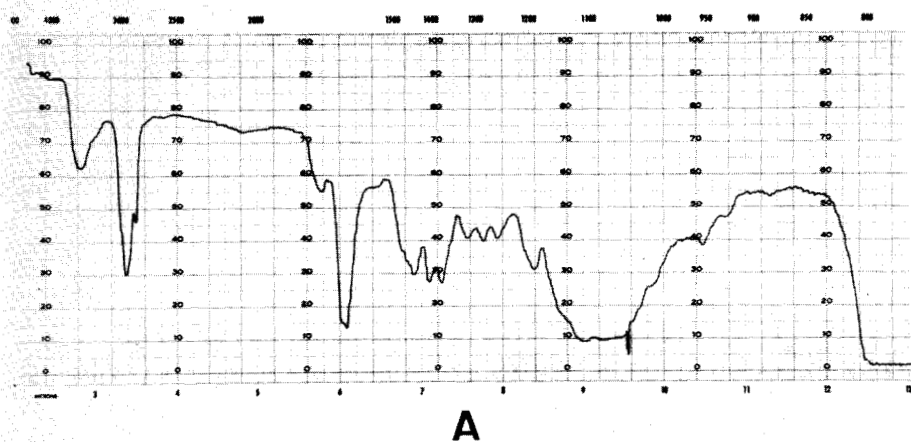


Figure 16

Spectre Infra-Rouge, dans le tétrachlorure de carbone, du glycopeptide β de l'ovomucoïde (A) et chromatographie d'adsorption en couche mince de Silicagel G, dans le système solvant chloroforme/méthanol (9 : 1) (v : v) du disaccharide α -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranosyl-(1 \longrightarrow 4)-D-mannopyranose (B) méthylés par la méthode de KUHN, BAER et GAUHE.



et SEELIGER à l'iodure de méthyle, oxyde de baryum dans la diméthylformamide. Cependant, nous avons constaté des méthylations partielles dans le cas d'oligosaccharides plus lourds (hexasaccharide, heptasaccharide). Toutefois, la perméthylation peut être atteinte en augmentant le nombre de cycle à reflux dans l'iodure de méthyle.

4 - Discussion

Les méthodes de KUHN marquent un progrès par rapport à la technique de HANORTH pour la perméthylation des molécules glucidiques. Nous constatons cependant, qu'en ce qui concerne la méthylation d'un glycopeptide, ces techniques ne conduisent pas à la perméthylation même après plusieurs cycles à reflux dans l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent. Par contre, ces procédés se prêtent à l'alkylation des oligosaccharides.

En laboratoire nous associons la méthode de KUHN, BAER et GARDEL à la technique de HAKOMORI qui est extrêmement efficace. Cette façon d'opérer est indispensable lorsqu'une dégradation de la molécule glucidique est à craindre. C'est le cas notamment pour les oligosaccharides qui peuvent subir une dégradation récurrente à partir de leur extrémité terminale réductrice. Les méthodes de KUHN, plus douces, stabilisent la molécule en bloquant notamment la fonction hémicétalique du monosaccharide terminal réducteur. L'oligosaccharide peut, dans un second temps, être soumis à une méthylation par un procédé plus classique.

C - METHYLATION DES GLYCOPEPTIDES PAR LA METHODE DE HAKOMORI

1 - Mode opératoire

0,25 g d'une dispersion d'hydrure de sodium (*) à 50 p. 100 sont ajoutés à 25 ml de diméthylsulfoxyde et l'on agite 15 mn à la température ordinaire en faisant passer un lent courant d'azote.

103 mg de glycopeptide β de l'ovomucoïde, dissous dans 4 ml de diméthylsulfoxyde sont ensuite versés dans la solution du méthyl-

(*) L'hydrure de sodium est fourni mélangé avec un poids égal de paraffine. Elle peut être éliminée par un lavage au pentane ou à l'éther rigoureusement anhydre.

sulfinyl carbanion. Après 6 h d'agitation, on additionne 1 ml d'iodure de méthyle et la réaction d'éthérisation est poursuivie durant 15 h. 50 ml d'eau sont alors ajoutés à la solution d'où l'on extrait le glycopeptide méthylé par 5 fois 20 ml de chloroforme. Les phases chloroformiques rassemblées sont lavées par 3 fois 30 ml d'une solution aqueuse de thiosulfate de sodium à 1 p. 100 puis séchées sur sulfate de sodium anhydre et évaporées.

Le résidu est repris par 10 ml d'un mélange éther/éther de pétrole 1 : 1 et la solution résultante est lavée par 5 fois 10 ml d'eau. Finalement, la phase éthérée est évaporée sous courant d'air sec.

2 - Résultats

Le rendement de la méthylation par la méthode de HAKOMORI est très faible puisqu'à partir de 100 mg de glycopeptide natif nous n'obtenons que 19 mg de composé méthylé : les faibles rendements sont dus aux nombreux lavages et extractions destinés à éliminer le diméthylsulfoxyde.

De plus, il nous a été impossible d'éliminer totalement le diméthylsulfoxyde, même après plusieurs lavages par l'eau de la solution éthérée de glycopeptide méthylé. Ce résultat ne nous a pas permis de suivre la méthylation par spectroscopie Infra-Rouge, la présence de diméthylsulfoxyde empêchant la réalisation des pastilles de bromure de potassium, et, en phase liquide (dans le tétrachlorure de carbone) nous avons toujours observé la présence d'une bande à 3500 cm^{-1} . Cette bande d'absorption indique donc la présence de fonctions O-H libres qui peuvent provenir du glycopeptide partiellement méthylé mais également des molécules d'eau dissoutes dans les gouttelettes de diméthylsulfoxyde.

C'est pour toutes ces raisons que nous avons modifié la méthode de HAKOMORI en ce qui concerne l'élimination du diméthylsulfoxyde.

D - METHYLATION DES GLYCOPEPTIDES PAR LA METHODE DE HAKOMORI MODIFIEE

1 - Mode opératoire

La modification personnelle apportée à la méthode originale de HAKOMORI réside uniquement dans la purification du glycopeptide

ou du polysaccharide méthylé.

Cette adaptation nous permet, d'une part, de réduire le nombre de lavages à l'eau des phases organiques qui sont la cause des faibles rendements observés dans la méthode originale, d'autre part, d'éliminer totalement le diméthylsulfoxyde.

Le glycopeptide est méthylé dans les conditions opératoires décrites p.83 jusqu'au stade du lavage des phases chloroformiques par la solution aqueuse de thiosulfate de sodium à 1 p. 100.

Les phases chloroformiques séchées sur sulfate de sodium anhydre et évaporées sous vide à l'évaporateur rotatif sont reprises par 3 ml du mélange chloroforme/éthanol (1 : 1) et chromatographiées sur colonne (2 x 50 cm) de Séphadex LH 20 dans les conditions expérimentales suivantes : solvant chloroforme/éthanol (1 : 1) ; débit de la colonne : 18 ml/h ; repérage des constituants glucidiques présents dans l'effluent par la méthode colorimétrique au phénol sulfurique de DUBOIS et al. (249). Les fractions "phénol positives" sont rassemblées et séchées sous vide à l'évaporateur rotatif. Le résidu est enfin placé en dessiccateur sur anhydride phosphorique pendant 2 jours. Le glycopeptide méthylé se présente alors sous forme de cristaux. 2 mg sont prélevés pour l'analyse en spectroscopie Infra-Rouge. Le reste est soumis à deux autres cycles de méthylation dans les mêmes conditions.

2 - Résultats

La figure 17 (p.86) rassemble les résultats de spectroscopie Infra-Rouge du glycopeptide β de l'ovomucoïde méthylé par 1 cycle, 2 cycles et 3 cycles suivant le procédé de HAKOMORI modifié. Nous constatons une diminution progressive de la bande à 3500 cm^{-1} caractéristique de la fonction O-H, qui disparaît totalement après le troisième cycle de méthylation.

Le rendement de la méthylation est multiplié par 4, par rapport à celui obtenu à partir de la méthode classique puisque nous obtenons, à partir de 100 mg de glycopeptide, 75 mg de glycopeptide perméthylé.

3 - Discussion

L'application de la méthode de HAKOMORI à la méthylation des

glycopeptides nous fournit d'excellents résultats tant du point de vue des rendements que du degré de perméthylation à condition toutefois de purifier la molécule perméthylée par chromatographie de gel filtration sur Séphadex LH 20. Cette méthode peut être appliquée à l'alkylation des monosaccharides et des oligosaccharides en ayant soin, préalablement, de bloquer la fonction réductrice. Ceci peut être réalisé en associant la méthode de KUHN, BAER et GAUHE qui stabilise l'oligosaccharide en bloquant notamment la fonction hémiacétalique du monosaccharide terminal réducteur, à la méthode de HAKOMORI qui perméthyle la molécule. Au laboratoire, nous appliquons ce protocole pour alkyler les oligosaccharides.

La méthode de HAKOMORI présente, en outre, l'avantage d'être extrêmement rapide et de nécessiter peu de réactifs.

L'efficacité de cette méthode est due à la facilité avec laquelle l'alcoolate de sodium est formé par l'action du méthylsulfinyl carbanion, l'éthérification devient facile car l'alcoolate formé réagit aisément avec les donneurs de radicaux méthyle tels les dérivés halogénés. Nous avons décrit dans l'historique une méthode analogue appliquée par FREUDENBERG et HIXON (250) qui utilisent le mélange ammoniac liquide/sodium pour former l'alcoolate et l'iodure de méthyle pour alkyler ou une autre technique publiée par BREDERESCH et al. (251) qui remplacent, dans le mélange précédent, l'ammoniac liquide par de l'éther anhydre. Il faut toutefois noter que ces méthodes sont d'un emploi plus difficile et qu'elles sont moins efficaces que la méthode de HAKOMORI.

Il existe de nombreuses variantes à la méthode originale de HAKOMORI, ainsi, nous avons utilisé la méthode de BRIMACOMBE et al. (252, 253, 254) dans laquelle le diméthylsulfoxyde est remplacé par la diméthylformamide, la réaction s'effectuant toujours en présence d'hydrure de sodium et d'iodure de méthyle. Cette méthode ne nous a pas apporté de meilleurs résultats, cependant, elle semble plus douce que la méthode de HAKOMORI et nous a permis de perméthyliser des oligosaccharides tel le raffinose.

E - CONCLUSIONS GENERALES SUR LA PERMETHYLATION DES GLYCOPEPTIDES ET DES OLIGOSACCHARIDES

L'étude critique systématique que nous avons effectuée à

propos des procédés de perméthylation des molécules glucidiques nous permet de tirer les conclusions suivantes :

1 - Quelle que soit la méthode, il est rare que la perméthylation d'une molécule glucidique puisse être réalisée en une seule opération. Généralement, il est nécessaire d'effectuer plusieurs cycles de méthylation.

2 - La méthode de HAWORTH ne réalise pas la perméthylation des glycopeptides.

3 - Les méthodes de KUHN marquent un progrès par rapport à la technique de HAWORTH pour la perméthylation des glucides, cependant, elles ne conduisent pas à la perméthylation surtout en ce qui concerne les N-acétylhexosamines présentes dans les glycopeptides. Toutefois, ces techniques réalisent une méthylation suffisante de la molécule glucidique et ainsi la stabilisent ce qui permet, dans un second temps, d'appliquer des méthodes plus agressives mais efficaces sans craindre de la dégrader.

4 - La méthode de HAKOMORI réalise la perméthylation des glycopeptides, des oligosaccharides comme des polysaccharides. Il faut toutefois noter plusieurs points :

a) le rendement en produit méthylé est multiplié par un facteur 4 lorsqu'on diminue le nombre de lavage à l'eau de la phase chloroformique renfermant le glycopeptide méthylé, le diméthylsulfoxyde peut toutefois être éliminé quantitativement par chromatographie de gel filtration en phase organique. Cette technique permet d'obtenir un produit cristallisé se prêtant aux analyses par spectroscopie Infra-Rouge.

b) les méthodes de KUHN seront associées à celle de HAKOMORI dans le cas de molécules susceptibles de subir des dégradations.

c) trois cycles successifs de méthylation seront toutefois nécessaires pour obtenir une méthylation quantitative.

En conclusion, nous utiliserons la méthode de HAKOMORI et quand il le sera nécessaire, nous effectuerons au préalable, une méthylation par la méthode de KUHN, BAER et GAUHE.

MISE AU POINT DE PROCÉDES DE FRACTIONNEMENT
DES HYDROLYSATS DE GLYCOPROTIDES PERMETHYLES
IDENTIFICATION DES ETHERS METHYLIQUES DES
MONOSACCHARIDES LIBERES PAR HYDROLYSE OU METHANOLYSE
DES GLYCANNES METHYLES

L'identification des éthers méthyliques des monosaccharides présents dans le glycanne perméthylé constitue le dernier problème à résoudre avant de conclure au point d'attache des liaisons osidiques, la libération des éthers méthyliques est donc un préalable à l'identification de ces derniers.

La rupture des liaisons osidiques, par hydrolyse ou méthanolyse du glycopeptide perméthylé, soulève les mêmes difficultés que celles rencontrées lors de l'hydrolyse de la molécule native. A ces problèmes de rupture quantitative des liaisons osidiques s'ajoute celui de la stabilité des monosaccharides méthylés dans les conditions de l'hydrolyse.

L'identification des éthers méthyliques des monosaccharides ainsi libérés est relativement aisée lorsque le substrat de départ est abondant. Dans ce cas, le fractionnement des hydrolysats ou des méthanolysats par chromatographie sur colonne de cellulose et élution par des mélanges d'éther de pétrole et de butanol saturé en eau fournit de bonnes quantités de monosaccharides méthylés qui peuvent être analysés et identifiés par les méthodes classiques : point de fusion et pouvoirs rotatoires. Ces opérations, longues et laborieuses, deviennent impossibles quand les quantités de substrats mises en jeu au départ sont de l'ordre de 30 à 50 mg. Dans ce cas, l'identification des éthers méthyliques fait appel aux méthodes chromatographiques : chromatographie sur papier pour les monosaccharides méthylés réducteurs, chromatographie sur couche mince et en phase gazeuse pour les monosaccharides méthylosidés. Ces techniques conduisent simultanément à la séparation et à l'identification des éthers méthyliques à condition toutefois de posséder des témoins de référence qui sont chromatographiés en même temps que la substance inconnue. L'identité de comportement dans des conditions variables permet de conclure à l'identité de nature.

Nous décrirons successivement :

I - Les procédés de rupture des liaisons glycosidiques du glycopeptide perméthylé.

II - Les procédés d'identification des monosaccharides méthylés présents dans les glycopeptides perméthylés.

III - Les procédés de synthèse des éthers méthyliques témoins.

I - PROCÉDES DE RUPTURE DES LIAISONS GLYCOSIDIQUES DES GLYCOPEPTIDES PERMÉTHYLÉS

Les liaisons osidiques de l'oligosaccharide ou du glycopeptide perméthylé peuvent être libérées par deux procédés : d'une part, l'hydrolyse qui fournit les monosaccharides méthylés, d'autre part, la méthanolyse qui libère les éthers méthyliques méthylglycosilés.

A - HYDROLYSE

L'hydrolyse de la molécule glucidique méthylée doit répondre à deux objectifs ; d'une part, la rupture quantitative de toutes les liaisons glycosidiques et en particulier celles contractées par les N-acétylhexosamines et d'autre part, la stabilité des éthers méthyliques ainsi libérés.

La plupart des acides minéraux ont été utilisés pour obtenir des monosaccharides méthylés réducteurs à partir des polysaccharides perméthylés.

- L'acide formique est utilisé pour hydrolyser quantitativement les polysaccharides méthylés de haut poids moléculaire. ISBELL et al. (255) font agir de l'acide formique à 90 p. 100 à 100°C pendant 4 h sur des dextrans perméthylés et constatent que cette technique cause moins de dégradation que les mélanges acide acétique, acide chlorhydrique. Cette technique est utilisée par ANDREWS, HOUGH et JONES (256) pour hydrolyser un galactane perméthylé : dans ce cas, les auteurs font suivre la formolyse par une hydrolyse sulfurique (H_2SO_4 à 100°C pendant 12 h). L'hydrolysate est ensuite neutralisé par le carbonate de baryum puis filtré et désionisé par passage sur colonne d'amberlite IR-120. ASPINALL, LAIDLAW et RASHBROOK (257) font suivre la formolyse d'un glucomannane perméthylé par une hydrolyse chlorhydrique (HCl N à 100°C pendant 3 h). Dans ce cas, l'hydrolysate est neutralisé par le carbo-

nate d'argent.

D'autres auteurs ont préféré utiliser des solutions d'acide sulfurique. CROON et LINDBERG (258), dans une étude sur les celluloses méthylées, préconisent l'hydrolyse par l'acide sulfurique dans les conditions suivantes : pré-hydrolyse avec de l'acide sulfurique à 72 p. 100 à 0°C pendant 30 mn suivie d'une dilution de l'acide à 7,2 p. 100 et une hydrolyse à 60°C pendant une nuit, terminée à 100°C pendant 3 h. Les auteurs ne constatent pas de déméthylation. L'acide sulfurique N ou 2N à 100°C est utilisé par de nombreux chercheurs : BREDERESH et HAMBSCH (259) (H_2SO_4 1N, 12 h à reflux), KUHN, BAER et GAUHE (260) (H_2SO_4 1N, 6 à 12 h à reflux), COURTOIS et al. (261) (H_2SO_4 à 6 p. 100, 5 h. au bain-marie bouillant), HIRANO, HOFFMAN et MEYER (262) (hydrolyse de kératosulfate perméthylé par H_2SO_4 N à 100°C pendant 17 h). L'utilisation de l'acide sulfurique permet de neutraliser et de désioniser aisément le milieu par l'addition de baryte suivie d'une extraction acétonique ou chloroformique du surnageant préalablement évaporé à siccité.

- L'acide oxalique a été utilisé par HAWORTH et LEARNER (263) et par HAWORTH, HIRST et PERCIVAL (264). Les auteurs hydrolysent les polysaccharides méthylés en chauffant pendant 24 h à 80°C une solution de 3 à 5 p. 100 du composé dans le mélange méthanol/acide oxalique à 4 p. 100 dans le rapport 3 : 1 (v : p). Le méthanol est ensuite éliminé sous pression réduite à 30, 35°C et la solution aqueuse résiduelle est maintenue pendant 5 h à 80°C, jusqu'à ce que le pouvoir rotatoire demeure constant.

- Un procédé d'hydrolyse en milieu acético-chlorhydrique a été décrit par BELL (265) dans lequel le produit méthylé est dissous dans le mélange de 5 parties d'acide acétique glacial et 10 parties d'une solution d'acide chlorhydrique à 5 p. 100. L'hydrolyse est maintenue pendant 5 h au bain-marie bouillant.

- Au laboratoire, nous avons recherché les meilleures conditions d'hydrolyse des osides méthylés en nous fondant sur les travaux effectués par MONTREUIL et SPIK (266) concernant l'hydrolyse quantitative des glycopeptides ou des oligosaccharides.

1 - Principe

L'oligosaccharide ou le glycopeptide méthylé est hydrolysé par des solutions d'acide chlorhydrique 1,5 N s'il ne renferme pas de N-

acétylhexosamine ou 4 N si la molécule possède ces monosaccharides.

2 - Mode opératoire

50 mg de glycopeptide β de l'ovomucoïde perméthylé sont dissous dans 1 ml de méthanol puis hydrolysés à 100°C, par 5 ml d'acide chlorhydrique 4 N pendant 4 h. L'hydrolysate est ensuite purifié selon deux procédés :

a) Désionisation par passage sur colonne de résine échangeuse d'ions : une partie de l'hydrolysate dilué avec de l'eau distillée est passée successivement sur des colonnes (2 x 40 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; H⁺) et d'anions (Duolite A-102 D ; "mesh" 25-50 ; HCO₂⁻). Le liquide effluent auquel on joint les eaux de lavage des colonnes (500 ml) est concentré à 35°C, sous vide, à l'évaporateur rotatif. Les monosaccharides neutres méthylés ainsi obtenus (les hexosamines méthylés sont retenus sur la colonne de Dowex 50 x 8) peuvent être analysés par chromatographie sur papier (voir p.119) ou après méthylosidation, par chromatographie en phase gazeuse (voir p.127). L'autre partie de l'hydrolysate renfermant les monosaccharides neutres et les hexosamines méthylés est conservée afin d'identifier les osamines méthylés par un des procédés que nous décrirons plus loin (p.100).

b) Elimination de l'acide chlorhydrique par codistillation avec de l'éthanol : l'hydrolysate est transféré dans un ballon de 250 ml et on additionne 50 ml d'éthanol. La solution ainsi obtenue est évaporée, sous vide, à l'évaporateur rotatif. Afin d'éliminer quantitativement l'acide chlorhydrique, le résidu est repris plusieurs fois par 20 ml d'éthanol et la solution est de nouveau évaporée sous vide à l'évaporateur rotatif. Le résidu est enfin placé en dessiccateur, en présence de soude et d'anhydride phosphorique, pendant une nuit.

Afin de vérifier que les monosaccharides ainsi libérés par hydrolyse n'aient pas subi de dégradations et en particulier de déméthylation, nous avons soumis à l'hydrolyse dans les mêmes conditions le méthyl-2,3,4-tri-O-méthyl-fucoside, le méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactoside et le méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-mannoside. 10 mg de chaque témoin sont hydrolysés à 100°C, par 1 ml d'acide chlorhydrique 1,5 N pendant 1,5 h et à 100°C par 1 ml d'acide chlorhydrique 4 N pendant 4 h. Les hydrolysats sont purifiés par évaporation en présence d'éthanol selon le mode opératoire décrit

plus haut.

Les monosaccharides méthylés ainsi obtenus sont méthylglycosilés par 1 ml d'une solution méthanol chlorhydrique N en tube scellé, à 100°C pendant 8 h. La solution est alors évaporée sous courant d'azote et les méthylglycosides des monosaccharides méthylés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne (0,3 x 300 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) contenant 3 p. 100 de Carbowax 6000 ; température de la colonne 170°C, de l'injecteur 200°C, du détecteur 210°C ; débit du gaz vecteur (azote) 30 ml/mn.

3 - Résultats

La figure 18(p.94) illustre les résultats sur la stabilité des monosaccharides neutres perméthylés couramment rencontrés dans les glycoprotéines dans les conditions de l'hydrolyse. Nous ne constatons aucune déméthylation en ce qui concerne les dérivés perméthylés du galactose et du mannose ; on peut cependant remarquer la disparition du pic correspondant au méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl- β -mannoside, l'hydrolyse et la méthylglycosilation favorisant la formation de l'anomère α . Quant au fucose, l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 1,5 N et surtout 4 N provoque des réactions de déméthylation.

4 - Discussion

L'hydrolyse des oligosaccharides ou des glycopeptides perméthylés dans les conditions décrites précédemment nous a fourni des résultats parfaitement reproductibles ; en particulier, nous n'avons jamais remarqué de déméthylation sauf en ce qui concerne le perméthyl-fucose. Dans ces conditions, les osamines méthylés sont également très stables. Toutefois, nous voudrions rappeler d'une part, que la concentration des hydrolysats acides en glucides doit être faible et de l'ordre de 0,5 à 1 p. 100 de glycopeptide et d'autre part, que les hydrolyses doivent être effectuées avec des produits exempts de sels de fer.

B - METHANOLYSE

La rupture des liaisons osidiques par le méthanol catalysé par de l'acide chlorhydrique présente de nombreux avantages. En effet, cette technique fournit directement les méthylglycosides ce qui stabilise le monosaccharide en bloquant le carbone réducteur et les grou-

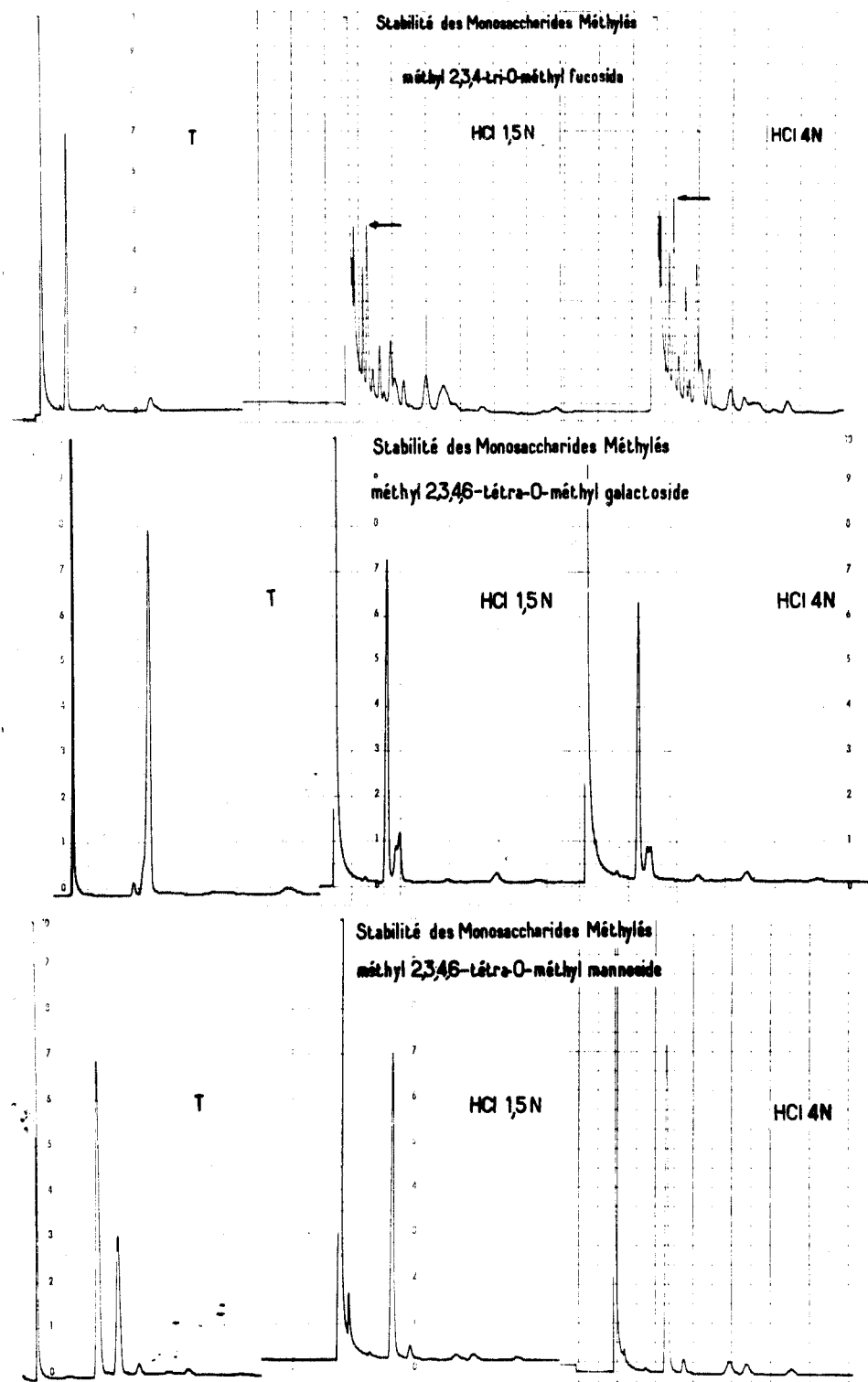


Figure 18

Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-2,3,4-tri-O-méthyl-L-fucoside, 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-galactoside et 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-mannoside après hydrolyse par l'acide chlorhydrique 1,5 N et 4 N et méthylglycosilation.

Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) à 3 p. 100 de Carbowax 6000 ; température de la colonne 170°C, débit du gaz vecteur (N₂) 30 ml/mm.

pements carboxyliques des acides uroniques et des acides sialiques en réalisant une méthylestérification. En outre, cette technique permet l'analyse directe des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse.

Pour toutes ces raisons, la méthanolyse est couramment utilisée pour couper les liaisons glycosidiques des oligosaccharides comme des polysaccharides perméthylés. JEANLOZ et al. (267) utilisent cette technique pour rompre les liaisons osidiques du chondroïtine sulfate B perméthylé. GOLDSTEIN et al. (268), en 1959, étudient les conditions de méthanolyse et démontrent que le taux de déméthylation des monosaccharides méthylés libérés par cette méthode est très faible. WALLENFELS et al. (269) préconisent la méthanolyse de polysaccharides du lait par le méthanol contenant 2 p. 100 d'acide chlorhydrique à 80°C pendant 24 à 90 h. Cependant BRAGG et HOUGH (270) n'ont pu mettre en évidence aucun dérivé méthylé de la glucosamine par méthanolyse de l'ovalbumine et de l'ovomucoïde perméthylés bien que ces deux glycoprotides possèdent ce monosaccharide en position terminale non réductrice.

1 - Principe

L'oligosaccharide ou le polysaccharide est traité à chaud par le mélange méthanol chlorhydrique. Le procédé fournit un mélange des méthylglycosides α et β .

2 - Mode opératoire

L'oligosaccharide perméthylé préalablement desséché en dessiccateur en présence d'anhydride phosphorique pendant une nuit est dissous à la concentration de 1 g p. 100 ml dans la solution méthanol chlorhydrique N, dans une ampoule en verre que l'on scelle ou dans un tube Sovirel qui est ensuite hermétiquement bouché. La solution est maintenue à l'ébullition au bain-marie pendant 8 h. On refroidit et on neutralise le méthanolysat au pH-mètre par le carbonate d'argent ou le carbonate de plomb. Le précipité de chlorure d'argent ou de chlorure de plomb, éliminé par filtration, est lavé sur filtre par le méthanol. Le filtrat et les phases méthanoliques de lavage sont enfin évaporés sous vide à l'évaporateur rotatif.

3 - Résultats

La méthanolyse des oligosaccharides perméthylés dans les

conditions décrites dans le paragraphe précédent libère quantitativement et sans provoquer de déméthylation les monosaccharides méthylés. La figure 19(p.97) nous donne le diagramme de chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques du disaccharide Man $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Man libérés par méthanolyse. Comme nous pouvons le constater, nous n'observons aucune réaction de dégradation. En outre, la libération des éthers méthyliques est quantitative puisque nous n'avons pu identifier le disaccharide en poursuivant la chromatographie à des températures plus élevées (200°C). Cependant, nous constatons des pertes appréciables de produits, lors de la neutralisation du méthanolysat, par adsorption sur le précipité de chlorure d'argent ou de chlorure de plomb des monosaccharides méthylés. Pour cette raison, nous avons modifié les conditions de purification du méthanolysat ; la solution méthanolique est évaporée à siccité sous un courant d'azote, l'évaporation est terminée en dessiccateur en présence de soude et d'anhydride phosphorique.

4 - Discussion

Comme pour l'hydrolyse, la méthanolyse dans les conditions décrites plus haut nous a fourni des résultats parfaitement reproductibles. Elle présente l'avantage, sur l'hydrolyse, de fournir directement les méthylsides que l'on peut analyser directement par chromatographie en phase gazeuse. En outre, dans ces conditions, nous n'avons jamais observé de déméthylation et les rendements sont très satisfaisants depuis que nous éliminons le mélange méthanolysant par simple évaporation sous un courant d'azote. Il faut enfin signaler que la méthanolyse doit s'effectuer en atmosphère anhydre. Il est donc absolument indispensable de travailler sur un glycopeptide ou un oligosaccharide perméthylé exempt d'eau. Cette condition ne pourra être remplie si le glycopeptide perméthylé n'est pas totalement débarrassé du diméthylsulfoxyde qui retient toujours de l'eau. La chromatographie de gel filtration sur Séphadex LH 20 en éliminant quantitativement le diméthylsulfoxyde nous fournit un matériel parfaitement anhydre qui peut ainsi subir la méthanolyse.

C - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LES PROCEDES DE RUPTURE DES LIAISONS GLYCOSIDIQUES DES GLYCOPEPTIDES OU DES OLIGOSACCHARIDES PERMETHYLES

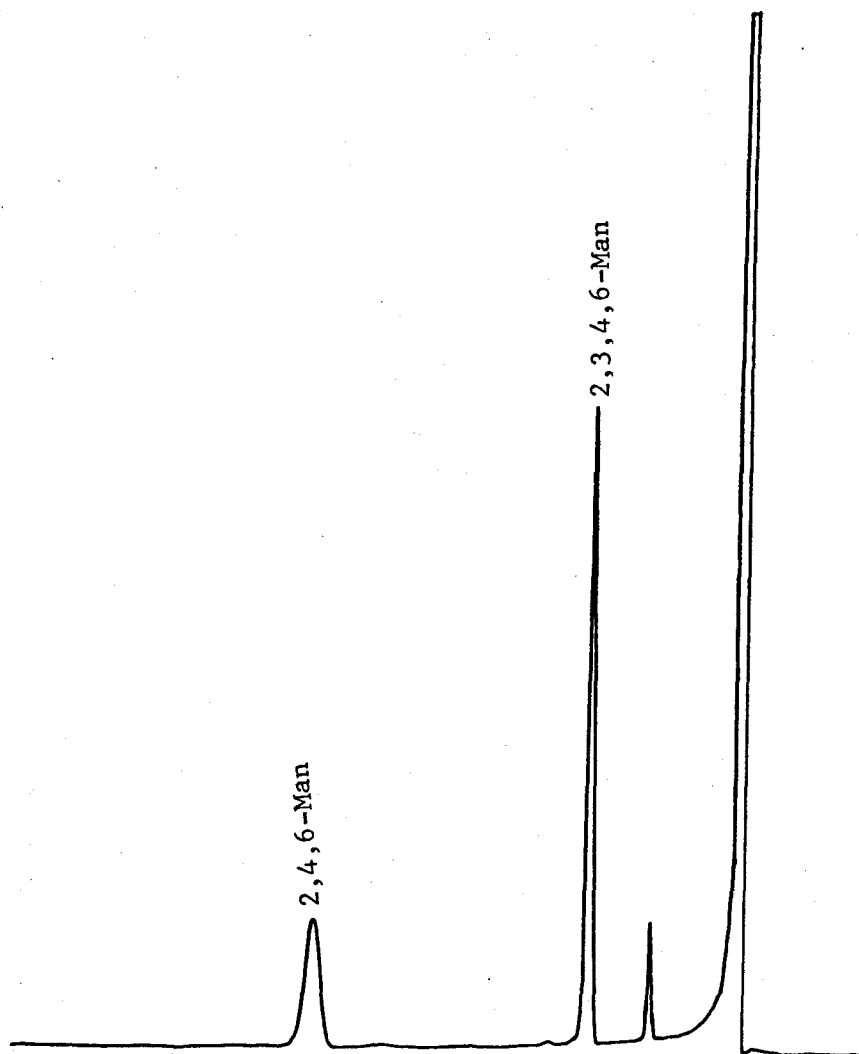


Figure 19

Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse du disaccharide 3-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranose isolé d'acétolysats de l'ovomucoïde.

Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60.80) à 3 p. 100 de Carbowax 6000 ; température de la colonne 170°C ; débit du gaz vecteur (N₂) 30 ml/mn.



Les conclusions que nous pouvons tirer de nos travaux sur les procédés de rupture des liaisons glycosidiques des glycopeptides perméthylés sont les suivantes :

1 - L'hydrolyse des glycopeptides perméthylés par l'acide chlorhydrique 1,5 N, à 100°C, pendant 1,5 h ou 4 N, à 100°C, pendant 4 h nous a fourni des résultats parfaitement reproductibles. Les monosaccharides neutres méthylés et les méthylsamines ainsi obtenus sont stables dans ces conditions, sauf le perméthyl-fucose qui subit une légère dégradation.

2 - La méthanolyse des oligosaccharides ou des polysaccharides par le méthanol chlorhydrique N, à 100°C pendant 8 h fournit quantitativement et sans déméthylation les méthyl-glycosides des monosaccharides méthylés qui peuvent être ainsi analysés directement par chromatographie en phase gazeuse.

3 - Comme nous le verrons dans le prochain paragraphe, la présence dans un glycopeptide perméthylé d'une grande diversité de monosaccharides (monosaccharides neutres méthylés, méthylglucosamines, monosaccharides acides méthylés) nous oblige à fractionner, préalablement, ce mélange afin de faciliter l'identification. Pour cette raison, nous utiliserons l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 4 N pour les molécules possédant à la fois des monosaccharides neutres et des osamines que l'on pourra plus facilement, dans un second temps, fractionner par électrophorèse (cas des glycopeptides) et la méthanolyse pour les molécules uniquement constituées de monosaccharides neutres qui pourront être analysés directement par chromatographie en phase gazeuse (cas de certains oligosaccharides et polysaccharides). La figure 20 (p.99) résume les deux voies possibles pour libérer les monosaccharides méthylés présents dans un polysaccharide perméthylé.

II - PROCÉDES D'IDENTIFICATION DES MONOSACCHARIDES METHYLES PRESENTS DANS LES GLYCOPEPTIDES PERMETHYLES

L'identification des éthers méthyliques libérés par hydrolyse des glycopeptides perméthylés pose de nombreux problèmes du fait même de la complexité de ces molécules. En effet, celles-ci possèdent généralement des acides sialiques, des osamines : N-acétylglucosamine et parfois N-acétylgalactosamine et des monosaccharides neutres : fucose, galac-

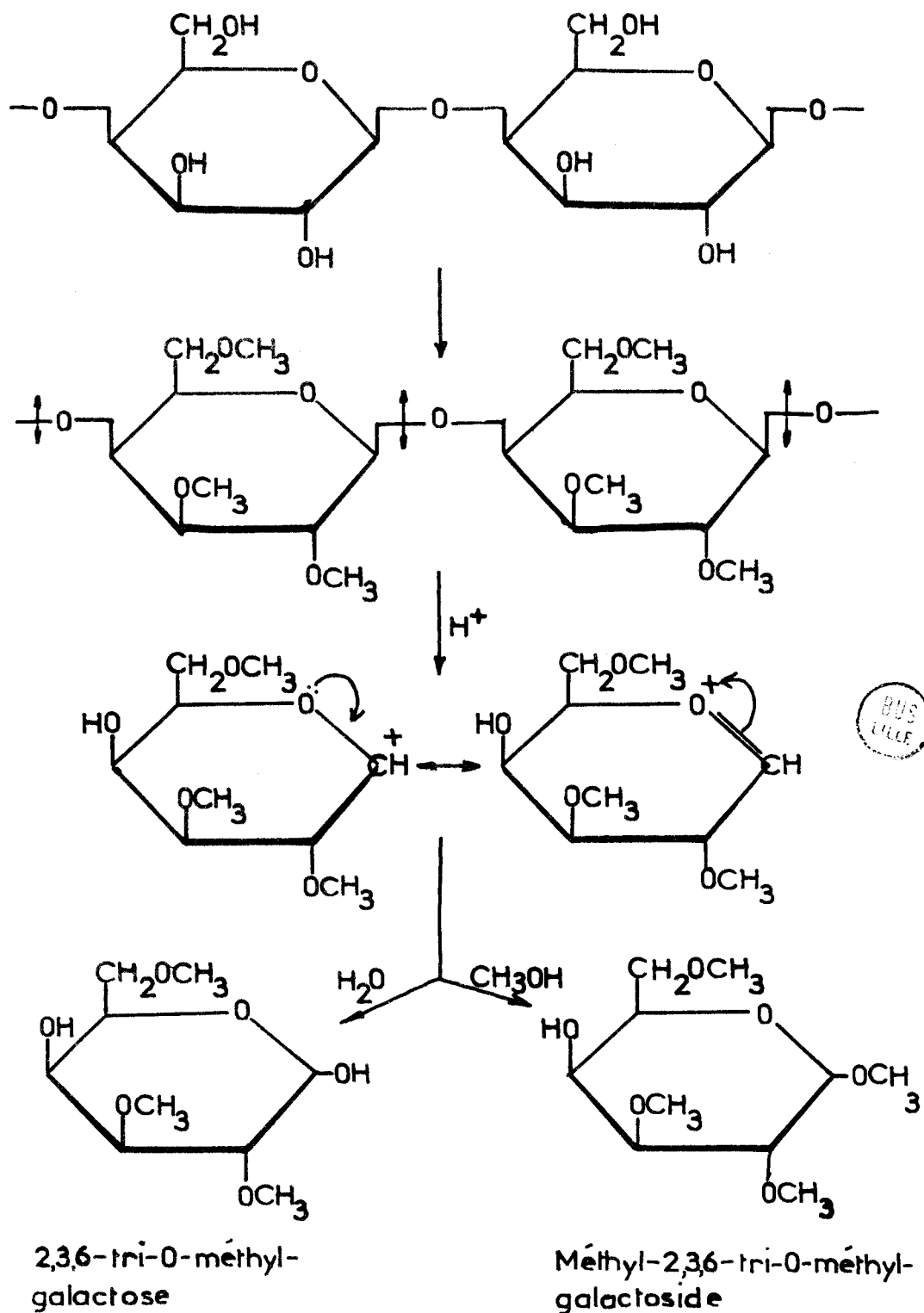


Figure 20

Libération des monosaccharides méthylés présents dans un polysaccharide perméthylé (SWIDERSKI et TEMERIUZS) (271).

tose et mannose. L'identification des éthers méthyliques de ces différents monosaccharides ne pourra être effectuée en une seule étape. En outre, nous possédons généralement de faibles quantités de substrats (20 à 50 mg de glycopeptides, 3 à 10 mg d'oligosaccharides). Ceci nous interdit l'identification des éthers méthyliques obtenus par fractionnement soit par chromatographie d'adsorption sur colonne de charbon-Célite (WHELAN et MORGAN) (272), (LINDBERG et WICKBERG) (273), soit par chromatographie sur colonne de cellulose (HOUGH et al.) (274), (ASPINALL et FERRIER) (275), par l'analyse de leurs pouvoirs rotatoires et de leur point de fusion. Nous nous sommes donc tournés vers les méthodes chromatographiques : chromatographie sur papier des éthers méthyliques réducteurs, chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques méthylosidés.

Nous décrivons donc successivement :

- A - Les méthodes d'analyse des éthers méthyliques des osamines
- B - Les méthodes d'analyse des éthers méthyliques des monosaccharides neutres
- C - Un procédé original de fractionnement des hydrolysats de glycopeptides ou d'oligosaccharides perméthylés

A - METHODES D'ANALYSE DES ETHERS METHYLIQUES DES OSAMINES

Les éthers méthyliques de la glucosamine et de la galactosamine sont analysés par des méthodes chromatographiques telles la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie sur colonne de résine échangeuse de cations et la chromatographie sur papier. Avant d'entrer dans les détails de ces techniques nous voudrions rappeler que des auteurs, tels LEMIEUX et CUSHLEY (276), ont montré que le groupement acétamido des osamines était N-méthylés si le monosaccharide ou les oligosaccharides possédant des hexosamines étaient méthylés par la méthode de HAKOMORI alors que les méthodes de KUHN (à la diméthylformamide, iodure de méthyle, oxyde de baryum par exemple) ne causaient pas cette réaction. Dans les conditions décrites précédemment, l'hydrolyse de polysaccharides ou de glycopeptides perméthylés par la méthode de HAKOMORI va donc nous fournir des dérivés méthylés du chlorhydrate de 2-désoxy-2-méthylamino-D-glucose.

Nous décrivons dans ce chapitre quelques méthodes de sépa-

ration chromatographique des osamines méthylées.

- 1 - En phase gazeuse,
- 2 - Sur couche mince de silice,
- 3 - Sur papier,
- 4 - Sur colonne de résine échangeuse de cations.

1 - Chromatographie en phase gazeuse

KUHN, EGGE et LOCHINGER (277) ont décrit une technique de séparation des dérivés méthylés de la glucosamine et de la galactosamine libérés par méthanolyse d'oligosaccharides ou de polysaccharides perméthylés.

Les méthyl-hexosamines obtenues sont N-acétylés (la méthanolyse N-désacétyle partiellement) et O-acétylés avant d'être injectées sur une colonne (100 cm) de kieselguhr à 10 p. 100 de polyester succinique du butane-1,4-diol. La chromatographie est effectuée à des températures de 200-250°C à un débit de gaz vecteur (Helium) de 70 à 202 ml par minute.

Les résultats de la séparation chromatographique de quelques éthers méthyliques de la glucosamine et de la galactosamine sont rassemblés dans le tableau IV (p.102).

PERRY et WEBB (278) en 1969 obtiennent de meilleures séparations par chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques réduits et peracétylés sur colonne remplie de néopentylglycol sébacate (NPGSb) à 245°C. Dans ce cas chaque isomère méthylé ne donne qu'un seul pic.

YAMAGUCHI, IKENAKA et MATSUSHIMA (279) analysent les éthers méthyliques de la glucosamine d'un glycopeptide de la Taka-amylase A par chromatographie en phase gazeuse des éthers réduits et triméthylsilylés. La colonne utilisée (0,3 x 200 cm) est remplie de Chromosorb W à 5 p. 100 de silicone SE 30 et la chromatographie est effectuée à 185°C.

Des études complètes sur la synthèse et l'analyse des dérivés O-méthylés du 2-desoxy-2-méthyl amino-D-glucose et D-galactose ont

Tableau IV

Temps de rétention de quelques éthers méthyliques de la glucosamine et de la galactosamine déterminés par rapport au méthyl N-acétyl-3,4,6-tri-O-méthyl- α -D-glucosaminide (KUHN, EGGE et LOCHINGER) (280).

Nature des composés	Temps de rétention
Méthyl N-acétyl-3,4,6-tri- <u>O</u> -méthyl- α - <u>D</u> -glucosaminide	1
Méthyl N-acétyl-3,4,6-tri- <u>O</u> -méthyl- β - <u>D</u> -glucosaminide	1,37
Méthyl N-acétyl-4,6-di- <u>O</u> -méthyl-3- <u>O</u> -acétyl- α - <u>D</u> -glucosaminide	1,13
Méthyl N-acétyl-3,6-di- <u>O</u> -méthyl-4- <u>O</u> -acétyl- α - <u>D</u> -glucosaminide	2,53
Méthyl N-acétyl-3,4-di- <u>O</u> -méthyl-6- <u>O</u> -acétyl- α - <u>D</u> -glucosaminide	3,00
Méthyl N-acétyl-3- <u>O</u> -méthyl-4,6-di- <u>O</u> -acétyl- α - <u>D</u> -glucosaminide	6,27
Méthyl N-acétyl-3,4,6-tri- <u>O</u> -méthyl- α - <u>D</u> -galactosaminide	1,31
Méthyl N-acétyl-3,4,6-tri- <u>O</u> -méthyl- β - <u>D</u> -galactosaminide	1,82
Méthyl N-acétyl-4,6-di- <u>O</u> -méthyl-3- <u>O</u> -acétyl- α - <u>D</u> -galactosaminide	1,56
Méthyl N-acétyl-3,4-di- <u>O</u> -méthyl-6- <u>O</u> -acétyl- α - <u>D</u> -galactosaminide	3,95



été publiées en 1971 par GORIN et FINLAYSON (281) et GORIN (282). Ces auteurs chromatographient ces éthers méthyliques préalablement triméthylsilylés sur colonne (0,3 x 100 cm) remplie de Chromosorb W à 10 p. 100 de néopentylglycolsebacate (NPG Sb) à 140°C. Les temps de rétention des éthers méthyliques de la glucosamine et de la galactosamine sont donnés dans le tableau V (p.104).

Dans une étude récente GORIN et MAGUS (283) étudient le comportement des différents isomères méthylés de la N-méthyl-glucosamine et galactosamine par chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés ou acétylés, et des dérivés réduits, triméthylsilylés ou acétylés. Les tableaux VI (p.105) et VII (p.106) donnent les résultats obtenus par ces auteurs par chromatographie de ces dérivés sur un certain nombre de phases liquides.

Au laboratoire nous identifions les éthers méthyliques de la glucosamine par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylsilylés ou de leurs produits de désamination oxydative.

a - Mode opératoire

α - Chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés des éthers méthyliques de la glucosamine

Les osamines méthyles libérés par hydrolyse chlorhydrique du glycopeptide perméthylé et isolés par électrophorèse préparative (p.138) sont triméthylés selon le procédé de SWEETLEY *et al.* (284) 0,1 mg de la fraction "osamine" sont dissous dans 100 μ l de pyridine anhydre que l'on additionne de 50 μ l d'hexaméthylidisilazane et de 50 μ l de triméthylchlorosilane. Le mélange est agité très énergiquement pendant 15 mn puis séché sous courant d'azote. Le résidu est repris par 1 ml d'heptane et la solution est centrifugée. Le surnageant est séché sous courant d'azote. Le résidu sec est repris par 50 μ l d'heptane et 1 μ l de solution est soumis à la chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes : Chromatographe muni d'un détecteur à ionisation de flamme, colonne de verre de 0,3 x 180 cm ; Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 100-120) contenant 3 p. 100 en poids de silicone OV 17 ; débit du gaz vecteur (azote) 20 ml/mn ; température du four 120°C, de l'injec-

Temps de rétention des éthers méthyliques de la glucosamine et de la galactosamine triméthylsilylés déterminés en minutes (Colonne de Chromosorb W à 10 p. 100 de néopentylglycol sébacate à 140°C). (GORIN et FINLAYSON) (285) et GORIN (286).

Dérivés- <u>O</u> -méthylés du 2-desoxy-2-méthyl amino- <u>D</u> -glucose	Temps de rétention	
	Pic majeur	Pic mineur
3 - mono	9,4	12,8
4 - mono	7,3	12,3
6 - mono	13,8	16,6
3,4 - di -	6,5	9,4
3,6 - di -	10,4	
4,6 - di -	8,1	10,6
3,4,6 - di -	7,3	

Dérivés- <u>O</u> -méthylés du 2-desoxy-2-méthyl amino- <u>D</u> -galactose	Temps de rétention	
	Pic majeur	Pic mineur
3 - mono	9,9	11,6
4 - mono	9,5	14,5
6 - mono	8,5	11,5
3,4 - di -	12,4	15,8
3,6 - di -	8,7	10,2
4,6 - di -	7,7	12,2
3,4,6 - tri	10,2	12,8



TABLEAU VI

Temps de rétention, déterminés en minutes, des éthers méthyliques du 2-desoxy-2-méthyl-amino-D-glucitol et D-galactitol (GORIN et MAGUS) (287).

dérivés-O-méthylés du N-méthyl-glucosaminitol	Temps de Rétention		
	dérivés triméthyl-silylés sur NPGSb à 140°C	dérivés triméthyl-silylés sur UC W-98 à 160°C	dérivés acétylés sur UC W-98 à 210°C
3-mono-	8,3	5,81	3,08
4-mono-	7,8	5,63	3,60
6-mono-	6,8	5,32	2,70
3,4-di-	8,2	4,08	2,53
3,6-di-	6,6	3,68	2,10
4,6-di-	5,8	3,53	2,37
3,4,6-tri-	6,8	2,62	1,63
dérivés-O-méthylés du N-méthyl-galactosaminitol			
3-mono-	9,2	6,28	3,35
4-mono-	7,6	5,55	3,80
6-mono-	7,2	5,38	2,70
3,4-di-	9,2	4,58	2,87
3,6-di-	7,6	4,22	2,20
4,6-di-	6,7	3,70	2,45
3,4,6-tri-	9,6	3,05	1,88

NPGSb : néopentyl glycol sébacate, UC W-98 : méthyl vinyl silicone.

TABLEAU VII

Temps de rétention, déterminés en minutes, des éthers méthyliques du 2-désoxy-2-méthyl-amino-D-glucose et D-galactose (GORIN et MAGUS) (288).

	Temps de rétention		
	dérivés triméthyl- silylés sur NPGSb à 140°C	dérivés triméthyl- silylés sur UC W-98 à 160°C	dérivés acétylés sur UC W-98 à 210°C
dérivés-O-méthylés de la N-méthyl-glucosamine			
3-mono-	9,4 12,8	3,54 4,56	1,39 3,35
4-mono-	7,3 12,3	3,36 4,46	1,42 3,13
6-mono-	13,8 16,6	4,45 5,10	1,17 2,39
3,4-di-	6,5 9,4	2,30 2,70	1,07 2,49
3,6-di-	10,4	2,59 2,88	0,88 2,17
4,6-di-	8,1 10,6	2,35 2,80	0,90 1,95
3,4,6-tri-	7,3	1,55	1,50
dérivés-O-méthylés de la N-méthyl-galactosamine			
3-mono-	9,9 11,6	3,68	1,50 3,02
4-mono-	9,5 14,5	3,60 4,44	1,50 3,29
6-mono-	8,5 11,5	3,33 3,70	1,27 2,45
3,4-di-	12,4 15,8	2,87 3,15	1,19 2,67
3,6-di-	8,7 10,2	2,37 2,94	2,00 2,10
4,6-di-	7,7 12,2	2,20 2,74	0,97 2,08
3,4,6-tri-	10,2 12,8	1,69 1,88	0,74 1,67

NPGSb : néopentyl glycol sébacate, UC W-98 : méthyl vinyl silicone.



teur 200°C, du détecteur 210°C et colonne de verre de 0,3 x 180 cm ; Chromosorb W. DMCS ("mesh" 100-120) contenant 3 p. 100 en poids de silicone OV 210 ; débit du gaz vecteur (azote) : 20 ml/mn ; température du four 105°C, de l'injecteur 200°C, du détecteur 210°C.

β - Chromatographie en phase gazeuse des produits de la désamination oxydative des éthers méthyliques de la glucosamine

Les O-méthylglucosamines obtenus par hydrolyse des glycopeptides ou des oligosaccharides perméthylés sont soumises à la désamination oxydative par la ninhydrine selon le procédé de BYCHKOV et KOLESNIKOVA (289); les dérivés méthylés de la glucosamine (5 mg) en solution dans 0,5 ml d'eau et 0,5 ml de pyridine sont désaminés par 50 mg de ninhydrine, en tube scellé, par chauffage à 100°C pendant 30 mn. Après refroidissement la solution, décolorée par agitation énergique avec du charbon "decolorizing", est passée sur une colonne de Silicagel (1,5 x 5 cm) et les méthyl-pentoses sont élués par le méthanol. L'éluat est ensuite évaporé à sec. Les méthyl-arabinoses sont réduits par le borohydrure de sodium (2 mg) pendant 18 h à la température du laboratoire. Après avoir éliminé les ions borate sous forme de borate de méthyle, par codistillation avec l'alcool méthylique (trois fois), les alditols obtenus sont acétylés par 1 ml du mélange pyridine anhydride acétique (1 : 1, en volumes) pendant 30 mn à 100°C. La solution est séchée sous courant d'azote et le résidu repris par le chloroforme est soumis à la chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes : chromatographe muni d'un détecteur à ionisation de flamme ; colonne métallique (0,3 x 180 cm) ; Chromosorb W ("mesh" 60-80) contenant 10 p. 100 de LAC-4R-886 ; débit du gaz vecteur (azote) : 50 ml/mn ; température du four 170°C, de l'injecteur 200°C, du détecteur 210°C (WILLIAMS et JONES) (290).

b - Résultats

α - Chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés des éthers méthyliques de la glucosamine.

A la suite de nombreux essais que nous avons effectués, les colonnes de Chromosorb W à 3 p. 100 de silicone OV 17 et 3 p. 100 de silicone OV 210, nous ont fourni les meilleures résolutions. L'examen de la figure 21 (p.108) et du tableau VIII(p.109) montre, en effet, que ces supports permettent d'identifier les éthers méthyliques précédents, à l'exception de la 3,4-di-O-méthyl-glucosamine, dont nous ne possédions pas le témoin de référence.

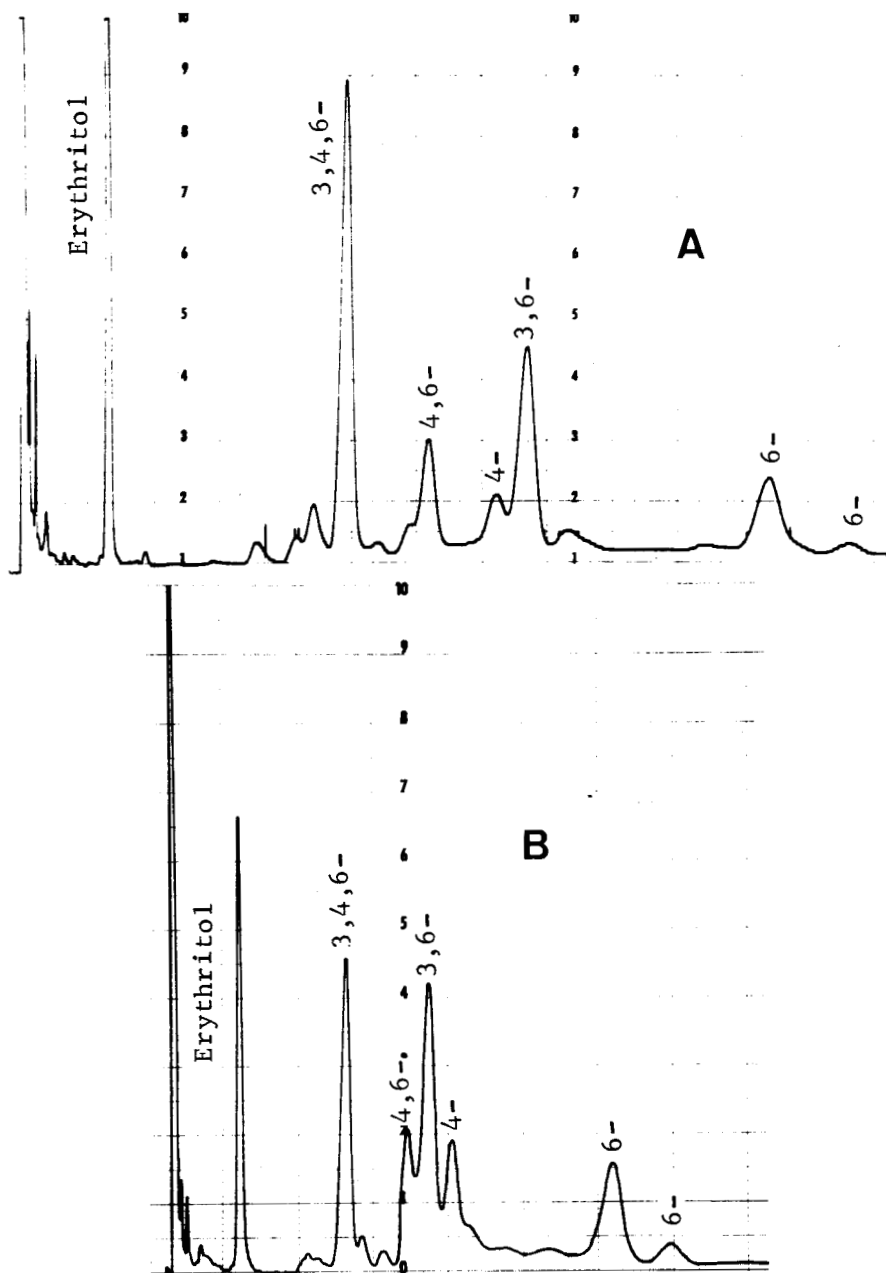


Figure 21

Chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés des éthers méthyliques de la glucosamine.

A : Colonne de verre (0,3 x 180 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 100-120) à 3 p. 100 de silicone OV 17 ; température de la colonne 120°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 20 ml/mn.

B : Colonne de verre (0,3 x 180 cm) remplie de Chromosorb W DMCS ("mesh" 100-120) à 3 p. 100 de silicone OV 210 ; température de la colonne 105°C ; débit du gaz vecteur (N₂) 20 ml/mn ; témoin interne : Erythritol



TABLEAU VIII

Temps de rétention des dérivés triméthylsilylés des éthers méthyliques de la glucosamine déterminés par rapport à l'érythritol.

NATURE DES ETHERS METHYLIQUES	TEMPS DE RETENTION			
	OV 17 3 p. 100		OV 210 3 p. 100	
	Pic majeur	Pic mineur	Pic majeur	Pic mineur
3 - mono -	6,23	7,87	4,39	4,91
4 - mono -	5,43	7,20	4,13	5,56
6 - mono -	8,61	9,46	6,52	7,35
3,6 - di -	5,80		3,78	
4,6 - di -	4,67	5,29	3,48	
3,4,6 - tri -	3,73		2,56	



β - Chromatographie en phase gazeuse des produits de la désamination oxydative des éthers méthyliques de la glucosamine

Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés dans la figure 22(p.111) et le tableau IX (p.112). Nous constatons que ce type de chromatographie permet d'identifier tous les éthers méthyliques des dérivés acétylés de l'arabinitol, donc de la glucosamine. Sur ce diagramme manque le 2,5-di-O-méthyl-1,3,4-tri-O-acétyl-arabinitol correspondant à la 3,6-di-O-méthyl-glucosamine. Cet éther méthylique a été synthétisé plus tard à partir de la 3,6-di-O-méthylglucosamine isolé de la N-acétylHactosamine perméthylée.

c - Discussion

La chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques de la glucosamine sous la forme de leurs dérivés triméthylsilylés présente de nombreux avantages :

- Elle est très rapide, la triméthylsilylation et la chromatographie pouvant s'effectuer en deux heures.
- Elle réclame peu de produits puisque nous pouvons identifier 5 à 10 mg d'osamine méthylé.

Il faut signaler cependant qu'il est indispensable d'éliminer les monosaccharides neutres méthylés présents avec les méthyl-osamines dans les hydrolysats de glycopeptides perméthylés. En effet, les oses neutres méthylés interfèrent avec les osamines méthylés. L'électrophorèse préparative (voir p. 138) de l'hydrolysat du glycopeptide ou de l'oligosaccharide permet d'obtenir les osamines méthylés débarrassées des monosaccharides neutres méthylés.

Nous avons abandonné la deuxième méthode (chromatographie en phase gazeuse des produits de désamination oxydative des méthyl-glucosamines) car cette technique réclame trop de produits (de l'ordre de 2 à 5 mg) et est très longue. Cependant elle nous a rendu d'excellents services pour identifier les éthers méthyliques de la glucosamine avant que nous possédions les produits de référence.

Nous adressons nos vifs remerciements au Professeur J.K.N. JONES qui nous a fourni les témoins méthylés de l'arabinitol.

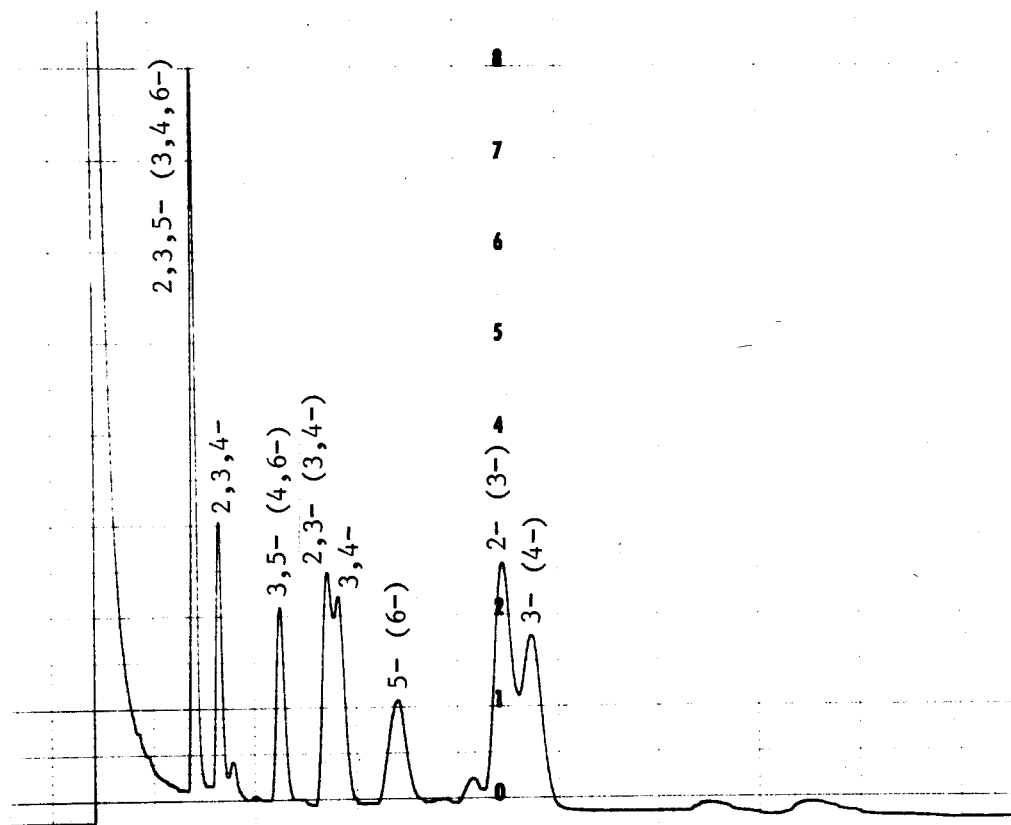


Figure 22

Chromatographie en phase gazeuse des dérivés acétylés des méthyl-arabinitols. Colonne de verre (0,3 x 180 cm) remplie de Chromosorb W ("mesh" 60-80) à 10 p. 100 de LAC-4R-886 ; température de la colonne: 170°C ; débit du gaz vecteur (N₂) 50 ml/mn .



TABLEAU IX

Temps de rétention des dérivés acétylés des méthyl-arabinitols déterminés par rapport au 2,3,4-tri-0-méthyl 1,5-di-0-acétyl-arabinitol.

Dérivés acétylés de 1' arabinitol	Méthyl-glucosamines correspondantes	Temps de rétention
2,3,5 - tri -	3,4,6 - tri -	0,76
2,3,4 - tri -		1
2,5 - di -	3,6 - di -	1,21
3,5 - di -	4,6 - di -	1,48
2,3 - di -	3,4 - di -	1,95
5 - mono -	6 -	2,45
2 - mono -	3 -	3,58
3 - mono -	4 -	3,76



2 - Chromatographie en couche mince

La technique de chromatographie d'adsorption en couche mince ne permet pas de séparer les 7 isomères des dérivés méthylés de la glucosamine.

a - Mode opératoire

Les chromatoplaques (4 x 9 cm) sont préparées en étalant une suspension de 30 g de Silicagel G (MERCK) dans 60 ml d'eau distillée. Le solvant est éliminé par chauffage à 130°C pendant 5 h.

Nous avons utilisé comme systèmes solvants ceux de HAY, LEWIS et SMITH (291).

- Benzène/éthanol/eau/acide acétique (200 : 47 : 15 : 1)
- Benzène/éthanol/eau/solution aqueuse d'ammoniaque à 0,55 p. 100 (200 : 47 : 15 : 1).

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant arrive au sommet de la plaque.

Après élimination du solvant, on pulvérise sur la plaque une solution d'acide sulfurique à 5 p. 100. Les composés organiques apparaissent sous forme de taches marrons, grises ou noires, après un chauffage de quelques minutes sur une plaque chauffante.

b - Discussions

Cette technique ne peut être comparée à la chromatographie en phase gazeuse ou à la chromatographie sur colonnes de résine échangeuse de cations que nous exposerons dans un instant. Elle peut, cependant, donner des renseignements sur le degré de substitution de l'osamine méthylé, la perméthyl-glucosamine ayant le Rf le plus élevé, les dérivés di- et mono-méthylés occupant des positions intermédiaires.

3 - Chromatographie sur papier

Après hydrolyse chlorhydrique, les éthers méthyliques de la glucosamine possèdent un groupement chlorhydrate d'amine ; ils peuvent être directement soumis à une chromatographie sur papier, ou être N-acétylés par la méthode de ROSEMAN (292) puis soumis à la chromatographie sur papier.

a - Mode opératoire

Les éthers méthyliques de la glucosamine sont analysés par

chromatographie descendante sur papier Whatman n°1 en utilisant le système solvant de PARTRIDGE (293) : n-butanol/acide acétique/eau : (4 : 1 : 5)

La révélation des osamines méthylées peut être effectuée par le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (294), par le réactif à la ninhydrine et par la réaction de ELSON et MORGAN en utilisant le réactif de PARTRIDGE (295) : pulvérisation d'une solution alcaline d'acétyl acétone (obtenue en mélangeant 1,5 ml d'acétylacétone et 50 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium cristallisé (17 g p. 100 ml), séchage à 105°C, pendant 5 mn, puis pulvérisation d'un réactif de EHRLICH (obtenu en dissolvant 1 g de p-diméthylamino-benzaldehyde dans 240 ml d'un mélange de n-butanol, d'éthanol et d'acide chlorhydrique concentré dans les proportions (6 : 1 : 1) et enfin séchage à 90°C pendant 5 à 10 mn. Les osamines apparaissent sous forme de taches violacé-mauve.

b - Résultats et discussions

Nous donnons dans le tableau X (p.115) les Rf des éthers méthyliques du chlorhydrate de glucosamine. Comme nous pouvons le constater, cette technique n'est pas satisfaisante. En effet, nous arrivons à séparer ces éthers selon leur degré de substitution, mais les mono-O-méthyl-éthers se chevauchent ainsi que les dérivés di-O-méthylés. GORIN et FINLAYSON (296) sont arrivés à la même conclusion par chromatographie sur papier dans le système solvant alcool butylique/éthanol/pyridine/eau.

4 - Chromatographie sur colonne de résine échangeuse de cations

a - Principe

Les osamines, après hydrolyse chlorhydrique des produits de méthylation, possèdent une fonction aminée libre. Elles sont donc susceptibles d'être fixées et éluées sur un échangeur de cations. La position et le nombre des groupements méthylés modifient l'affinité de chacune de ces osamines méthylées vis-à-vis de la résine.

b - Mode opératoire

Nous avons utilisé la technique mise au point au laboratoire par MONSIGNY (297). Les osamines méthylées sont séparées en utilisant un gradient de force ionique.

TABLEAU X

Rf des éthers méthyliques de la glucosamine en chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le système solvant de PARTRIDGE.

Ethers <u>O</u> -méthylés de la glucosamine	Rf
4 - mono -	0,26
6 - mono -	0,26
4,6 - di -	0,40
3,6 - di -	0,40
3,4,6 - tri -	0,53



Les colonnes (0,6 x 130 cm ou 0,6 x 65 cm) utilisées, fournies par la firme Technicon, sont remplies de "Chromobeads A" ou de "Chromobeads B".

Les osamines méthylées libérées par hydrolyse chlorhydrique dans les conditions décrites précédemment (p. 92) peuvent être analysées directement à partir de l'hydrolysate ou après électrophorèse. A la solution aqueuse (0,5 ml) d'osamines méthylées on ajoute 0,1 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N et 0,4 ml de glycérol. Ce mode opératoire facilite le dépôt de l'hydrolysate à la surface de la résine.

L'éluat est réalisé par le passage d'un gradient (P-OSA-15) de force ionique dont la composition est précisée dans le tableau XI (p.117).

L'éluat est analysé, en continu, par deux colorations différentes avec d'une part, un réactif à la ninhydrine et d'autre part, un réactif de ELSON-MORGAN modifié (voir appendice technique). Le réactif de ELSON-MORGAN a l'avantage d'être spécifique des osamines. Le réactif à la ninhydrine révèle les acides aminés qui peuvent se trouver dans le milieu.

c - Résultats

Cette méthode de chromatographie qui est illustrée dans la figure 23(p.118) permet l'identification de tous les dérivés méthylés de la glucosamine à l'exception de la 3-mono et de la 3-6-di-O-méthyl-glucosamine. L'éluat est complète en 4 h avec une bonne reproductivité.

d - Discussions

L'application de la chromatographie d'échange d'ions à la séparation des méthyl-osamines présente l'avantage d'utiliser les produits d'hydrolyse sans transformation préalable, contrairement à l'analyse par chromatographie de phase gazeuse. Le double repérage ELSON-MORGAN ninhydrine permet d'éviter l'interférence des acides aminés ou des peptides présents dans les hydrolysats des glycopeptides perméthylés. Cependant, le dépôt direct des hydrolysats en haut de colonne encrasse assez rapidement les résines qui doivent être régénérées après chaque analyse. Enfin, cette méthode est moins sensible que la chromatographie en phase gazeuse.

Une étude critique de cette méthode de chromatographie sur résine échangeuse de cations a été effectuée par DELMOTTE (298) qui a pu cons-

TABLEAU XI

Composition du gradient P-OSA-15 permettant la séparation des isomères méthylés de la glucosamine (colonne de 0,6 x 65 cm) (*)

Compartiment	pH 2,875 (**)	NaCl (***)
1	40	-
2	40	-
3	40	-
4	37,5	2,5
5	37,5	2,5
6	35	5
7	35	5

(*) Si l'on utilise une colonne de 0,6 x 130 cm, on introduit dans chaque compartiment des quantités de solution doubles de celles indiquées dans le présent tableau.

(**) Composition du tampon de pH 2,875 = Citrate trisodique 0,2 M ajusté à pH 2,875 avec de l'acide chlorhydrique.

(***) Solution à 35 g de NaCl dans 100 ml d'eau distillée.



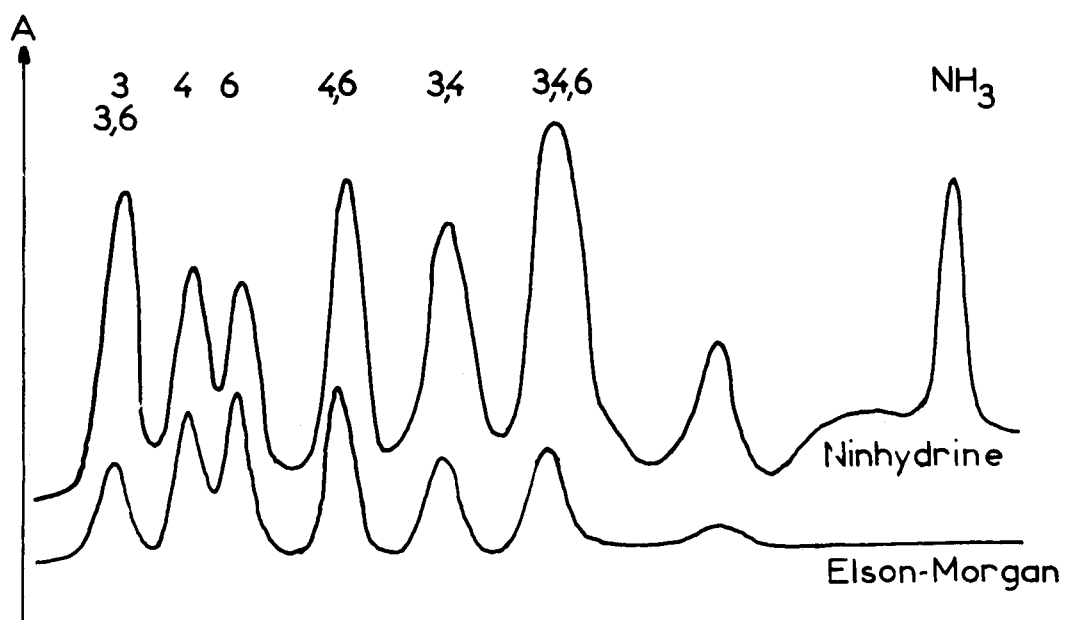


Figure 23

Chromatographie à l'Auto-analyseur Technicon des éthers méthyliques de la glucosamine. Les chiffres précisent les positions des groupes méthoxy ; A : densité optique.



tater que les dérivés N-méthylés ont un temps de rétention légèrement plus faible que leurs homologues non substitués sur l'azote et que ces dérivés donnent une réaction positive à la ninhydrine, ainsi qu'au réactif de ELSON-MORGAN modifié. Nous avons pu confirmer nous-même cette dernière remarque (nos osamines étant N-méthylées) qui est en accord avec les résultats de ITO et al. (299).

D'autres méthodes de chromatographie sur résine échangeuse de cations ont été publiées. Ainsi, ADAMS et al.(300) séparent tous les dérivés méthylés de la glucosamine en utilisant un tampon citrate de sodium de pH 3,10 pour stabiliser la résine (citrate trisodique : 58,84 g ; solution 2 M de NaCl : 100 ml ; solution de Brij 35 (100 g dans 300 ml) : 40 ml ; HCl 6 N pour obtenir un pH de 3,10 et un tampon analogue mais ajusté à pH 4,40 pour l'élution. GORIN et FINLAYSON (301) sur un analyseur d'acide SPINCO, séparent d'une manière très satisfaisante les éthers méthyliques de la glucosamine. Les conditions expérimentales de chromatographie sont les suivantes : colonne (57 x 0,9 cm) chauffée à 55°C, élution par un tampon citrate 0,2 M de pH 3,28 pendant 135 mn puis par un tampon citrate de pH 4,25 à un débit de 65 ml/h. Les résultats obtenus par ces auteurs sont rassemblés dans le tableau XII(p.120).

B - METHODES D'ANALYSE DES ETHERS METHYLIQUES DES MONOSACCHARIDES NEUTRES

La chromatographie sur papier et en couche mince et la chromatographie en phase gazeuse ont été appliquées à l'identification et au dosage des dérivés méthylés des monosaccharides libres ou méthylglycosylés.

1 - Chromatographie sur papier

La chromatographie sur papier des éthers méthyliques des monosaccharides neutres est très largement utilisée, le nombre de systèmes solvants publié jusqu'à ce jour en témoigne. Nous reportons dans le tableau XIII (p.121) les principaux solvants de chromatographie des monosaccharides neutres méthylés. Parmi tous ces solvants, celui de HIRST et JONES (302) butanol/éthanol/eau (5 : 1 : 4) est de beaucoup le plus satisfaisant et le plus pratique pour réaliser une séparation d'un mélange complexe de mo-

TABLEAU XII

Temps de rétention des éthers méthyliques de la gluco-
samine déterminés par rapport à la phénylalanine par chromatographie sur
résine échangeuse de cations (GORIN et FINLAYSON) (303).

O-méthyl-dérivés du 2-désoxy-2-méthyl amino-D-glucose	Temps de rétention
3 - mono -	- 31
4 - mono -	- 18
6 - mono -	- 11
3,4 - di -	+ 40
3,6 - di -	- 40
4,6 - di -	+ 8
3,4,6 - tri -	+ 55



TABLEAU XIII

Systèmes solvants utilisés pour la chromatographie sur papier des dérivés méthylés des monosaccharides.

Systèmes solvants	Conditions de Chromatographie	Applications	Références
n-BOH saturé d'eau	W_1 : D 37°C	Monosaccharides méthylés	HOUGH <i>et al.</i> (304)
n-BOH/EtOH/eau (4:1:5)	W_1 D	" "	HOUGH <i>et al.</i> (305)
n-BOH/EtOH/eau (5:1:4)	W_1 D	" "	HIRST <i>et JONES</i> (306)
n-BOH/EtOH/eau (40:11:19)	W_1 D	" "	ASPINALL <i>et al.</i> (307)
n-BOH/EtOH/eau (4:1:1)	W_1 D	" "	HIRANO <i>et al.</i> (308)
n-BOH/EtOH/AmOH/eau (4:1:0,1:4,9)	W_1 D	Séparation des di- et tri-	HIRST <i>ET JONES</i> (309)
n-BOH/Pyr/eau (6:4:3)	W_1 D	Méthyl-éthers du Fucose	Mac LEENAN (310)
Benz/EtOH/eau (39:10:3)	W_1 D	Monosaccharides méthylés	WICKSTROM <i>et al.</i> (311)
Benz/AcEth/EtOH/eau (4:1:1:0,5)	W_2 D	" "	"
Benz/SO ₂ Me ₂ (20 :1)	W_2 D	" "	BOUVENG (312)
MEC saturée d'eau	W_1 D	Séparation des tétra et tri-méthyléthers	BOOGS <i>et al.</i> (313)
MEC/eau (10 : 1)	W_1 A	" "	BOOGS <i>et al.</i> (314)
MEC/eau (89:11)	W_1 A	" "	LEECH (315)
AcEth/AcCOOH/eau (9:2:2)	W_1 A	Séparation des triméthyl éthers	KUHN <i>et GAUHE</i> (316)
EtOH/AcCOOH/eau (85:5:10)	W_1	Monosaccharides méthylés	LEECH (317)
n-octane/IsoPOH/sol. aq. d'ammoniaque à 10 p. 100 (50:25:2)	W_1 (*) D	Séparation des tri- et tétra méthyléthers	PETEK <i>et DONG</i> (318)
Iso octane/IsoPOH/sol. aq. d'ammoniaque à 10 p. 100 (65:25:2)	W_1 D	" "	" "
di-isopropyléther saturé en DMSO	W_1 (**)	Monosaccharides méthylés	WICKBERG (319,320) WALLENFELS (321)

n-BOH = n-butanol ; EtOH = éthanol ; AmOH = solution aqueuse d'ammoniaque ;
 Pyr = pyridine ; Benz = benzène ; AcEth = acétate d'éthyle ; MEC = méthyl-éthyl-
 cétone ; AcCOOH = acide acétique ; IsoPOH = isopropanol.

W_1 ; W_2 : papiers Whatman n° 1 et 2 ; D = chromatographie descendante ; A = chromatographie ascendante.

- (*) Le papier est traité par trempage dans une solution aqueuse de chlorure d'ammonium à 2 p. 100
- (***) Le papier est imprégné d'un mélange toluène/diméthylsulfoxyde (5:1, v/v)



nosaccharides méthylés. Tous les solvants à base de butanol et d'éthanol dans des proportions variables permettent d'obtenir une séparation en groupes des isomères mono-, di-, tri- et tétra-O-méthylés d'un monosaccharide. Cette technique de chromatographie nous permettra de simplifier l'identification des éthers méthyliques des monosaccharides neutres obtenus par hydrolyse d'un glycopeptide perméthylé (voir p.138).

Les systèmes solvants à base d'octane de PETEK et DONG (322) nous ont également donné de très bonnes résolutions en ce qui concerne les dérivés perméthylés et des séparations moins nettes des dérivés triméthylés.

a - Mode opératoire

Les hydrolysats de glycopeptides ou d'oligosaccharides perméthylés préalablement purifiés par passage sur des colonnes d'échangeur de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; H⁺) puis d'anions (Duolite A 102 D ; "mesh" 25-50 ; HCO₂⁻) sont chromatographiés sur papier Whatman n° 1.

Les systèmes solvants utilisés sont :

- Système-solvant de HIRST et JONES (323) : n-butanol/ éthanol/H₂O : (5 : 1 : 4) pendant 26 h.

- Systèmes-solvants de PETEK et DONG (324) : n-octane/ iso-propanol/solution aqueuse d'ammoniaque à 10 p. 100 (50 : 25 : 2) et iso-octane/isopropanol/solution aqueuse d'ammoniaque à 10 p. 100 (65:25:2) pendant 10h.

Pour réaliser la chromatographie les feuilles de papier Whatman n° 1 sont préalablement imprégnées par passage rapide dans une solution aqueuse de chlorure d'ammonium à 2 g p. 100 ml (p : v).

Les chromatogrammes sur papier sont révélés par pulvérisation à l'aide des réactifs suivants :

- Réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (325) obtenu en mélangeant 2 vol. d'une solution éthanolique d'aniline à 2 p. 100 (v : v) à 3 vol. d'une solution aqueuse d'acide oxalique à 25 p. 1000 (p : v). Les éthers méthyliques apparaissent sous forme de taches marrons allant jusqu'au rouge pour les isomères méthylés en 4 (HOUGH, JONES et WADMAN) (326) après un chauffage de 10 mn à 110°C.

- Réactif au chlorure de triphényltétrazolium de WALLENFELS (327) obtenu en mélangeant 1 vol. d'une solution aqueuse de chlorure de triphényltétrazolium à 2 g p. 100 ml (p:v) à 1 vol. de NaOH 1 N. Les éthers méthyliques dont l'hydroxyle en 2 est libre apparaissent en rouge par chauffage dans une étuve saturée en vapeur d'eau.

- Réactif à la diméthyl-aniline de HOUGH, JONES et WADMAN (328) obtenu en mélangeant 2 ml de diméthyl-aniline à 100 ml d'une solution à 5 p. 100 (p.v.) d'acide trichloracétique dans l'acide acétique glacial. Les éthers méthyliques, dont l'hydroxyle en 4 est libre, donnent une coloration mauve violacé sur fond vert pâle par chauffage à l'étuve à 110°C pendant 10 mn.

b - Résultats

La figure 24(p.124) rassemble les résultats de la chromatographie sur papier des éthers méthyliques du mannose dans le système solvant de HIRST et JONES (329) : M butanol/éthanol/eau (5:1:4). Nous constatons que ce système solvant sépare en groupes les isomères mono-, di-, tri- et tétra-O-méthylés de ce monosaccharide.

Par contre, dans le système solvant de PETEK et DONG (330) les éthers perméthyliques du fucose, galactose, glucose et mannose se séparent très nettement (Fig. 25 ; p. 125).

c - Discussion

La chromatographie de partage sur papier permet l'analyse des éthers méthyliques des monosaccharides neutres sans modification préalable. Son pouvoir séparateur est trop faible pour individualiser les 15 isomères méthylés des monosaccharides (galactose et mannose) couramment rencontrés dans les glycopeptides. Le problème est en fait plus compliqué, car les deux monosaccharides précédemment cités se trouvent en mélange dans les hydrolysats de glycopeptides perméthylés. Nous pouvons cependant retenir deux applications de cette technique.

- La chromatographie sur papier dans un solvant à base de n-butanol/éthanol/eau permet d'obtenir une séparation en groupes des isomères di-, tri- et tétraméthylés. Nous mettrons à profit cette propriété pour simplifier l'étude d'un mélange complexe en réalisant une chromatographie préparative sur papier ; l'élution des zones correspondantes permettra de

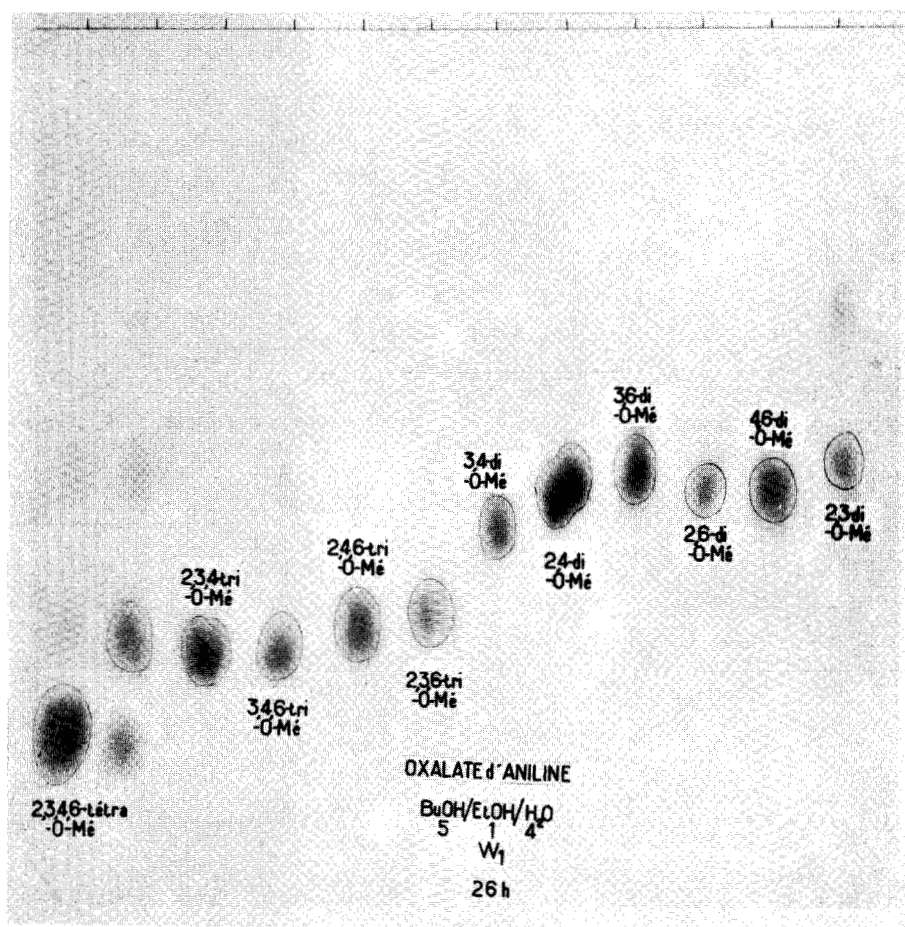


Figure 24

Chromatographie des éthers méthyliques du mannose sur papier Whatman n° 1 dans le système solvant de HIRST et JONES (331) : n-butanol/éthanol/eau 5 : 1 : 4. Durée de la chromatographie : 26 h ; révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (332).



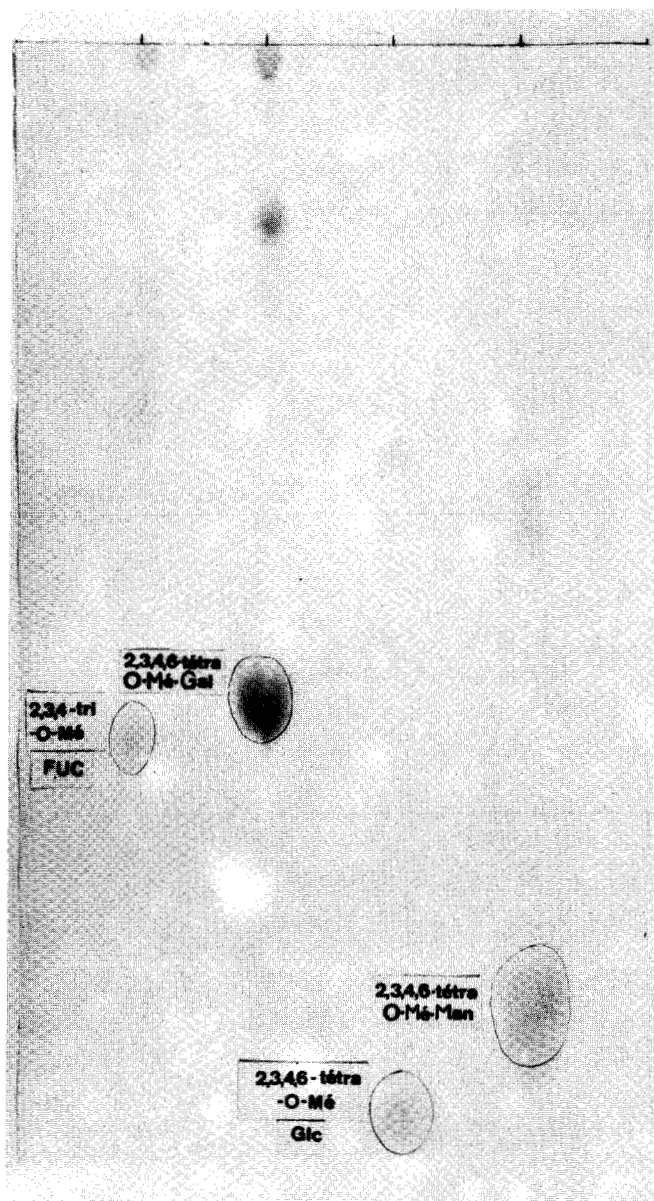


Figure 25

Chromatographie sur papier des dérivés perméthylés du fucose, galactose, glucose et mannose. Papier Whatman n° 1 imprégné de chlorure d'ammonium ; système solvant de PETEK et DONG (333) : n-octane/isopropanol/solution aqueuse d'ammoniaque à 10 p. 100 (50:25:2) ; durée de la chromatographie 10 h ; révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

recueillir les groupes de monosaccharides par degré de substitution dont la séparation sera réalisée par chromatographie en phase gazeuse (voir p.138).

- La chromatographie sur papier associée à une série de révélations colorées spécifiques : coloration rouge par l'oxalate d'aniline des isomères méthylés en 4 (HOUGH, JONES et WADMAN) (334), coloration mauve violacé par la diméthyl-aniline des dérivés dont l'hydroxyle en 4 est libre (HOUGH et al.)(335). révélation spécifique par le chlorure de triphényl tétrazolium (WALLENFELS) (336) des isomères dont l'hydroxyle en 2 est libre, peut fournir d'excellents renseignements sur la nature du dérivé méthylé étudié.

Enfin, nous voudrions rappeler les très bons résultats que fournit la chromatographie sur papier dans les systèmes solvants de PETEK et DONG (337).

2 - Chromatographie en couche mince

Comme dans le cas de la chromatographie sur papier, la chromatographie d'adsorption sur couche mince des monosaccharides neutres méthylés a un pouvoir résolutif très limité. Elle peut renseigner sur le degré de substitution du monosaccharide méthylé, ce type de chromatographie permettant d'obtenir une séparation en classe de dérivés mono-, di-, tri- et tétra-O-méthylés.

a - Mode opératoire

Les conditions opératoires sont décrites plus haut (voir p. 50). Le support est le Silicagel G (MERCK). Les systèmes solvants sont ceux de HAY, LEWIS et SMITH (338), ou le système solvant chloroforme/méthanol (9 : 1). La révélation se fait par pulvérisation d'acide sulfurique à 5 p. 100.

b - Résultats et discussion

Nous utilisons cette technique de chromatographie pour suivre la méthylation des monosaccharides neutres (méthyl-mannoside et méthyl-galactoside) afin de déterminer les conditions optimales de synthèse des éthers perméthyliques ou des dérivés moins substitués que nous fractionnons par chromatographie préparative en phase gazeuse (voir p.157). En effet,

cette méthode est très rapide (15 mn sur petite plaque de 4 x 9 cm) et nécessite peu de produits. Elle s'adapte donc très bien pour le contrôle d'une réaction.

3 - Chromatographie en phase gazeuse

La première application de la chromatographie en phase gazeuse aux dérivés des sucres a été publiée en 1958 par Mc INNES et al. (339) qui reportent la séparation des méthyl-glycosides des perméthyl-xylose, arabinose, glucose, mannose et galactose sur une colonne d'Apiezon M sur celite 545. Deux ans plus tard, KIRCHER (340) sépare les anomères α et β des dérivés perméthylés des méthyl-xyloside, glucoside et mannoside. OVODOV et EVTUSHENKO (341) étudient la séparation de polyols perméthylés (arabinitol, rhamnitol, mannitol et galactitol) à l'aide de trois phases liquides ; une phase polaire : l'ester adipique du polyéthylène glycol et deux phases apolaires : l'apiézon M et L et une phase mixte constituée par un mélange d'apiézon L et de cellulose méthylé. Ce mélange de phase liquide leur donne une excellente séparation des polyols perméthylés.

Les monosaccharides partiellement méthylés peuvent être également étudiés par chromatographie en phase gazeuse. Les premières études systématiques ont été effectuées par BISHOP (342) et KIRCHER (343) sur les dérivés triméthylés du glucose, ces auteurs séparent les quatre éthers triméthyliques sur colonne de polyester succinique du butane -1,4-diol. KLEIN et BARTER (344) étudient les effets de la température et de différentes phases liquides et concluent que les séparations des méthyl-glucosides sont meilleures avec des colonnes de faible pourcentage en phase liquide et à de basses températures.

La présence dans les dérivés partiellement méthylés de fonctions hydroxyles libres fait croître les temps de rétention de ces dérivés et ce problème s'accroît lorsque l'on s'adresse aux dérivés monométhylés. Des résultats intéressants sont obtenus en mélangeant des phases liquides de propriétés différentes tels des mélanges effectués avec des hydrocarbures (Apiezon L) ou des polymères siliconés (SE 30, SE 52) de masse moléculaire élevée, stables à haute température qui fournissent de bonnes séparations des dérivés les moins volatils des sucres et des polyesters (tel le polyester succinique du butane -1,4-diol) qui donnent de bons résultats pour les dérivés perméthylés et triméthylés. Cette technique a permis à JONES et PERRY (345) de séparer un très grand nombre de méthyl-glycosides. Ce problème apporté par

les hydroxyles libres peut être également résolu en bloquant ces derniers par des groupements acétylés (WILLIAMS et JONES) (346) ou des groupements triméthylsilylés (FUJINAGA-ISEMURA et al.) (347), (LEE et BALLOU) (348), LLOYD et al. (349), LOEWUS (350), STEWART et al. (351). Cette dernière technique, qui consiste à triméthylsilyler les fonctions hydroxyles libres du dérivé partiellement méthylé, est extrêmement intéressante à deux points de vue : d'une part, elle diminue les temps de rétention de ces dérivés et d'autre part, la sensibilité des éthers obtenus est accrue. En outre, la préparation de ces dérivés est très rapide.

La complexité des diagrammes peut être diminuée en réduisant la fonction hémiacétalique des monosaccharides méthylés et en analysant ainsi les glycitols correspondants. C'est ainsi que BISHOP et COOPER (352) analysent les mono-O-méthyl-hexoses sous la forme de leurs produits de réduction et de peracétylation. Cette technique a été étendue à l'analyse des dérivés di- et tri-O-méthylés (de BELDER et NORRMAN) (353) (HELLERQVIST et al.) (354) (355), (LANCE et JONES) (356), (REES et RICHARDSON) (357), REES et SAMUEL) (358), (WILLIAMS et JONES) (359).

L'identification des dérivés méthylés peut être réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrographe de masse. Nous discuterons cette technique dans le prochain chapitre.

Dans le tableau XIV (p.129) nous indiquons les principales phases liquides qui permettent la résolution des éthers méthyliques des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse.

Nous avons, en ce qui nous concerne, abordé le problème de l'identification des monosaccharides neutres méthylés par chromatographie en phase gazeuse qui permettrait une séparation convenable du mélange des dérivés méthylés du fucose, galactose et mannose. Ces monosaccharides entrent en effet dans la composition des glycannes de la plupart des glycoprotéines que nous étudions au laboratoire.

a - Mode opératoire

1°) Séparation des dérivés perméthylés du L-fucose, D-galactose et D-mannose

Cette première étude avait pour but de mettre au point une méthode d'identification rapide de ces quatre éthers perméthyliques. En effet, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant (voir p.142) nous caractérisons les monosaccharides partiellement méthylés non pas par identification

Phases liquides utilisées pour la chromatographie en phase gazeuse des dérivés méthylés des monosaccharides

Phases liquides	Supports	Conditions de la chromatographie	Applications	Références
Apiezon M	Celite 545	0,7x240cm 170°C 130 ml/mn (He)	Ethers perméthylliques	Mac INNES et al. (360)
Hydroxyethyl cellulose méthylé 30p.100	Chromosorb	180cm 190°C 34 ml/mn (He)	" "	KIRCHER (361)
Apiezon L 20p.100	Celite 545	180°C	Polyols perméthyllés	OVODOV et EVTUSHENKO (362)
PEGA 15p.100	Chromosorb W	152°C		
Apiezon L 10p.100	Celite 545	138°C		
Cellulose méthylé 10p.100	Celite 545	138°C	Ethers triméthyllés	BISHOP (363)
B.D.S.P. 20p.100	Celite 545	150°C 60ml/mn Argon		
B.D.S.P. 20p.100	Brique	300 cm.200°C 77ml/mn (He)	" "	KIRCHER (364)
LAC-4R-886 5p.100	Chromosorb W "mesh" 100-120	0,5x120cm	Ethers méthyllés et acétylés	WILLIAMS et JONES (365)
LAC-4R-886 15p.100		150°C - 200°C		
Apiezon M 20p.100		50 à 100 ml/mn (He)		
SE 30 5p.100	Chromosorb W	0,3x300cm 180°C 70 ml/mn	Ethers méthyllés et silylés	FUJINAGA-ISEMURA et al. (366)
NPGS 2p.100	Celite	140°C	" "	LEE et BALLOU (367)
QF-1 1,3p.100		130°C	" "	
Polyphenyl éther 10p.100			185°C 0,3x180 cm	" "
B.D.S.P. 15p.100	Celite	160°C	" "	STEWART et al. (369)
Carbowax 20 M 10p.100	Aeropak 30	0,3x150cm 20-30ml/mn		
SE52 3p.100	Chromosorb W. "mesh"80-100	0,3x150cm 60-150°C (N ₂)	" "	HANDA et MONTGOMERY (370)
NPGS 20p.100	Gaschrom Q900	460cm 180°C	" "	UNRAU et CHOY (371)
ECNSS-M 3p.100	Gaschrom Q "mesh" 100-120	0,3x300cm 192°C 45 ml/mn (N ₂)	" " Glycitolés méthyllés et acétylés	de BELDER et NORRMAN (372) HELLERQVIST et al. (373)

PEGA : ester adipique du polyéthylène glycol; B.D.S.P. : polyester succinique du butane-1,4-diol; LAC-4R-886 : polyester succinique de l'éthylène glycol; SE-30 : méthyl silicone; NPGS : ester succinique du néopentyl glycol ; QF-1 : trifluoro propyl-méthyl silicone; SE-52 : méthyl-phenyl silicone; ECNSS-M : Copolymène de l'ester succinique du polyéthylène glycol et de nitrile



de leur produit de déméthylation, mais de leur dérivé de perméthylation. Les éthers perméthylés du fucose, galactose et mannose synthétisés selon le mode opératoire décrit page 80 sont chromatographiés dans les conditions expérimentales suivantes :

- Colonne de verre (0,3 x 180 cm) remplie de Chromosorb W ("mesh" 100-120) contenant 10 p. 100 de Carbowax 6000 ; température de la colonne : 130°C, de l'injecteur:200°C, du détecteur : 210°C; débit du gaz vecteur (azote) : 25 ml/mn.

- Colonne de verre (0,3 x 180 cm) remplie de Chromosorb W AW DMCS (✱) ("mesh 60-80") contenant 5 p. 100 de polyester succinique du butane -1,4-diol ; température de la colonne:140°C ; de l'injecteur : 200°C ; du détecteur : 210°C ; débit du gaz vecteur (azote) : 20 ml/mn.

2°) Séparation des dérivés mono-, di-, tri- et tétra-O-méthylés du D-galactose et du D-mannose

Les éthers méthylés du D-galactose et du D-mannose sont résolus par chromatographie gazeuse dans les conditions expérimentales suivantes :

Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS (✱) ("mesh" 60-80) contenant 3 p. 100 de Carbowax 6000 ; température de la colonne : 170°C ; de l'injecteur : 200°C; du détecteur : 210°C ; débit du gaz vecteur (azote) : 30 ml/mn.

b - Résultats

1°) Séparation des dérivés perméthylés du L-fucose, D-galactose et D-mannose

A la suite de nombreux essais que nous avons effectués, le Chromosorb W à 10 p. 100 de Carbowax 6000 et le Chromosorb W AW DMCS à 5 p. 100 de polyester succinique du butane -1,4-diol nous ont fourni les meilleures résolutions des méthyl-perméthyl-L-fucoside, D-galactoside et D-mannoside. L'examen de la figure 26 (p.131) et du tableau XV(p.132) montre, en effet, que ces supports permettent d'identifier les éthers méthyliques précédents.

(✱) Le chromosorb W est préalablement lavé à l'acide et désactivé soit par chauffage à reflux dans le diméthylchlorosilane (DMCS) ou l'héxaméthylidisilane (HMDS) (voir appendice technique)

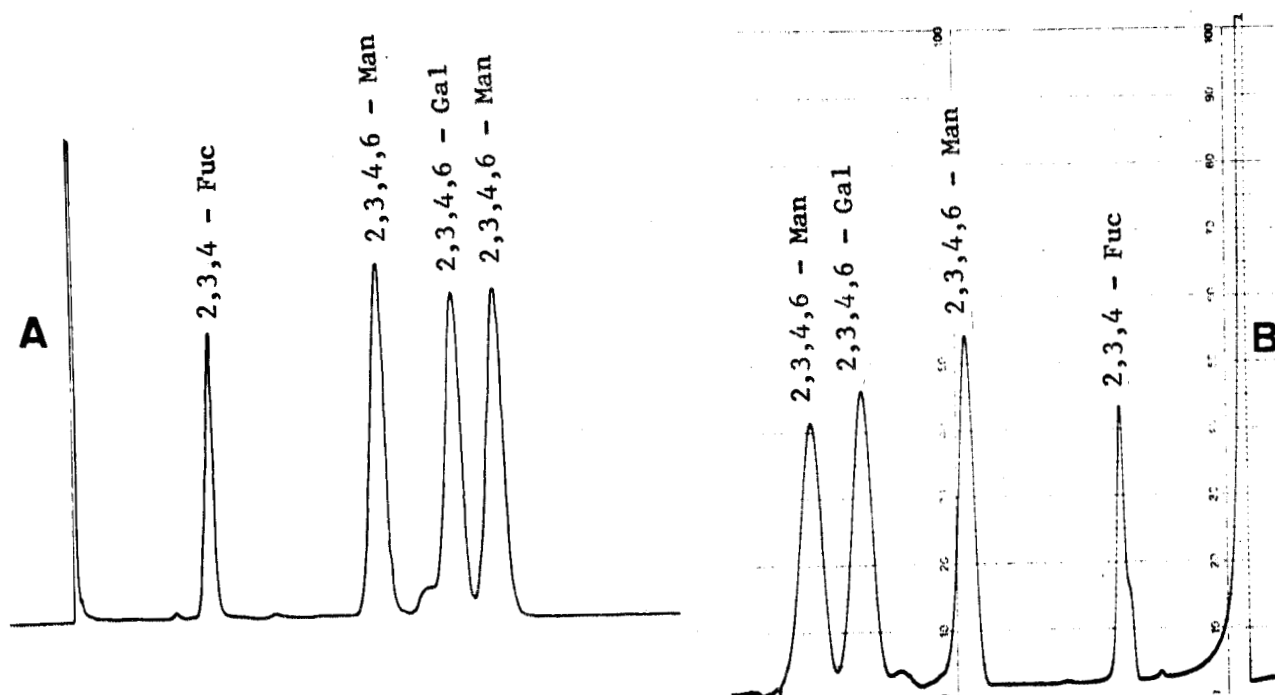


Figure 26

Chromatographie en phase gazeuse des dérivés perméthylés des méthyl-L-fucose, D-galactoside et D-mannoside . (A) : colonne de Chromosorb W ("mesh" 100-120) à 10p.100 de Carbowax 6000; température de la colonne : 120°C; débit du gaz vecteur (N₂) : 25 ml/mn.

(B) : colonne de Chromosorb W AW DMCS ("mesh" 60-80) à 5p.100 de polyester succinique du butane-1,4-diol; température de la colonne : 140°C; débit du gaz vecteur (N₂) : 20ml/mn.



TABLEAU XV

Temps de rétention des dérivés perméthylés des méthyl-L-fucoside, D-galactoside et D-mannoside déterminés par rapport au méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-α-D-mannoside.

Nature des composés	Temps de rétention	
	Carbowax 6000	B.D.S.P.
méthyl-2,3,4-tri- <u>O</u> -méthyl- <u>α,β</u> - <u>L</u> -fucoside	0,44	0,42
méthyl-2,3,4,6-tétra- <u>O</u> -méthyl- <u>α</u> - <u>D</u> -mannoside	1	1
méthyl-2,3,4,6-tétra- <u>O</u> -méthyl- <u>β</u> - <u>D</u> -mannoside	I,38	I,4I
méthyl-2,3,4,6-tétra- <u>O</u> -méthyl- <u>α,β</u> - <u>D</u> -galactoside	I,24	I,23



2°) Séparation des dérivés mono-, di-, tri- et tétra-O-méthylés du D-galactose et du D-mannose

Les résultats concernant la séparation des éthers méthyliques des monosaccharides précédemment cités sont rassemblés dans la figure 27 (p.134) et le tableau XVI (p.135).

Nous constatons qu'en ce qui concerne la séparation des éthers méthyliques du mannose, la Chromosorb W AW HMDS à 3 p. 100 de Carbowax 6000 nous a fourni la meilleure résolution des dérivés di-, tri- et tétra-O-méthylés du méthyl- α -D-mannoside, à l'exception des 2,3,4- et 3,4,6-tri-O-méthyl-dérivés dont les temps de rétention sont absolument identiques. Toutefois, comme le démontre la figure 28 (p.136) et le tableau XVII (p.137), ces deux éthers peuvent être identifiés sous la forme de leurs dérivés triméthylsilylés par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions décrites ci-dessus à la modification près de la température de la colonne qui a été fixée à 132° C, ou sur une colonne de verre (0,3x180 cm) remplie de Chromosorb W HMDS ("mesh" 100-120) contenant 3 p. 100 de silicone OV 17 ; température de la colonne : 115°C ; de l'injecteur : 200°C ; du détecteur : 210°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 20 ml/min. Quant aux dérivés mono-O-méthylés nous n'avons pas encore entrepris leur étude car d'une part, nous ne possédons pas les témoins de référence et d'autre part, l'urgence s'en fait moins sentir : la présence de mono-O-méthyl-mannose dans les glycanes perméthylés étant peu probable.

En ce qui concerne les éthers méthyliques du galactose, nous constatons une séparation satisfaisante des éthers mono-O-méthyliques ; une résolution de tous les éthers di-O-méthylés et une séparation plus moyenne des éthers triméthyliques. Nous essayons actuellement d'autres phases liquides à des pourcentages différents pour améliorer la séparation des 2,3,6-, 2,4,6- et 3,4,6-tri-O-méthyl-dérivés. Toutefois, la chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés des trois éthers méthyliques précédemment cités, sur Carbowax 6000, permet d'identifier sans ambiguïté le méthyl-4-TMS-2,3,6-tri-O-méthyl-galactoside.

c - Discussion

La chromatographie en phase gazeuse nous a permis de séparer tous les éthers méthyliques des monosaccharides "neutres" présents dans les glycanes des glycoprotéines. A la qualité de séparation, nous devons ajouter la rapidité avec laquelle se réalise une analyse et le peu de produits que réclame cette technique.

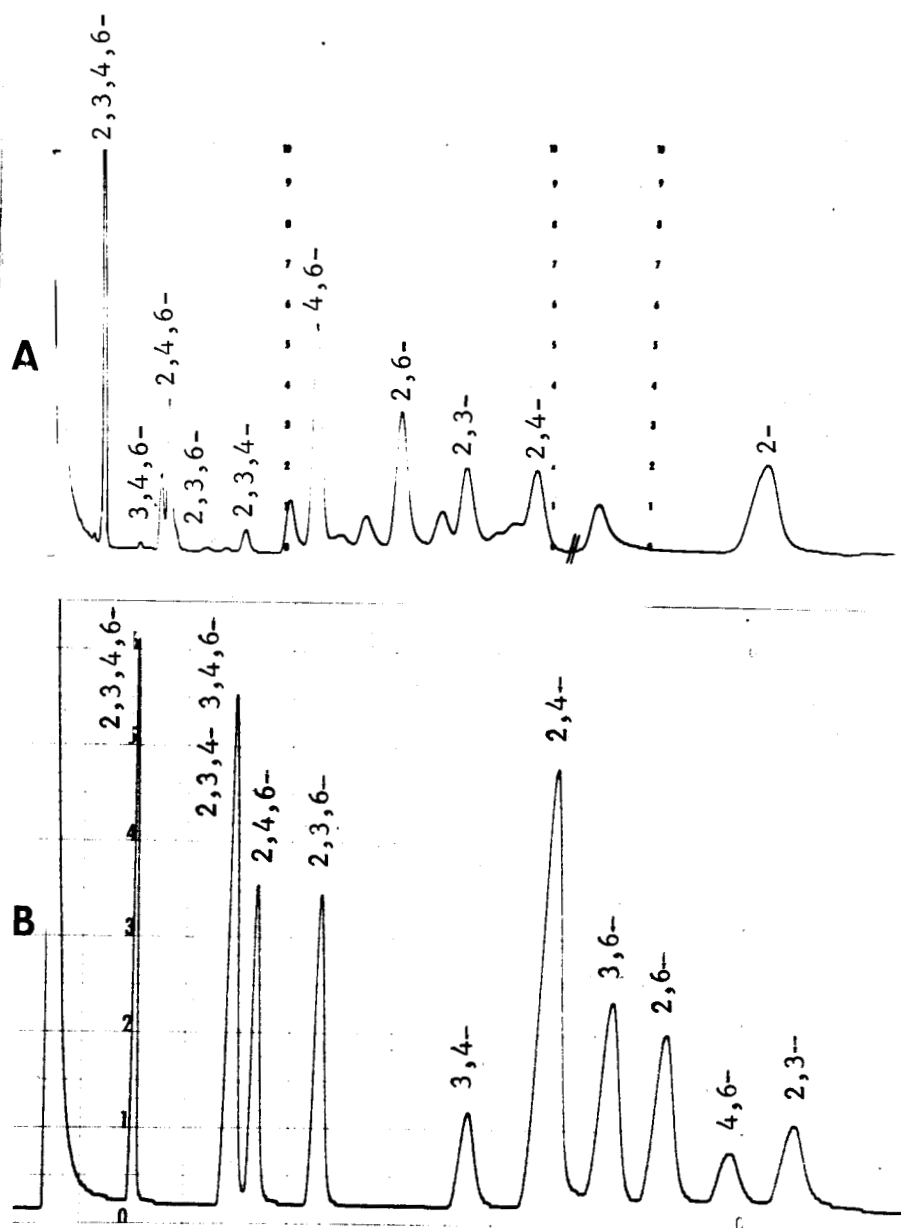


Figure 27

Chromatographie en phase gazeuse (A) des d \acute{e} riv \acute{e} s m \acute{e} thyl \acute{e} s du m \acute{e} thyl- α -D-galactoside et (B) du m \acute{e} thyl- α -D-mannoside.

Colonne de verre (0,3x300cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh"60-80) contenant 3p.100 de Carbowax 6000; temp \acute{e} rature de la colonne 170°C; d \acute{e} bit du gaz vecteur (N $_2$) : 30 ml/mm.



TABLEAU XVI

Temps de rétention des dérivés méthylés des méthyl- α -D-galactosides et mannosides déterminés, respectivement, par rapport au méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-galactoside et au méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-mannoside.

Ethers méthyliques du méthyl- α - <u>D</u> -galactoside	Temps de rétention
2,3,4,6-tétra- <u>O</u> -méthyl-	1
3,4,6-tri- <u>O</u> -méthyl-	2,39
2,4,6-tri- <u>O</u> -méthyl-	2,39
2,3,6-tri- <u>O</u> -méthyl-	2,87
2,3,4-tri- <u>O</u> -méthyl-	4,59
4,6-di- <u>O</u> -méthyl-	6,22
2,6-di- <u>O</u> -méthyl-	6,90
2,3-di- <u>O</u> -méthyl-	10,22
2,4-di- <u>O</u> -méthyl-	11,15
Ethers méthyliques du méthyl- α - <u>D</u> -mannoside	
2,3,4,6-tétra- <u>O</u> -méthyl-	1
2,3,4-tri- <u>O</u> -méthyl-	2,31
3,4,6-tri- <u>O</u> -méthyl-	2,31
2,4,6-tri- <u>O</u> -méthyl-	2,71
2,3,6-tri- <u>O</u> -méthyl-	3,67
3,4-di- <u>O</u> -méthyl-	5,78
2,4-di- <u>O</u> -méthyl-	7,27
3,6-di- <u>O</u> -méthyl-	8,38
2,6-di- <u>O</u> -méthyl-	9,29
4,6-di- <u>O</u> -méthyl-	10,61
2,3-di- <u>O</u> -méthyl-	11,49



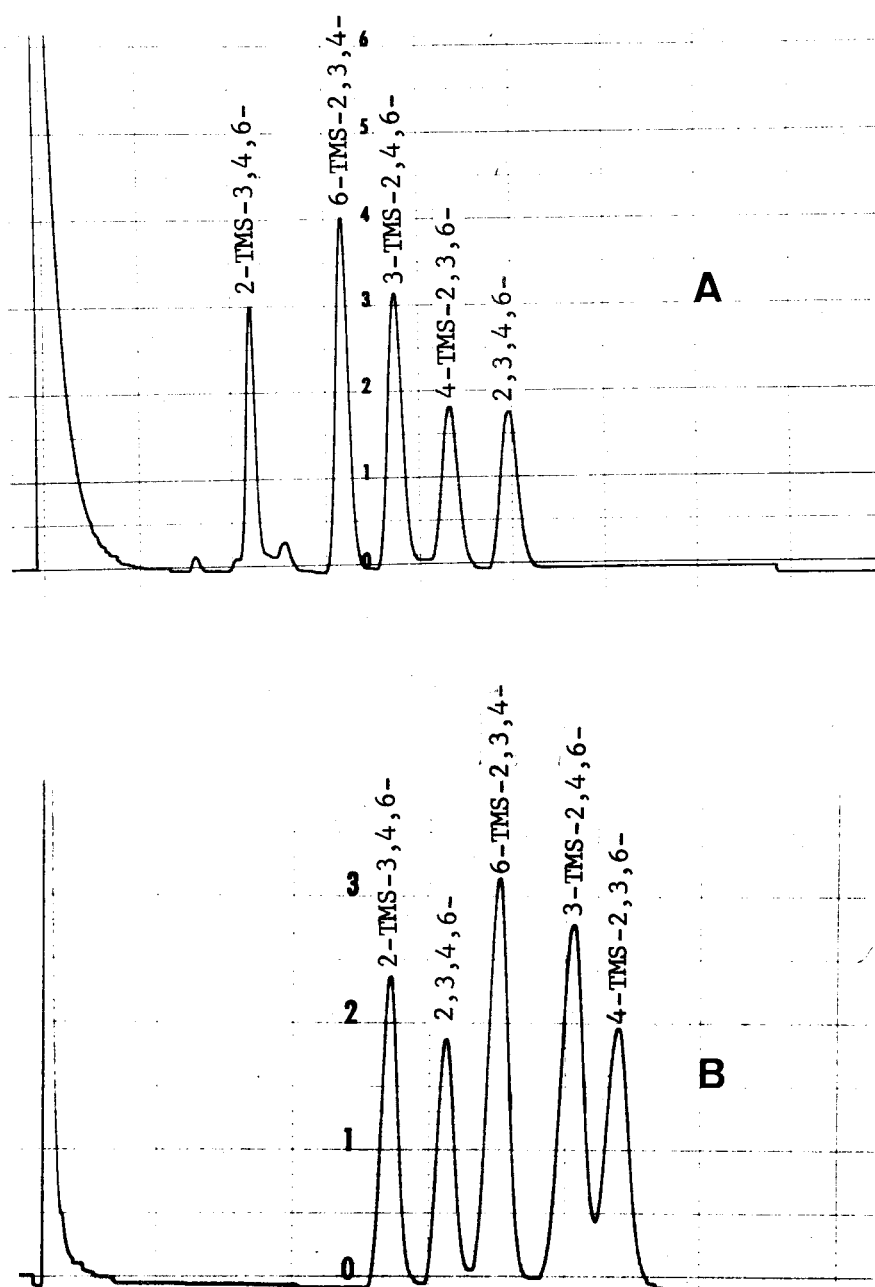


Figure 28

Chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside. (A) : colonne de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) contenant 3p.100 de Carbowax 6000; température de la colonne : 132°C; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mn.

(B) : colonne de Chromosorb W HMDS ("mesh" 100-120) contenant 3p.100 de silicone OV 17; température de la colonne : 115°C; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mn.



TABLEAU XVII

Temps de rétention des dérivés triméthylsilylés des éthers triméthyliques du méthyl- α -D-mannoside déterminés par rapport au méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl- α -D-mannoside.

Nature des composés	Temps de rétention	
	Carbowax 6000	OV 17
2,3,4,6-tétra-O-méthyl-	1	1
4-TMS-2,3,6-tri-O-méthyl-	0,874	1,43
3-TMS-2,4,6-tri-O-méthyl-	0,747	1,32
6-TMS-2,3,4-tri-O-méthyl-	0,652	1,13
2-TMS-3,4,6-tri-O-méthyl-	0,461	0,86



Toutefois, il faut préciser que dans les conditions décrites ci-dessus, nous n'arrivons pas à séparer, en une seule analyse, tous les éthers méthyliques du galactose et du mannose, notamment les éthers diméthyliques qui se chevauchent. C'est pour cette raison que nous réalisons un fractionnement préalable de ces dérivés par chromatographie préparative sur papier (voir p.141).

C - PROCÉDE DE FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS DE GLYCOPEPTIDES PERMETHYLES EN VUE DE L'IDENTIFICATION DES ETHERS METHYLIQUES

La présence dans un glycopeptide d'une grande diversité de monosaccharides (N-acétylglucosamine, fucose, galactose, mannose et acide N-acétyl neuraminique) rend impossible l'identification en une seule analyse des différents éthers méthyliques libérés par hydrolyse ou méthanolyse du glycanne perméthylé. Nous avons résolu ce problème en pratiquant un fractionnement préalable de ces composés.

I - PRINCIPE

L'hydrolysate du glycopeptide perméthylé est fractionné par électrophorèse préparative en composés "neutres" : éthers méthyliques des monosaccharides "neutres" et composés "basiques" : éthers méthyliques de la glucosamine. Les composés "neutres" sont de nouveau séparés suivant leur degré de substitution par chromatographie préparative sur papier. Le schéma du fractionnement est donné dans la figure 29 (p.139).

2 - MODE OPERATOIRE

a - Electrophorèse préparative

100 mg de glycopeptide β de l'ovomucofde perméthylés par trois cycles de méthylation suivant la méthode de HAKOMORI et hydrolysés par de l'acide chlorhydrique 4N, à 100°C, pendant 4 h sont soumis à une électrophorèse préparative sur papier réalisée dans les conditions expérimentales suivantes : papier Whatman n° 3 MM ; tampon de MICHL (374) de pH 3,9 (pyridine/ acide acétique/eau 3 : 10 : 487) ; 7 V/cm pendant 15 h. La révélation des bandes latérales par le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (375) et par le réactif à la ninhydrine permet de localiser la bande "basique" des 0-méthylglucosamines et la bande "neutre" des monosaccharides "neutres"-0-méthylés (Fig.30;p.140). Ces deux fractions sont éluées selon la méthode de DENT (376) par de l'eau distillée additionnée de quelques gouttes d'acide acétique et les éluats sont évaporés à siccité dans un évaporateur rotatif, puis en désiccateur.

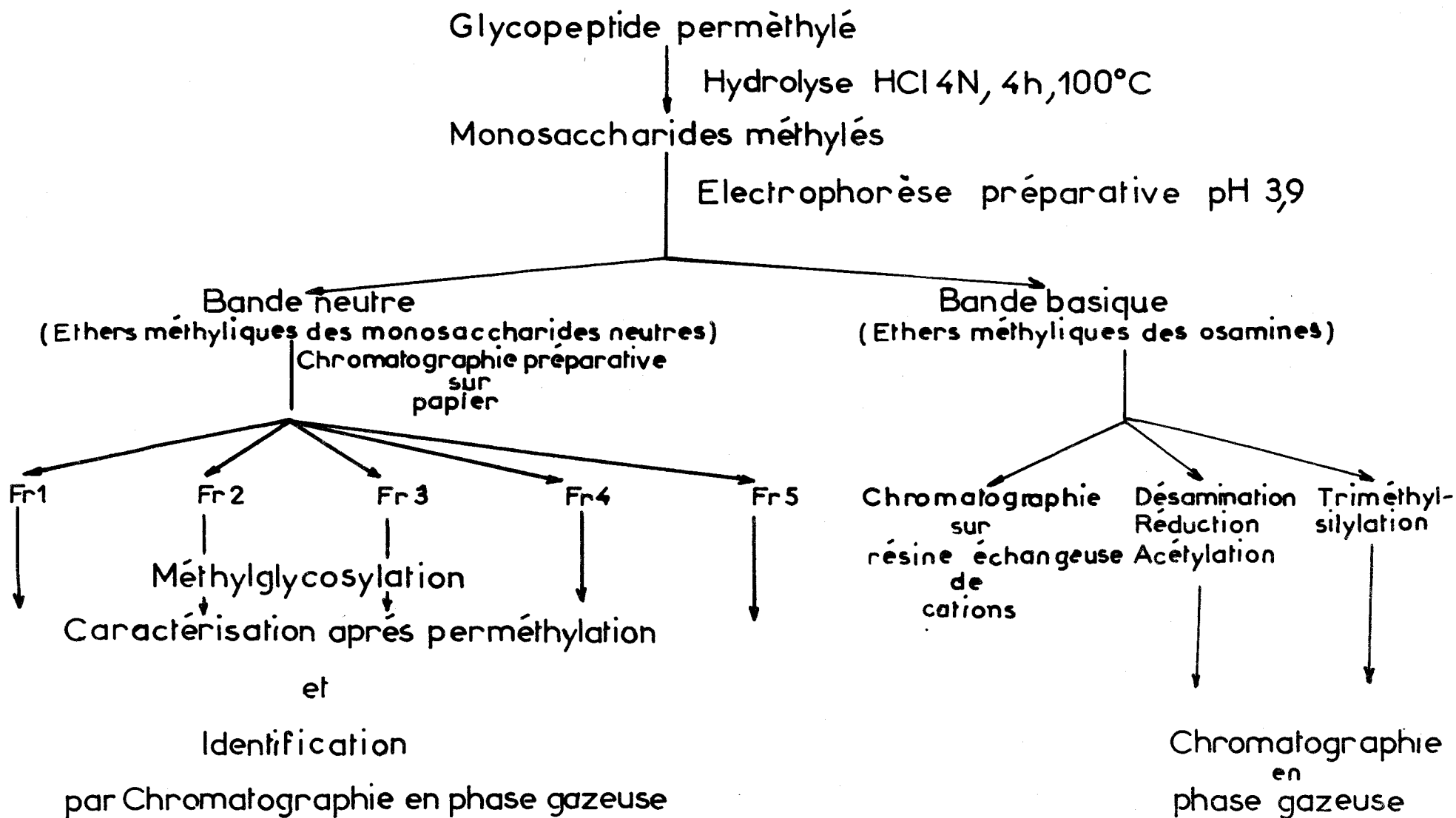


Figure 29

Schéma de fractionnement des hydrolysats de glycopeptide perméthylé



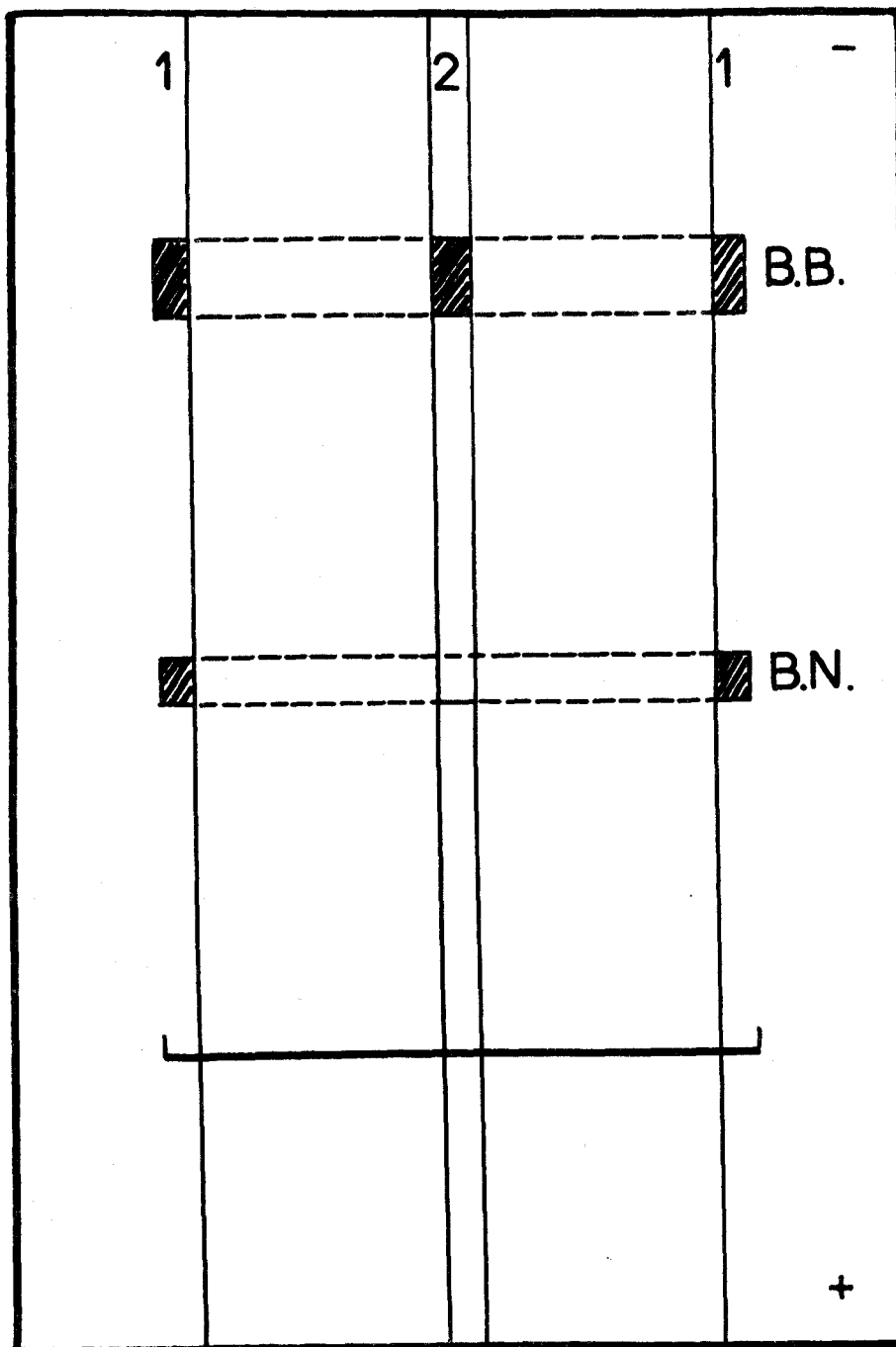


Figure 30

Electrophorèse préparative de l'hydrolysat du glycopeptide β de l'ovomucoïde perméthylé. Papier Whatman n° 3 MM; tampon de MICHL de pH 3,9 (pyridine/ acide acétique/eau 3 : 10 : 487); 7V/cm pendant 15h; 1 : révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline; 2 : révélation par la ninhydrine ; B.B. : bande basique; B.N. : bande neutre.



b - Identification des méthyl-osamines

Le mélange des dérivés méthylés de la glucosamine est soumis directement à l'analyse chromatographique selon les modes opératoires décrits dans le paragraphe précédent (voir p. 100).

c - Identification des éthers méthyliques des monosaccharides "neutres"

1°) Chromatographie préparative sur papier

Les éthers méthyliques des monosaccharides "neutres" sont préalablement fractionnés par une chromatographie préparative sur papier Whatman n° 3 MM effectuée avec le système solvant : n-butanol/éthanol/eau (2 : 1 : 1) (durée de la chromatographie : 15 h). La révélation des bandes latérales par le réactif à l'oxalate d'aniline permet de localiser les fractions de monosaccharides "neutres" qui sont ensuite éluées dans les conditions décrites ci-dessus. Sur chaque fraction nous réalisons une double identification: d'une part, nous caractérisons le ou les monosaccharides présents sous la forme de O-méthyl-dérivés et d'autre part, nous identifions directement ces éthers méthyliques.

2°) Caractérisation des monosaccharides méthylés

A cause des imperfections des méthodes de séparation, il sera parfois indispensable de faire retour, par déméthylation, à l'ose initial ou, selon un procédé que nous avons décrit (FOURNET et MONTREUIL) (377), pousser la méthylation jusqu'au stade du dérivé perméthylé de manière à réaliser l'identification des dérivés méthylés.

Caractérisation des monosaccharides à l'aide du procédé de déméthylation.

Les monosaccharides méthylés sont caractérisés en identifiant leur produit de déméthylation. Nous avons utilisé la méthode de HOUGH, JONES et WADMAN (378) à l'acide bromhydrique sur le perméthyl-galactose et mannose. 5 à 10 mg de ces dérivés sont traités par 1 ml d'acide bromhydrique (48 p. 100 p : p), à 100°C, pendant 5 minutes, en tube scellé. La solution est alors diluée avec 10 ml d'eau distillée puis neutralisée au pH-mètre avec du carbonate d'argent. Elle est décolorée par agitation énergique avec du charbon "décolorizing", puis filtrée. Les dernières traces d'argent sont éliminées par un barbottage d'hydrogène sulfuré suivi d'une filtration sur charbon "décolorizing". Le filtrat est concentré et analysé en chromatographie sur

papier Whatman n° I dans le système solvant n-butanol/éthanol/eau (2 : 1 : 1) pendant 18 h. La révélation est effectuée par le réactif à l'oxalate d'aniline.

Caractérisation des monosaccharides à l'aide du procédé de perméthylation (FOURNET et MONTREUIL)(379).

Les monosaccharides méthylés sont caractérisés en identifiant leur produit de perméthylation. 2 mg de chacune des fractions de monosaccharides "neutres" méthylés obtenus par chromatographie préparative sur papier, préalablement séchés en dessiccateur en présence d'anhydride phosphorique sont méthylglycosilés par 0,2 ml de méthanol chlorhydrique (1 N en HCl), à 100°C, pendant 8 h en tube scellé. La solution est évaporée à siccité sous courant d'azote. Une aliquote est alors perméthylée suivant le procédé de HAKOMORI. Les dérivés perméthylés ainsi obtenus sont analysés et identifiés par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions expérimentales décrites plus haut (voir p.128).

3°) Identification des éthers méthyliques

Les monosaccharides "neutres" méthylés obtenus par chromatographie préparative sur papier, préalablement méthylglycosilés dans les conditions décrites ci-dessus, sont analysés par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions expérimentales précisées dans le paragraphe précédent (voir p. 130).

3 - RESULTATS

a - Identification des méthyl-osamines

Les éthers méthyliques de la glucosamine ont été analysés par chromatographie sur résine échangeuse de cations et par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylsilylés. Les résultats sont rassemblés dans la figure 31 (p.143). Nous identifions pour le premier type de chromatographie la 3-mono-ou la 3,6-di-O-méthyl-glucosamine et la 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine. La chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés fournit deux pics correspondant à la 3,6-di-O-méthyl-glucosamine et la 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine.

b - Identification des éthers méthyliques des monosaccharides "neutres"

1°) Chromatographie préparative sur papier

La chromatographie préparative sur papier des dérivés méthylés des monosaccharides "neutres" obtenus par électrophorèse préparative

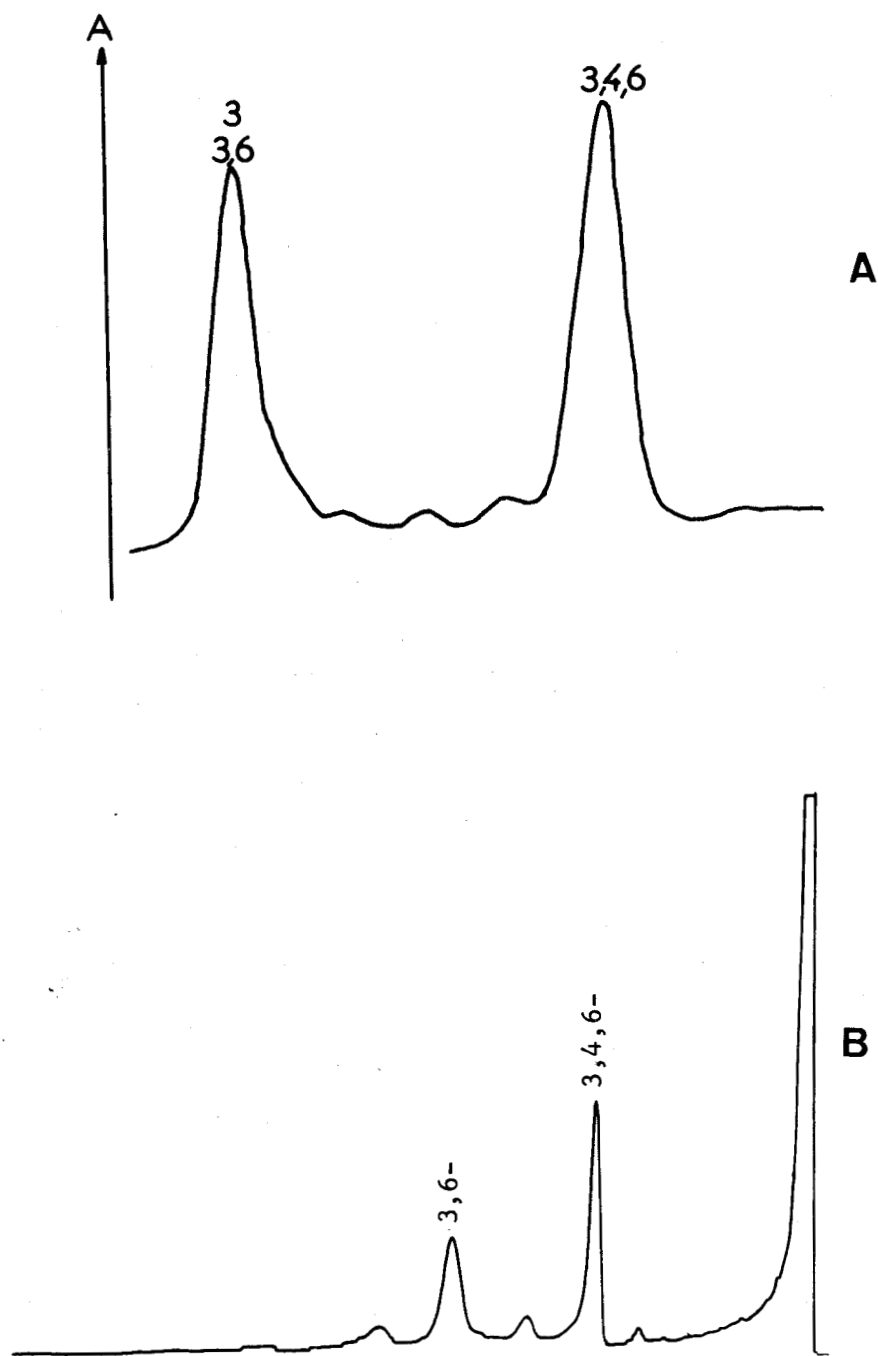


Figure 31

Chromatographie sur résine échangeuse de cations (A) et en phase gazeuse (B) des éthers méthyliques de la glucosamine présents dans le glycopeptide β de l'ovomucoïde. (Pour les conditions expérimentales voir p.100).



de l'hydrolysate de glycopeptide perméthylé fournit 5 fractions (Fig. 32 ; p. 145).

2°) Caractérisation des monosaccharides méthylés

Caractérisation des monosaccharides à l'aide du procédé de déméthylation.

La figure 33 (p. 146) montre que l'on obtient par déméthylation à l'aide de l'acide bromhydrique les homologues méthylés inférieurs. Cette réaction n'est donc pas quantitative.

Caractérisation des monosaccharides à l'aide du procédé de perméthylation.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans la figure 34 (p.147). La perméthylation d'une aliquote de chaque fraction permet d'identifier :

- dans la fraction I : du perméthyl-mannose indiquant la présence de dérivé méthylé du mannose dans cette fraction.
- dans la fraction 2 : du perméthyl-mannose et du perméthyl-galactose indiquant la présence des dérivés méthylés de ces deux monosaccharides.
- dans la fraction 3 : du perméthyl-galactose indiquant la présence de dérivés méthylés de ce monosaccharide.
- dans les fractions 4 et 5 : du perméthyl-mannose indiquant la présence de dérivé méthylé de ce monosaccharide.

3°) Identification des éthers méthyliques

Les chromatographies en phase gazeuse des éthers méthyliques présents dans la fraction "neutre" de l'électrophorèse préparative et dans les fractions de la chromatographie préparative sur papier sont rassemblées dans la figure 35(p.148). Nous identifions :

- dans la fraction I : le perméthyl-mannose.
- dans la fraction 2 : le perméthyl-galactose et deux dérivés triméthylés du mannose : le méthyl-3,4,6-tri-O-méthyl-mannoside et en proportion beaucoup plus faible: le méthyl-2,3,6-tri-O-méthyl-mannoside.
- dans la fraction 3 : un dérivé triméthylé du galactose : le méthyl-2,4,6-tri-O-méthyl-galactoside.
- dans la fraction 4 : trois dérivés diméthylés du mannose : les méthyl-3,4-, 2,4- et 3,6-di-O-méthyl-mannosides.

Le ou les éthers méthyliques présents dans la fraction 5

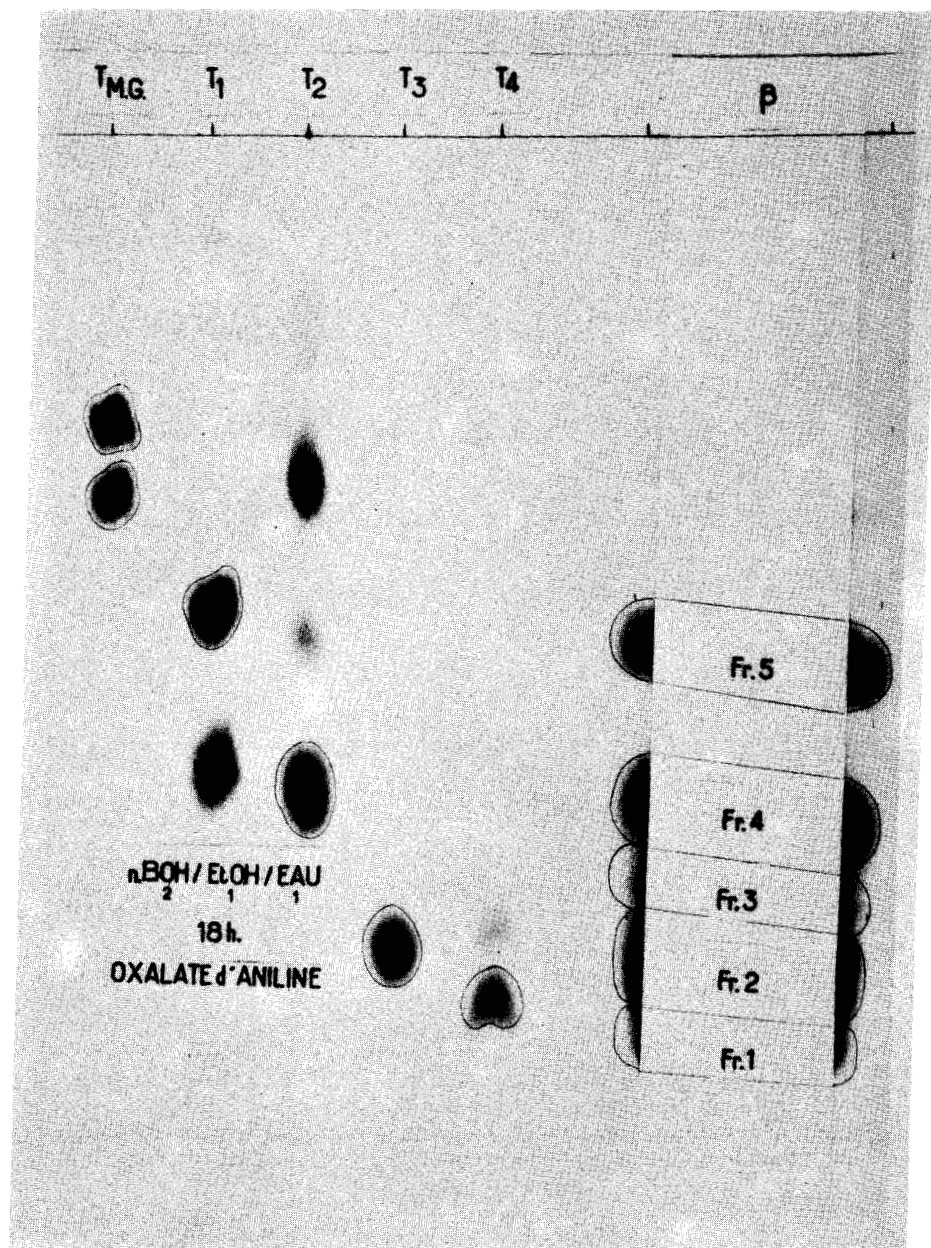


Figure 32

Chromatographie préparative sur papier des éthers méthyliques des monosaccharides (galactose et mannose) présents dans la fraction électrophorétique neutre des hydrolysats chlorhydriques du glycopeptide β de l'ovomucoïde. Papier Whatman n° 3 MM; système solvant : n-butanol/éthanol/eau (2 : 1 : 1); durée de la chromatographie 18h; révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline; T.M.G: dépôt témoin de mannose et de galactose, T₁, T₂, T₃, T₄ : dépôts témoins, respectivement, de dérivés mono-, di-, tri-, et tétra-O-méthylés.

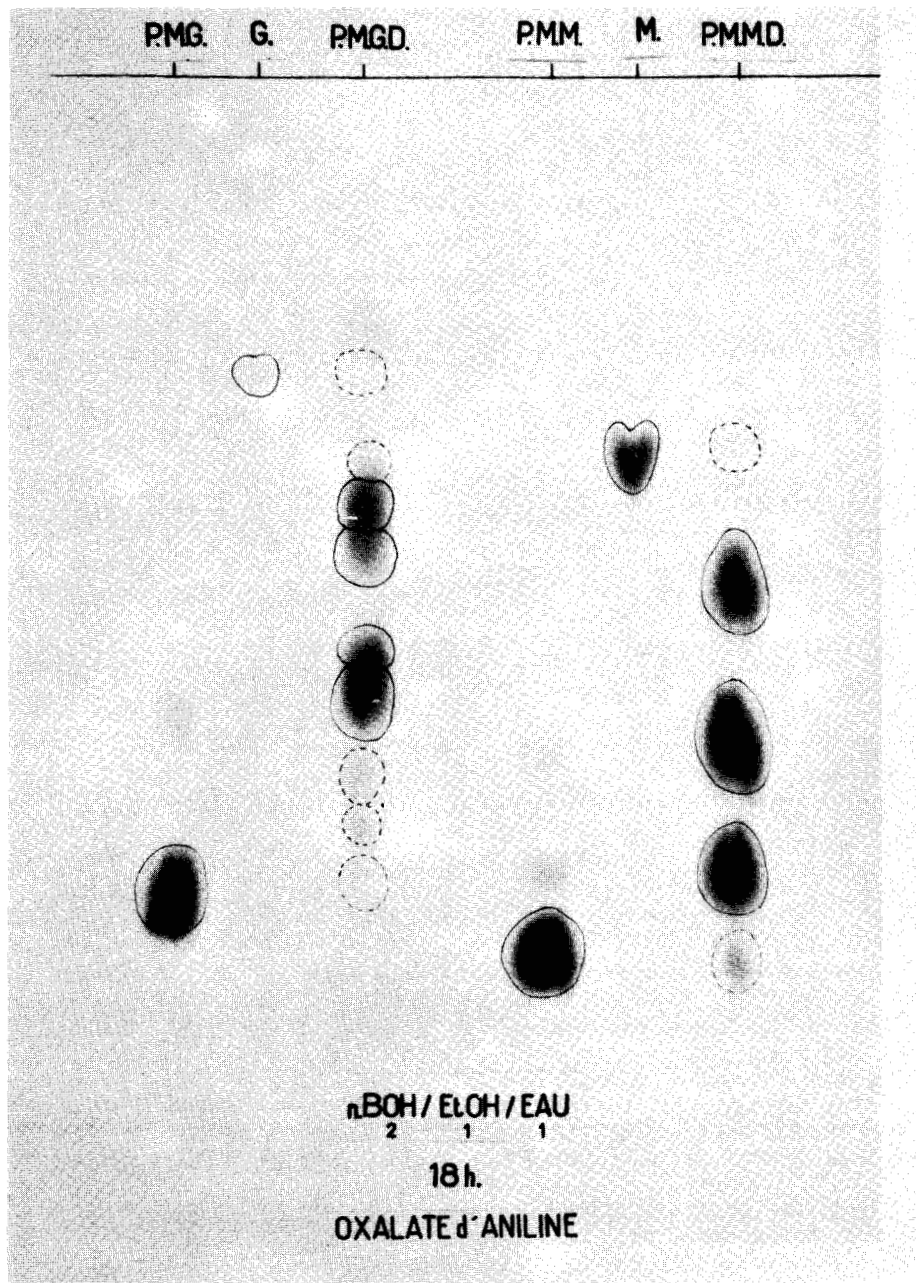


Figure 33

Chromatographie sur papier des produits de la déméthylation par l'acide bromhydrique du perméthyl-galactose et mannose. Papier Whatman n° 1; système solvant : n-butanol/éthanol/eau (2 : 1 : 1); durée de la chromatographie : 18h; PMG : perméthyl-galactose; G : galactose; PMGD : perméthyl-galactose déméthylé; PMM : perméthyl-mannose; M : mannose; PMMD : perméthyl-mannose déméthylé.



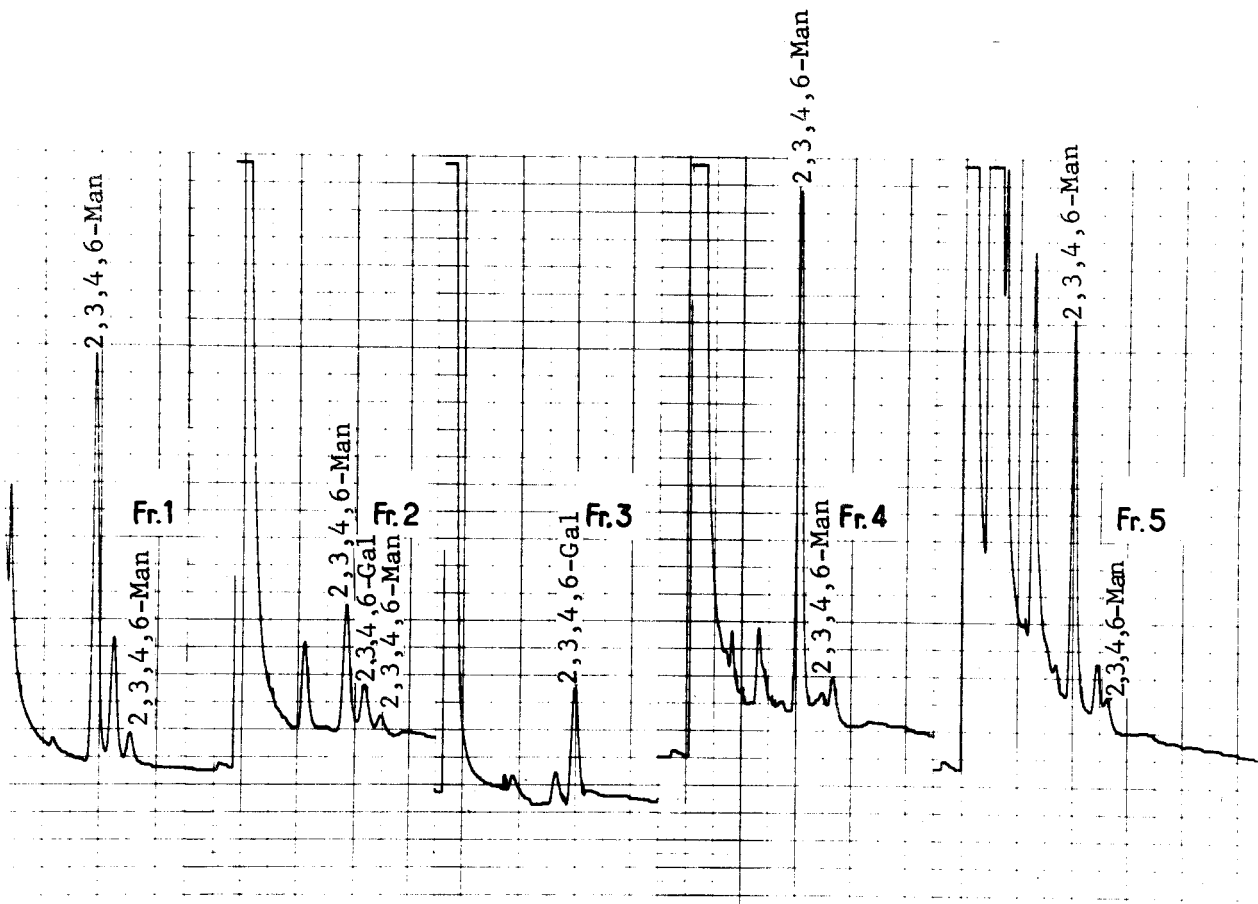


Figure 34

Chromatographie en phase gazeuse des dérivés méthylés obtenus par perméthylation d'une aliquote de chaque fraction de monosaccharides neutres méthylés de la chromatographie préparative sur papier. Colonne (0,3x180cm) remplie de Chromosorb W ("mesh" 100-120) contenant 10p.100 de Carbowax 6000; température de la colonne : 130°C; débit du gaz vecteur (N₂) : 25ml/mm.



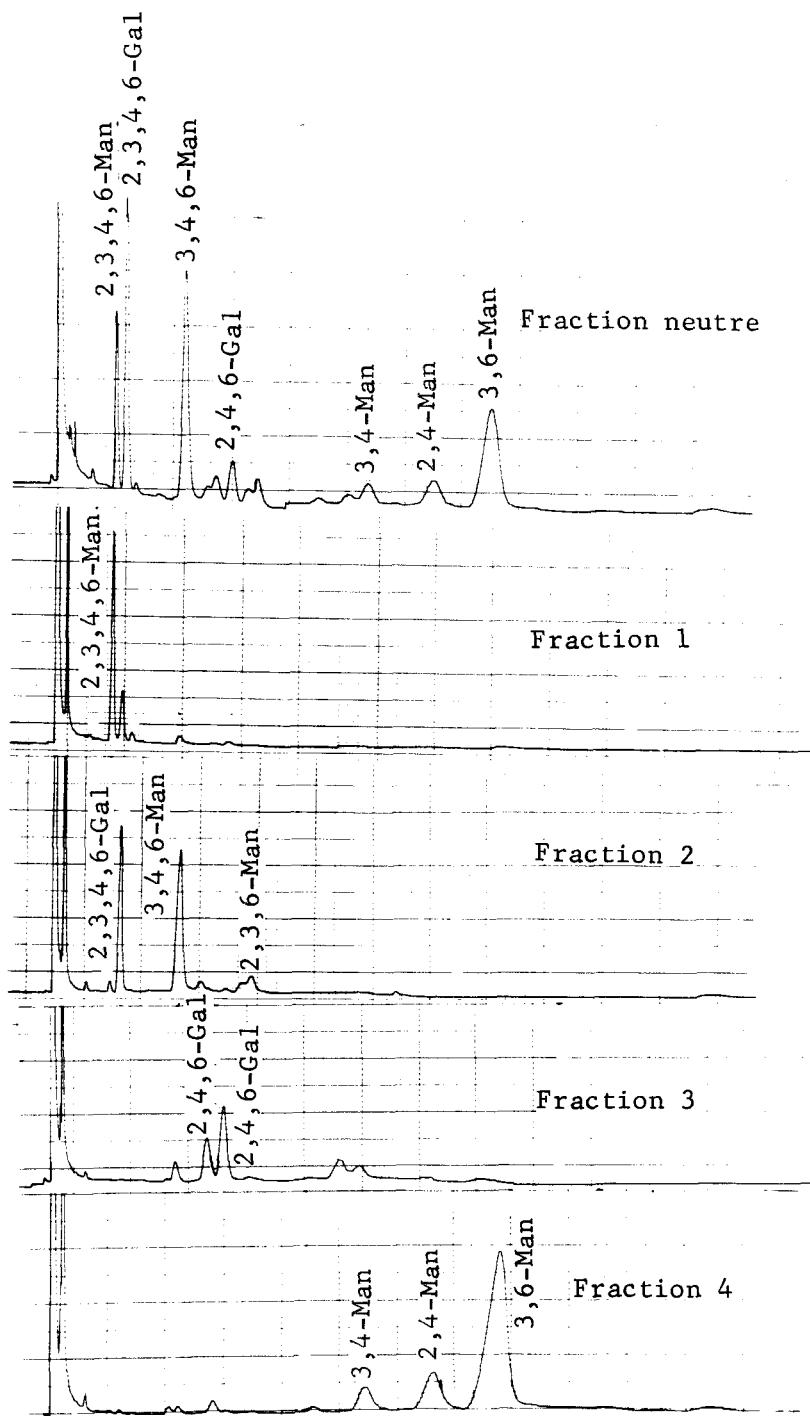


Figure 35

Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques présents dans les fractions de la chromatographie préparative sur papier. Colonne de verre (0,3x300 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) contenant 3 p. 100 de Carbowax 6000 ; température de la colonne : 170°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mm.



n'ont pu être identifiés, il s'agit d'éthers mono-O-méthylés du mannose, la fraction 5 contenant du mannose (la perméthylation de cette fraction fournit en effet du perméthyl-mannose). En résumé, les constituants principaux présents dans la fraction "neutre" de l'électrophorèse préparative sont : les méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-mannoside et galactoside, le méthyl-3,4,6-tri-O-méthyl-mannoside et le méthyl-3,6-di-O-méthyl-mannoside.

4 - DISCUSSION

La présence dans les glycanes des glycoprotéines d'une grande diversité de monosaccharides rend difficile l'identification des éthers méthyliques obtenus par perméthylation et hydrolyse de ces hétérosaccharides. La méthode décrite simplifie ce problème d'identification :

I - L'électrophorèse préparative réalise un premier fractionnement entre méthyl-osamines et dérivés méthylés des monosaccharides "neutres". Elle permet donc d'étudier séparément ces deux classes de monosaccharides et d'éviter des causes d'erreur dans le dépouillement des chromatogrammes : les méthyl-osamines pouvant interférer avec les monosaccharides "neutres" méthylés.

2 - La chromatographie préparative sur papier dans les conditions décrites ci-dessus, réalise un double fractionnement selon la nature du monosaccharide méthylé et le degré de substitution. Ainsi, pour un glycopeptide ou un polysaccharide constitué de galactose et de mannose, nous obtenons au maximum 7 fractions : la fraction I contenant le perméthyl-mannose, la fraction 2 étant constituée du perméthyl-galactose et des dérivés triméthylés du mannose, la fraction 3 renfermant uniquement les éthers triméthylés du galactose, la fraction 4 contenant les éthers diméthyliques du mannose, la fraction 5 étant constituée des di-O-méthyl-galactoses, la fraction 6 renfermant les mono-O-méthyl-mannoses et enfin la fraction 7 constituée des mono-O-méthyl-galactoses. Ce fractionnement est indispensable dans le cas où le glycanne perméthylé possède des dérivés diméthylés du galactose et du mannose qui se chevauchent ou des dérivés triméthylés du galactose et du mannose qui possèdent des temps de rétention très voisins dans les conditions de la chromatographie en phase gazeuse décrites précédemment.

3 - La caractérisation des éthers méthyliques sous la forme de leur dérivé perméthylé remplace avantageusement la méthode de déméthylation. En effet, cette technique est rapide et réclame peu de produits, de plus l'identification des éthers perméthyliques par chromatographie en phase gazeuse est très satisfaisante.

D - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LES PROCÉDES D'IDENTIFICATION DES MONOSACCHARIDES METHYLES

Les conclusions que nous pouvons tirer de nos travaux sur les méthodes d'analyse des éthers méthyliques sont les suivantes :

I - En ce qui concerne les éthers méthyliques de la glucosamine

a - La chromatographie d'adsorption sur couche mince de Silicagel G et la chromatographie de partage sur papier ne permettent pas de séparer les 7 éthers méthyliques de la glucosamine. Toutefois, ces techniques renseignent sur le degré de substitution des isomères méthylés obtenus par hydrolyse du glycopeptide perméthylé et permettent d'analyser rapidement une cinétique de méthylation d'un glycanne.

b - L'utilisation de la chromatographie sur résine échangeuse de cations permet de réaliser la séparation de 5 éthers méthyliques de la glucosamine, la 3- et la 3,6-di-O-méthyl-glucosamine n'étant pas résolues dans ces conditions. Toutefois, ces deux dérivés méthylés peuvent être séparés par chromatographie sur papier ou par chromatographie en phase gazeuse.

c - La chromatographie en phase gazeuse sur colonne de silicone OV 17 ou OV 210 réalise de bonnes séparations des éthers méthyliques de la glucosamine. En effet, nous identifions 6 éthers méthyliques sur 7, n'ayant pu préparer la 3,4-di-O-méthyl-glucosamine. En outre cette méthode réclame très peu de produits puisque nous identifions de 5 à 10 μ g de dérivés méthylés, elle présente en outre l'avantage d'être très rapide puisque les opérations de triméthylsilylation et de chromatographie peuvent être effectuées en moins de 2 h. Cette méthode pourra, dans un proche avenir, être rendue quantitative.

2 - En ce qui concerne les éthers méthyliques des monosaccharides "neutres"

a - La chromatographie sur papier Whatman n° I dans le système solvant de HIRST et JONES (380) réalise une séparation suivant le degré de méthylation des monosaccharides. Dans le système solvant de PETEK et DONG (381) il est possible d'identifier les éthers perméthyliques et quelques dérivés triméthylés. Toutefois le pouvoir de résolution de ces techniques peut être accru en leur associant des révélations spécifiques.

b - La chromatographie d'adsorption sur couche mince de Silicagel G ne permet pas d'identifier les monosaccharides méthylés présents dans un méthanolysat de glycopeptide perméthylé. Elle est cependant précieuse, comme méthode de routine, pour suivre la méthylation des monosaccharides.

c - La chromatographie en phase gazeuse dans les conditions décrites ci-dessus donne d'excellents résultats. Elle permet dès à présent l'identification des principaux éthers méthyliques rencontrés dans les glycanes perméthylés de plus, elle s'adapte très bien au dosage de ces dérivés, problème qui est résolu en ce qui concerne les éthers méthylés du mannose (voir p.176). Cette technique très fine réclame peu de produits, ce qui nous a permis de déterminer la structure de plusieurs oligosaccharides par perméthylation de 3 à 4 mg de ces derniers. Enfin, le couplage du chromatographe en phase gazeuse avec un spectromètre de masse permettra dans l'avenir de descendre encore en quantité et d'améliorer les identifications de ces dérivés méthylés des sucres.

d - Il sera parfois nécessaire d'utiliser plusieurs méthodes chromatographiques pour identifier avec certitude certains éthers méthyliques : c'est le cas en particulier des éthers diméthyliques du galactose et du mannose. Le fractionnement par chromatographie préparative sur papier, que nous venons de décrire, permet de discriminer les diméthyl-éthers de ces deux monosaccharides isomères.

III - SYNTHÈSE DES ÉTHERS MÉTHYLIQUES TEMOINS

La synthèse des éthers méthyliques des monosaccharides présents dans les glycoprotéines est une condition préalable indispensable à l'identification de ces composés par les méthodes chromatographiques décrites dans le paragraphe précédent. En outre, la chromatographie quantitative ne pourra être réalisée que lorsque nous serons en possession de tous les éthers méthyliques.

Nous exposerons donc successivement :

A - La préparation des éthers méthyliques de la glucosamine

B - La préparation des éthers méthyliques du mannose

C - Les premiers résultats de la préparation des éthers méthyliques du galactose

A - PRÉPARATION DES ÉTHERS MÉTHYLIQUES DE LA D-GLUCOSAMINE

I - Préparation de la 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine

a) Principe

La 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine est synthétisée par perméthylation de la N-acétylglucosamine par la méthode de KUHN, BAER et GAUHE (382) suivie d'un cycle de méthylation par la méthode de HAKOMORI (383).

b) Mode opératoire

5 g de N-acétylglucosamine sont dissous dans 60 ml de diméthylformamide. 10 ml d'iodure de méthyle et 10 g d'oxyde d'argent sont ensuite ajoutés en 30 mn, par petites portions, à la température ordinaire. On agite pendant 16 h à l'obscurité, puis on procède à une nouvelle addition de réactifs : 10 ml d'iodure de méthyle et 10 g d'oxyde d'argent. L'agitation est poursuivie pendant encore 8 h.

On filtre, on lave soigneusement le filtre avec du chloroforme. La solution obtenue est abandonnée à + 4°C pendant 24 h. Les sels d'argent colloïdaux et les formyl-dérivés cristallisent. On élimine les cristaux par filtration et on lave la phase chloroformique par trois fois 30 ml d'eau distillée. La solution chloroformique, séchée sur sulfate de sodium anhydre, est ensuite évaporée sous vide à l'évaporateur rotatif puis sous un courant d'air sec. Au résidu brunâtre repris par 20 ml d'iodure de méthyle on ajoute 5 g d'oxyde d'argent et 3 g de sulfate de calcium anhydre. L'ensemble est chauffé pendant 4 h à reflux. On arrête le chauffage et on effectue une nouvelle addition de réactifs. Le reflux est poursuivi pendant 4 h. Après filtration et lavage du résidu insoluble avec du chloroforme, le monosaccharide méthylé est obtenu par évaporation à siccité du filtrat et des extraits chloroformiques.

2 g du produit précédent sont dissous dans 10 ml de diméthylsulfoxyde et ajoutés à la solution de méthyl-sulfinyl carbanion obtenue en dissolvant, sous agitation et sous atmosphère d'azote, 2 g d'hydrure de sodium à 20 ml de diméthylsulfoxyde. Après 2,5 h d'agitation on additionne, lentement, 5 ml d'iodure de méthyle et la réaction d'éthérification est poursuivie pendant 24 h. La réaction est arrêtée par addition de 50 ml d'eau et la perméthylglucosamine est extraite 5 fois par 20 ml de chloroforme. Les phases organiques sont réunies, lavées une fois par 50 ml d'eau, puis concentrées en un sirop. La perméthylglucosamine est purifiée par chromatographie sur colonne de Silicagel G (élution par le système solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 9 : 1).

Une aliquote (1 mg) est triméthylsilylée par la méthode de SWEeley et al. (384) puis analysée en chromatographie en phase gazeuse dans les conditions décrites précédemment.

c) Résultats

L'analyse chromatographique en phase gazeuse montre la présence d'un seul constituant (Fig.37 ; p.155).

2 - Préparation des dérivés partiellement méthylés de la glucosamine

a) Principe

Les dérivés partiellement méthylés de la glucosamine ont été préparés à partir d'oligosaccharides du lait de Femme (*): la 4,6-di-O-méthyl-glucosamine avec le fucosido-lacto-N-tétraose, la 4- et la 6-mono-O-méthyl glucosamine à partir, respectivement, du disialyl-lacto-N-tétraose et du lacto-N-fucopentaose II; la 3,6-di-O-méthyl-glucosamine à partir du chitotriose obtenu par acétolyse de la chitine (*). Enfin tous ces dérivés partiellement méthylés ont été préparés en mélange par méthylation d'une fraction isolée du lait de Femme; le S₉. La figure 36 (p.154) rassemble les structures de ces différents oligosaccharides.

b) Mode opératoire

Tous ces oligosaccharides ont été perméthylés par la méthode de KUHN et al. (385) à la diméthylformamide, iodure de méthyle, oxyde d'argent suivie par deux cycles de méthylation suivant la technique de HAKOMORI dans les conditions expérimentales décrites page 84. Les osamines O-méthylées ont été isolées par électrophorèse préparative à pH 3,9 (voir p.138) après une hydrolyse chlorhydrique (HCl 4N, 4 h, 100°C) des oligosaccharides perméthylés. Les dérivés méthylés ainsi obtenus ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (voir p.103) de leur produit de triméthylsilylation.

c) Résultats

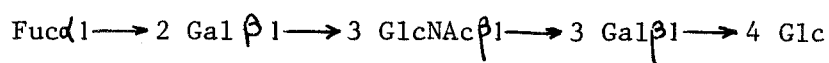
La figure 37 (p.155) rassemble les résultats des analyses chromatographiques des différents éthers méthyliques de la glucosamine isolés à partir d'oligosaccharides de structure connue. Nous constatons que tous sont homogènes en chromatographie en phase gazeuse, les 4,6-di-O-méthyl-, 6-mono- et 4-mono-O-méthyl-glucosamines étant résolues en leurs deux anomères.

d) Discussion

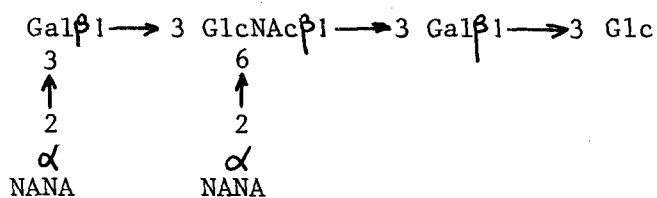
La méthylation d'oligosaccharides de structure connue nous a fourni rapidement, et dans un état de pureté satisfaisant, les éthers méthyliques de la glucosamine. Il est à noter, comme nous l'avons précisé plus haut (p.100), que la méthylation selon la méthode de HAKOMORI entraîne une N-méthylation sur l'azote de la glucosamine et qu'ainsi tous les éthers que nous avons préparés sont des dérivés-O-méthylés du 2-désoxy-2-méthylamino-D-glucose.

(*) Nous adressons nos remerciements à M. GRIMMONPREZ qui nous a fourni les échantillons d'oligosaccharides du lait de Femme et à M. BAYARD qui nous a fourni l'échantillon de chitotriose.

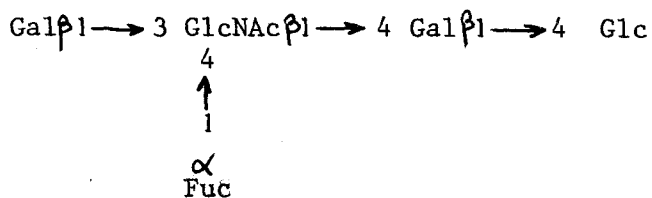
Fucosido-lacto-N-tétraose



Disialyl-lacto-N-tétraose



Lacto-N-fucopentaose II



Chitotriose

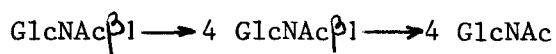


Figure 36

Structure des oligosaccharides du lait de Femme et du Chitotriose qui nous ont permis de préparer les dérivés partiellement méthylés de la glucosamine.



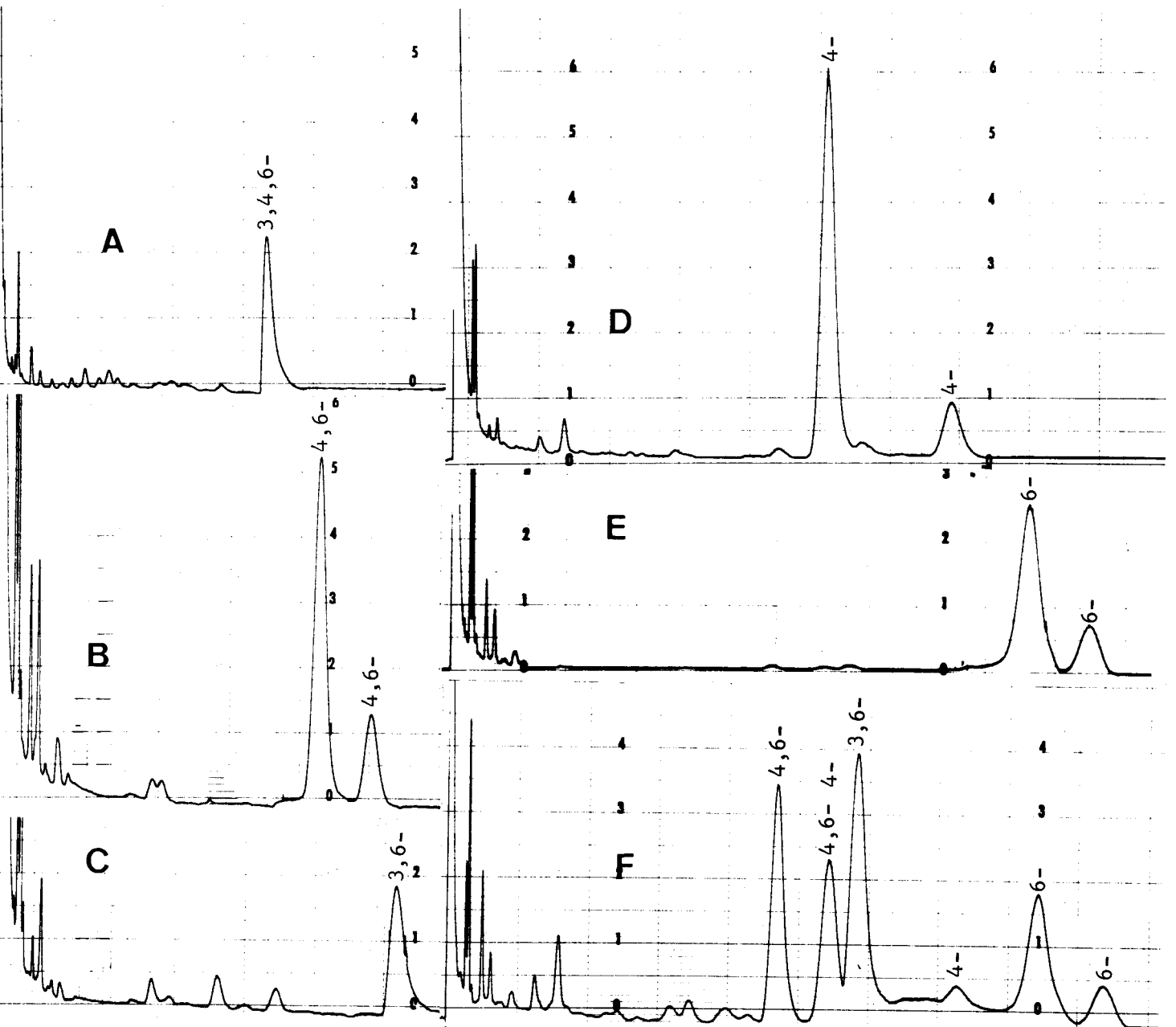


Figure 37

Chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés

(A) de la perméthyl-glucosamine, (B) de la 4,6- et (C) de la 3,6-di-O-méthyl-glucosamines, (D) de la 4- et (E) de la 6-mono-O-méthyl-glucosamines, (F) mélange des éthers méthyliques obtenus à partir de la fraction S₉ du lait de Femme. Colonne de verre (0,3x180 cm), remplie de Chromosorb W ("mesh" 100-120) contenant 3 p. 100 en poids de silicone OV 17 ; température de la colonne : 120°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 20 ml/min.



Nous n'avons pu préparer par cette technique la 3,4-di-et la 3-mono-O-méthyl-glucosamines. Nous comptons prochainement les préparer. La 3,4-di-O-méthyl-glucosamine sera préparée par la méthode de JEANLOZ (386) par méthylation du méthyl-O-trityl-6-acétamido-2-désoxy-2-glucopyranoside. Quant à la 3-mono-O-méthyl-glucosamine, elle sera préparée selon la méthode de NEUBERGER (387) par méthylation du dérivé benzylidéné de la glucosamine.

B - PREPARATION DES ETHERS METHYLIQUES DU D-MANNOSE

I - Principe

Parmi les monosaccharides présents dans la copule glucidique des glycoprotéines, le D-mannose occupe une place importante car, contrairement au D-galactose, il se trouve en position interne où il constitue des points de branchement. Il est donc indispensable de synthétiser, non seulement les éthers triméthyliques, mais également les éthers diméthyliques. Ces éthers méthyliques sont généralement préparés par synthèse organique. Ce genre de procédé est toujours d'application longue et délicate, principalement en ce qui concerne les dérivés méthylés du D-mannose. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers la chromatographie préparative en phase gazeuse des éthers méthyliques obtenus par un procédé de méthylation partielle du méthyl- α -D-mannoside inspiré de la technique de HANDA et MONTGOMERY (388). Nous décrivons donc une méthode simple et rapide qui permet d'identifier et d'isoler les dérivés tétra-, tri- et di-O-méthylés du méthyl- α -D-mannoside que l'on rencontre le plus couramment dans les méthanolysats de polysaccharides et des glycannes contenant du mannose. Ce travail a fait l'objet d'un mémoire au Journal of Chromatography (FOURNET et MONTREUIL) (389).

2 - Mode opératoire

a) Méthylation partielle du méthyl- α -D-mannoside

A une solution maintenue à 0°C de 8 g de méthyl- α -D-mannoside (K & K Laboratories), séchés sous vide en présence de P₂O₅ pendant 24 h dans 140 ml de diméthylformamide (MERCK), on ajoute, par petites fractions et sous agitation constante, 12 ml d'iodure de méthyle (PROLABO) et 29 g d'oxyde d'argent préparés extemporanément selon le procédé de WHISTLER et WOLFROM (390). On laisse ensuite le mélange se réchauffer progressivement à la température du laboratoire et on le maintient encore sous agitation constante pendant 8 h. Les produits insolubles sont éliminés par filtration et sont soigneusement lavés sur le filtre

avec du chloroforme. Le filtrat final (volume : 600 ml environ) est abandonné à + 4°C pendant une nuit et débarassé par une filtration des sels d'argent colloïdaux et des formyl-dérivés qui ont cristallisé. La solution obtenue est traitée cinq fois consécutives par 200 ml d'eau distillée en ampoule à décanter. On obtient ainsi une "phase aqueuse" qui est purifiée par passage successif sur des colonnes (4 x 40 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; H⁺), puis d'anions (Duolite A I02 D ; "mesh" 25-50 ; HCO₂⁻). La solution effluente, à laquelle on joint les eaux de lavage des colonnes (4 l), est évaporée sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'un sirop qui renferme les éthers méthyliques hydrosolubles. Après ce lavage à l'eau distillée, la fraction organique résiduelle est traitée par 100 ml d'une solution aqueuse à 1 p. 100 de thiosulfate de sodium, séchée par agitation en présence de sulfate de sodium anhydre et évaporée jusqu'à l'obtention d'un sirop qui représente la "phase organique" et contient les éthers méthyliques insolubles dans l'eau. La réassociation des deux phases constitue l'"extrait total".

b) Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside

- Chromatographie analytique

Les éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions expérimentales décrites page 130. Les temps de rétention ont été calculés par rapport au temps de passage du méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl- α -D-mannoside.

Les dérivés triméthylsilylés des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside, obtenus par le procédé de SWEeley et al. (391), ont été soumis à la chromatographie en phase gazeuse dans les conditions décrites p. 133 à la modification près de la température de la colonne qui a été programmée de 100 à 150°C (augmentation de 1°C par mm).

- Chromatographie préparative

Les éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside ont été isolés à partir de l'"extrait total" ou de la "phase organique" en adaptant les conditions précédentes à la chromatographie préparative : appareil Varian-Aerograph 705 ; colonnes de métal (0,92 x 600 cm) remplies de Chromosorb W HMDS ("mesh" 100-120) à 3 p. 100 de Carbowax 6000 ; température de la colonne : 195°C ; de

l'injecteur : 210°C ; du détecteur : 200°C ; du collecteur : 135°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 220 ml/mm ; décomposition de l'effluent vers le détecteur : 20 ml/mm, vers le collecteur : 200 ml/mm ; sensibilité : 1/32 ; volume injecté à chaque opération, manuellement ou automatiquement : 200 μ l d'une solution méthanolique à 7 p. 100 (p : v) de l'"extrait total" ou de la"phase organique". Les fractions sont recueillies dans des tubes refroidis dans la glace.

Dans ces conditions expérimentales, les 2,3,4- et 3,4,6-tri-O-méthyl-dérivés possèdent le même comportement chromatographique et il est nécessaire de soumettre le mélange préalablement triméthylsilylé selon le procédé classique de SWEeley et al. (392) à une seconde chromatographie préparative en phase gazeuse. Celle-ci est réalisée dans les conditions décrites ci-dessus aux modifications près suivantes : température de la colonne : 175°C ; de l'injecteur : 180°C ; du détecteur : 185°C ; du collecteur : 90°C ; volume injecté : 200 μ l d'une solution à 4,5 p. 100 (p : v) de triméthylsilyl-dérivés dans l'heptane.

c) Dé-triméthylsilylation des méthyl-2-TMS-3,4,6- et 6-TMS-2,3,4-tri-O-méthyl- α -D-mannosides

Le radical triméthylsilyl peut être éliminé par le méthanol aqueux à reflux (HEDGLEY et OVEREND) (393). 10 mg de dérivé triméthylsilylé sont dissous dans 10 ml d'un mélange à parties égales de méthanol et d'eau et portés à reflux. Des aliquotes de 200 μ l sont prélevées aux temps suivants : 15 mn, 30 mn, 60 mn, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h et 8 h. Ces solutions sont évaporées, reprises par 20 μ l de méthanol et 2 μ l sont analysés en chromatographie en phase gazeuse (colonne de verre : 0,3 x 300 cm, de Chromosorb W AW HMDS à 3 p. 100 de Carbowax 6000 ; température de la colonne : 150°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mm).

d) Identification des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside

La plupart des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside isolés par chromatographie préparative en phase gazeuse ont pu être identifiés en comparant leur comportement en chromatographie analytique en phase gazeuse avec celui d'éthers qui avaient pu être préparés par synthèse ou à partir d'oligosaccharides. En outre, la position des groupements méthoxylés a été confirmée ou déterminée dans le cas de trois éthers diméthyliques dont nous ne possédions pas les composés de référence : par oxydation périodique, par des

réactions spécifiques appliquées aux éthers méthyliques du mannose après une chromatographie sur papier, par spectrographie de masse des éthers méthyliques préalablement réduits par le borodéutérure de sodium et peracétylés et par mesure de leur pouvoir rotatoire.

- Préparation d'éthers méthyliques témoins du méthyl- α -D-mannoside

Le méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl- α -D-mannoside a été obtenu par trois cycles de méthylation du méthyl- α -D-mannoside suivant HAKOMORI. Les dérivés 2,3,4-, 2,3,6- et 3,4,6-tri-O-méthylés ainsi que les dérivés 2,3- et 4,6-di-O-méthylés étaient des produits de synthèse préparés par TAKERKART (394). Une solution témoin renfermant le 2,3,4,6-tetra-O-méthyl-, les 2,4,6 et 3,4,6-tri-O-méthyl- ainsi que le 3,4-di-O-méthyl- dérivé du méthyl- α -D-mannoside a été obtenue par méthanololyse d'un perméthyl-mannane de Levure (*) (KOCOUREK et BALLOU) (395) perméthylé par 3 cycles de méthylation selon le procédé de HAKOMORI dans les conditions expérimentales décrites plus haut (voir p.84).

- Oxydation periodique

Les éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside ont été oxydés par l'acide periodique suivant le mode opératoire de GLICK, CHEN et ZILLIKEN (396) : 0,7 ml de solution aqueuse de dérivé (1 μ M de composé par ml de solution oxydante) est additionné de 0,3 ml de periodate de sodium 0,086 M et de 1,5 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M de pH 5,0. Le mélange est maintenu à 4°C et à l'obscurité. La consommation d'acide periodique est déterminée en suivant régulièrement l'absorbance de la solution mesurée à 310 μ m. Au bout de 48 h l'absorbance est en général stabilisée.

- Chromatographie sur papier des éthers méthyliques du

D-mannose

Les éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside sont d'abord soumis à une hydrolyse chlorhydrique (100 μ l d'acide chlorhydrique 1,5 N par mg de composé ; 1,5 h à 100°C). Les hydrolysats sont ensuite purifiés par un passage sur une colonne d'échangeur d'anions (Duolite A 102 D ; "mesh" 25-50 ; HCO₂⁻). La fraction effluente à laquelle on joint les eaux de lavage des

(*) Nous adressons nos vifs remerciements au Professeur M. MASLER de BRATISLAVA qui nous a fourni un échantillon de mannane de Levure.

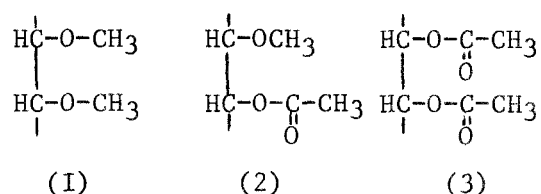
colonnes est évaporée à siccité sous pression réduite. Elle est enfin analysée par chromatographie sur papier Whatman n° I dans le système solvant : n-butanol/éthanol/eau (5 : 1 : 4 ; v:v) de HIRST et JONES (397) (durée de la chromatographie : 26 h). La révélation des éthers méthyliques est effectuée à l'aide des réactifs suivants : 1°) réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (398) ; 2°) réactif à la diméthylaniline de HOUGH, JONES et WADMAN (399) spécifique des monosaccharides dont l'hydroxyle en C-4 est libre ; 3°) réactif au chlorure de triphényltétrazolium de WALLENFELS (400) spécifique des monosaccharides dont l'hydroxyle en C-2 est libre.

- Spectrographie de masse

Les éthers di-O-méthylés du méthyl- α -D-mannoside ont été analysés en spectrographie de masse sous la forme de leurs dérivés réduits et peracétylés. Un point important est à relever ici : après réduction des sucres, la reconnaissance de la séquence des atomes de carbone n'est plus possible. La réduction par le borodeutériure de sodium marquant le carbone C-1 a permis d'éliminer cette difficulté. En effet il y aura un atome de deutérium sur le carbone C-1 de chaque sucre, ce qui permet de le distinguer du carbone terminal C-6. Les fragments contenant C-1 présentent une masse $m+1$ par rapport à la masse m du fragment non deutéré.

L'application de la spectrométrie de masse aux molécules organiques implique leur bombardement par un faisceau d'électrons ou par un champ électrique intense, sous vide poussé, et l'analyse des particules et fragments chargés ainsi formés. Les ions positifs produits par le bombardement électronique ou électrique de la molécule étudiée sont accélérés par des plateaux chargés négativement et sont envoyés dans un tube d'analyse recourbé où ils sont triés par l'aimant selon le rapport de leur charge à leur masse (m/e).

En 1966, GOLOVKINA, CHIZHOV et WULFSON (401) publient une étude sur les acétates d'alditols. Ces auteurs ont pu distinguer deux types de fragments formés lors de l'analyse en spectrométrie de masse ; d'une part, les fragments primaires dus à la coupure entre deux atomes de carbone et d'autre part, les fragments secondaires formés à partir des précédents par élimination d'acide acétique, de cétène, de méthanol ou de radicaux formyl-. Dans le cas des acétates d'alditol partiellement méthylés on peut prévoir trois coupures primaires possibles :



BJORNDAL, LINDBERG et SVENSSON (402) ont montré que la coupure se produit entre les carbones des structures (I) et (2) de préférence à ceux de la structure (3). La charge positive est en effet stabilisée par le groupement "méthoxy". On rencontre peu de fragments contenant des groupements "méthoxy" voisins ; ceci indique que la structure (I) est scindée de préférence à la structure (2). Les fragments secondaires dérivent des fragments primaires par élimination d'acide acétique (60), de cétène (42), de méthanol (32) ou de formaldéhyde (30). Dans le tableau XVIII (p.162) nous reportons les principaux fragments primaires, obtenus à partir d'alditols méthylés et acétylés et les fragments secondaires qui en dérivent.

Synthèse des alditols acétates.

5 mg de dérivés diméthylés du méthyl- α -D-mannoside sont hydrolysés par 500 μ l d'acide chlorhydrique 1,5 N, à 100°C pendant 1,5 h. L'hydrolysate est ensuite neutralisé par un passage sur une colonne d'échangeur d'anions (Duolite A 102 D ; "mesh" 25-50; HCO $\bar{2}$). La fraction effluente à laquelle on joint les eaux de lavage des colonnes est évaporée à siccité sous pression réduite. Le résidu est repris par 5 ml d'eau lourde et la solution est de nouveau évaporée à siccité. Les éthers diméthyliques sont repris par 5 ml d'eau lourde et réduits en alditols par 50 mg de borodutérure de sodium, pendant 3 h à température ordinaire. Après traitement par le Dowex 50x8 ("mesh" 25-50, H $^+$) jusqu'à pH 4 et concentration, on élimine l'acide borique sous forme de borate de méthyle, par codistillation avec l'alcool méthylique (3 fois). Les éthers diméthyliques du D-mannitol sont alors acétylés par 1 ml du mélange pyridine-anhydride acétique 1 : 1, (v:v) à température ordinaire pendant une nuit. La figure 38 (p.163) donne un schéma des différentes opérations conduisant aux acétates méthylés du mannitol. Les éthers diméthyliques du D-mannitol acétylé sont dissous dans le chloroforme et injectés dans une colonne d'ECNSS-M à 3 p. 100, montée sur un chromatographe en phase gazeuse (température programmée de 170°C à 200°C, à raison de 2°C par mm) lui-même couplé à un spectrographe de masse (*).

(*) Nous adressons nos vifs remerciements au Docteur H. MAYER, de FRIBOURG, qui a effectué les analyses en spectrographie de masse.

TABLEAU XVIII

Fragments primaires et secondaires obtenus à partir d'alditols méthylés acétylés

Fragments primaires	m/e	Fragments secondaires
$\text{CH}_2=\overset{+}{\text{O}}-\text{CH}_3$	45	
$\begin{array}{c} \text{CHDO}-\text{COCH}_3 \\ \\ \text{HC}=\overset{+}{\text{O}}-\text{CH}_3 \end{array}$	118	
$\begin{array}{c} \text{HC}=\overset{+}{\text{O}}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3 \end{array}$	161	$\begin{array}{l} \xrightarrow{-\text{CH}_3\text{OH}} 129 \xrightarrow{-\text{Cétène}} 87 \\ \xrightarrow{-\text{AcOH}} 101 \xrightarrow{-\text{HCHO}} 71 \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{CHDO}-\text{COCH}_3 \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{HC}=\overset{+}{\text{O}}-\text{CH}_3 \end{array}$	162	$\xrightarrow{-\text{AcOH}} 102$
$\begin{array}{c} \text{HC}=\overset{+}{\text{O}}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{COCH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{O}-\text{COCH}_3 \end{array}$	189	$\xrightarrow{-\text{AcOH}} 129 \xrightarrow{-\text{Cétène}} 87$
$\begin{array}{c} \text{CHDO}-\text{COCH}_3 \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{COCH}_3 \\ \\ \text{HC}=\overset{+}{\text{O}}-\text{CH}_3 \end{array}$	190	$\xrightarrow{-\text{AcOH}} 130 \xrightarrow{-\text{Cétène}} 88$
$\begin{array}{c} \text{HC}=\overset{+}{\text{O}}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{COCH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{O}-\text{COCH}_3 \end{array}$	233	$\xrightarrow{-2 \text{AcOH}} 113$
$\begin{array}{c} \text{CHDO}-\text{COCH}_3 \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{COCH}_3 \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{HC}=\overset{+}{\text{O}}-\text{CH}_3 \end{array}$	234	
$\begin{array}{c} \text{HC}=\overset{+}{\text{O}}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{COCH}_3 \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{COCH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{O}-\text{COCH}_3 \end{array}$	H/261	$\xrightarrow{-\text{AcOH}} 201$
	D/262	$\xrightarrow{-\text{AcOH}} 202$



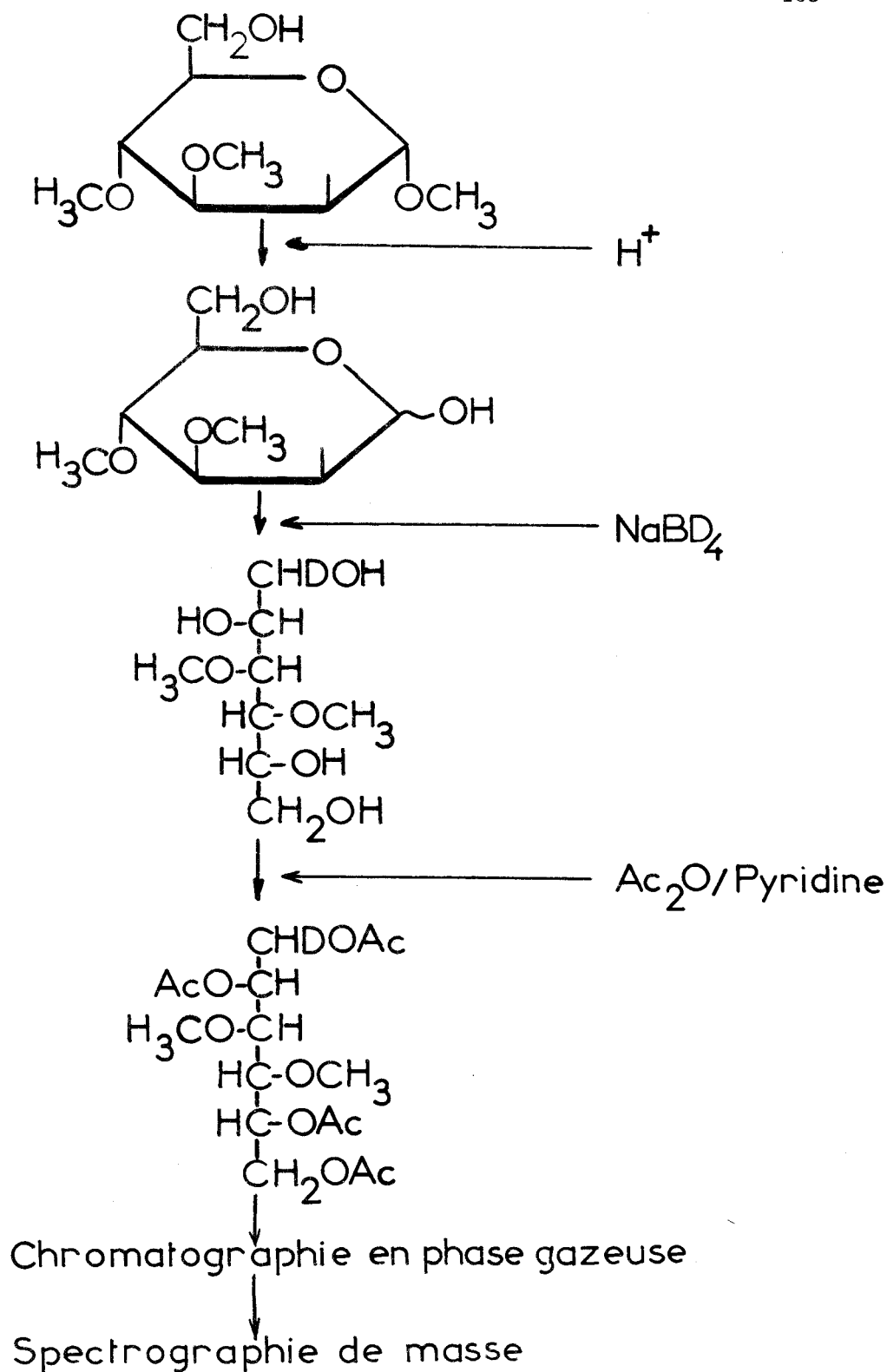


Figure 38

Schéma de synthèse des acétates méthylés du D-mannitol obtenus par hydrolyse, réduction par le borodeutérure de sodium et peracétylation des dérivés diméthylés du méthyl-α-D-mannoside.



- Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires des monosaccharides méthylés présentent en général des valeurs caractéristiques. Les pouvoirs rotatoires des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside ont été mesurés sur un micropolarimètre ZEISS dans des cuves de 2 cm de long en solution dans le méthanol.

e) Dosage des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside par chromatographie en phase gazeuse

Les réponses molaires des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannosides ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de Chromosorb W AW HMDS à 3 p. 100 de Carbowax 6000 par mesure de la surface des pics par rapport au méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl- α -D-mannoside pris comme standart interne.

3 - Résultats

a) Chromatographie analytique

Les résultats de la chromatographie analytique des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside ont été rassemblés dans la figure 27 (p.134) et le tableau XVI (p.135). Nous avons constaté que tous les éthers méthyliques étaient résolus à l'exception des 2,3,4 et 3,4,6-tri-O-méthyl-dérivés qui peuvent toutefois être identifiés (Fig. 28 ; p.136 et le tableau XVII ; p.137) sous la forme de leur dérivé triméthylsilylé. L'application de notre procédé à l'analyse de la "phase aqueuse" et de la "phase organique", obtenues après le traitement par l'eau de la solution chloroformique des dérivés méthylés du méthyl- α -D-mannoside, révèle que ce procédé réalise un fractionnement sélectif tout à fait relatif. En effet, la figure 39 (p.165) montre que, si le dérivé tétra-O-méthylé se trouve en totalité dans la "phase chloroformique" et les éthers di-O-méthylés dans la "phase aqueuse", les dérivés triméthylés se répartissent, au contraire, dans les deux phases.

b) Chromatographie préparative

La chromatographie analytique en phase gazeuse des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside, telle que nous l'avons décrite dans le paragraphe précédent a été adaptée à la chromatographie préparative. Les résultats que nous avons obtenus peuvent se résumer de la manière suivante :

- La chromatographie préparative de l'"extrait total" (rendement 9,5 g à partir de 8 g de méthyl- α -D-mannoside) fournit, pour chaque injection de 14 mg d'"extrait total", les quantités suivantes d'éthers méthyliques purs (Fig. 40 ; p.166) qui correspondent à un rendement final de 96 p. 100 :

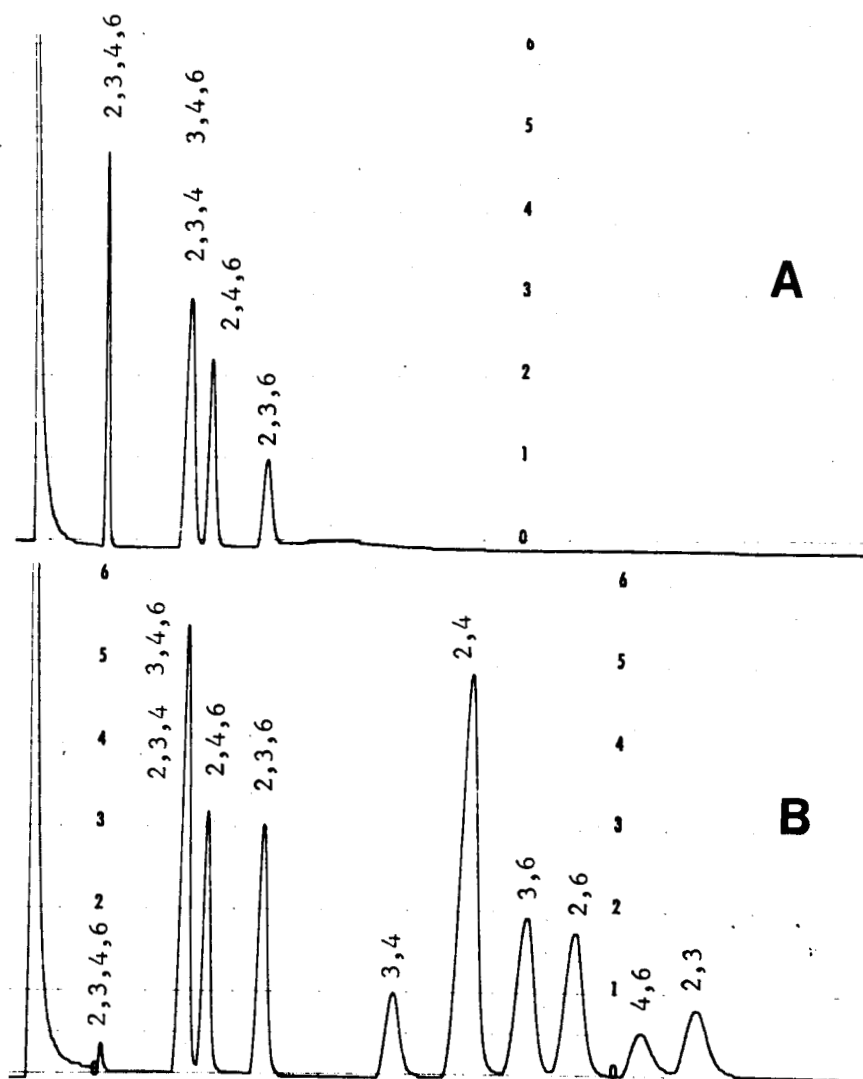


Figure 39

Chromatographie analytique en phase gazeuse des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside présents dans la "phase chloroformique" (A) et dans la "phase aqueuse" (B). Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) contenant 3 p. 100 de Carbowax; température de la colonne : 170°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mn .



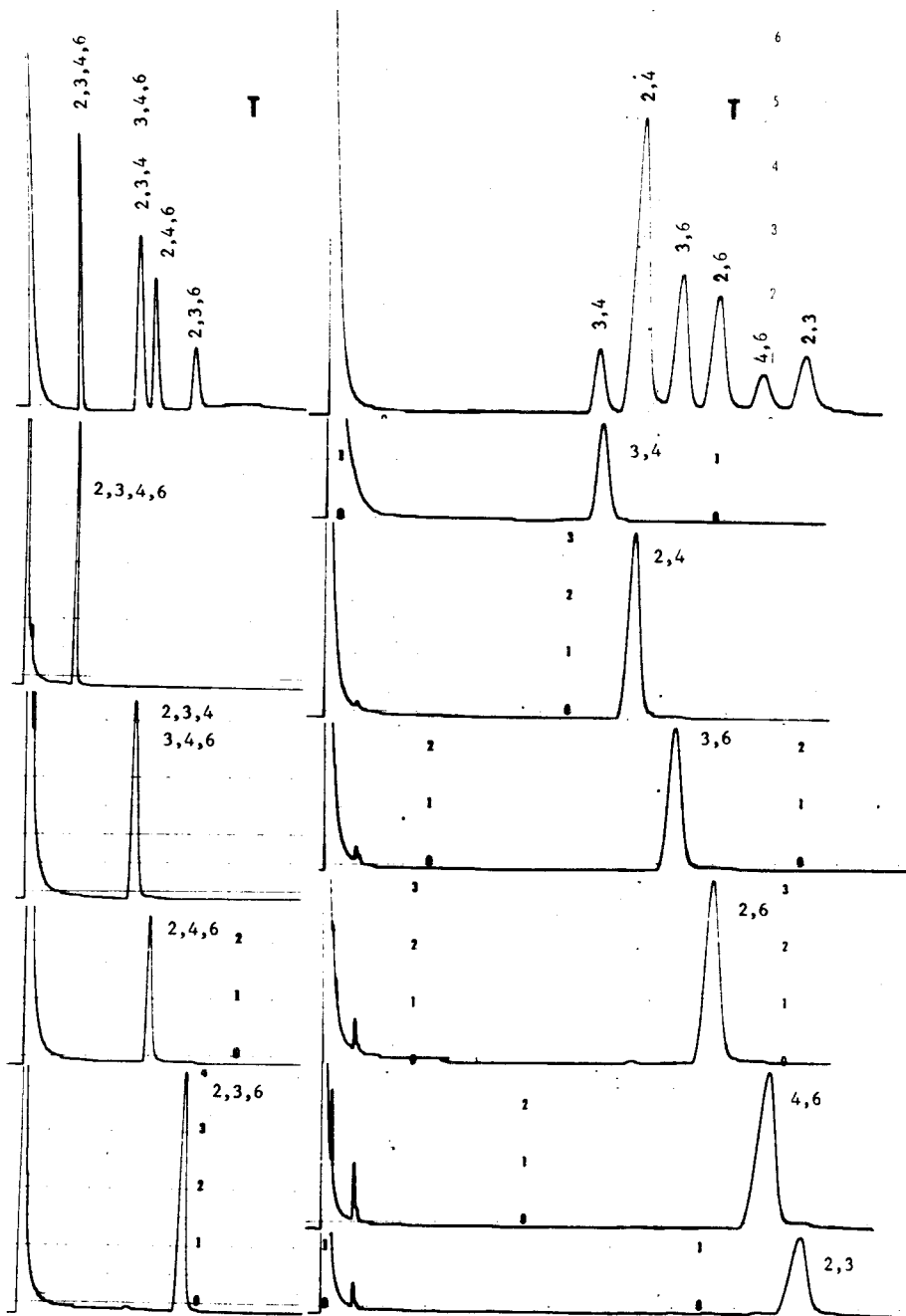


Figure 40

Chromatographie en phase gazeuse des éthers tétra-, tri- et di-O-méthylés du méthyl- α -D-mannoside isolés par chromatographie préparative en phase gazeuse. Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh"60-80) contenant 3 p. 100 de Carbowax 6000 ; température de la colonne : 170°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mn ; T : mélange témoin.



2,3,4,6-	: 1,2 mg
2,3,4- + 3,4,6-	: 1,9 mg
2,3,6-	: 0,65 mg
2,4,6-	: 1 mg
2,3-	: 0,96 mg
2,4-	: 3,2 mg
2,6-	: 1,48 mg
3,4-	: 0,87 mg
3,6-	: 1,65 mg
4,6-	: 0,57 mg

- La chromatographie préparative (Fig.41 A ; p.168) de 9 mg du mélange des méthyl-2-TMS-3,4,6-tri-O-méthyl- et 6-TMS-2,3,4-tri-O-méthyl- α -D-mannosides fournit 2,73 mg du premier et 4,48 mg du second composé.

- L'isolement du tétra-O-méthyl et des quatre tri-O-méthyl-dérivés peut encore être réalisé à partir de la "phase organique" (3 g pour 9,5 g d'"extrait total") préalablement triméthylsilylée. En effet, comme le montrent la figure 28(p.136) et le tableau XVII(p.137), la chromatographie en phase gazeuse sur Chromosorb W AW HMDS à 3 p. 100 de Carbowax fournit d'excellentes résolutions des cinq composés précédents. Les quantités obtenues pour chaque injection de 9 mg de "phase organique" triméthylsilylée sont les suivantes :

2,3,4,6-tétra-O-méthyl-	: 1,09 mg
2-TMS-3,4,6-tri-O-méthyl-	: 1,25 mg
3-TMS-2,4,6-tri-O-méthyl-	: 1,81 mg
4-TMS-2,3,6-tri-O-méthyl-	: 1,07 mg
6-TMS-2,3,4-tri-O-méthyl-	: 2,1 mg

c) Dé-triméthylsilylation des méthyl-TMS-tri-O-méthyl- α -

D-mannosides

La cinétique de dé-triméthylsilylation des dérivés triméthylsilylés des méthyl-3,4,6- et 2,3,4-tri-O-méthyl- α -D-mannosides (Fig. 42 ; p.169) nous a permis de fixer à 8 h le temps d'élimination quantitative du radical triméthylsilyle. Dans ces conditions la dé-triméthylsilylation de 2,73 mg du méthyl-2-TMS-3,4,6-tri-O-méthyl- et de 4,48 mg du méthyl-6-TMS-2,3,4-tri-O-méthyl- α -D-mannosides conduit finalement à l'isolement (Fig.41B ; p.168) de 2,3 mg de méthyl-3,4,6-tri-O-méthyl- et de 3,77 mg de méthyl-2,3,4-tri-O-méthyl- α -D-mannosides.

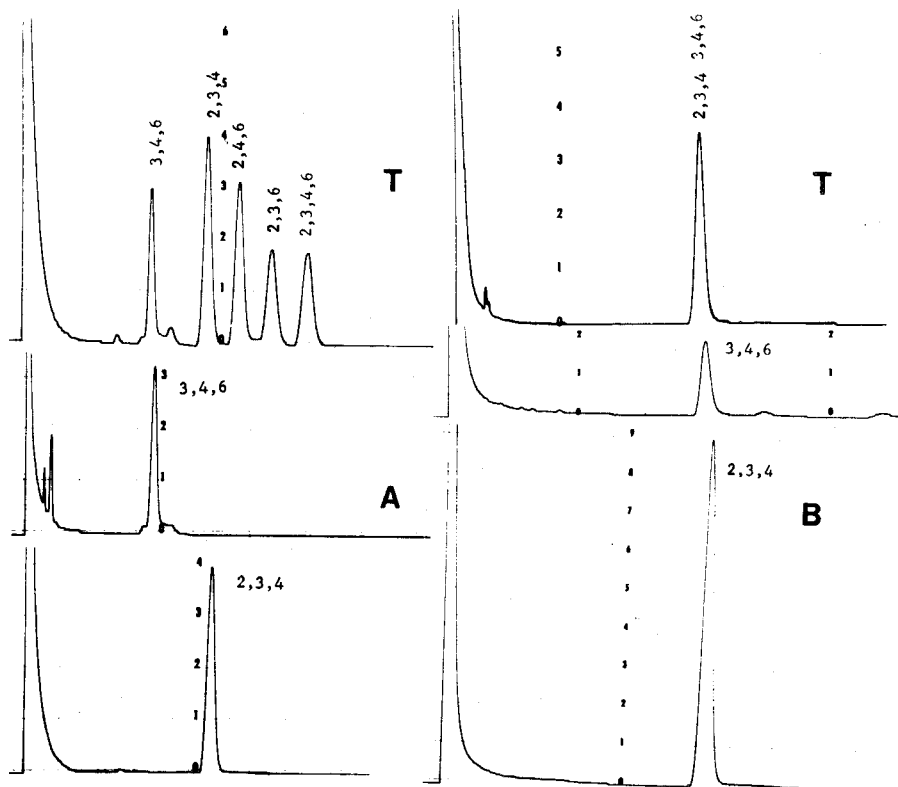


Figure 41



Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-2-TMS-3,4,6-tri-O-méthyl et 6-TMS-2,3,4-tri-O-méthyl- α -D-mannosides (A) et des méthyl-3,4,6- et 2,3,4-tri-O-méthyl- α -D-mannosides (B) obtenus par traitement des TMS précédents par le méthanol aqueux à l'ébullition. Colonne de verre (0,3x 300cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) contenant 3 p. 100 de Carbowax 6000; température de la colonne : 150°C; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mn; T : mélange témoin.

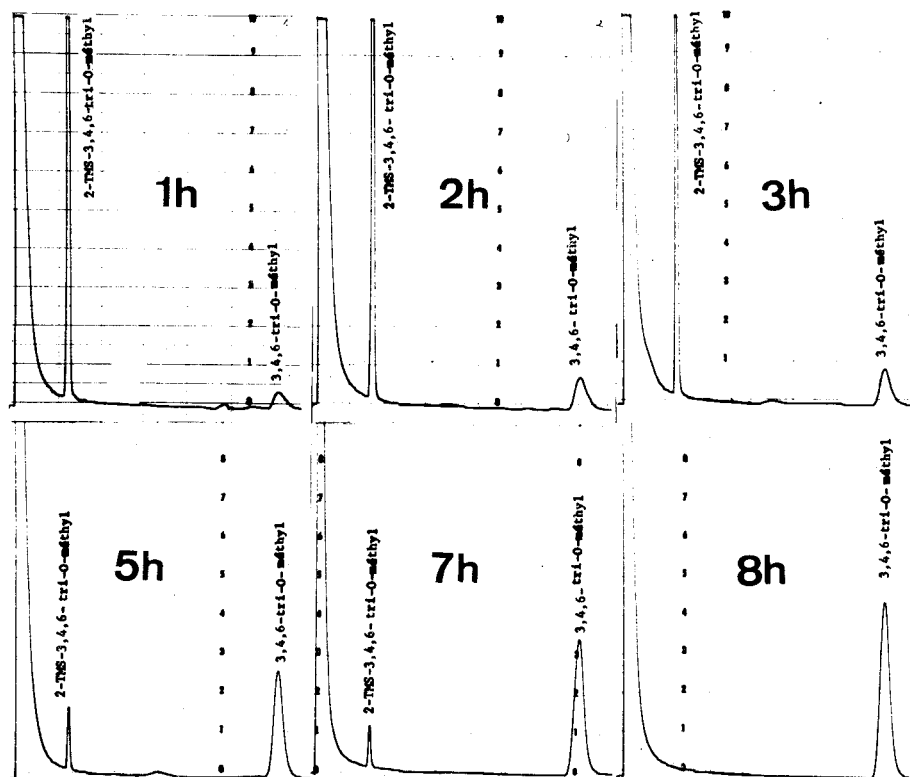


Figure 42



Chromatographies en phase gazeuse de la cinétique de dé-triméthylsilylation du méthyl-2-TMS-3,4,6-tri-O-méthyl- α -D-mannoside. Colonne de verre (0,3x300cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) contenant 3 p. 100 de Carbowax 6000; température de la colonne : 150°C; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mn .

Les rendements obtenus par dé-triméthylsilylation des TMS dérivés des méthyl-3,4,6-, 2,4,6-, 2,3,6- et 2,3,4-tri-O-méthyl- α -D-mannosides sont les suivants :

3,4,6-tri-O-méthyl-	: 1,05 mg
2,4,6-tri-O-méthyl-	: 1,52 mg
2,3,6-tri-O-méthyl-	: 0,9 mg
2,3,4-tri-O-méthyl-	: 1,7 mg

d) Identification des éthers méthyliques du méthyl- α -

D-mannoside

- Les éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside suivants ont été identifiés en comparant leur comportement chromatographique avec celui des composés de référence obtenus par synthèse organique ou préparés à partir de polysaccharides : 2,3,4,6-, 2,3,4-, 2,4,6-, 2,3,6-, 3,4,6-, 2,3-, 3,4- et 4,6-.

- L'oxydation periodique des 6 isomères di-O-méthylés du méthyl- α -D-mannoside nous a permis d'identifier les éthers diméthyliques 2,4-, 2,6- et 3,6- dont nous ne possédions pas les produits de référence : la consommation d'acide periodique par ces trois dérivés isolés par chromatographie préparative en phase gazeuse a été respectivement de 0,1 et 0 mole (Fig.43 ; p.171).

- Les révélations spécifiques réalisées après chromatographie sur papier Whatman n°1 (Fig.44 ; p.172) permet de discriminer les 2,4- et 3,6-di-O-méthyl-dérivés ; en effet, les révélations par le chlorure de triphényl-tétrazolium et par la N-diméthylaniline sont négatives pour le premier et positives pour le second.

- Ces résultats sont confirmés par l'analyse des spectres de masse des dérivés acétylés des diméthyl-mannitols (Fig.45 ; p.173 et tableau XIX ; p.174). En effet le composant du pic 2 de la chromatographie en phase gazeuse sur Carbowax 6000 avec les fragments m/e 118, 189 et 234 dérive d'un 2,4-di-O-méthyl-hexitol et le composant du pic 3 de la chromatographie en phase gazeuse sur Carbowax 6000 avec les fragments m/e 45, 190 et 233 dérive d'un 3,6-di-O-méthyl-hexitol.

Enfin dans le tableau XX (p.175) nous avons rassemblé les valeurs des pouvoirs rotatoires des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside. Ceux-ci concordent avec ceux trouvés par d'autres auteurs.

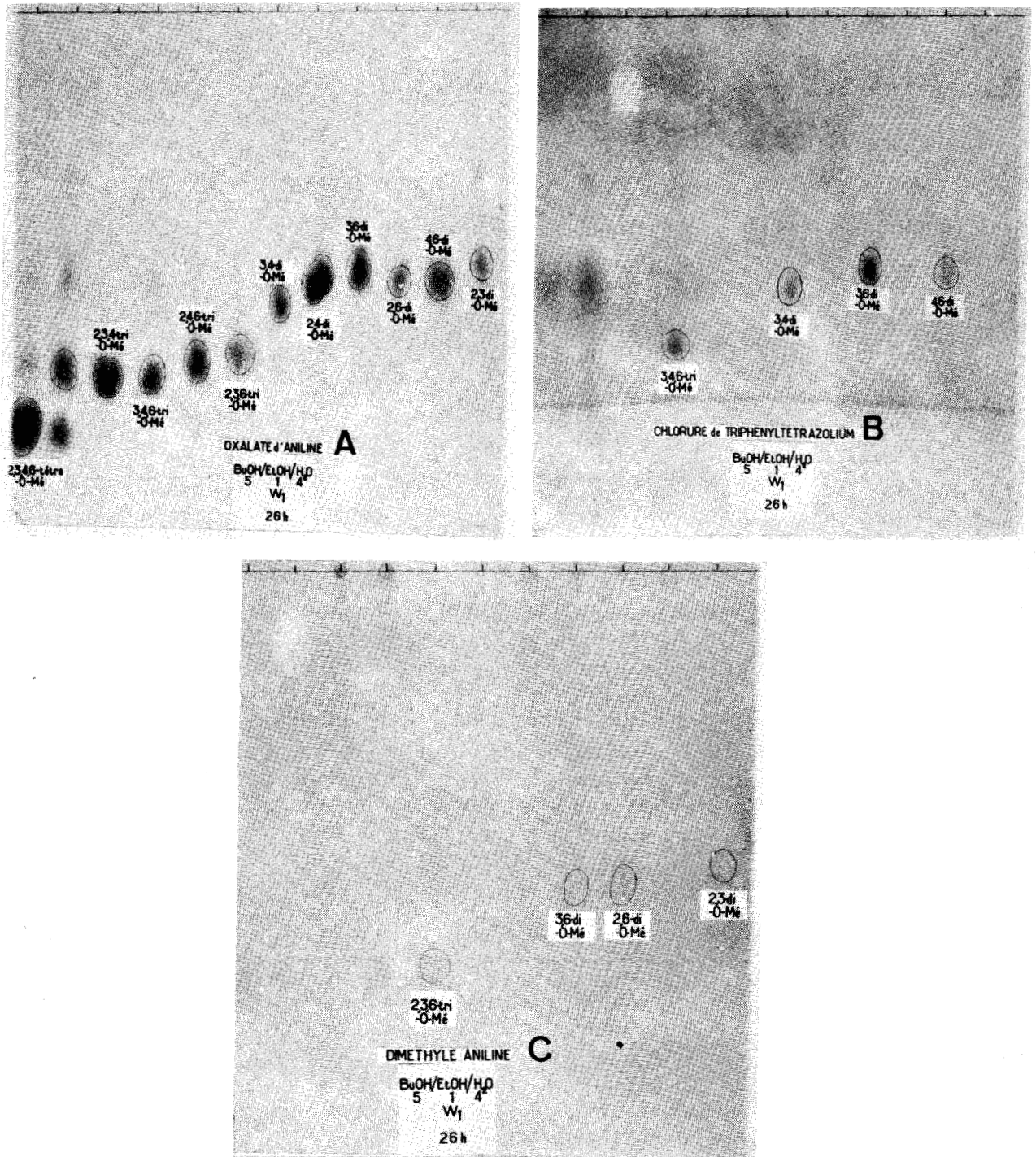


Figure 44



Chromatographie sur papier des éthers méthyliques du D-mannose. Papier Whatman n° 1; système solvant : n-butanol/éthanol/eau (5 : 1 :4); durée de la chromatographie : 26 h; révélations par le réactif à l'oxalate d'aniline (A), par le réactif au chlorure de triphényltétrazolium (B) et par le réactif à la diméthylaniline (C).

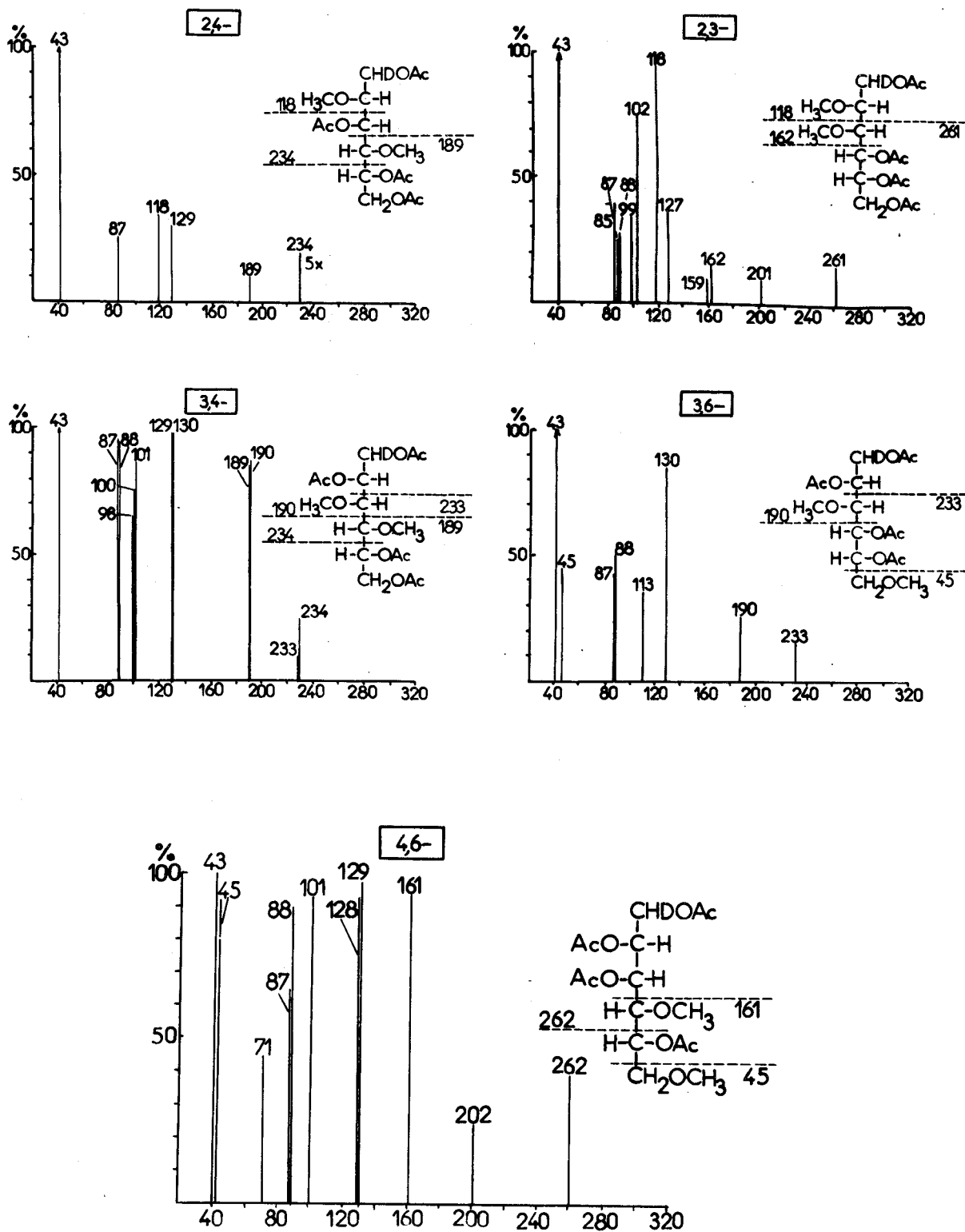


Figure 45

Spectres de masse des dérivés acétylés des di-O-méthyl-mannitols.



Fragments primaires des spectres de masse des dérivés acétylés des di-O-méthyl-mannitols.

dérivés des sucres	118(*)	162	189	190	234	262
3,4-di-O-méthyl-			+	+	+	
2,4-di-O-méthyl-	+		+		+	
3,6-di-O-méthyl-				+	+	
4,6-di-O-méthyl-	+					+
2,3-di-O-méthyl-	+	+			+	

(*) Les masses de la rangée supérieure représentent les fragments comportant le carbone réducteur C-1 du dérivé méthylé augmenté d'une unité (deutérium).



TABLEAU XX

Pouvoirs rotatoires des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside obtenus par chromatographie en phase gazeuse préparative

Dérivés méthylés du méthyl- α - <u>D</u> -mannoside	$\left[\alpha \right]_D^{20}$	
	Valeurs personnelles Solvant : CH ₃ OH	Valeurs de la littérature
2,3,4,6-tétra- <u>O</u> -méthyl-	+ 68,2°	+ 70,5° (CH ₃ OH), IRVINE et MOODIE (403)
2,3,4-tri- <u>O</u> -méthyl-	+ 39,1°	+ 47° (H ₂ O), SMITH <u>et al.</u> (404)
3,4,6-tri- <u>O</u> -méthyl-	+ 26,8°	
2,4,6-tri- <u>O</u> -méthyl-	+ 70,3°	
2,3,6-tri- <u>O</u> -méthyl-	+ 50,8°	
3,4-di- <u>O</u> -méthyl-	+ 62,2°	+ 67° (H ₂ O), HAWORTH <u>et al.</u> (405)
2,4-di- <u>O</u> -méthyl-	+ 69,5°	+ 47,6° (C ₂ H ₅ OH), NORRMAN (406)
3,6-di- <u>O</u> -méthyl-	+ 52,1°	
2,6-di- <u>O</u> -méthyl-	+ 50,5°	+ 50,3° (CH ₃ OH), HANDA et MONTGOMERY (407)
4,6-di- <u>O</u> -méthyl-	+ 45°	+ 80,5° (H ₂ O), AULT <u>et al.</u> (408)
2,3-di- <u>O</u> -méthyl-	+ 38,3°	+ 43,5 (CHCl ₃), ROBERTSON (409)



e) Dosage des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside par chromatographie en phase gazeuse

Les valeurs des réponses molaires des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside sont rassemblées dans le tableau XXI (p.177). Ces réponses molaires vont nous permettre de doser les éthers méthyliques du mannose présents dans les glycopeptides ou les oligosaccharides perméthylés par chromatographie en phase gazeuse de leur méthanolysat.

4 - Discussion

La chromatographie en phase gazeuse analytique sur colonne de Chromosorb W AW HMDS contenant 3 p. 100 de Carbowax 6000 permet d'identifier en une seule étape les éthers tétra-, tri- et di-O-méthylés du méthyl- α -D-mannoside à l'exception des 2,3,4- et 3,4,6-tri-O-méthyl-éthers qui peuvent toutefois être séparés, dans un second temps, à l'aide de la même colonne sous la forme de leurs dérivés triméthylsilylés. Les éthers méthyliques ainsi analysés ont pu être préparés rapidement, et avec de bons rendements, en adaptant les conditions de la chromatographie analytique à la chromatographie préparative.

Dans les conditions de méthylation partielle du méthyl- α -D-mannoside que nous avons décrites plus haut, nous n'avons pas pu préparer les dérivés monométhylés. Dernièrement nous avons déterminé les conditions de temps et de réactifs (iodure de méthyle et oxyde d'argent) qui permettent la synthèse préférentielle des quatre isomères mono-O-méthylés. Ceux-ci seront isolés par chromatographie en phase gazeuse préparative selon un mode opératoire voisin de celui qui nous a permis d'isoler les isomères tétra-, tri- et di-O-méthylés du méthyl- α -D-mannoside.

C - PREPARATION DES ETHERS METHYLIQUES DU D-GALACTOSE

I - Principe

Les glycanes des glycoprotéines possèdent généralement du galactose. Ce monosaccharide occupe une position plus externe dans la molécule. En effet, il constitue parfois le monosaccharide terminal non réducteur d'une chaîne glycanique ou l'avant dernier sucre et dans ce cas il est substitué par une mole d'acide N-acétyl neuraminique ou de fucose. Les premiers éthers qu'il fallait donc synthétiser étaient le perméthyl-galactose et les quatre isomères triméthylés. Comme dans le cas du D-mannose, nous nous sommes tournés vers la chromatographie en phase gazeuse préparative des éthers méthyliques obtenus par méthylation partielle du méthyl- α -D-galactoside. Nous commençons actuellement cette étude sur les éthers méthyliques de ce monosaccharide aussi,

TABLEAU XXI

Réponses molaires des éthers méthyliques du méthyl- α -D-mannoside déterminées par rapport au méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl- α -D-mannoside.

2,3,4,6-tétra- <u>O</u> -	1
2,3,4-tri- <u>O</u> -	0,75
3,4,6-tri- <u>O</u> -	0,39
2,4,6-tri- <u>O</u> -	0,499
2,3,6-tri- <u>O</u> -	0,90
3,4-di- <u>O</u> -	0,529
2,4-di- <u>O</u> -	0,799
3,6-di- <u>O</u> -	0,566
2,6-di- <u>O</u> -	0,541
4,6-di- <u>O</u> -	0,490
2,3-di- <u>O</u> -	0,272



nous rassemblerons dans ce paragraphe quelques résultats fragmentaires.

2 - Mode opératoire

a) Cinétique de méthylation du méthyl- α -D-galactoside

Afin de déterminer les meilleures conditions d'obtention des dérivés triméthylés, diméthylés ou monométhylés du méthyl- α -D-galactoside, nous avons effectué une cinétique de temps de méthylation.

A une solution maintenue à 0°C de 1 g de méthyl- α -D-galactoside (Koch-Light Laboratories) dans 18 ml de diméthylformamide on ajoute, par petites fractions et sous agitation constante, 1 ml d'iodure de méthyle (PROLABO) et 2 g d'oxyde d'argent. On laisse ensuite le mélange se réchauffer progressivement à la température du laboratoire et on prélève dans la première heure de la réaction, toutes les quinze minutes, ensuite toutes les heures, une aliquote qui est centrifugée et immédiatement analysée en chromatographie en phase gazeuse.

b) Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques du méthyl- α -D-galactoside

Les éthers méthyliques du méthyl- α -D-galactoside ont été analysés et préparés par chromatographie en phase gazeuse dans des conditions identiques à celles décrites pour les dérivés méthylés du méthyl- α -D-mannoside.

c) Identification des éthers méthyliques du méthyl- α -D-galactoside

Les éthers méthyliques isolés par chromatographie préparative en phase gazeuse ont été identifiés en comparant leur comportement en chromatographie analytique en phase gazeuse avec celui d'éthers qui avaient pu être préparés par synthèse (TAKERKART) (410) : 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-, 2,3,4-, 2,3,6-, 3,4,6-tri-O-méthyl-, 2,3-, 2,6- et 4,6-di-O-méthyl-dérivés ou à partir d'oligosaccharides du lait de Femme de structure connue (GRIMMONPREZ) (411) : 2,4,6-tri-O-méthyl- et 2,4-di-O-méthyl-dérivés.

3 - Résultats

a) Cinétique de méthylation du méthyl- α -D-galactoside

Nous avons rassemblé dans la figure 46(p.179) les résultats de la cinétique de méthylation. A la lecture de ces diagrammes de chromatographie en phase gazeuse, nous avons choisi trois temps différents de méthylation : le temps 5 h pour préparer les dérivés mono-O-méthylés, le temps 6 h pour préparer plus spécifiquement les dérivés di-O-méthylés et enfin le temps 9 h,

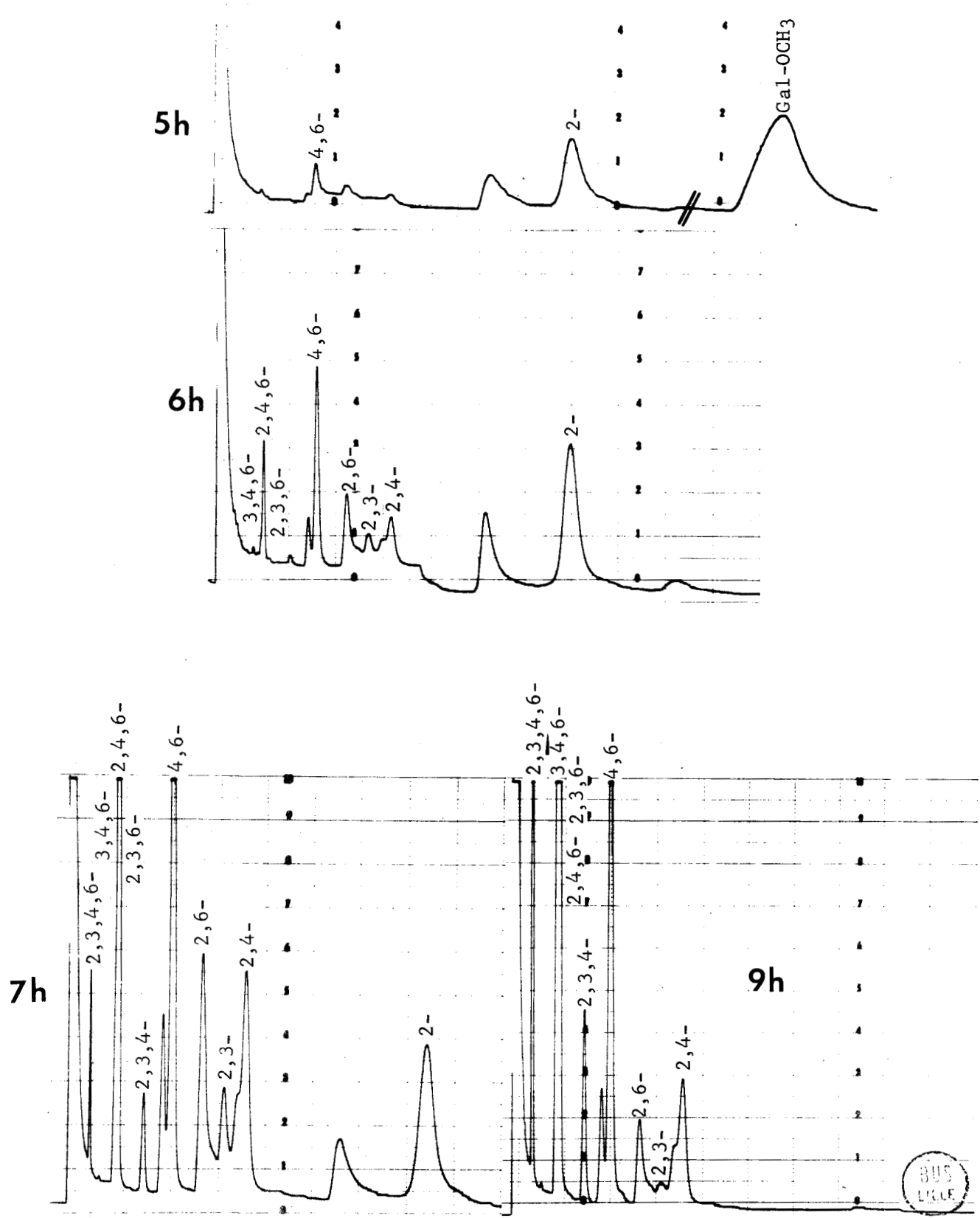


Figure 46

Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques du méthyl- α -D-galactoside obtenus par méthylation partielle de ce monosaccharide. Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS contenant 3 p. 100 de Carbowax 6000; température de la colonne : 200°C; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mn.

pour isoler les éthers tri-O-méthylés du méthyl- α -D-galactoside. Nous avons donc entrepris la préparation des éthers triméthyliques par méthylation partielle de 8 g du méthyl- α -D-galactoside. Le mode opératoire de méthylation est identique à celui du méthyl- α -D-mannoside à l'exception des quantités d'agent de méthylation et de catalyseur ainsi que du temps de contact (140 ml de diméthylformamide ; 8 ml d'iodure de méthyle ; 16 g d'oxyde d'argent ; temps de contact : 9 h). Le lavage à l'eau de la solution chloroformique des dérivés méthylés du méthyl-galactoside fournit une "phase aqueuse" enrichie en éthers diméthyliques, la solution chloroformique séchée par le sulfate de sodium représente la "phase organique" et contient les éthers insolubles dans l'eau.

b) Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques du méthyl- α -D-galactoside

Les résultats de la chromatographie analytique des éthers méthyliques du méthyl- α -D-galactoside isolés dans la "phase organique" et dans la "phase aqueuse" sont rassemblés dans la figure 47 (p.181). Nous constatons d'une part le partage des éthers triméthyliques dans la "phase organique" et dans la "phase aqueuse", seul le tétra-O-méthyl-dérivé se trouve en totalité dans la phase chloroformique d'autre part, la séparation des dérivés triméthylés est moins satisfaisante qu'en ce qui concerne leurs homologues du méthyl- α -D-mannoside ; seul le méthyl-2,3,4-tri-O-méthyl-D-galactoside se sépare distinctement des trois autres éthers qui forment un bloc ; enfin, les éthers diméthyliques sont résolus dans les conditions de la chromatographie.

La chromatographie préparative de la "phase organique" sur colonne de Chromosorb W à 3 p. 100 de Carbowax 6000 nous a permis d'isoler deux éthers à l'état pur : les méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl- et 2,3,4-tri-O-méthyl- α -D-galactosides. Les méthyl-2,3,6-, 2,4,6- et 3,4,6-tri-O-méthyl-galactosides ont été collectés ensemble (Fig. 48 ; p.182). Nous expérimentons actuellement sur d'autres phases liquides pour tenter de séparer correctement ces trois éthers triméthyliques. Toutefois, la chromatographie en phase gazeuse analytique des dérivés triméthylsilylés des éthers triméthyliques permet d'identifier très nettement le méthyl-4-TMS-2,3,6-tri-O-méthyl-D-galactoside. Nous pensons donc pouvoir isoler ce dérivé méthylé par chromatographie en phase gazeuse préparative.

c) Discussion

Les résultats de la préparation des éthers méthyliques du méthyl- α -D-galactoside sont encore trop fragmentaires pour que nous puissions tirer des conclusions intéressantes. Toutefois, la chromatographie analytique

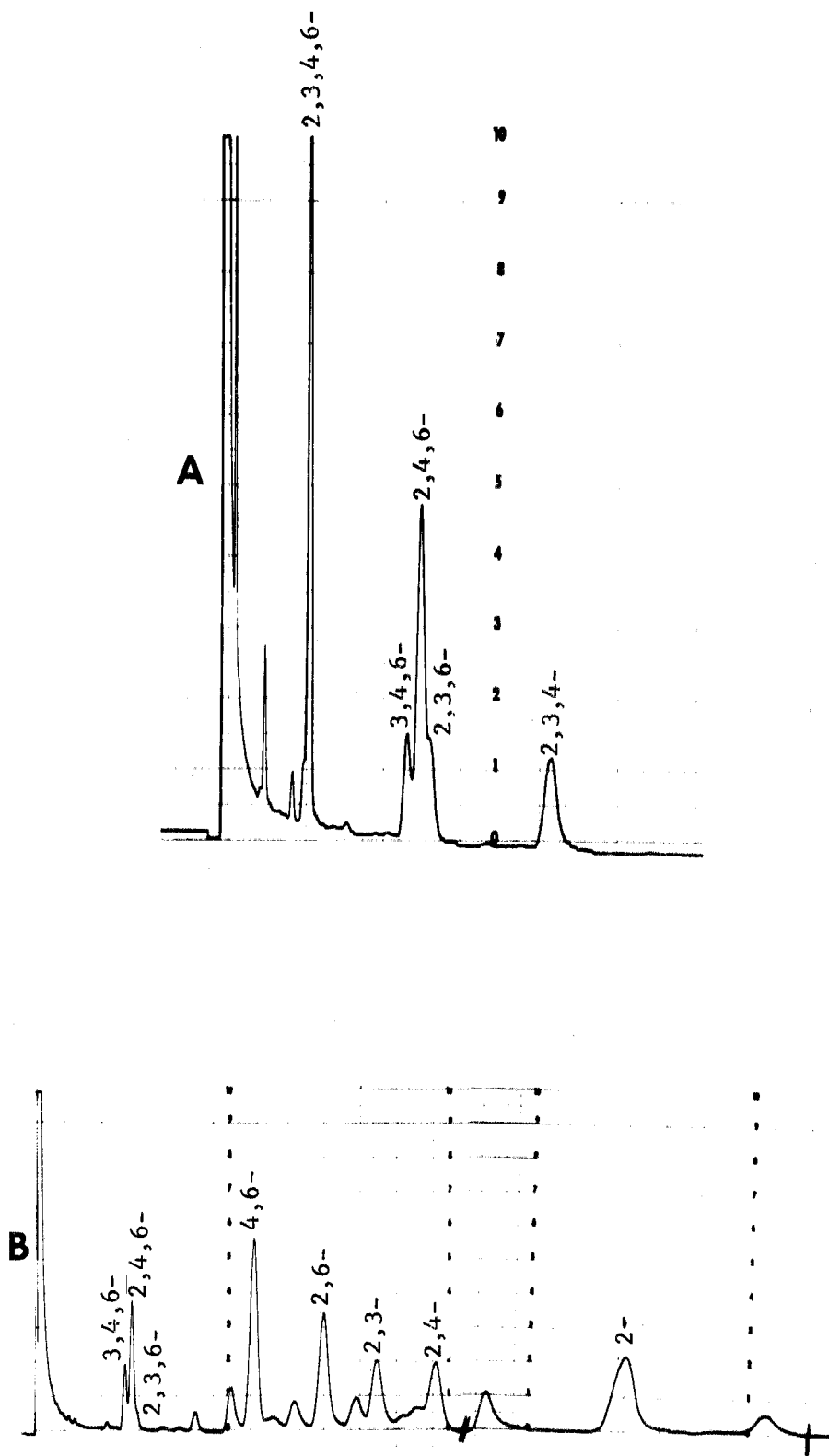


Figure 47



Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques du méthyl- α -D-galactoside présents dans la "phase organique" (A) et dans la "phase aqueuse" (B). Colonne de verre (0,3 x 300cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) contenant 3 p. 100 de Carbowax 6000; température de la colonne : 170°C; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mn.

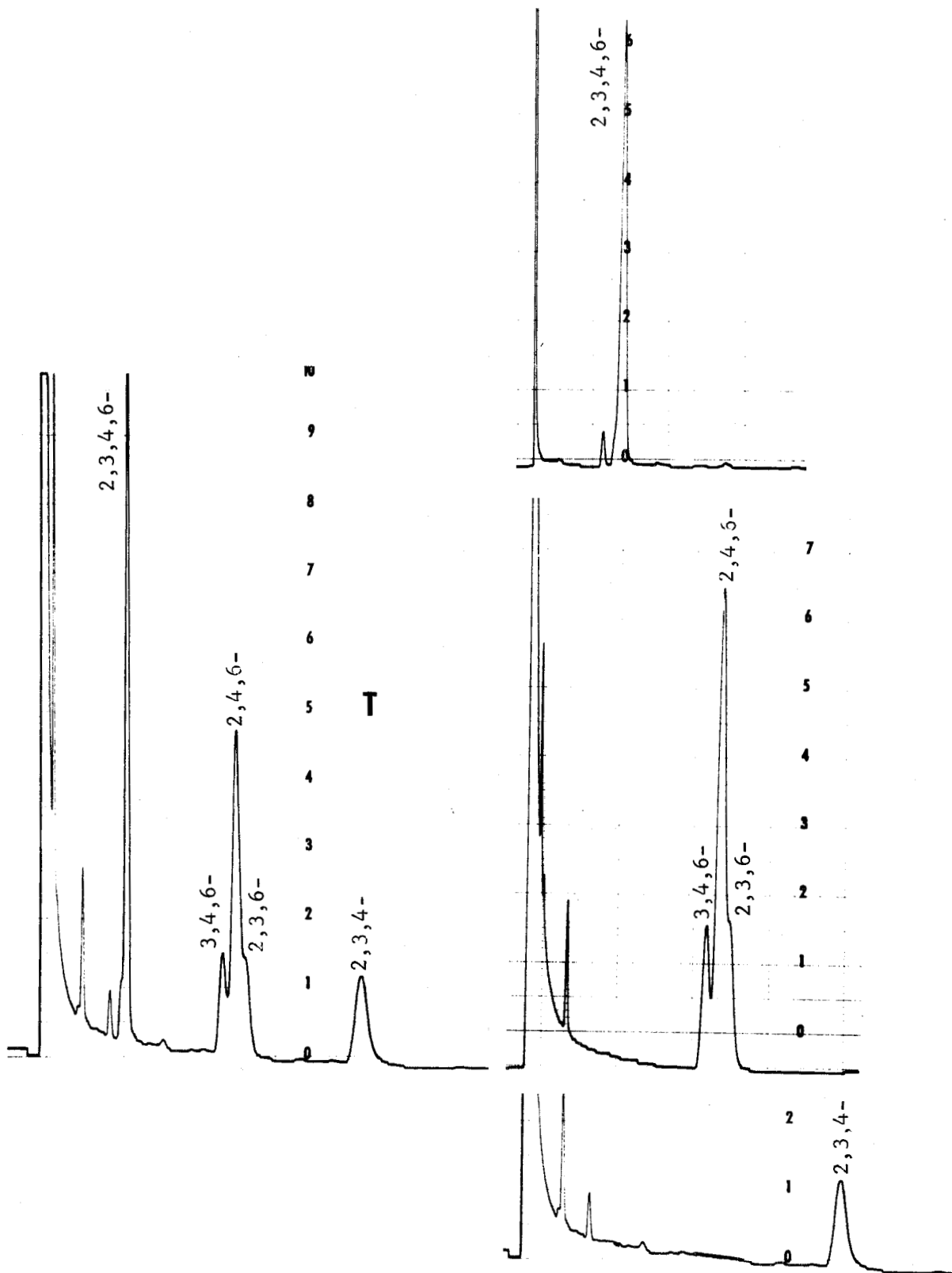


Figure 48



Chromatographie en phase gazeuse des dérivés tétra- et tri-O-méthylés du méthyl- α -D-galactoside isolés par chromatographie préparative en phase gazeuse. Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) contenant 3 p. 100 de Carbowax 6000 ; température de la colonne : 150°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mn ; T : mélange témoin.

des éthers préparés par méthylation partielle de ce monosaccharide nous encourage à poursuivre notre effort ; nous avons pu constater les séparations satisfaisantes des éthers diméthyliques. Nous pouvons donc envisager à présent leur fractionnement par chromatographie préparative en phase gazeuse.

Enfin, nous n'avons pas parlé dans ce chapitre de la synthèse des éthers méthyliques du L-fucose, monosaccharide présent dans certains glycoprotides et oligosaccharides. En fait ce monosaccharide occupe toujours, dans les chaînes glycaniques, la position terminale non réductrice. Le problème se résume donc à la synthèse du perméthyl-L-fucose qui est facilement réalisée par perméthylation du monosaccharide.

D - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA PREPARATION DES ETHERS METHYLIQUES TEMOINS

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude sur la préparation des éthers méthyliques sont les suivantes :

1 - La méthylation d'oligosaccharides de structure connue nous a fourni rapidement et dans un état de pureté satisfaisant les éthers méthyliques de la glucosamine suivants : la 3,6- et la 4,6-di-O-méthyl-glucosamine, la 4- et la 6-mono-O-méthyl-glucosamine. La perméthylation de la N-acétylglucosamine nous a fourni la 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine.

2 - Tous les éthers méthyliques de la glucosamine ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse sous la forme de leur dérivé triméthylsilylé, la fonction -NH₂ ayant subi une N-méthylation.

3 - La méthylation partielle des monosaccharides "neutres" (galactose et mannose) permet de préparer, en mélange, les éthers méthyliques de ces sucres. Ces derniers ont pu être fractionnés et isolés par chromatographie préparative en phase gazeuse en adaptant à cette technique les conditions opératoires de la chromatographie analytique en phase gazeuse. Nous avons pu ainsi préparer et isoler le perméthyl-mannose, les quatre dérivés tri-O-méthylés et les 6 isomères di-O-méthylés dont nous avons précisé quelques propriétés physico-chimiques. Nous devrions isoler dans un proche avenir les 4 isomères mono-O-méthylés. En ce qui concerne les éthers méthyliques du galactose, les premiers essais sont encourageants puisque nous séparons les 6 isomères diméthylés que nous pourrions facilement isoler par chromatographie préparative en phase gazeuse.

Ces procédés de synthèse ne sont pas aussi élégants que ceux de la chimie organique classique. Toutefois ils permettent d'isoler des quantités appréciables de dérivés qui seraient, pour certains d'entre eux, très longs et très difficiles à synthétiser par les voies classiques.

2ème PARTIE

APPLICATION DE LA PERMETHYLATION A L'EXPLORATION DE LA
STRUCTURE D'OLIGOSACCHARIDES LIBRES ET CONJUGUES

- I - STRUCTURES DES GLYCANNES DE L'OROSOMUCOÏDE, DE L'OVOMUCOÏDE ET DE LA TRANSFERRINE

- 2 - STRUCTURES D'OLIGOSACCHARIDES ISOLES DE DIVERS MILIEUX (HYDROLYSE PARTIELLE DE L'OROSOMUCOÏDE, ACETOLYSE DE L'OVOMUCOÏDE, URINE HUMAINE)

STRUCTURES DES GLYCANNES DE L'OROSOMUCOÏDE, DE L'OVOMUCOÏDE
ET DE LA TRANSFERRINE

Dans le cadre d'un travail d'équipe sur la structure des glycanes des glycoprotéines, nous avons appliqué nos procédés de méthylations et d'identification des éthers méthyliques à certains glycopeptides isolés de diverses glycoprotéines. Il est bien certain que ces techniques font parti d'un ensemble de méthodes qui permettent de préciser la nature et les quantités des monosaccharides présents dans la glycoprotéine, l'enchaînement de ces dérivés dans la chaîne glycanique, la nature des points d'attache et enfin l'anomérisation des liaisons. Il est donc indispensable d'associer plusieurs techniques dont chacun des membres de "l'équipe" est responsable : dosage des monosaccharides (SPIK) (412), hydrolyse ménagée et acétolyse (BAYARD) (413), oxydation périodique (STRECKER) (414), hydrolyse enzymatique (BOUQUELET) (415).

Nous constaterons dans ce chapitre qu'un travail précis ne peut être réalisé que lorsque l'étude est effectuée sur un glycanne pur, en effet l'application des techniques citées plus haut sur les glycopeptides totaux de l'orosomucoïde (5 chaînes glycaniques) et du glycopeptide β de l'ovomucoïde (4 chaînes glycaniques) ne nous ont pas permis de donner des structures complètes ; il n'en est pas de même sur les deux glycopeptides de la transferrine humaine qui ont pu être fractionnés (CHARET, SPIK et MONTREUIL) (416) et pour lesquelles les structures seront discutées.

I - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES TOTAUX DE L'OROSOMUCOÏDE

L'orosomucoïde ou glycoprotéine acide α_1 du sérum humain fait, depuis plus de vingt ans, l'objet de recherches très actives en raison de son importance chimique et de ses propriétés physico-chimiques très particulières. L'étude des variations de sa concentration dans le sang apporte des renseignements extrêmement précieux dans le diagnostic et dans l'évolution de certains cas pathologiques comme, par exemple, le rhumatisme articulaire aigu, les phénomènes inflammatoires et le cancer. La grande facilité avec laquelle cette glycoprotéine peut être isolée du sérum et sa grande richesse en sucre (40 p. 100) expliquent l'attrait des chercheurs pour cette glycopro-

téine (voir à ce sujet les revues générales de JEANLOZ (417) et de MONTGOMERY (418)). L'orosomucoïde n'est pas dénaturé par la chaleur, il n'est pas précipité par l'acide perchlorique 1,8 M et l'acide trichloracétique à 20 p. 100. Il est précipité par le sulfate d'ammonium à saturation et l'éthanol à pH 3,5. Il constitue le composant le plus stable et le plus acide du sérum humain. Le point isoélectrique de la molécule est de 2,7 en tampon phosphate de force ionique 0,1 (SCHMID) (419) et sa masse moléculaire est de 44.100 (SMITH) (420). Cette protéine a pu être dissociée en plusieurs variants (SCHMID) (421) dont certains ont pu être isolés (YAMASHINA) (422). La structure primaire de la protéine a été particulièrement étudiée par SCHMID (423) quant à la fraction glucidique, plusieurs schémas de structure statistique ont été proposés (SATO et al.) (424), (WAGH, BORNSTEIN et WINZLER) (425); la molécule contient 5 chaînes glycaniques de masse moléculaire moyenne de 3.100.

A - MODE OPERATOIRE

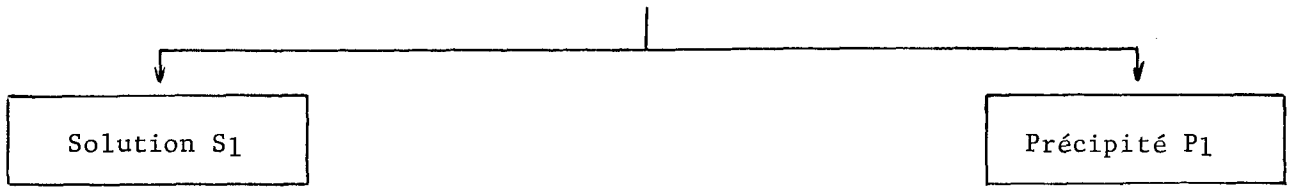
1 - Préparation de l'orosomucoïde

L'orosomucoïde a été préparé par un procédé original de relargage au sulfate d'ammonium qui permet d'isoler une fraction nettement enrichie en cette glycoprotéine qui ne précipite qu'à saturation (voir Fig. 49; p. 187). Ce précipité enrichi en orosomucoïde (précipité P₅) est purifié par chromatographie sur résine carboxylique de type XE 64 (Amberlite IRC 50) selon le procédé de SCHMID et al. (426). La glycoprotéine obtenue est homogène en électrophorèse, en immuno-électrophorèse et en ultracentrifugation. La composition centésimale en glucides est la suivante : 14,5 p. 100 de monosaccharides neutres, 10,5 p. 100 d'osamines et 10,8 p. 100 d'acides sialiques. La fraction glycanique est constituée de galactose, de mannose, de fucose, de N - acétylglucosamine et d'acide N - acétyl neuraminique.

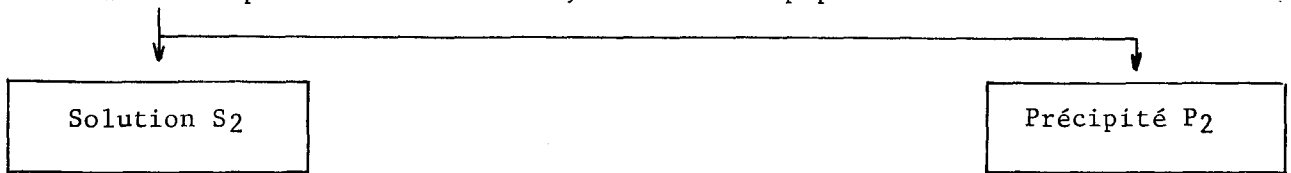
2 - Préparation des glycopeptides de l'orosomucoïde

L'hydrolyse pronasique, la défécation trichloracétique et la purification des hydrolysats sur échangeurs d'ions et sur colonne de Séphadex G - 25 ont été réalisées dans les conditions qui ont été décrites dans le chapitre précédent (p. 68). On obtient de cette manière les glycopeptides totaux dont la composition centésimale en glucides est la suivante : 30,5 p. 100 de monosaccharides neutres, 34,5 p. 100 d'osamines et 19,3 p. 100 d'acides sialiques. Ces glycopeptides ne possèdent que de l'acide aspartique, de la thréonine et de la lysine comme amino-acides (respectivement dans les

- V volume de plasma humain + V volume d'une solution de sulfate d'ammonium saturée.
- Amener à pH 3,5.
- Laisser reposer une nuit à 4°C, puis centrifuger.



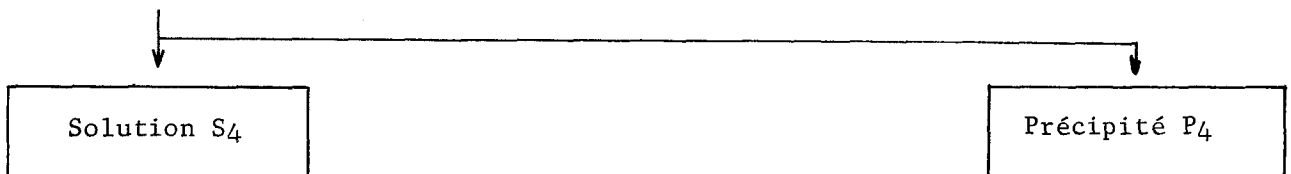
- Amener à pH 6,2 puis à 2/3 saturation en sulfate d'ammonium
- Laisser reposer une nuit à 4°C, filtrer sur papier Whatman n° 1



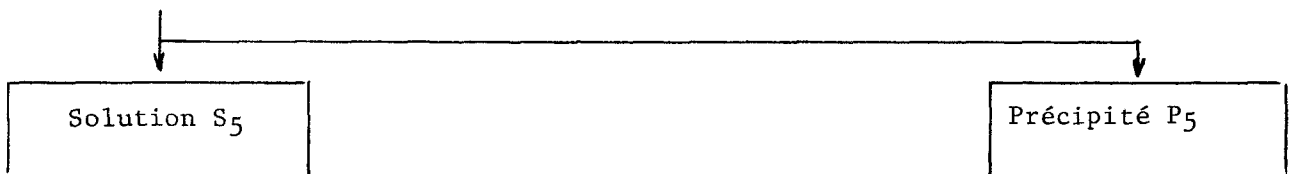
- Amener à pH 4,9
- Laisser reposer une nuit à 4°C, filtrer sur papier Whatman n° 1



- Amener à pH 3,7
- Laisser reposer une nuit à 4°C, filtrer sur papier Whatman n° 1



- Saturer la solution par le sulfate d'ammonium
- Laisser reposer 48 h à 4°C, filtrer sur papier Whatman n° 1



Éliminée

Fraction enrichie en orosomucoïde

Figure 49

Fractionnement par le sulfate d'ammonium du plasma humain.



rapports 1,0,44, 0,7).

3 - Oxydation periodique des glycopeptides de l'orosomucoïde

Afin d'étudier la fraction interne des glycannes liée à la protéine, nous avons soumis le mélange des glycopeptides à l'oxydation periodique :

Une solution de 100 mg de glycopeptide dans 25 ml d'eau est additionnée de 25 ml de métaperiodate de sodium 0,02 M. Le mélange est maintenu à + 4°C et à l'obscurité. La consommation d'acide periodique est déterminée en suivant régulièrement l'absorbance de la solution mesurée à 310 m μ . Après 8 jours, l'absorbance est stabilisée et la réaction est arrêtée en amenant la solution à pH 7 avec de l'hydroxyde de baryum. Après un repos de 2 heures à 4° C, le précipité formé est éliminé par centrifugation. Les polyaldéhydes apparus lors de l'oxydation sont réduits par le borohydrure de potassium (250 mg) pendant 18 heures. La solution, amenée à pH 6 par de l'acide acétique, est évaporée à siccité et l'acide borique est libéré sous forme de borate de méthyle par codistillation avec un mélange acide acétique méthanol (1 : 5 v/v).

Le résidu est repris par 10 ml d'eau et la solution est amenée a pH 1 par de l'acide sulfurique 2 N, l'hydrolyse est poursuivie pendant 18 heures à température ordinaire. La solution est alors neutralisée par de l'hydroxyde de baryum et le précipité de sulfate de baryum est abondamment lavé par de l'eau distillée. Le surnageant et les eaux de lavage sont évaporés à siccité. Le glycopeptide résistant à l'oxydation periodique est isolé par chromatographie sur Séphadex G - 25.

La composition centésimale en monosaccharides "neutres" et osamines, ainsi que leur identification, ont été déterminées par l'application des méthodes colorimétriques et chromatographiques décrites précédemment (voir p. 69).

4 - Perméthylation des glycopeptides

La perméthylation des glycopeptides, l'hydrolyse, le fractionnement des éthers méthyliques et leurs identifications ont été réalisés dans les conditions décrites dans le chapitre précédent (voir p.83 et p.138). Cependant nous avons remarqué que les glycopeptides riches en acides sialiques se méthylaient très difficilement, cette observation avait d'ailleurs été signalée par GRIMMONPREZ (427) lorsqu'il méthylait un oligosaccharide du lait de Femme riche en acides sialiques : le disialyllacto- N - tétraose. Pour cette raison nous avons réalisé la méthylation des sialo-glycopeptides

sous la forme de leur sel de potassium : 100 mg de glycopeptide dissous dans le minimum d'eau sont amenés a pH 8 par une solution aqueuse de potasse 0,01 N. La solution est alors immédiatement congelée, puis lyophilisée. Les glycopeptides ainsi neutralisés peuvent subir les réactions de méthylation.

B - RESULTATS

I - Perméthylation des glycopeptides totaux de l'orosomucoïde

Les glycopeptides perméthylés ont été hydrolysés et l'électrophorèse préparative sur papier nous a fourni une fraction "basique" contenant les éthers méthyliques de la glucosamine et une fraction "neutre" renfermant les éthers méthyliques des monosaccharides neutres.

Nous avons identifié, par chromatographie en phase gazeuse, un pic unique de 3,6-di-O-méthyl-glucosamine (Fig. 51 p. 191).

La chromatographie préparative sur papier des éthers méthyliques isolés de la bande neutre de l'électrophorèse préparative nous a fourni trois fractions (Fig.50 p.190). Dans chaque fraction nous avons caractérisé les monosaccharides méthylés par identification de leur produit de perméthylation ; dans la fraction I : du perméthyl-fucose, galactose et mannose, dans la fraction 2 : uniquement du perméthyl-galactose, dans la fraction 3 : du perméthyl-mannose.

L'identification des éthers méthyliques présents dans chaque fraction a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de ChromosorbW à 3 p. 100 de Carbowax 6.000 (Fig.51p.191). Dans la fraction I : le méthyl-2,3,4-tri-O-méthyl-fucoside , le méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactoside et le méthyl-3,4,6-tri-O-méthyl-mannoside . Dans la fraction 2 : les méthyl-2,4,6- et 2,3,4-tri-O-méthyl-galactosides . Dans la fraction 3 : les méthyl-3,4-, 2,4- et 3,6-di-O-méthyl-mannosides.

2 - Perméthylation des glycopeptides résistants à l'oxydation periodique

L'oxydation periodique des glycopeptides totaux de l'orosomucoïde fournit le noyau central qui est constitué de : mannose, de N-acétylglucosamine et d'acide aspartique dans les rapports, respectivement, de 3,3,1.

L'identification des monosaccharides méthylés libérés par hydrolyse du glycopeptide perméthylé a été réalisée classiquement par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats sont rassemblés dans la figure 52 (p. 192).

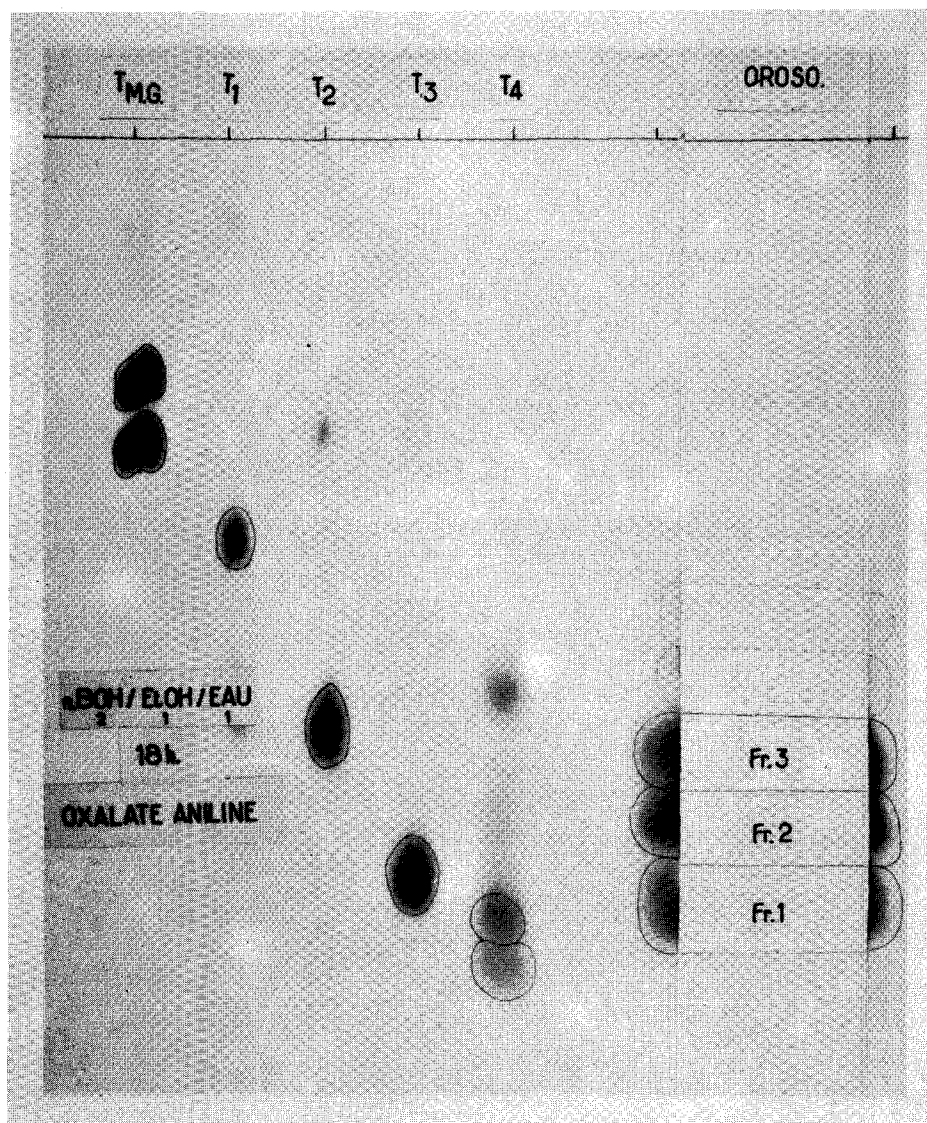


Figure 50

Chromatographie préparative sur papier des éthers méthyliques des monosaccharides (galactose, mannose et fucose) présents dans la fraction électrophorétique "neutre" des hydrolysats chlorhydriques des glycopeptides de l'orosomucoïde.

Papier Whatman n° 3 MM ; système solvant : n-butanol/éthanol/eau (2:1:1) ; durée de la chromatographie : 18 h ; révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline ; T.M.G: témoin de mannose et de galactose; T₁, T₂, T₃, T₄ : dépôts témoins, respectivement, de dérivé mono-, di-, tri- et tétra-O-méthylés.



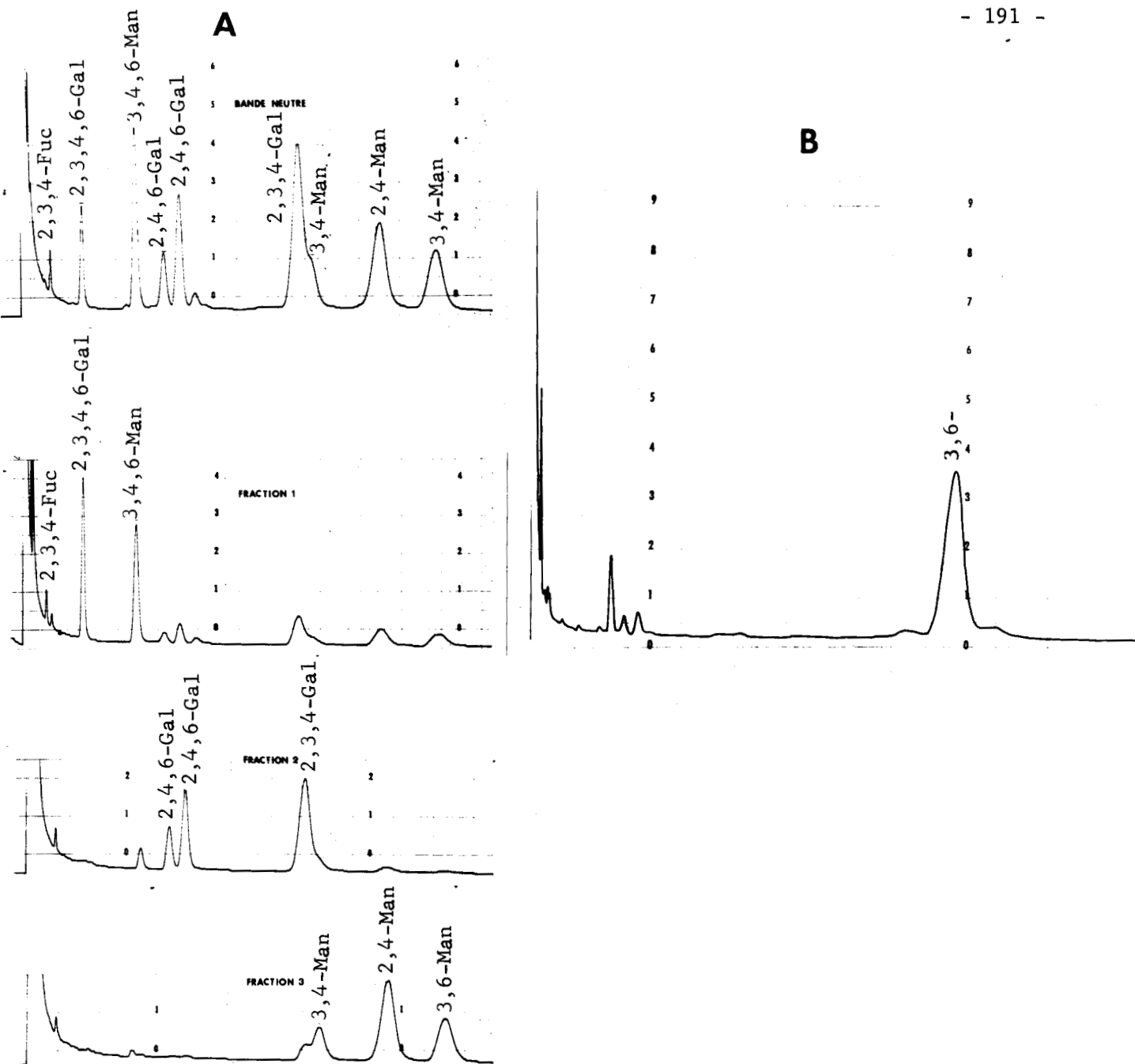


Figure 51

Identification des éthers méthyliques présents dans les glycopeptides perméthylés de l'orosomucoïde.

A : Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques des monosaccharides "neutres" présents dans les fractions de la chromatographie préparative sur papier ; colonne de verre (0,3X300 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) à 3 p. 100 de Carbowax 6000 ; température de la colonne : 170°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mn.

B : Chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés des éthers méthyliques de la glucosamine présents dans la fraction électrophorétique "basique" ; colonne de verre (0,3XI80 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 100-120) à 3 p. 100 de Silicone OV 17 ; température de la colonne : 120°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 20 ml/mn.



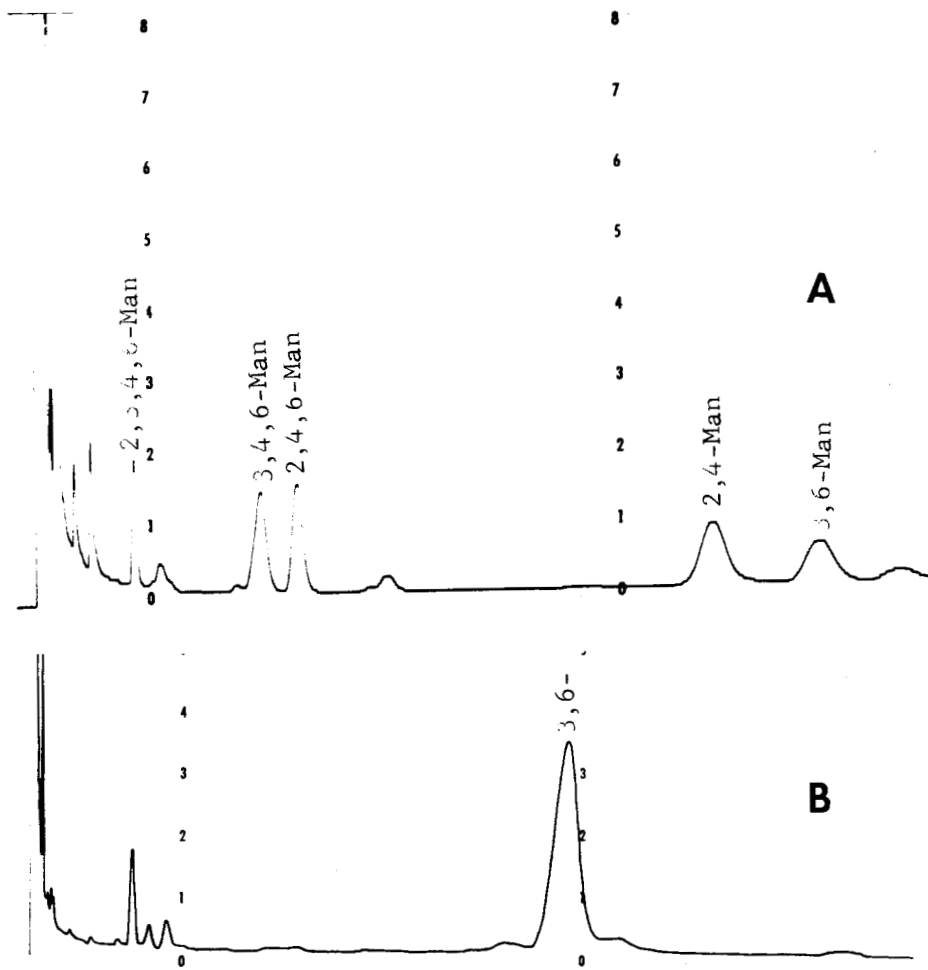


Figure 52

Identification des éthers méthyliques présents dans les glycopeptides perméthylés de l'orosomucoïde résistants à l'oxydation périodique.

A : Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques des monosaccharides "neutres" ; colonne de verre (0,3X300 cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) à 3 p.100 de Carbowax 6000 ; température de la colonne : 170°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mn.

B : Chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés des éthers méthyliques de la glucosamine ; colonne de verre (0,3XI80cm) remplie de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 100-120) à 3 p.100 de Silicone OV 17 ; température de la colonne : 120°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 20 ml/mn.

Nous identifions la 3,6-di-O-méthyl-glucosamine et les méthyl-2,3,4,6-tétra-, 3,4,6-tri-, 2,4,6-tri-, 2,4-di- et 3,6-di-O-méthyl-mannosides.

C - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les conclusions que nous pouvons tirer de l'étude très fragmentaire de la perméthylation des glycopeptides de l'orosomucoïde sont les suivantes :

1 - L'analyse des diagrammes de chromatographie en phase gazeuse nous montre la complexité du mélange des glycopeptides de l'orosomucoïde. En effet, nous identifions trois dérivés diméthylés du mannose, ce qui indique la présence dans les chaînes glycaniques de trois points de branchement différents sur ce monosaccharide.

2 - Nous retrouvons les résultats de JEANLOZ et EYLAR (428) et de JEANLOZ (429) en ce qui concerne les méthyl-osamines présentes dans la glycoprotéine ; en effet nous ne trouvons que de la 3,6-di-O-méthyl-glucosamine . Ce résultat met en défaut les schémas de structure des unités polysaccharitiques de l'orosomucoïde proposés par SATO et al. (430) et WAGH et al. (431). En effet ces auteurs font de la N-acétylglucosamine un point de branchement, ce qui devrait fournir des mono-O-méthyl-glucosamines.

3 - La présence de 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactose indique que des molécules d'acide N - acétyl neuraminique sont détachées durant la méthylation ou l'existence de quelques unités galactoses en position terminale non réductrice des chaînes glycaniques. Nous retrouvons là également un résultat de JEANLOZ et CLOSSE (432). Le fait que nous ne trouvons pas de 2,3,6-tri-O-méthyl-galactose, sucre méthylé identifié par plusieurs auteurs dans les hydrolysats des glycopeptides perméthylés de l'orosomucoïde (JEANLOZ et CLOSSE) (433), SATO et al. (434) indique peut-être que la liaison ANAN α 2 \rightarrow 4 Gal est coupée dans les conditions de méthylation. La présence de 2,3,4-et 2,4,6-tri-O-méthyl-galactose permet de conclure sur la structure de quelques unités disaccharidiques terminales : ANAN α 2 \rightarrow 6 Gal et ANAN α 2 \rightarrow 3 Gal.

4 - L'étude, par méthylation, des glycopeptides résistants à l'oxydation périodique ne nous fournit aucun renseignement intéressant sur la structure du glycanne au voisinage du point d'attache. La présence du dérivé perméthylé, de plusieurs dérivés triméthylés et diméthylés du mannose,

indique que cette fraction est encore très hétérogène.

5 - La chromatographie préparative sur papier des éthers méthyliques des monosaccharides neutres réalise, comme nous l'avions remarqué pour le glycopeptide β de l'ovomucoïde, un double fractionnement suivant la nature du monosaccharide et son degré de substitution ; nous avons pu ainsi identifier, sans ambiguïté, le 2,3,4-tri-O-méthyl-galactose et le 3,4-di-O-méthyl-mannose qui se chevauchent dans les conditions de la chromatographie analytique en phase gazeuse.

II - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES β DE L'OVOMUCOÏDE

A - MODE OPERATOIRE

L'hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde préparé selon le procédé de FREDERICQ et DEUTSH (435), la défécation trichloracétique, la purification des hydrolysats sur échangeurs d'ions et l'isolement du glycopeptide β ont été décrits dans le chapitre précédent (p. 68).

La perméthylation de ce glycopeptide qui renferme du galactose, du mannose et de la N-acétylglucosamine dans les rapports, respectivement, de 1,5,10 et l'identification des éthers méthyliques libérés par hydrolyse du glycopeptide perméthylé ont été réalisées dans les conditions décrites dans le chapitre précédent (p.83 et p.138).

B - RESULTATS

Nous avons rassemblé dans la figure 31 (p.143) et la figure 35 (p.148) les résultats des analyses chromatographiques des éthers méthyliques des monosaccharides neutres et des méthyl-osamines. Nous constatons une nette simplification dans les profils chromatographiques. En effet nous identifions le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-mannose, le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactose, le 3,4,6-tri-O-méthyl-mannose et les 3,4-, 2,4- et 3,6-di-O-méthyl-mannoses dans les rapports de surface suivants : 0,55 1 1 0,5 0,9 1,22 respectivement. Quant aux osamines, nous identifions les 3,4,6-tri-O-méthyl et 3,6-di-O-méthyl-glucosamines dans les rapports de surface suivants : 1 0,76 .

C - DISCUSSION

La perméthylation du glycopeptide β de l'ovomucoïde qui est en fait un mélange de quatre glycannes ne nous permet pas de donner

un schéma de cette molécule. Ces résultats pourront être interprétés seulement quand l'isolement de chacun des glycanes aura été réalisé. Toutefois ces glycopeptides β de l'ovomucoïde nous aurons permis de mettre au point les techniques de méthylation et d'identification des éthers méthyliques indispensables pour étudier la structure de glycanes dont nous ne possédons que de faibles quantités, comme les glycopeptides de la transferrine dont nous exposerons à présent les résultats.

III - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES ISOLES DE LA TRANSFERRINE HUMAINE (*)

La transferrine constitue la véhicule du fer à travers tout l'organisme. Elle se trouve essentiellement dans le sang, à la concentration de 2 g p. litre environ, mais elle existe aussi dans de nombreux liquides biologiques comme les urines, le liquide céphalorachidien, le lait, la bile, la salive et la lymphe. La transferrine est essentiellement synthétisée dans le foie (SCHULTZE et HEREMANS) (436), elle intervient d'une part, entre le fer alimentaire et les formes de réserve transitoires ou durables de la ferritine et de l'hémosidérine et d'autre part, entre ces dernières et les formes "actives" de conjugués du fer : hémoglobine et myoglobine, cytochromes, catalases et peroxydases, métallo-flavo-protéines. De nombreux variants génétiques de la transferrine ont été décrits et identifiés par électrophorèse en gel d'amidon (SMITHIES) (437). On connaît actuellement 18 variants génétiques dans lesquels le phénotype homozygote CC est observé avec une fréquence de 99 p. 100.

La transferrine sérique humaine est obtenue avec les meilleurs rendements à partir de préparations enrichies provenant de fractionnement du plasma par le procédé à l'éthanol de COHN (438) ou par le procédé au rivanol de HOREJSI et SMETANA (439). Ces fractions enrichies sont ensuite purifiées par chromatographie sur DEAE-cellulose.

La masse moléculaire de la transferrine oscille, suivant les auteurs, entre 69.700 (CHARLWOOD) (440) et 90.000 (MORRISON et LOUTIE) (441).

La composition centésimale en glucides de cette glycoprotéine est la suivante : 2,3 p. 100 de monosaccharides neutres, 1,98 p. 100 d'osamines et 1,43 p. 100 d'acides sialiques (SPIK) (442). Elle possède deux chaînes glycaniques constituées de galactose, mannose, de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétyl neuraminique dans les rapports suivants : 5,5,8,3 ou 4

(*) Avec la collaboration de SPIK, CHARET et STRECKER

respectivement (SPIK)(443). JAMIESON (444) donne I galactose pour 2 mannoses.

A - MODE OPERATOIRE

Les études de structure ont été effectuées sur des échantillons de transferrine commercialisés par la firme BEHRINGWERKE.

I - Préparation des glycopeptides

Les glycopeptides de la transferrine ont été préparés à partir d'hydrolysats tryptiques de la glycoprotéine selon un procédé décrit par CHARET, SPIK et MONTREUIL (445). De cette manière, les auteurs obtiennent deux glycopeptides. L'un (glycopeptide A) possède un résidu de demi-cystéine et 14 amino-acides, l'autre (glycopeptide B) est le glycodipeptide II de SPIK et MONTREUIL (446) : Asn (glycanne) Lys. Le glycopeptide A a été soumis, dans un second temps, à une hydrolyse pronasique afin de se débarrasser de la copule peptidique. De cette manière on obtient le glycopeptide Ser-Asn (glycanne) ou glycopeptide I de SPIK et MONTREUIL (447). On a constaté au laboratoire une très grande dispersion dans les valeurs des rapports molaires galactose/mannose. La composition molaire en glucides de ces deux glycopeptides est donnée dans le tableau XXII (p. 197).

2 - Hydrolyse par la neuraminidase

Nous avons suivi, pendant 24 heures, la cinétique de libération de l'acide N-acétyl neuraminique détaché par l'action de la neuraminidase de Clostridium perfringens (SIGMA "grade III") dans les conditions expérimentales suivantes (ROBINSON et PIERCE)(448) : 100 mg de glycopeptide et 1 mg d'enzyme sont dissous dans 1 ml de tampon d'acétate de sodium 0,05 M, renfermant du chlorure de sodium (0,06 M) et du chlorure de calcium (0,004 M) et ajusté à pH 5,6. La solution est maintenue à 37°C pendant des temps variant de 0 à 24 h. Les acides sialiques libérés sont dosés après oxydation périodique par l'acide thiobarbiturique.

3 - Oxydation périodique des glycopeptides

L'oxydation périodique de 100 mg de glycopeptides A et B a été effectuée dans les conditions opératoires décrites précédemment p.188.

4 - Perméthylation des glycopeptides

Les glycopeptides ont été perméthylés par la méthode de HAKOMORI (449) dans les conditions expérimentales décrites dans le chapitre précédent. L'identification des éthers méthyliques a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse ; colonne de Chromosorb W à 3 p. 100 de

Tableau XXII

Rapports molaires en glucides des glycopeptides A et B de la transferrine humaine.

	Glycopeptide A	Glycopeptide B
Galactose	3	2
Mannose	3	3
N-acétylglucosamine	4	4
Acide N-acétyl neuraminique	3	2



Carbowax 6.000 pour les éthers méthyliques des monosaccharides neutres et colonne de Chromosorb W à 3 p. 100 de Silicone OV 17 pour les méthyl-osamines préalablement triméthylsilylés.

B - RESULTATS

I - Méthylation des sialo-et asialo-glycopeptides A et B

Afin de mettre en évidence d'éventuelles différences de structure, nous avons perméthylé les deux glycopeptides A et B sialylés et désialylés. Nous avons rassemblé dans la figure 53 (p. 199) les résultats des analyses chromatographiques des éthers méthyliques des monosaccharides neutres et des méthyl-osamines libérés par hydrolyse acide des sialo-et asialo-glycopeptides perméthylés. La chromatographie en phase gazeuse des osamines méthylés nous a donné dans les 4 cas de la 3,6-di-O-méthyl-glucosamine. Quant aux éthers méthyliques des monosaccharides neutres, les sialo-glycopeptides A et B renferment les méthyl-3,4,6-tri-O-méthyl-mannoside, 2,3,4-tri-O-méthyl-galactoside et 2,4-di-O-méthyl-mannoside, les asialo-glycopeptides A et B renferment les méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactoside, 3,4,6-tri-O-méthyl-mannoside et 2,4-di-O-méthyl-mannoside. Nous avons rassemblé dans le tableau XXIII (p. 200) ces résultats en indiquant les rapports de surface de chaque pic.

2 - Oxydation periodique des asialo-glycopeptides A et B

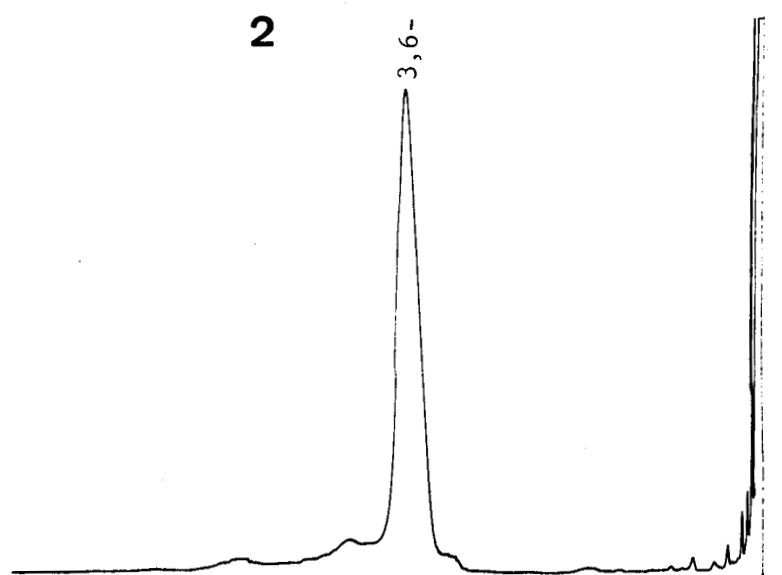
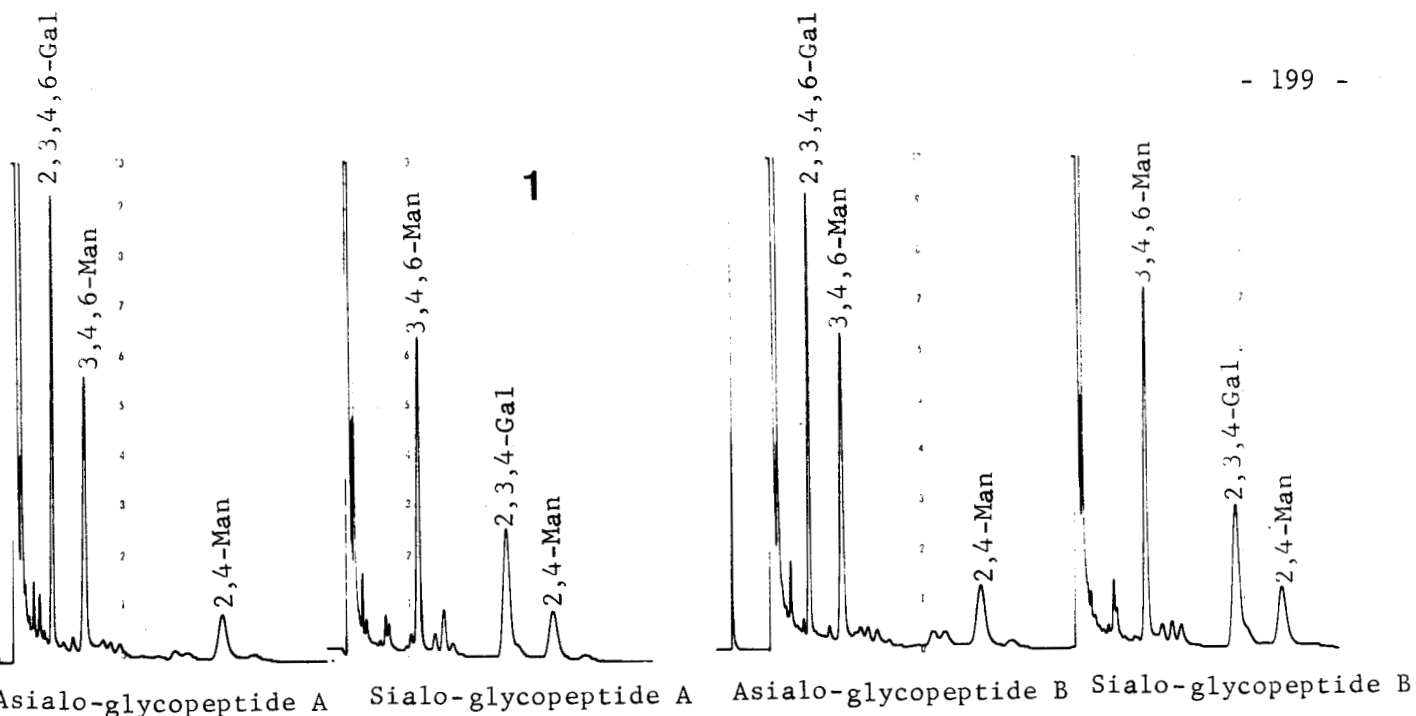
L'oxydation periodique de 55 mg d'asialo-glycopeptide A fournit 14 mg d'un glycopeptide dont la composition est la suivante : mannose 1, N-acétylglucosamine 3.

L'oxydation periodique de 90 mg d'asialo-glycopeptide B fournit 28 mg d'un glycopeptide dont la composition est la suivante : mannose 1, N-acétylglucosamine 2.

Ces glycopeptides résistant à l'oxydation periodique seront dénommés glycopeptides oxydés.

3 - Méthylation des glycopeptides A et B oxydés

Les résultats de la perméthylation des glycopeptides A et B oxydés sont rassemblés dans la figure 54 (p. 201). Les manipulations ayant été effectuées sur de petites quantités de glycopeptides (de l'ordre de 10 mg), les composés de la bande neutre de l'électrophorèse préparative ont été triméthylsilylés afin d'augmenter leur sensibilité au détecteur à ionisation de flamme. Nous avons pu mettre en évidence par chromatographie en phase



Sialo-et Asialo-glycopeptide A et glycopeptide B

Figure 53

Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques des monosaccharides "neutres" (1) et des méthyl-osamines (2) libérés par hydrolyse chlorhydrique des sialo-et asialo-glycopeptides A et B perméthylés de la transferrine .

1 : Colonne (0,3X300 cm) de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) contenant 3 p.100 de Carbowax 6000 ; température du four : 170°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 30 ml/mn.

2 : Colonne (0,3XI80 cm) de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 100-120) contenant 3 p.100 de Silicone OV 17; température du four : 120°C ; débit du gaz vecteur (N₂) : 20 ml/mn.



TABLEAU XXIII

Rapports des surfaces de pics correspondants aux éthers méthyliques des monosaccharides neutres libérés par hydrolyse acide des sialo et asialo-glycopeptides A et B perméthylés de la transferrine rapportés au méthyl-2,4-di-O-méthyl-D-mannoside.

Ethers méthyliques Glycopeptides	2,3,4,6-Gal	3,4,6-Man	2,4-Man	2,3,4-Gal
	Sialo-glycopeptide A		1,7	1
Asialo-glycopeptide A	1,85	1,85	1	
Sialo-glycopeptide B		2,24	1	2,09
Asialo-glycopeptide B	1,90	1,62	1	



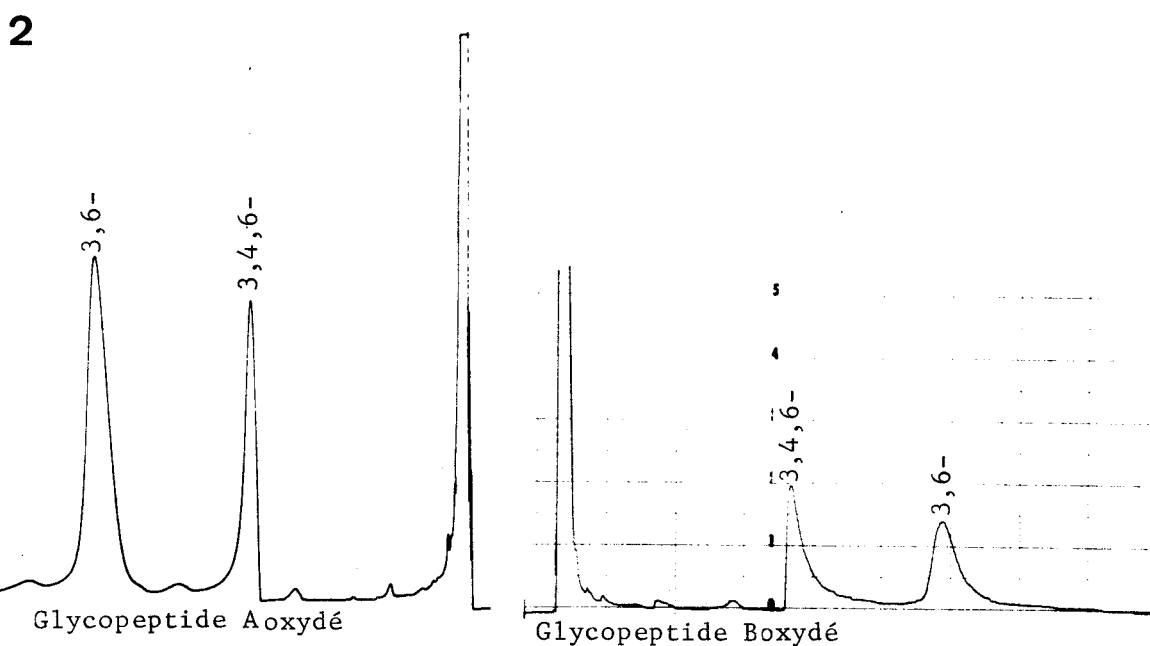
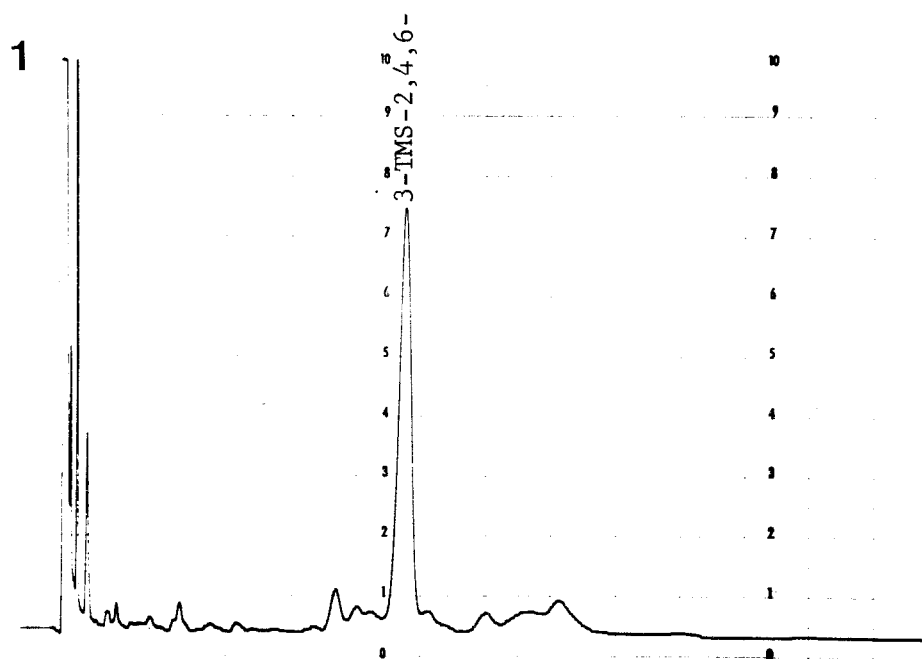


Figure 54



Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques des monosaccharides neutres (1) et des méthyl-osamines (2) libérés par hydrolyses chlorhydriques des glycopeptides oxydés A et B perméthylés. Colonne (0,3 x 180cm) de Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 100-120) contenant 3 p. 100 de silicone OV 17; température du four : 120°C; débit du gaz vecteur (N₂) 20 ml/mn.

gazeuse sur colonne de Silicone OV 17 un pic unique de méthyl-2,4,6-tri-O-méthyl-3-O-silyl-mannoside pour les deux glycopeptides oxydés.

La chromatographie en phase gazeuse des osamines méthylés nous fournit les résultats suivants : glycopeptide A ; 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine : I, 3,6-di-O-méthyl-glucosamine : I,7I.

glycopeptide B , 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine : I, 3,6-di-O-méthyl-glucosamine : I (rapports de surface).

C - DISCUSSION

A la lecture de ces résultats nous pouvons tirer plusieurs conclusions :

1 - Les sialo-glycopeptides ne possèdent pas de galactose externe.

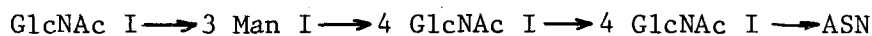
2 - Dans les deux glycopeptides le galactose est substitué par l'acide N-acétyl neuraminique en 6 : 2 résidus de ANAN pour 2 résidus de galactose ; les extrémités des chaînes glycaniques sont donc constituées par la séquence : ANAN 2 → 6 Gal.

3 - MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (450) et MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (451) ont montré que l'hydrolyse par les résines polystyrène sulfonée de la transferrine libère de nombreux oligosaccharides en quantité élevée. Parmi ceux-ci, la N-acétyllactosamine apparaît dès le début de l'hydrolyse. Elle est d'ailleurs suivie par des mannobioses et des mannotrioses. Nous pouvons donc augmenter d'une unité les extrémités des chaînes glycaniques en faisant figurer ce résidu de lactosamine ; ceci nous donne la séquence terminale suivante : ANAN 2 → 6 Gal. I → 4 GlcNAc. Ces résultats confirment ceux de JAMIESON (452).

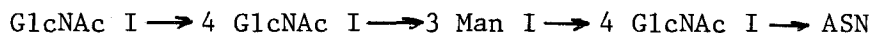
4 - Les rapports de surface Gal/Man des éthers méthyliques (Gal 2, Man 3) ne concordent pas avec les rapports molaires trouvés par SPIK (453) (Gal 3, Man 3) et par JAMIESON (454) (Gal 2, Man 4).

5 - La présence d'un dérivé diméthylé indique que les chaînes glycaniques possèdent un point de ramification. Ce dérivé diméthylé est le 2,4-di-O-méthyl-mannose et non le 3,4-di-O-méthyl-mannose, comme l'a suggéré JAMIESON (455).

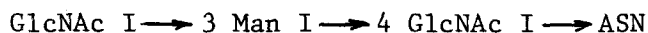
6 - L'oxydation périodique des glycopeptides A et B donne des résultats différents, en effet, pour le glycopeptide A, nous obtenons un tétrésaccharide attaché à l'acide aminé renfermant 3 résidus de N-acétylglucosamine et 1 résidu de mannose. Compte tenu des résultats de la méthylation, deux structures sont possibles :



OU



Quant au glycopeptide B oxydé il renferme 2 résidus de N-acétylglucosamine pour 1 résidu de mannose. Les résultats de la perméthylation nous permettent de donner sa structure :



7 - SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (456) ont démontré, sans ambiguïté, la nature de la liaison glycanne-protide de ces deux glycopeptides qui est du type asparaginy-glucosamine.

Plusieurs problèmes restent encore à résoudre avant de donner la structure des glycanes des glycopeptides de la transferrine, en particulier celui des rapports molaires galactose / mannose. Nous nous trouvons certainement là devant les mêmes problèmes que nous rencontrons avec l'orosomucoïde, à savoir, la variance glycanique. Ces glycopeptides seraient en fait des mélanges à proportions variable de galactose et de mannose.

Sur la base de ces expérimentations et en nous fondant sur les rapports molaires des éthers méthyliques présents dans le glycopeptide B perméthylé nous proposons, dans la figure 55 (p.204), un schéma de structure de cette fraction glucidique de la transferrine humaine.

IV - CONCLUSIONS GENERALES CONCERNANT LA STRUCTURE DES GLYCANES DES GLYCOPROTEINES

Les conclusions que nous pouvons tirer de l'étude que nous avons effectuée sur la structure des fractions glycaniques de plusieurs glycoprotéines sont les suivantes :

1 - La perméthylation d'un mélange de glycopeptides fournit d'une part, des renseignements sur l'enchaînement des monosaccharides aux extrémités des chaînes glycaniques et d'autre part, permet de se faire une idée de la complexité de la structure de ces hétéropolysaccharides.

2 - Nous proposons un schéma général de structure du glycopeptide B de la transferrine qui a le mérite de rendre compte des résultats que nous avons obtenus et de représenter un modèle sur lequel nous fonderons nos expérimentations futures.

3 - Le problème de la composition exacte des glycannes de la transferrine reste posé. Cette disparité des résultats, surtout en ce qui concerne les rapports molaires en galactose et en mannose, ne provient pas de l'imperfection des techniques de dosage, mais de la présence de variants glycanniques comme l'a démontré YAMASHINA (457) pour l'orosomucoïde. Nous arriverons au but lorsque nous aurons isolé ces différents variants.

4 - L'étude comparée de ces trois glycoprotéines nous montre des analogies de structure que MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (458) avaient énoncées dès 1962. Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, nous avons pu isoler à partir d'hydrolysats partiels de ces différentes glycoprotéines, des chaînons communs : N-acétyl lactosamine, mannobioses et mannotrioses. Dans toutes ces glycoprotéines le mannose constitue des points de ramification qui sont communs à ces diverses glycoprotéines, ce monosaccharide étant substitué préférentiellement sur les carbones 3 et 6 ou 2 et 4.

STRUCTURES D'OLIGOSACCHARIDES

ISOLES DE DIVERS MILIEUX

Dans le cadre d'un travail d'équipe nous avons participé à l'exploration des structures de plusieurs oligosaccharides :

- I - Oligosaccharides isolés des hydrolysats partiels de l'orosomucoïde
- II - Oligosaccharides isolés des urines normales (*)
- III - Oligosaccharides isolés d'acétolysats de l'ovomucoïde (**)

I - STRUCTURES DES OLIGOSACCHARIDES ISOLES DES HYDROLYSATS PARTIELS DE L'OROSOMUCOÏDE

Dans des mémoires antérieurs MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (459) et MONTREUIL, ADAM-CHOSSON et SPIK (460) ont démontré que l'hydrolyse de la fraction glucidique des glycoprotéines par les résines de polystyrène sulfoné représentait le procédé de choix pour obtenir des quantités élevées d'oligosaccharides. Appliquée à l'ovomucoïde, la méthode avait permis aux auteurs cités plus haut d'isoler deux mannobioses isomères (mannobiose I et II d'ADAM-CHOSSON et MONTREUIL) (461). Nous fondant sur l'hypothèse que ces auteurs avaient émise de l'existence d'un schéma général de structure de la fraction glucidique de nombreuses glycoprotéines d'origine animale, nous avons étendu le procédé à l'étude de l'orosomucoïde et isolé les mêmes mannobioses à partir des hydrolysats partiels de ce dernier. Ce travail a fait l'objet d'une note (FOURNET, TAKERKART, BROHON et MONTREUIL) (462).

A - MODE OPERATOIRE

I - Préparation de l'orosomucoïde

La glycoprotéine acide α_1 du sérum humain a été préparée suivant le mode opératoire décrit plus haut (voir p.186).

2 - Hydrolyse partielle par les échangeurs d'ions

Nous avons effectué des hydrolyses cinétiques de l'orosomucoïde par une résine insoluble polystyrène sulfonée (Dowex 50 X 8 ; "mesh" 25-50 ; H⁺) afin de déterminer le temps optimum de libération des oligosaccharides.

200 mg d'orosomucoïde en solution dans 100 ml d'eau dis-

(*) Avec la collaboration de G. STRECKER

(**) Avec la collaboration de B. BAYARD, S. BOUQUELET et G. SPIK.

tillée sont maintenus à 100° C, sous agitation, en présence de 50 ml de résine humide. Des prélèvements sont effectués à des temps déterminés et les hydrolysats sont directement soumis à l'analyse chromatographique.

3 - Isolement des oligosaccharides

L'étude cinétique que nous avons réalisée nous a permis de fixer à 50 mn la durée de l'hydrolyse : dans ces conditions on obtient une quantité maximale d'oligosaccharides,

a) Hydrolyse

2 g d'orosomucoïde, dissous dans 1 litre d'eau distillée, sont hydrolysés pendant 50 mn à 100° C, sous agitation continue, par 500 ml de Dowex 50 X 8 ("mesh" 20-50 ; H⁺). L'hydrolysats et sa résine sont introduits dans une colonne et cette dernière est lavée par 2 l d'eau distillée.

Les eaux de lavage sont jointes à l'hydrolysats et la solution obtenue est concentrée à l'évaporateur rotatif.

b) Fractionnement des oligosaccharides

Le fractionnement des oligosaccharides est effectué par les procédés suivants :

I - Chromatographie préparative sur papier. La solution d'oligosaccharides est déposée en un trait continu sur toute la largeur d'une feuille de papier Whatman n°3. La chromatographie est effectuée à l'aide des systèmes solvants suivants :

Solvant n° I : n-butanol/acide acétique/eau (4 : I : 5)
(PARTRIDGE) (463) ; durée de la chromatographie :
6 jours.

Solvant n° 2 : n-butanol/éthanol/eau (40 : II : 19)
(HOUGH, JONES et WADMAN) (464) ; durée de
la chromatographie : 5 jours.

2 - Chromatographie sur des colonnes de charbon-Celite. Les monosaccharides et les oligosaccharides sont fractionnés par chromatographie d'adsorption sur charbon Celite (WHISTLER et DURSO) (465). Le support de chromatographie est obtenu en mélangeant des quantités égales de charbon et de Celite sous forme d'une poudre homogène qui est alors mise en suspension dans de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'une pâte liquide. Ce mélange est ensuite introduit dans une colonne de verre : environ 100 ml de suspension pour 1 g de glucides. Un écoulement régulier est assuré par l'emploi d'une pompe péristaltique, placée au sommet de la colonne. Après le passage de la solution

aqueuse de glucide (I p. 100), la colonne est tout d'abord rincée par 4 litres d'eau distillée. La désorption des oligosaccharides est assurée grâce à un gradient discontinu d'éthanol de concentration croissante : 1,5 3,5 5 7,5 10 15 25 et 50 p. 100 (4 litres de chacune de ces solutions). Chaque fraction est évaporée à siccité et étudiée par chromatographie sur papier.

4 - Etude de la structure des oligosaccharides

a) Composition centésimale et molaire en glucides

La composition centésimale en monosaccharides "neutres", osamines et acides sialiques, a été déterminée par l'application des méthodes colorimétriques décrites précédemment p. 69.

L'identification des monosaccharides "neutres", des osamines et des acides sialiques ainsi que la détermination de leur composition molaire ont été réalisées après hydrolyse de l'oligosaccharide par l'application des méthodes chromatographiques décrites précédemment p. 71 .

b) Identification du monosaccharide terminal réducteur

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

c) Perméthylation

Les oligosaccharides ont été perméthylés par la méthode de KUHN, BAER et GAUHE (466) décrite précédemment p. 80 . L'identification des monosaccharides méthylés est réalisée par chromatographie sur papier dans le système solvant de PETEK et DONG (467) après hydrolyse chlorhydrique de l'oligosaccharide perméthylé.

B - RESULTATS

I - La chromatographie sur colonne de charbon-Celite (élution par l'éthanol à 3,5 p. 100) associée à la chromatographie préparative sur papier

dans le système solvant n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) nous a permis d'isoler, dans les hydrolysats partiels de l'orosomucoïde, deux oligosaccharides dont les comportements chromatographiques sont identiques à ceux des mannobioses I et II d'ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (468)(Fig.56 p.210) et dont les $R_{Galactose}$ sont respectivement les suivants : 0,68 à 0,70-0,59 à 0,63.

2 - Les dosages colorimétriques et chromatographiques des oses, avant et après réduction, montrent qu'il s'agit dans tous les cas de mannobioses.

3 - Dans les hydrolysats acides des perméthyl-mannobioses nous avons identifié les O-méthyl-mannoses suivants :

Perméthyl-mannobiose I : 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-
2,3,4-tri-O-méthyl-
Perméthyl-mannobiose II: 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-
2,4,6-tri-O-méthyl-

Les séquences de ces deux disaccharides sont donc les suivantes :

Mannobiose I : Man I \rightarrow 6 Man
Mannobiose II : Man I \rightarrow 3 Man

C - DISCUSSION

I - L'identification de mannobioses dans les hydrolysats partiels de l'orosomucoïde implique la présence, dans les fractions glucidiques de ces glycoprotéines, de séquences mannose-mannose. Celles-ci avaient déjà été caractérisées dans l'ovomucoïde (MONTREUIL et al.) (469), (ADAM-CHOSSON et MONTREUIL) (470), (CHOSSON et al.) (471), mais leur existence n'avait pas encore été démontrée dans l'orosomucoïde. Jusqu'à présent, de nombreux schémas de structure de la fraction glucidique de cette glycoprotéine ont été proposés dans lesquels ce type de séquence ne figure pas (EYLAR et JEANLOZ) (472), (BARKER et al.) (473), (SATO et al.) (474), (WAGH et al.) (475).

2 - Nous avons vérifié que les mannobioses présents dans les hydrolysats n'étaient pas le résultat de réactions de transosidation à partir du mannose. En effet, les mannobioses sont absents sur les chromatogrammes de solutions de mannose traitées par le Dowex 50, dans les conditions d'hydrolyse partielle de la glycoprotéine. En outre, l'autoradiographie des hydrolysats par le Dowex 50 de l'orosomucoïde effectués en présence de ^{14}C -glucose ne révèle l'existence d'aucun oside radioactif.

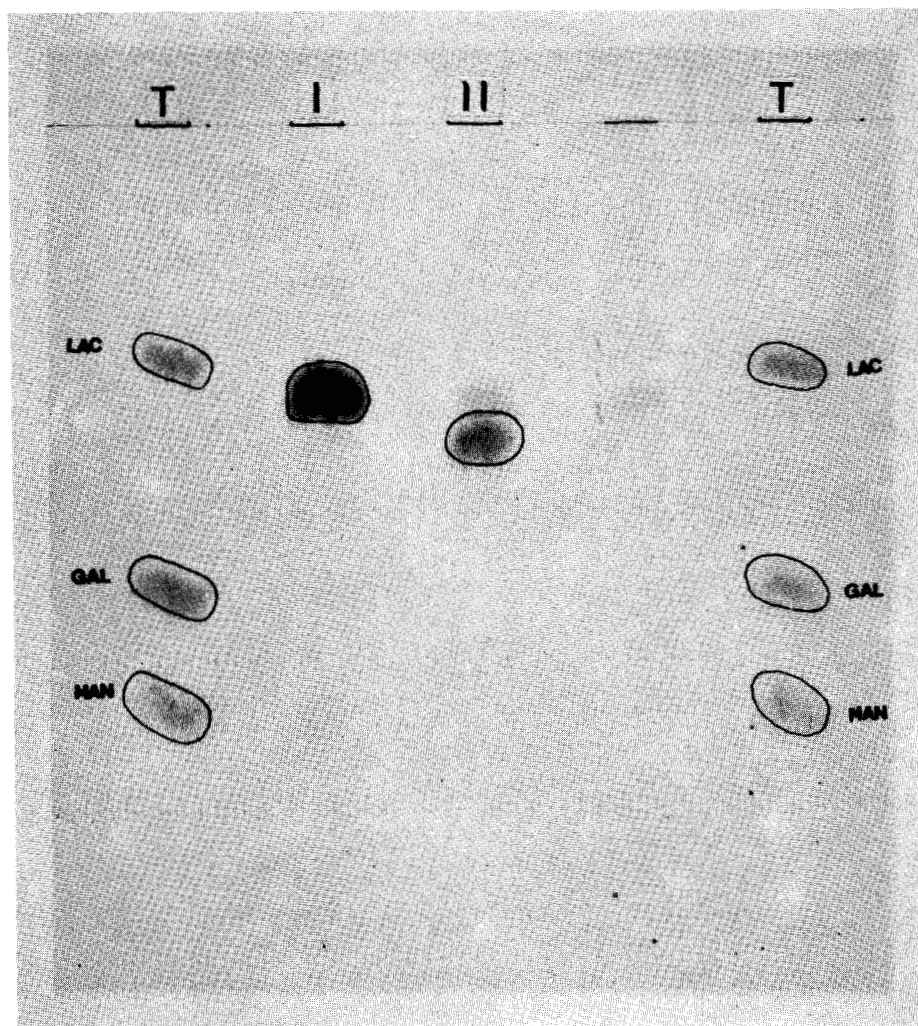


Figure 56

Chromatographie sur papier des mannobioses I et II isolés des hydrolysats partiels de l'orosomucoïde. Papier Whatman n° 3; système solvant : n-butanol/ acide acétique/eau (4 : 1 : 5); révélation à l'oxalate d'aniline; T : solution témoin de sucre; Lac : lactose; Gal : galactose; Man : mannose.



3 - La présence de mannobioses possédant le comportement chromatographique des mannobioses I et II a été observée dans des hydrolysats partiels de transferrine et de lactotransferrine humaine (SPIK) (476). Ce résultat transparait dans les structures des glycopeptides de la transferrine proposées par JAMIESON (477) et nous-mêmes (voir p. 204). En outre, un mannobiose a été isolé des hydrolysats sulfuriques de la macroglobuline du plasma humain, de la fétuine et de la thyroglobuline (DUNN et SPIRO) (478). Enfin, des schémas de structure dans lesquels figurent des séquences oligomannosidiques ont été proposés pour différents glycoprotides : ovalbumine (MONTGOMERY et al.) (479), globulines du myélome (DAWSON et CLAMP) (480), glycopeptides isolés de microsomes de foie de Rat (LI et al.) (481), taka-amylase A (MATSUSHIMA et al.) (482). L'ensemble de ces résultats renforce l'hypothèse de l'existence de motifs structuraux identiques dans les fractions glucidiques de nombreuses glycoprotéines.

II - STRUCTURES D'OLIGOSACCHARIDES DE GROUPES SANGUINS ISOLES DES URINES DE SUJETS NORMAUX

Nous avons participé à un travail concernant la structure d'oligosaccharides isolés d'urines normales après une épreuve de galactosurie provoquée. Cette étude, entreprise au laboratoire par G. STRECKER, montre que cette oligosaccharidosurie induite est liée à la nature du groupe sanguin des individus.

A - MATERIEL ET METHODES

I - Epreuve de galactosurie provoquée

Les épreuves de galactosurie provoquée ont été pratiquées chez les adultes selon le protocole suivant : 40 g de galactose, en solution aqueuse à 10 p. 100, sont absorbés per os et les urines sont recueillies heure par heure durant les 8 heures qui suivent. Les échantillons urinaires, additionnés d'un mélange de chloroforme et de toluène, sont entreposés 24 h à 2° C.

2 - Fractionnement des extraits urinaires

Les urines ont été fractionnées selon le procédé de STRECKER et al. (483) : l'urine filtrée est passée sur une paire de colonnes de résines échangeuses de cations (Dowex 50 X 8 ; "mesh" 25-50; H⁺; 2 X 40 cm) et d'anions (Duolite A IO2D ; "mesh" 25-50; HCO₂⁻; 2 X 40 cm). Après rinçage des résines par 200 ml d'eau, la solution effluente est passée sur une

colonne de charbon Celite (2 X 10 cm) qui est rincée par 500 ml d'eau. Les oligosaccharides sont ensuite élués de la colonne par des solutions aqueuses d'éthanol à 3,5- 7,5 et 50 p. 100 (v:v). Les fractions éthanoliques sont concentrées sous vide.

L'analyse chromatographique des glucides urinaires a été effectuée sur papier Whatman n° 3 à l'aide des systèmes solvants suivants :

Solvant n° 1 : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5)
(PARTRIDGE) (484).

Solvant n° 2 : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau
(5 : 5 : 1 : 3) (FISHER et NEBEL) (485).

Les révélations ont été effectuées à l'aide du réactif à l'oxalate d'aniline.

3 - Etude de la structure des oligosaccharides

a) Composition centésimale et molaire en glucides

La composition centésimale en glucides des oligosaccharides urinaires a été déterminée par l'application des méthodes colorimétriques décrites p. 69. La composition molaire en glucides a été déterminée après hydrolyse chlorhydrique par l'application des méthodes chromatographiques décrites précédemment p. 71.

b) Identification du monosaccharide terminal réducteur

L'identification du monosaccharide terminal réducteur des oligosaccharides a été déterminée selon le protocole expérimental décrit p. 208.

c) Perméthylation des oligosaccharides

La perméthylation des oligosaccharides urinaires (3 mg) a été effectuée par la méthode de KUHN et al. (486) (1 cycle) suivie de 2 cycles par la technique de HAKOMORI.

Les éthers méthyliques des hexasamines et des monosaccharides "neutres" sont obtenus par électrophorèse préparative de l'hydrolysate de l'oligosaccharide perméthylé.

Les osamines méthylées sont analysées après triméthylsilylation par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de Silicone OV 17. Les éthers méthyliques des monosaccharides "neutres" sont analysés, après méthyl-glycosilation, par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de Carbowax 6000. La température du four est programmée de 130 à 190° C (2° C/mm).

B. - RESULTATS

1 - Mise en évidence d'une oligosaccharidosurie au cours de l'épreuve de galactosurie provoquée

STRECKER(487) a montré que l'épreuve de galactosurie provoquée est responsable d'une augmentation du taux de glucides libres de l'urine. Cette augmentation est due essentiellement à l'élimination de galactose et de deux oligosaccharides qui étaient absents de l'urine normale. L'élimination maximale de galactose se situe entre 1 et 2 h, tandis que l'élimination des oligosaccharides est maximale au bout de la 4^e h.

2 - Influence de la nature du groupe sanguin

Des épreuves de galactosurie provoquée ont été pratiquées chez les sujets sains de groupe sanguin connu : 2 sujets A Lewis(a-b+) sécréteurs, 2 sujets A Lewis(a-b-) sécréteurs, 1 sujet A Lewis(a+b-) non sécréteur, 2 sujets B Lewis(a-b+) sécréteurs, 2 sujets O Lewis(a-b+) sécréteurs et 1 sujet O Lewis(a+b-) non sécréteur. STRECKER (488) a pu démontrer que l'apparition de nouveaux oligosaccharides est fonction du groupe sanguin du sujet (Fig.57 ;p.214).

Les sujets sécréteurs éliminent des quantités plus importantes d'oligosaccharides que les sujets non sécréteurs. Chez les sujets sécréteurs, la nature des nouveaux oligosaccharides varie avec la nature du groupe A, B, O. Chez les sujets A sécréteurs, la présence d'un oligosaccharide de haut poids moléculaire est liée à la nature du groupe Lewis.

3 - Isolement et structure des oligosaccharides

STRECKER (489) a isolé, à partir d'urines de sujets normaux de groupe sanguin A, B et O Lewis(a-b+) sécréteurs, 6 nouveaux oligosaccharides indiqués par une flèche dans la figure 57 (p.214). Ces oligosaccharides proviennent de la fraction 7,5p.100 de la chromatographie sur charbon et ont été purifiés par chromatographie préparative sur papier.

L'oligosaccharide O₁ a été identifié au O-L-fucopyranosyl-(1→2)-D-galactopyranose de la manière suivante : il est constitué, en proportion équimolaire de L-fucose et de D-galactose. Ce dernier disparaît totalement après réduction par le borohydrure de sodium.

L'hydrolysât du dérivé perméthylé contient du 2,3,4-tri-O-méthyl-fucose et du 3,4,6-tri-O-méthyl-galactose.

L'oligosaccharide A₁ est le O-2-acétamido-2-désoxy-D-galactopyranosyl-(1→3)-[O-L-fucopyranosyl-(1→2)]-D-galactopyranose en effet :

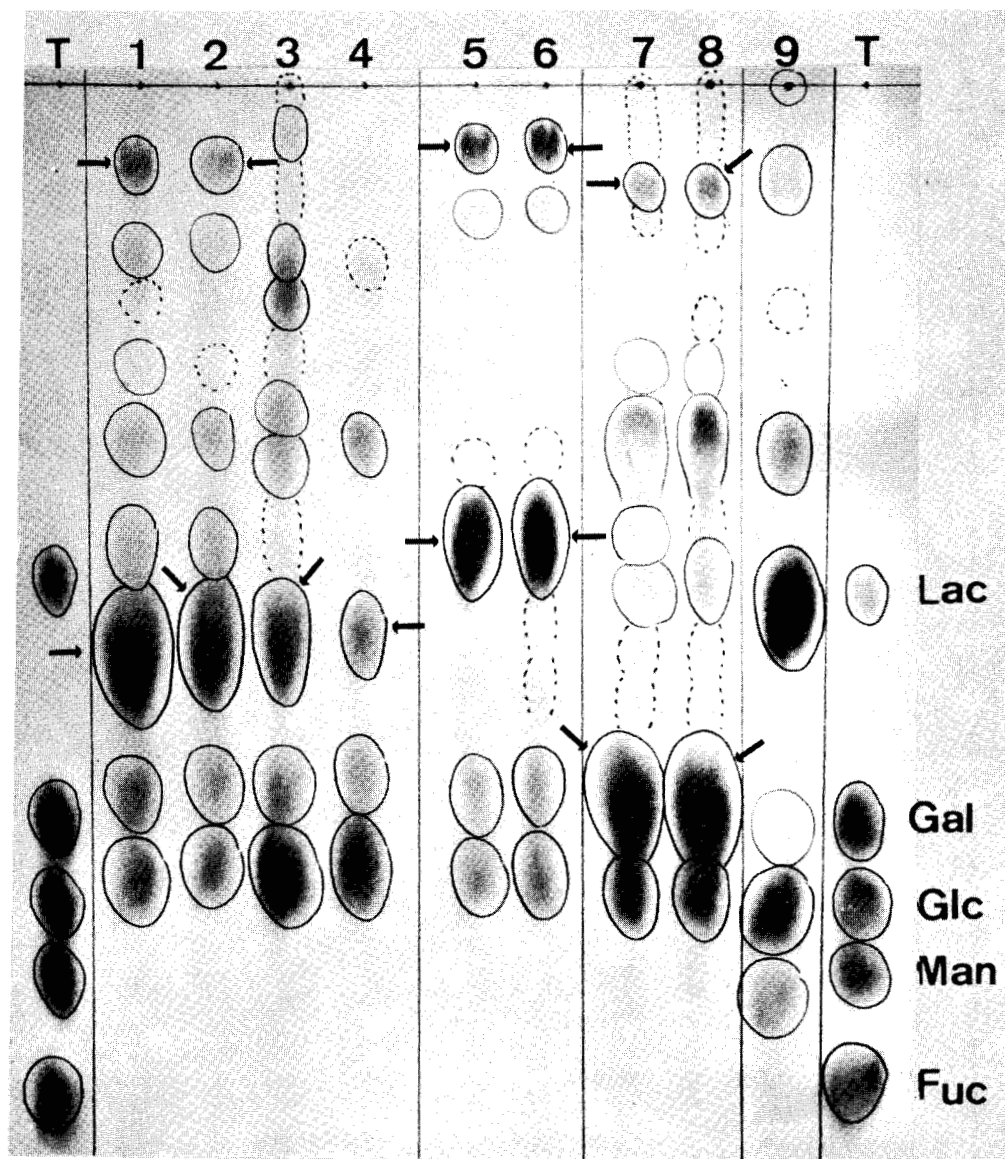


Figure 57

Chromatographie sur papier de la fraction oligosaccharidique urinaire éluée de colonne de charbon par l'éthanol à 7,5 p. 100, obtenue chez les sujets ayant subi une épreuve de galactosurie provoquée. Conditions de la chromatographie : papier Whatman n°3; système solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3), 20 heures; révélation à l'oxalate d'aniline. Les flèches indiquent les oligosaccharides absents de l'urine normale. T : solution témoin de sucres purs; Raf : raffinose; Lac : lactose; Sac : saccharose ; Gal : galactose; Glc : glucose. Echantillons urinaires de sujets respectivement de groupe 1 et 2 : A Lewis (a-b+) sécréteur; 3 et 4 : A Lewis (a-b-) sécréteur; 5 et 6 : B Lewis (a-b+) sécréteur; 7 et 8 : O Lewis (a-b-) sécréteur; 9 : O Lewis (a+b-) non sécréteur.



il est constitué en proportions équimolaires de D-galactosamine, de L-fucose et de D-galactose. La réduction par le borohydrure de sodium fait disparaître le résidu de D-galactose.

après perméthylation et hydrolyse de l'oligosaccharide perméthylé, on identifie la 3,4,6-tri-O-méthyl-galactosamine, le 2,3,4-tri-O-méthyl-fucose et le 4,6-di-O-méthyl-galactose.

L'oligosaccharide B₁ constitué de galactose et de fucose dans le rapport 2:1 est le O-D-galactopyranosyl-(1→3)-[O-L-fucopyranosyl-(1→2)]-D-galactopyranose en effet :

la réduction par le borohydrure de sodium fait disparaître un résidu de galactose sur les 2 que contient l'oligosaccharide.

la perméthylation fournit le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactose, le 2,3,4-tri-O-méthyl-fucose ainsi que le 4,6-di-O-méthyl-galactose.

Nous ne sommes pas encore en mesure de donner les structures des trois derniers oligosaccharides. Toutefois, les premiers résultats indiquent que nous devons nous trouver devant des molécules isomères.

L'oligosaccharide O₂ est un hexasaccharide :

il est constitué de 3 résidus de L-fucose, 2 résidus de D-galactose et 1 résidu de N-acétyl-D-glucosamine. La réduction par le borohydrure de sodium fait disparaître un résidu de galactose sur les 2 que contient l'oligosaccharide.

la perméthylation fournit la 6-mono-O-méthyl-glucosamine, le 2,3,4-tri-O-méthyl-fucose, le 3,4,6-tri-O-méthyl-galactose et le 2,3-di-O-méthyl-galactose.

L'oligosaccharide A₂ diffère de l'oligosaccharide O₂ par la présence d'un résidu de N-acétyl-D-galactosamine. C'est donc un heptasaccharide;

la perméthylation fournit la 3,4,6-tri-O-méthyl-galactosamine, la 6-mono-O-méthyl-glucosamine, le 2,3,4-tri-O-méthyl-fucose et les 2,3 et 4,6-di-O-méthyl-galactoses.

L'oligosaccharide B₂, diffère de l'oligosaccharide A₂ par un résidu de galactose qui remplace le résidu de N-acétyl-galactosamine. Les résultats de la perméthylation sont donc identiques, si ce n'est l'identification du perméthyl-galactose et la disparition de la perméthyl-galactosamine.

Nous avons rassemblé, dans le tableau XXIV p. 216, les résultats des analyses chromatographiques des éthers méthyliques libérés par hydrolyse des oligosaccharides perméthylés.

TABLEAU XXIV

Identification par chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques présents dans les hydrolysats des oligosaccharides O₁, A₁, B₁, O₂, A₂ et B₂ perméthylés.

Ethers méthyliques des monosaccharides neutres (*)	t r	Oligosaccharides					
		O ₁	A ₁	B ₁	O ₂	A ₂	B ₂
2,3,4-tri- <u>O</u> -méthyl- <u>L</u> -fucose	0,61	+	+	+	+	+	+
2,3,4,6-tétra- <u>O</u> -méthyl- <u>D</u> -galactoside	1			+			+
3,4,6-tri- <u>O</u> -méthyl- <u>D</u> -galactoside	1,45	+			+		
4,6-di- <u>O</u> -méthyl- <u>D</u> -galactoside	2,12		+	+		+	+
2,3-di- <u>O</u> -méthyl- <u>D</u> -galactoside	2,87				+	+	+
Ethers méthyliques des méthyl-osamines (* *)	t r						
3,4,6-tri- <u>O</u> -méthyl- <u>D</u> -galactosamine	1		+			+	
6-mono- <u>O</u> -méthyl- <u>D</u> -glucosamine	1,73 1,89				+	+	+

(*) Colonne de verre (0,3 x 300cm) : Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) à 3 p. 100 de Carbowax 6000; température programmée de 130 à 190°C (2°C/mn); débit du gaz vecteur 30 ml/mn ; temps de rétention relatif au méthyl 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-galactoside.

(* *) Colonne de verre (0,3x180cm): Chromosorb W AW HMDS ("mesh"100-120) à 3 p. 100 de Silicone OV 17; température de la colonne : 120°C;débit du gaz vecteur : 20 ml/mn;temps de rétention relatif à la 3,4,6-tri-O-méthyl-D-galactosamine.



C - DISCUSSION

L'épreuve de galactosurie provoquée est à l'origine d'une oligosaccharidosurie dont l'existence est étroitement liée aux phénotypes ABH, Lewis et sécréteur du sujet. L'étude de ces 6 nouveaux oligosaccharides obtenus par fractionnement des urines sur colonne de charbon Celite va nous permettre d'établir les relations entre leur structure et leurs propriétés immuno-chimiques et ainsi confirmer ou infirmer les principes, actuellement établis par WATKINS et MORGAN (490) et par KABAT et al. (491), qui permettent de connaître les structures d'oligosaccharides suivant leurs activités de groupes sanguins.

III - STRUCTURES DES OLIGOSACCHARIDES ISOLEES DES ACETOLYSATS DE GLYCOPEPTIDES DE L'OVOMUCOÏDE

L'acétolyse des glycanes des glycopeptides a été étudiée au laboratoire par BAYARD et MONTREUIL (492). Ces auteurs ont décrit un procédé général de fractionnement par chromatographie sur résine échangeuse d'ions des acétolysats de polysaccharides libres ou conjugués qui fournit, dans le cas particulier de sialo-glycopeptides, trois séries de composés : des sialo-oligosaccharides, des oligosaccharides neutres et des glycoprotides correspondant respectivement, aux parties externes, centrales et internes des glycanes. En ce qui nous concerne, nous avons participé à la détermination des structures de 13 oligosaccharides isolés de la fraction neutre des acétolysats de glycopeptides β de l'ovomucoïde (BAYARD, FOURNET, BOUQUELET, STRECKER, SPIK et MONTREUIL) (493).

A - MODE OPERATOIRE

1 - Acétolyse du glycopeptide β de l'ovomucoïde (*)

Le glycopeptide de l'ovomucoïde préparé selon le protocole expérimental décrit précédemment (voir p.68) a été acétolysé pendant 4 jours puis saponifié par le méthylate de sodium selon le mode opératoire décrit par BAYARD et MONTREUIL (494).

2 - Fractionnement des produits de l'acétolyse

BAYARD et MONTREUIL (495) fractionnent les acétolysats du glycopeptide β de l'ovomucoïde, préalablement saponifiés, par chromatographie sur Dowex 50x2 ("mesh" 100-120; H⁺). On obtient de cette manière une fraction effluente "neutre" qui contient les oligosaccharides neutres (12g pour 25g de glycopeptide) et une fraction "basique", élue de l'échangeur de cations par

(*) L'acétolyse et l'isolement des oligosaccharides ont été effectués par B. BAYARD.

de l'ammoniaque à 0,5p.100 (v:v) et contenant des glycopeptides qui correspondent aux séquences glucidiques situées au voisinage du point d'attache avec la chaîne peptidique.

3 - Fractionnement des oligosaccharides de la fraction "neutre"

Les oligosaccharides de la fraction "neutre" ont été fractionnés par chromatographie d'adsorption sur colonnes de charbon Celite (4 x 50cm pour 12g de fraction "neutre") selon le procédé de WHISTLER et DURSO (496). Les monosaccharides et les oligosaccharides sont élués par passage de solutions aqueuses de concentrations croissantes en éthanol. Les oligosaccharides présents dans chaque fraction sont isolés par chromatographie préparative sur papier Whatman n°3 dans les systèmes solvants suivants :

Solvant n°1 : alcool butylique/acide acétique/eau (4:1:5)
(durée de la chromatographie : 1 à 4 jours)

Solvant n°2 : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau
(5:5:1:3) (durée de la chromatographie : 1 à 2 jours).

Dans quelques cas particuliers, nous avons utilisé l'électrophorèse préparative sur papier Whatman n°3 dans les conditions suivantes : tampon borate de sodium (1p.100 p/v d'eau distillée) de pH 9,2 ; cuve d'électrophorèse en toit ; 7 V/cm pendant 4h.

4 - Etude de la structure des oligosaccharides

a) Composition centésimale et molaire en glucides

La composition centésimale en monosaccharides a été déterminée par l'application des méthodes colorimétriques décrites précédemment p.69. L'identification de ces monosaccharides ainsi que la détermination de la composition molaire ont été réalisées après hydrolyse de l'oligosaccharide, par l'application des méthodes chromatographiques décrites p.71.

b) Identification du monosaccharide terminal réducteur

L'identification du monosaccharide terminal réducteur des oligosaccharides a été déterminée selon le protocole expérimental décrit p.208.

c) Détermination de la masse moléculaire des oligosaccharides

La masse moléculaire de chaque oligosaccharide a été déterminée par gel filtration (BHATTI et CLAMP) (497) (colonne de Séphadex G 25 fine, 130 x 1,8cm; élution avec le tampon NaCl 0,15 M; fractions de 2 ml en 10 mm).

d) Perméthylation

Les oligosaccharides ont été perméthylés par la méthode de KUHN et al. (498) décrite précédemment p. 80. Les monosaccharides méthylés, libérés par hydrolyse chlorhydrique sont identifiés selon les procédés suivants : chromatographie en phase gazeuse des O-acétyl-O-méthyl-arabinitols formés par

désamination oxydative des méthyl-osamines par la ninhydrine (voir p. 107), chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides des monosaccharides neutres méthylés (voir p.130).

e) Hydrolyse enzymatique des oligosaccharides (*)

Nous avons utilisé les glycosidases suivantes : β -D-galactosidase (E.C. 3.2.1.23) de la rate Boeuf (BUDDECKE et WERRIES) (499); α -D-galactosidase (E.C. 3.2.1.22) des graines de Fenugrec (BEAUGIRAUD et al.) (500); α -D-mannosidase (E.C. 2.2.1.24) de la fève Jack (LI) (501); N-acétyl- β -D-glucosaminidase (E.C. 3.2.1.30) de la fève Jack (LI et LI) (502). L'hydrolyse des oligosaccharides (2 mM) a été effectuée en présence de 0,1 à 1 unité d'enzyme, à 37°C pendant 48h, dans un tampon citrate de sodium 0,01M-phosphate disodique 0,1M de pH 4,6 pour la β -D-galactosidase et pour l' α -D-mannosidase, de pH 5,4 pour la N-acétyl- β -D-glucosaminidase et de pH 5,5 pour l' α -D-galactosidase. Après arrêt de l'action des enzymes par chauffage à 70°C pendant 1 à 2 mn, les monosaccharides libérés ont été dosés par réductimétrie (MONTREUIL et SCHEPPLER) (503) et la N-acétyl-D-glucosamine, par colorimétrie à l'aide d'un réactif au borate p-diméthyl-amino-benzaldéhyde (GOOD et BESSMAN) (504), après purification des hydrolysats sur Dowex 50x8 puis sur Duolite A-102D

f) Action du chlorure de triphényltétrazolium

Pour confirmer, dans les oligosaccharides C,E et F, la substitution de l'hydroxyle en position 2 du résidu de mannose placé en position terminale réductrice, nous avons utilisé le réactif au chlorure de triphényltétrazolium de TREVELYAN et al. (505).

B - RESULTATS

1 - Isolement des oligosaccharides

La chromatographie sur colonne de charbon Celite associée à la chromatographie et à l'électrophorèse préparative sur papier ont permis à BAYARD et MONTREUIL (506) d'isoler de la fraction "neutre" des acétolysats de glycopeptides β de l'ovomucoïde 13 oligosaccharides numérotés de A à M. Tous ces oligosaccharides sont homogènes en chromatographie et en électrophorèse. Cette homogénéité est confirmée par les résultats que nous obtenons par perméthylation de ces oligosaccharides.

2 - Structure des oligosaccharides

La structure complète des 13 oligosaccharides a été déterminée sur la base des résultats expérimentaux suivants :

(*) Les hydrolysés enzymatiques ont été effectués par S. BOUQUELET.

1 - Tous les oligosaccharides possèdent le D-mannose en position terminale réductrice, à l'exception de l'oligosaccharide B dans lequel cette position est occupée par la N-acétylglucosamine.

2 - L'hydrolyse des oligosaccharides perméthylés contenant de la N-acétyl-D-glucosamine fournit toujours du 1,4-di-O-acétyl-2,3,5-tri-O-méthyl-arabinitol correspondant au produit de la désamination oxydative, réduit et peracétylé de la 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine (Fig.58;p.221), à l'exception de l'oligosaccharide B qui donne du 1,3,4-tri-O-acétyl-2,5-di-O-méthyl-arabinitol correspondant à la 3,6-di-O-méthyl-glucosamine. Dans tous ces oligosaccharides, la N-acétyl-D-glucosamine se trouve donc en position terminale non réductrice.

3 - Les résultats particuliers sont les suivants :

(Le tableau XXVp.222 indique les temps de rétention des éthers méthyliques des monosaccharides neutres par rapport au méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl- α -D-mannoside obtenus par hydrolyse acide des 13 oligosaccharides).

- L'oligosaccharide A a été identifié au O-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 4)-D-mannopyranose de la manière suivante :

Il est constitué, en proportions équimolaires, de N-acétyl-D-glucosamine et de D-mannose. Ce dernier disparaît totalement après réduction par le borohydrure de sodium et il apparaît du mannitol. L'oligosaccharide est hydrolysé par la N-acétyl- β -D-glucosaminidase de la Fève Jack.

L'hydrolysats du dérivé perméthylé contient de la 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine et du 2,3,6-tri-O-méthyl-mannose.

- L'oligosaccharide B a été identifié à la N-acétyllactosamine ou O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranose.

L'hydrolysats du dérivé perméthylé contient du perméthyl-galactose et de la 3,6-di-O-méthyl-glucosamine.

Il est totalement hydrolysé par la β -D-galactosidase de la rate de Boeuf.

Cet oligosaccharide a été isolé par ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (507) des hydrolysats partiels de l'ovomucoïde.

- L'oligosaccharide C est le O-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-mannopyranose. Il possède, en effet, les mêmes caractéristiques que l'oligosaccharide A, à la différence près qu'il fournit après méthylation du 3,4,6-tri-O-méthyl-mannose (identifié sous la forme de son dérivé méthylglycosilé et, après oxydation periodique, réduction et péracétylation, il fournit du 1,4-di-O-acétyl-2,3,5-tri-O-méthyl-arabinitol). En outre, il donne une réaction négative avec le chlorure de triphényltétrazolium.

- L'oligosaccharide D est le mannosido-1,3 mannose ou O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannopyranose. Cette structure a été définie sur la base des résultats

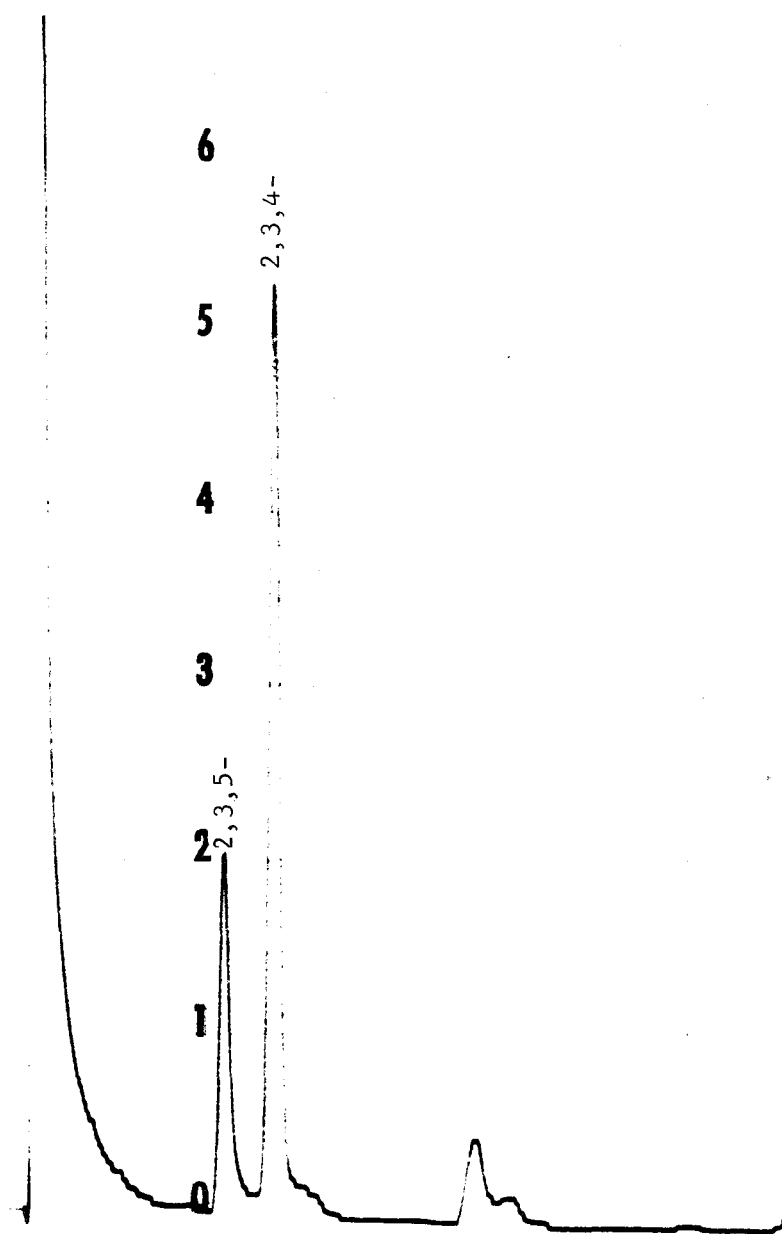


Figure 58

Chromatographie en phase gazeuse des O-acétyl-O-méthyl-D-arabinitols formés par désamination oxydative des dérivés O-méthylés de la D-glucosamine obtenus par hydrolyse acide des oligosaccharides A,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L et M.

Colonne (0,3 x 180cm) de Chromosorb W ("mesh" 60-80) contenant 10 p. 100 de LAC 4R-886; température du four 200°C; débit du gaz vecteur (He) : 20 ml/mn;

2,3,5 = 1,4-di-O-acétyl-2,3,5-tri-O-méthyl-D-arabinitol;

2,3,4 = 1,5-di-O-acétyl-2,3,4-tri-O-méthyl-D-arabinitol : témoin interne.



TABLEAU XXV

Identification par chromatographie en phase gazeuse (*) des éthers méthyliques des monosaccharides neutres présents dans les hydrolysats des oligosaccharides A à M perméthylés.

Ethers méthyliques	t _r (**)	Oligosaccharides														
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M		
2,3,4,6-tétra-O-méthyl-mannoside	1				+											
2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactoside	1,21		+													
3,4,6-tri-O-méthyl-mannoside	2,31			+												
2,4,6-tri-O-méthyl-mannoside	2,71				+				+							
2,3,6-tri-O-méthyl-mannoside	3,67								+							+
3,6-di-O-méthyl-mannoside	8,38															
2,6-di-O-méthyl-mannoside	9,29															+
4,6-di-O-méthyl-mannoside	10,61															+

(*) Colonne de verre (0,3 x 300cm) : Chromosorb W AW HMDS ("mesh" 60-80) à 3 p. 100 de Carbowax 6000; température : 170°C; débit du gaz vecteur (azote) : 30 ml/mn .

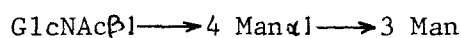
(**) Temps de rétention relatif au méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl- α -D-mannoside .



est hydrolysé par la N-acétyl-β-D-glucosaminidase de la Fève Jack en N-acétylglucosamine et en mannose. Il n'est pas révélé par le réactif au chlorure de triphényltétrazolium.

La méthylation fournit de la 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine et du 3,6-di-O-méthyl-mannose.

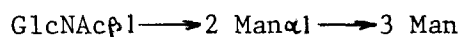
- L'oligosaccharide G est le 0-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-O-α-D-mannopyranosyl-(1 → 3)-D-mannopyranose.



Le mannose et la glucosamine sont dans les rapports 2 : 1. La moitié des résidus du mannose est éliminée par réduction. La masse moléculaire déterminée par chromatographie sur Séphadex est de 540 (masse calculée : 545). L'acétolyse conduit à un mélange des oligosaccharides A et D. La N-acétyl-β-D-glucosaminidase de la Fève Jack libère de la N-acétylglucosamine et le manno-biose D.

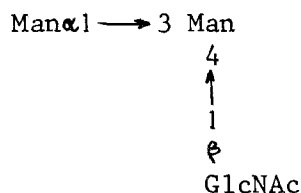
La perméthylation de l'oligosaccharide conduit à la perméthyl-glucosamine et aux 2,3,6- et 2,4,6-tri-O-méthyl-mannoses .

- L'oligosaccharide H diffère de l'oligosaccharide G par la conjugaison du résidu de la N-acétyl-D-glucosamine en position C-2 au lieu de la position C-4 sur le résidu de D-mannose médian. C'est donc le 0-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1 → 2)-O-α-D-mannopyranosyl-(1 → 3)-D-mannopyranose.



La perméthylation fournit la 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine et les 3,4,6- et 2,4,6-tri-O-méthyl-mannoses.

- L'oligosaccharide I est un isomère des deux trisaccharides G et H précédents dans lequel le résidu de N-acétyl-D-glucosamine est conjugué sur le résidu de D-mannose terminal réducteur. Il s'agit du 0-α-D-mannopyranosyl-(1 → 3)-[0-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranose-(1 → 4)]-D-mannopyranose.



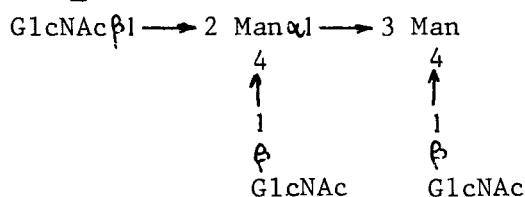
L'acétolyse fournit les oligosaccharides A et D. L'hydrolyse par la N-acétyl-β-D-glucosaminidase de la Fève Jack, libère de la N-acétylglucosamine et le manno-biose D.

La perméthylation conduit à la perméthyl-glucosamine et aux 2,3,4,6-tétra- et 2,6-di-O-méthyl-mannoses.

- L'oligosaccharide J est le 0-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-

l'oligosaccharide J, à la différence près suivante : la perméthylation fournit outre la 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine, les 2,3,6-tri-et 2,6-di-O-méthyl-mannoses.

- L'oligosaccharide M possède le schéma de structure du O-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-[O-2-acétamido-2-désoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-O-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)]-D-mannopyranose.



Cette structure a été déterminée de la manière suivante :

Les résidus de N-acétylglucosamine et de mannose sont dans le rapport 3 : 2. La réduction par le borohydrure de sodium fait disparaître la moitié de la quantité de mannose. La masse moléculaire déterminée par gel filtration sur Séphadex est de 930(masse calculée pour un pentasaccharide : 950). L'hydrolyse par la N-acétyl-β-D-glucosaminidase de la Fève Jack libère de la N-acétyl-glucosamine et le disaccharide D. L'acétolyse libère les trisaccharides G, H et I et les tétrasaccharides J, K et L.

La perméthylation fournit de la 3,4,6-tri-O-méthyl-glucosamine et les 3,6- et 2,6-di-O-méthyl-mannoses.

C - DISCUSSION

1- L'application des techniques de perméthylation des molécules glucidiques et d'identification des éthers méthyliques que nous avons décrits dans la première partie de notre mémoire nous a permis de confirmer les structures des 13 oligosaccharides isolés de la fraction "neutre" des acétolysats de glycopeptides β de l'ovomucoïde.

2- Les résultats que nous avons obtenus ne sont pas interprétables du point de vue de la connaissance de la structure de la fraction glycannique de l'ovomucoïde. En effet, il est impossible de reconstituer quelque structure que ce soit à partir de trop nombreux fragments oligosaccharidiques que nous avons isolés. Tout au plus pourrions nous faire figurer dans le schéma la formule du pentasaccharide M sans toutefois pouvoir préciser sa position au sein du glycanne. Comme nous l'avions vu plus haut (voir p.185), ces oligosaccharides proviennent de deux variants de l'ovomucoïde (asialo-

ovomucoïde 1 et 2); comme chaque variant renferme 2 glycannes, c'est donc sur un mélange de 4 glycopeptides que nous devrions essayer de reconstituer ce puzzle à partir des oligosaccharides dont nous avons déterminé la structure. Ceci est illusoire car rien ne prouve à priori que la structure de ces quatre glycannes soit identique.

3- Ces oligosaccharides nous ont été extrêmement précieux car ils nous ont fourni des éthers méthyliques du mannose.

IV - CONCLUSIONS

Les conclusions que nous pouvons tirer de l'étude que nous avons effectuée sur la structure d'oligosaccharides isolés de divers milieux sont les suivantes :

1- L'application de la perméthylation nous a permis de préciser la structure de 18 oligosaccharides isolés des hydrolysats partiels ou des acétolysats de glycoprotéines et de milieux biologiques tel l'urine.

2- L'étude comparée des oligosaccharides isolés des hydrolysats partiels ou des acétolysats de diverses glycoprotéines nous montre, de nouveau, des analogies de structure de la fraction glucidique de ces hétéroprotéides. A l'heure actuelle, il nous est impossible de replacer ces oligosaccharides dans une structure globale. Ce travail sera rendu possible lorsque nous appliquerons ces procédés de rupture séquentielle à des glycannes purs. Ces oligosaccharides constituent des modèles moléculaires qui nous ont permis d'isoler des éthers méthyliques à l'état pur et qui servent actuellement à étudier la spécificité des glycosidases (BOUQUELET) (509).

3- L'étude de la structure des oligosaccharides de l'urine nous ouvre à d'autres problèmes : relation entre structures et activités immunochimiques, origine de ces oligosaccharides dont la synthèse est induite par une épreuve de galactosurie provoquée.

CONCLUSIONS GENERALES

Les recherches que nous avons effectuées nous ont conduits à mettre au point les procédés de perméthylation des glucides dont l'application a permis de déterminer la structure d'oligosaccharides libres ou conjugués : glycannes de la transferrine humaine et de l'ovomucoïde, oligosaccharides isolés des hydrolysats partiels ou des acétolysats de l'ovomucoïde et de l'orosomucoïde, oligosaccharides isolés des urines de sujets normaux. Les travaux concernant ces derniers composés ont été effectués dans le cadre d'un travail d'équipe.

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'ensemble de nos travaux sont les suivantes :

1- Nous avons repris l'étude des divers procédés qui permettent, sans ambiguïté, de conclure à une substitution totale de toutes les fonctions hydroxyles de l'oligosaccharide perméthylé. Le problème est, en effet, capital car une méthylation incomplète peut être la cause de graves erreurs lors de l'interprétation des résultats. De notre étude, nous avons relevé deux procédés rapides de contrôle de la perméthylation : d'une part, l'analyse des oligosaccharides perméthylés de faibles masses moléculaires par chromatographie d'adsorption sur couche mince et d'autre part, l'étude des spectres Infra-Rouges des molécules glucidiques perméthylées. Dans le premier cas, nous concluons à la perméthylation quand il n'apparaît plus qu'une seule tache sur les chromatoplaques; dans le second cas, la présence ou l'absence de la bande d'absorption à $3500\text{ }3600\text{ cm}^{-1}$ nous renseigne avec précision sur le degré de substitution des fonctions hydroxyles. Nous n'avons pas utilisé la technique précise du dosage des groupements "méthoxy" car elle n'est pas compatible avec le peu de substrats dont nous disposons. En outre, il est difficile de déterminer à priori le pourcentage de groupements "méthoxy" des glycopeptides perméthylés.

2- Nos études sur les procédés de perméthylation des molécules glucidiques nous ont permis de constater qu'il est rare que la substitution de

toutes les fonctions hydroxyles puisse être réalisée en une seule opération. Généralement, il est nécessaire d'effectuer plusieurs cycles de méthylation. Parmi toutes les méthodes d'alkylation, nous avons retenu le procédé de HAKOMORI qui réalise le mieux la perméthylation. Cette méthode sera associée à celle de KUHN dans le cas de molécules susceptibles de subir des dégradations, principalement les oligosaccharides possédant une extrémité terminale réductrice. En ce qui concerne la perméthylation des glycopeptides, trois cycles successifs de méthylation sont généralement nécessaires pour obtenir une substitution quantitative de toutes les fonctions hydroxyles. Le glycopeptide perméthylé sera enfin purifié par chromatographie de gel filtration sur Séphadex LH 20.

3- La libération des résidus monosaccharidiques du glycopeptide perméthylé soulève les mêmes problèmes que ceux rencontrés pour la molécule native. A ces difficultés s'ajoute celle de la stabilité des fonctions "méthoxy" dans les conditions de l'hydrolyse. Les liaisons osidiques de l'oligosaccharide ou du glycopeptide perméthylés seront libérées par deux procédés : la méthanolyse par le méthanol chlorhydrique N, à 100°C pendant 8 heures, fournit les méthylglycosides des monosaccharides méthylés qui peuvent être directement analysés en chromatographie en phase gazeuse; dans ces conditions nous n'avons remarqué aucune réaction de déméthylation; l'hydrolyse par des solutions d'acide chlorhydrique exempt de fer, de concentration 1,5 N et 4 N qui fournit des résultats parfaitement reproductibles. Il faut toutefois noter que le 2,3,4-tri-O-méthyl L Fucose est partiellement dégradé par l'acide chlorhydrique 4 N.

Nous utilisons la méthanolyse pour les molécules glucidiques uniquement constituées de monosaccharides neutres méthylés.

L'hydrolyse sera préférée dans le cas de molécule possédant à la fois des monosaccharides neutres et des osamines. Ces dernières pourront être fractionnées par électrophorèse préparative et ainsi être identifiées séparément.

4- Nous avons conçu un procédé de fractionnement des éthers méthyliques présents dans les glycopeptides perméthylés qui associe les techniques d'électrophorèse préparative et de chromatographies sur papier, en phase

gazeuse ou sur résine échangeuse de cations. Cette méthode réalise un premier fractionnement des éthers méthyliques des monosaccharides neutres et des méthyl-osamines. Ces dernières peuvent être directement analysées par chromatographie sur résine échangeuse de cations et par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylsilylés ou de leurs produits de désamination par la ninhydrine. Quant aux monosaccharides neutres méthylés, ils sont fractionnés suivant leur degré de substitution et la nature du monosaccharide méthylé par chromatographie préparative sur papier.

La caractérisation des monosaccharides neutres méthylés présents dans chaque fraction est réalisée, non pas par les procédés classiques de déméthylation et d'identification du monosaccharide, mais par identification du ou des composés perméthylés obtenus par alkylation totale des monosaccharides partiellement méthylés.

L'identification des monosaccharides neutres méthylés est réalisée par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés de méthylglycosylation. Dans certains cas (méthyl-2,3,4-et 3,4,6-tri-O-méthyl-mannosides, éthers triméthylés du méthyl-galactoside), il est nécessaire de soumettre les éthers méthyliques, préalablement triméthylsilylés, à une seconde chromatographie en phase gazeuse.

La chromatographie en phase gazeuse résout le problème de l'identification des éthers méthyliques des monosaccharides présents dans les oligosaccharides libres ou conjugués perméthylés. Elle réclame peu de substrats puisqu'elle nous a permis de déterminer la structure de plusieurs oligosaccharides par perméthylation de 3 à 4 mg. Parmi toutes les phases stationnaires commercialisées que nous avons expérimentées, deux ont retenu notre attention. Il s'agit des polyéthylènes glycol de type Carbowax 6000 pour l'analyse des éthers méthyliques des monosaccharides neutres et les phényl-méthyl silicones de type OV 17 pour l'analyse des dérivés triméthylsilylés des osamines. Dans les deux cas, elles seront utilisées à de faibles pourcentages (1 à 5p.100).

5- Les recherches que nous avons effectuées sur la synthèse des éthers méthyliques nous ont apporté les résultats suivants :

a - Chaque fois que cela est possible, il est préférable de faire appel à des substrats de structure connue pour obtenir les mono-

saccharides O-méthylés. Cette voie nous a permis de préparer les éthers méthyliques suivants :

la 3,6-et la 4,6-di-O-méthyl-D-glucosamines, la 4- et la 6-mono-O-méthyl-D-glucosamines, ainsi que le 3,4-di-O-méthyl-D-mannose.

b - Les études cinétiques de méthylation des monosaccharides permettent de préparer des mélanges de dérivés méthylés plus ou moins substitués. Ceux-ci peuvent subir un premier fractionnement par extraction chloroformique qui réalise un partage entre éthers organo-solubles et hydro-solubles. Ces éthers méthyliques ont pu être fractionnés et isolés par chromatographie en phase gazeuse préparative en adaptant à cette technique les conditions opératoires de la chromatographie en phase gazeuse analytique. Lorsque cela est nécessaire, les dérivés triméthylsilylés des éthers méthyliques peuvent être préparés par cette technique : dans ce cas, le dérivé obtenu peut être dé-triméthylsilylé par le méthanol aqueux à reflux.

c - Chaque éther ainsi préparé a été identifié en faisant appel à plusieurs techniques : révélations spécifiques, oxydation periodique, spectrographie de masse et enfin pouvoir rotatoir.

d - Cette méthode nous a permis de préparer rapidement et avec de bons rendements les éthers tétra-, tri- et diméthyliques du méthyl- α -D-mannoside, ainsi que les méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl et 2,3,4-tri-O-méthyl-D-galactosides.

6- L'application de nos techniques à l'étude de la structure d'oligosaccharides libres ou conjugués nous a apporté les résultats suivants :

a - Sur la base des résultats de la perméthylation de l'oxydation périodique, de l'hydrolyse par la neuraminidase, nous avons proposé un schéma de structure des fractions glycaniques de la transferrine humaine.

b - L'étude comparée des glycannes de plusieurs glycoprotéines nous montre des analogies de structure que MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (510) avaient énoncées dès 1962. C'est ainsi que nous avons pu identifier des chaînons communs dans les fractions glucidiques de glycoprotéines telles l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de Poule, la transferrine et l'orosomucoïde du sérum humain.

c - L'association de techniques complémentaires : acétolyse, hydrolyse enzymatique, perméthylation nous a permis d'établir la structure de 13 oligosaccharides isolés de la fraction "neutre" des acétolysats

de glycopeptides β de l'ovomucoïde. Ces résultats ne sont pas encore interprétables du point de vue de la connaissance de la structure de la fraction glycanique de l'ovomucoïde car ces oligosaccharides proviennent d'un mélange de glycopeptides. Toutefois, ils constituent des modèles moléculaires qui servent actuellement à étudier la spécificité des glycosidases. Ces mêmes méthodes nous ont fourni les structures de trois oligosaccharides d'activité de groupes sanguins isolés des urines de sujets normaux. Ces oligosaccharides constituent des modèles moléculaires intéressants pour étudier les relations entre structures et activités immunochimiques.

Nous pouvons donc conclure que nous possédons actuellement les méthodes qui nous permettent de déterminer la structure des fractions glucidiques des glycoprotéines.

Ce stade de technologie dépassé, nous pouvons nous attacher à l'étude complète de la structure de différents glycannes d'une même glycoprotéine ou de molécules différentes. Ces études comparées nous apporteront des renseignements précieux sur la manière dont ces polysaccharides sont biosynthétisés et en particulier sur l'existence d'un codage de cette synthèse.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J. , Bull.Soc.Chim. Biol., 1965,47, 1881, (461,468,470,507).
- ADAMS G.A., YAGUCHI M. et PERRY M.B., Carbohyd.Res.,1970,12,267, (300).
- ANDERSON D.M.W. et CREE G.M., Carbohyd.Res.,1966,2,162, (183)
- ANDERSON D.M.W. et DEA I.C.M., Carbohyd.Res.,1968,8,440-447, (39,213).
- ANDERSON D.M.W. et DEA I.C.M., Carbohyd.Res.,1968,8,448, (213).
- ANDERSON D.M.W., DEA I.C.M., MAGGS P.A. et MUNRO A.C., Carbohyd.Res.,1967,5,489, (176).
- ANDERSON F.B., HIRST E.L., MANNERS D.J., et ROSS A.G., J. Chem.Soc.,1958,3233, (37).
- ANDREWS P., HOUGH L. et JONES J.K.N., J. Chem.Soc.,1954,806, (33, 256).
- ARNDT F., Org.Synthesis,1943,2,165,(119).
- ASPINALL G.O et FERRIER R.J., J.Chem.Soc.,1958,638, (275).
- ASPINALL G.O., AURET B.J. et HIRST E.L., J. Chem.Soc.,1958,221, (307).
- ASPINALL G.O., LAIDLAW R.A. et RASHBROOK R.B., J. Chem.Soc.,1957,4444, (38, 83, 257).
- AULT R.G., HAWORTH W.N. et HIRST E.L., J. Chem.Soc., 1935,1012,(408).
- BACON T.S.D., BALDWIN E. et BELL D.J., Biochem. J., 1944,38,198,(172).
- BARKER S.A., PARDOE G.I., STACEY M. et HOPTON J.W., Nature, 1963,197,231, (473).
- BAYARD B., Thèse,Doct. 3ème cycle, Lille 1970, (413).
- BAYARD B. et MONTREUIL J., Carbohyd.Res.,(sous presse), (492,494,495,506).
- BAYARD B., FOURNET B., BOUQUELET S., STRECKER G., SPIK G. et MONTREUIL J. Carbohyd.Res., (sous presse), (493).
- BEAUGIRAUD S., PERCHERON F., COURTOIS J.E. et LANCHEC C.,Bull.Soc.Chim.Biol., 1968,50,621, (500).
- BECHTLER G., Diploma Thesis, Universität Freiburg, 1960, Ph D. Thesis, Universität Freiburg, 1962, (135,138,139,153,163,241,243).
- BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.M., Analyst,1954,79,201, (223).
- BELL D.J., Biochem.J., 1935,29,203I, (265).
- BELL D.J., Biochem.J.,1937,31,1683, (264).
- BELL D.J., J.Chem.Soc.,1944,473, (264).
- BHATTI T. et CLAMP I.R., Biochem.Biophys.Acta,1968,170,206, (497).
- BISHOP C.T., Advances in Carbohydrate Chemistry, M.L. Wolfrom and R.S.Tipson, Eds Academic, New York,1964 p. 95, (363).
- BISHOP C.T. et COOPER F.P., Can.J.Chem.,1960,38,388, (342,352).
- BISHOP C.T. et COOPER F.P., Can.J.Chem., 1960,38,793; (55).
- BJÖRNDAL H., LINDBERG B. et SVENSSON S., Carbohyd.Res.,1967,5,433, (402).
- BOOGS L., CUENDEL L.S., EHRENTAL I., KOCH R. et SMITH F., Nature,1950,166,520, (313,314).

- BOUQUELET S., Thèse, Doct. 3^{ème} cycle, Lille 1972, (415,509).
- BOURNE E.J., FANTES K.H. et PEAT S., J. Chem. Soc., 1949, 1109, (101).
- BOURNE E.J., SIDEBOTHAM R.L. et WEIGEL H., Carbohyd. Res., 1972, 22, 13-22, (104).
- BOUVENG H.O., Acta Chem. Scand., 1959, 13, 1869, (312).
- BRAGG P.D. et HOUGH L., Biochem. J., 1961, 78, 11, (60,75,270).
- BREDERESCH H., HAGELLOCH G. et HAMBSCH E., Chem. Ber., 1954, 87, 35, (251,259).
- BRIMACOMBE J.S., PORTSMOUTH D. et STACEY M., J. Chem. Soc., 1964, 5614, (187,254).
- BRIMACOMBE J.S., STACEY M. et TUCKER L.C.N., J. Chem. Soc., 1964, 5391, (186,253).
- BRIMACOMBE J.S., JONES B.D., STACEY M. et WILLARD J.J., Carbohyd. Res., 1966, 2, 167, (185,252).
- BUDDECKE E. et WERRIES E., Z. Physiol. Chem., 1965, 340, 257, (499).
- BYCHKOV S.M. et KOLESKIKOVA M.F., Biokhimiya, (traduction anglaise), 1966, 31, 465, (289).
- CAMPBELL W.G., HIRST E.L. et JONES J.K.N., J. Chem. Soc., 1948, 774, (64, 82).
- CASERIO M.C., ROBERTS J.D., NEEMAN M. et JOHNSON W.S., J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 2584, (118, 122).
- CHARET P., MONSIGNY M., SPIK G. et MONTREUIL J., C.R. Acad. Sc. Paris, 1969, 269, 1019, (416,445).
- CHARLWOOD P.A., Biochem. J., 1963, 88, 394, (440).
- CHIZHOV O.S., GOLOVKINA L.S. et WULFSON N.S., Izv. Akad. Nauk SSSR. Ser. Khim, 1966, 1915, (401).
- CHOSSON A., MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3261, (471).
- CLAMP J.R., DAWSON G. et HOUGH L., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 148, 342, (238).
- COHN E.J., Science, 1945, 101, 51, (438).
- COREY E.J. et CHAYKOVSKY M., J. Amer. Chem. Soc., 1962, 84, 866, (169).
- COURTOIS J.E., LE DIZET P. et PETEK F., Bull. Soc. Chim. Biol, 1959, 41, 1261, (29, 261).
- CROON I., Svensk Papperstidn., 1959, 62, 700, (112).
- CROON I. et LINDBERG B., Acta Chem. Scand., 1957, 11, 192, (258).
- CUTLER W.O., HAWORTH W.N. et PEAT S., J. Chem. Soc., 1937, 1979, (23).
- DANISHEFSKY I., EIBER H.B. et WILLIAMS A.H., J. Biol. Chem., 1963, 238, 2895, (70).
- DAWSON G. et CLAMP J.R., Biochem. J., 1968, 107, 341, (480).
- de BELDER A.N. et NORRMAN B., Carbohyd. Res., 1968, 8, 1, (353,372).
- DEFERRARI J.O., GROS E.G. et MASTRONARDI I.O., Carbohyd. Res., 1967, 4, 432, (128).
- DELMOTTE F., Thèse, Doct. 3^{ème} cycle, Lille , (298).
- DENHAM W.S. et WOODHOUSE H., J. Chem. Soc., 1913, 103, 1735, (16,31).
- DENHAM W.S. et WOODHOUSE H., J. Chem. Soc., 1914, 105, 2357, (18,19).
- DENT C.E., Biochem. J., 1947, 41, 240, (376).

- DEUEL H., HUBER G. et LEUENBERGER R., *Helv.Chim.Acta*, 1950, 33, 1226, (108).
- DINER U.E., SWEET F. et BROWN R.K., *Can.J.Chem.*, 1966, 44, 5691, (184).
- DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F., *Anal.Chem.*, 1956, 28, 350, (225, 249).
- DUNN J.T. et SPIRO R.G., *J.Biol.Chem.*, 1967, 242, 5556, (478).
- DUPONT P., Diplôme d'Etudes approfondies, Lille 1969, (196, 210).
- EADES E.D.M., BALL D.H. et LONG L., *J.Org.Chem.*, 1965, 30, 3949, (189).
- ELSON L.A. et MORGAN W.T.J., *Biochem.J.*, 1933, 27, 1824, (222).
- ETZLER M.E., ANDERSON B., SHERMAN B., GRUEZO F., LLOYD K.O., RICHARDSON N.G. et KABAT E.A., *Arch.Biochem.Biophys.*, 1970, 141, 588, (157).
- EYLAR E.H. et JEANLOZ R.W., *J.Biol.Chem.*, 1962, 237, 3622, (472).
- FEAR C.M. et MENZIES R.C., *J. Chem.Soc.*, 1926, 937, (77, 78).
- FISHER F.G. et NEBEL H.G., *Z.Physiol.Chem.*, 1955, 302, 10, (485).
- FOSTER A.B., *Adv.Carbohydr.Chem.*, 1957, 12, 81, (234).
- FOURNET B. et MONTREUIL J., C.R. 6ème Symp.Intern.Chromat.Electroph.Bruxelles, 1970, Presses Eur.éd., Bruxelles, 1971, p.248, (377, 379).
- FOURNET B. et MONTREUIL J., *J. Chromatog.*, (sous presse), (389).
- FOURNET B., TAKERKART G., BROHON J. et MONTREUIL J., *Bull.Soc.Chim.Biol.*, 1968, 50, 1351, (462, 508).
- FREDERICQ E. et DEUTSCH H.F., *J.Biol.Chem.*, 1949, 181, 499, (214, 435).
- FREUDENBERG K. et BOPPEL H., *Ber.*, 1938, 71, 2505, (89, 100).
- FREUDENBERG K. et HIXON R.M., *Ber.*, 1923, 56, 2125, (95, 190, 250).
- FREUDENBERG K. et RAPP W., *Ber.*, 1936, 69, 2041, (92).
- FREUDENBERG K., PLANKENHORN E. et BOPPEL H., *Ber.*, 1938, 71, 2435, (61, 93, 100).
- FUJINAGA-ISEMURA M., IKENAKA T. et MATSUSHIMA Y., *J.Biochem.(Tokyo)*, 1968, 64, 73, (347, 366).
- GAHAN L.C., SANDFORD P.A. et CONRAD H.E., *Biochemistry*, 1967, 6, 2755, (177, 180).
- GARDELL S., *Acta.Chem.Scand.*, 1953, 7, 207, (233).
- GARDELL S., HEJKENSJOLD F. et ROCHNORLUND A., *Acta Chem.Scand.*, 1950, 4, 970, (232).
- GLICK M.C., CHEN I.W. et ZILLIKEN F., *J. Biol.Chem.*, 1962, 232, 981, (396).
- GOLDSTEIN I.J., HAMILTON J.K. et SMITH F., *J. Amer.Chem.Soc.*, 1959, 81, 6252, (268).
- GOOD T.A. et BESSMAN S.P., *Anal.Biochem.*, 1964, 9, 253, (504).
- GORIN P.A.J., *Carbohydr.Res.*, 1971, 18, 281-288, (282, 286).
- GORIN P.A.J. et FINLAYSON A.J., *Carbohydr.Res.*, 1971, 18, 269-279, (281, 285, 296, 301, 303).
- GORIN P.A.J. et MAGUS R.J., *Can.J.Chem.*, 1971, 49, 15, (283, 287, 288).
- GORIN P.A.J. et SPENCER J.F.T., *Carbohydr.Res.*, 1970, 13, 339-349, (42, 161).

- GRIMMONPREZ L., Thèse Doct.Sci., Lille,1972, (411,427).
- GROS E.G. et FLEMATTI S.M., Chem.Ind.(London),1966,1556, (121,126).
- GROS E.G. et GRUNEIRO E.M., Carbohyd.Res.,1970,14,409, (130,131).
- GROS E.G. et MASTRONARDI I.O., Carbohyd.Res.,1969,10,318-321, (129).
- HAKOMORI S.I., J.Biochem.(Tokyo),1964,55,205, (43,156,167,168,170,182,199,201,202,203,383,449).
- HAMILTON J.K. et KIRCHER H.W., J.Amer.Chem.Soc.,1958,80,4703, (54).
- HANDA N. et MONTGOMERY R., Carbohyd.Res.,1969,11,467, (370,388,407).
- HAWORTH W.N., J.Chem.Soc.,1915,107,8, (15,21,24).
- HAWORTH W.N. et LAW J., J. Chem.Soc.,1916,109,1314, (20,25).
- HAWORTH W.N. et LEARNER A., J.Chem.Soc.,1928,619 et 2681, (263).
- HAWORTH W.N. et LEITCH G.C., J.Chem.Soc.,1918,113,188, (26).
- HAWORTH W.N. et LEITCH G.C., J.Chem.Soc.,1919,115,809, (27).
- HAWORTH W.N. et PERCIVAL E.G.V., J.Chem.Soc.,1932,2277, (53).
- HAWORTH W.N. et STREIGHT R.L., Helv.Chim.Acta,1932,15,609, (52).
- HAWORTH W.N., HIRST E.L. et ISHERWOOD F.A., J.Chem.Soc.,1937,577, (171).
- HAWORTH W.N., HIRST E.L. et ISHERWOOD F.A., J.Chem.Soc.,1937,784, (405).
- HAWORTH W.N., HIRST E.L. et PERCIVAL E.G.V., J. Chem.Soc.,1932,2384, (52,264).
- HAWORTH W.N., HIRST E.L. et THOMAS H.A., J.Chem.Soc.,1931,821, (51).
- HAWORTH W.N., HIRST E.L. et WEBB J.I., J.Chem.Soc.,1928,2681, (57).
- HAWORTH W.N., MONTONNA R.E. et PEAT S., J.Chem.Soc.,1939,1899, (48,49).
- HAWORTH W.N., HIRST E.L., OWEN L.N., PEAT S. et AVERILL F.J., J.Chem.Soc.,1939,1885, (47).
- HAY G.W., LEWIS B.A. et SMITH F., J. Chromatog.,1963,11,479, (291,338).
- HEAD F.S.H., Trans.Textile Inst.,1952,43,1, (113,132).
- HEDGLEY E.J. et OVEREND W.G., Chem.Ind.(London),1960,378, (393).
- HEIDELBERGER M. et AISENBERG A.C., Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry-Vienne 1958 - Pergamon Press 1959,1,52,Proc.Nat. Acad.Sci.,1958,39,453, (2).
- HELLERQVIST C.G., LINDBERG B., SVENSSON S., HOLME T. et LINDBERG A.A., Carbohyd.Res.,1968,8,43, (355).
- HELLERQVIST C.G., LINDBERG B., SVENSSON S., HOLME T. et LINDBERG A.A., Carbohyd.Res.,1969,9,237, (354,373).
- HERZIG J. et SCHÖNBACH R., Monatsh.,1912,33,673, (117).
- HIRANO S., HOFFMAN P. et MEYER K., J.Org.Chem.,1961,26,5064, (69,71,262,308).
- HIRST E.L. et JONES J.K.N., J.Chem.Soc.,1938,496, (79).
- HIRST E.L. et JONES J.K.N., J.Chem.Soc.,1946,506, (80).

- HIRST E.L. et JONES J.K.N., J.Chem.Soc.,1947,1221, (50).
- HIRST E.L. et JONES J.K.N., J.Chem.Soc.,1948,2311, (50).
- HIRST E.L. et JONES J.K.N., Chromatographic Analysis. A discussion of the Faraday society,1949,248, (302,306,309,323,329,331,380,397).
- HODGE J.E., KARJALA S.A. et HILBERT G.E., J.Amer.Chem.Soc.,1951,73,3312, (62,90,102).
- HOFFMAN D.O. et WOLFROM M.L., Anal.Chem.,1947,19,225, (207,211,212).
- HOREJSI J. et SMETANA R., Acta Med.Scand., 1956,155,66, (439).
- HOUGH L. et JONES J.K.N., J.Chem.Soc.,1950,1199, (46).
- HOUGH L. et JONES J.K.W., Chem.Ind. (London), 1952,380, (111,115).
- HOUGH L. et THEOBALD R.S., in WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., Methods in Carbohydrate Chemistry, 2,162,Acad.Press, New York,1963, (106).
- HOUGH L., JONES J.K.N. et WADMAN W.H., Nature, 1948,162,448, (305).
- HOUGH L., JONES J.K.W. et WADMAN W.H., J.Chem.Soc.,1949,2511, (274,305).
- HOUGH L., JONES J.K.N. et WADMAN W.H., J.Chem.Soc.,1950,1702, (303,326,328,334,335,378,399,464).
- HUGHES R.C. et JEANLOZ R.W., Biochemistry,1964,3,1535, (229).
- IRVINE J.C., J.Chem.Soc.,1901,79,668, (5).
- IRVINE J.C. et CAMERON A., J.Chem.Soc.,1904,85,1071, (8).
- IRVINE J.C. et MOODIE A.M., J.Chem.Soc.,1905,87,1465, (10,403).
- IRVINE J.C. et ROSE R.E., J.Chem.Soc.,1906,89,814, (11).
- IRVINE J.C., STEELE E.S. et SHANNON M.J., J.Chem.Soc.,1922,121,1060, (17).
- ISBELL H.S., FRUSH H.L., BRUCHNER B.H., KOWKABANY G.N. et WAMPLER G., Anal.Chem.,1957,29,1523, (103,105,255).
- ITO Y., OHASHI Y et MIYAGISHIMA T., Carbohyd.Res.,1969,9,125, (299).
- JAMIESON G.A., J.Biol.Chem.,1965,240,2914, (444,454).
- JAMIESON G.A., JETT M. et de BERNARDO S.L., J.Biol.Chem.,1971,246,11,3686, (452,455,477).
- JEANLOZ W., J.Amer.Chem.Soc.,1952,74,4497, (386).
- JEANLOZ R.W., in"Glycoproteins" GOTTSCHALK A., Elsevier ed., Amsterdam, 1966,362, (417).
- JEANLOZ R.W., Bull.Soc.Chim.Biol.,1960,42,303,(429).
- JEANLOZ R.W. et CLOSSE A., Federation Proc., 1963,22,538, (432,433).
- JEANLOZ R.W. et EYLAR E.H., in KERN W.(Ed.),Short Commun.Intern.Symp. Macromolécules, Wiesbaden, Verlag Chemie, Weinheim,1959,Section V,A8, (428).
- JEANLOZ R.W., STOFFYN P.J. et TREMEGE M., Federation Proc.,1957,16,201, (267).
- JONES J.K.N., J.Chem.Soc.,1947,1055, (81).
- JONES H.G. et PERRY M.B.,Can.J.Chem.,1962,40,1339, (345).

- KABAT E.A., in Blood and Tissue Antigens, Acad. Press. N.Y., AMINOFF D. éd, 1970, p.187, (491).
- KIRCHER H.W., Anal. Chem., 1960, 32, 1103, (340, 361).
- KIRCHER H.W., Méthods Carbohyd. Chem., Vol. 1, R.L. Whistler and M.L. Wolfrom, Eds., Academic, New York, 1962, p.13, (343, 364).
- KLEIN E. et BARTER C.J., Textile Res., 1961, 31, 486, (344).
- KOELTZOW D.E., EPLEY J.D et CONRAD H.E., Biochemistry, 1968, 7, 2920, (174).
- KOUCOUREK J. et BALLOU C.E., J. Bactériol., 1969, 100, (395).
- KRAUS C.A. et WHITE G.F., J. Amer. Chem. Soc., 1923, 45, 768, (84).
- KUHN R. et BAER H.H., Chem. Ber., 1953, 86, 724, (120).
- KUHN R. et BAER H.H., Chem. Ber., 1956, 89, 504, (148).
- KUHN R. et EGGE H., Chem. Ber., 1963, 96, 3338, (142).
- KUHN R. et GAUHE A., Chem. Ber., 1962, 95, 518, (145, 316).
- KUHN R. et TRISCHMANN H., Liebigs Ann. Chem., 1958, 611, 117, (143).
- KUHN R. et TRISCHMANN H., Chem. Ber., 1961, 94, 2258, (137).
- KUHN R. et TRISCHMANN H., Chem. Ber., 1963, 96, 284, (140, 141, 151, 152, 166, 244, 245).
- KUHN R. et WIEGANDT H., Chem. Ber., 1963, 96, 866, (149).
- KUHN R., BAER H.H. et GAUHE A., Chem. Ber., 1954, 87, 1553, (147).
- KUHN R., BAER H.H. et GAUHE A., Chem. Ber., 1956, 89, 2519, (14, 155, 198, 200, 246, 248, 382, 385, 466, 486, 498).
- KUHN R., BAER H.H. et GAUHE A., Chem. Ber., 1958, 91, 364, (28, 150, 260).
- KUHN R., BAER H.H. et SEELIGER A., Ann. Chem., 1958, 611, 236, (136, 158, 242, 247).
- KUHN R., EGGE H. et LOCHINGER W., 4 th international Congress on Gas Chromatography in Hamburg. Angew. Chem., 1963, 2, 9, (277, 280).
- KUHN R., LÖW I. et TRISCHMANN N., Chem. Ber., 1957, 90, 203, (40, 159).
- KUHN R., TRISCHMANN H. et LÖW I., Angew. Chem., 1955, 67, 32, (74, 134, 154, 240).
- KUHN R., EGGE H., BROSSMER R., GAUHE A., KLESSE P., LOCHINGER W., RÖHM E., TRISCHMANN H. et TSCHAMPEL D., Angew. Chem., 1960, 72, 805, (144).
- LANCE D.G. et JONES J.K.N., Can. J. Chem., 1967, 45, 1995, (356).
- LEE Y.C. et BALLOU C.E., Biochemistry, 1965, 4, 257, (348, 367).
- LEECH J.G., Tappi, 1958, 41, 80, (315, 317).
- LEMAL D.M., PACTH P.D. et WOODWARD R.B., Tetrahedron, 1962, 18, 1275, (188).
- LEMIEUX R.U. et CUSHLEY R.J., Can. J. Chem., 1963, 41, 858, (276).
- LESCHZINER C. et CEREZO A.S., Carbohyd. Res., 1970, 15, 291-299, (41, 160).
- LEVY G.A. et Mac ALLAN A., Biochem. J., 1959, 73, 127, (235).
- LI Y.T., J. Biol. Chem., 1966, 241, 1010, (501).
- LI S.C. et LI Y.T., J. Biol. Chem., 1970, 245, 5153, (502).

- LI Y.T. et LI S.C. et SHETLAR M.R., *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 656, (481).
- LINDBERG B. et WICKBERG B., *Acta Chem. Scand.*, 1954, 8, 569, (273).
- LLOYD K.O., KABAT E.A., LAYUG E.J. et GRUEZO F., *Biochemistry*, 1966, 5, 1489, (349, 368).
- LOEWUS F., *Carbohyd. Res.*, 1966, 3, 130, (350).
- LUCAS H.J. et STEWART W.T., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1940, 62, 1070, (107).
- Mac INNES A.G., BALL D.H., COOPER F.P. et BISHOP C.T., *J. Chromatog.*, 1958, 1, 556, (339, 360).
- Mac LENNAN H.P., SMITH D.W. et RANDALL H.M., *Biochem. J.*, 1960, 74, 3.p., (310).
- MARTIN D., WEISE A. et NICLAS H.J., *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.*, 1967, 6, 318, (175).
- MASTRONARDI I.O., FLEMATTI S.M., DEFERRARI I.O. et GROS E.G., *Carbohyd. Res.*, 1966, 3, 177-183, (127).
- MICHL H., *Monatsh. Chem.*, 1951, 82, 489, (374).
- MONSIGNY M., 2eme Thèse Doct. Sci., Lille, 1968, (297).
- MONSIGNY M., ADAM-CHOSSON A. et MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1968, 50, 843, (217, 218, 224).
- MONTGOMERY R., in "The Carbohydrates", PIGMAN W. et HORTON D., Academic Press, New York, 1970, IIB, 660, (418).
- MONTGOMERY R., LEE Y.C. et WU Y.C., *Biochemistry*, 1965, 4, 566, (479).
- MONTREUIL J. et SCHEPPLER N., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, 41, 13, (230, 503).
- MONTREUIL J. et SPIK G., *Microdosage des glucides Monographie N° 1*, Lille 1963, (219, 412).
- MONTREUIL J. et SPIK G., *Microdosage des glucides, Monographie N° 2*, Lille 1968, (266).
- MONTREUIL J., ADAM-CHOSSON A. et SPIK G., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, 47, 1867, (451, 460).
- MONTREUIL J., SPIK G. et CHOSSON A., *C.R. Acad. Sci.*, 1962, 255, 3493, (450, 458, 459, 469, 510).
- MONTREUIL J., SPIK G., DUMAISNIL J. et MONSIGNY M., *Bull. Soc. Chim.*, 1965, 239, (227).
- MONTREUIL J., CASTIGLIONI B., ADAM-CHOSSON A., CANER F. et QUEVAL J., *J. Biochem.*, 1965, 57, 514, (215).
- MONTREUIL J., MONSIGNY M., SPIK G., DUQUESNE N., CHERON A., DESCAMPS J. et FOURNET B., *Z. physiol. Chem.*, 1969, 350, 664, (192).
- MORRISON F.R. et LOUTIE R., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1952, 2649, (441).
- MÜLLER E. et RUNDEL W., *Angew. Chem.*, 1958, 70, 105, (124).
- MÜLLER E., BAUER M. et RUNDEL W., *Z. Naturforsch.*, 1959, 14b, 209, (125).
- MUSKAT I.E., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1934, 56, 693, (88, 91, 94, 98, 191).
- MUSKAT I.E., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1934, 56, 2449, (88, 91, 94, 96, 97, 99, 191).

- NEEMAN M., CASERIO M.C., ROBERTS J.D. et JOHNSON W.S., *Tetrahedron*, 1959, 6, 36, (123).
- NEUBERGER A., *J.Chem.Soc.*, 1941, 50, (387).
- NEUBERGER A., *Communication au Symposium de Bochum (Allemagne)*, 1968, (193).
- NEUKOM H. et DEUEL H., *Chem.Ind. (London)*, 1958, 683, (110).
- NIERENSTEIN M., *Ber.*, 1925, 58, 2615, (116).
- NORRMAN B., *Acta Chem.Scand.*, 1968, 22, 1623, (406).
- OVODOV Yu.S. et EVTUSHENKO E.V., *J. Chromatog.*, 1967, 31, 527, (341, 362).
- PARIKH V.M. et JONES J.K.N., *Can.J.Chem.*, 1966, 44, 327, (164).
- PARTRIDGE S.M., *Biochem.J.*, 1948, 42, 238, (228, 292, 293, 295, 463, 484).
- PARTRIDGE S.M., *Biochem.Soc.Symp.*, 3, 52; Cambridge University Press éd., London, 1949, (294, 325, 332, 375, 398).
- PERRY M.B. et WEBB A.C., *Can.J.Chem.*, 1969, 47, 4091, (278).
- PETEK F. et DONG T., *Bull.Soc.Chim.Biol.*, 1962, 44, 1137, (318, 322, 324, 330, 333, 337, 381, 467).
- PURDIE T. et IRVINE J.C., *J.Chem.Soc.*, 1903, 83, 1021, (3, 4, 6, 13).
- PURDIE T. et IRVINE J.C., *J.Chem.Soc.*, 1904, 85, 1049, (7).
- PURDIE T. et IRVINE J.C., *J.Chem.Soc.*, 1905, 87, 1025, (9).
- PURDIE T. et PAUL D. McL., *J.Chem.Soc.*, 1907, 91, 289, (12).
- REES D.A. et RICHARDSON N.G., *Biochemistry*, 1966, 5, 3099, (357).
- REES D.A. et SAMUEL J.W.B., *J.Chem.Soc.C*, 1967, 2295, (358).
- REISSIG J.L., STROMINGER J.L. et LELOIR L.F., *J.Biol.Chem.*, 1955, 217, 959, (236).
- REBERS P.A. et HEIDELBERGER M., *J.Amer.Chem.Soc.*, 1961, 83, 3056, (178).
- RIMINGTON C., *Biochem.J.*, 1931, 25, 1062, (221).
- RIMINGTON C., *Biochem.J.*, 1940, 34, 931, (220).
- ROBERTSON G.J., *J.Chem.Soc.*, 1934, 330, (409).
- ROBINSON J.C. et PIERCE J.E., *Arch.Biochem.Biophys.*, 1964, 106, 348, (448).
- ROSEMAN S. et DAFFNER I., *Ann.Chem.*, 1956, 28, 1743, (292).
- SANDFORD P.A., *Ph.D.Thesis, University of Illinois, Urbana, Illinois*, 1967, (173).
- SANDFORD P.A. et CONRAD H.E., *Biochemistry*, 1966, 5, 1508, (179).
- SATO T., YOSIZAWA Z., MASUBUCHI M. et YAMAUCHI F., *Carbohyd.Res.*, 1967, 5, 387, (424, 430, 434, 474).
- SCHMID K., *J.Amer.Chem.Soc.*, 1953, 75, 60, (419).
- SCHMID K., Mac NAIR M.B. et BURGI A.F., *J.Biol.Chem.*, 1958, 230, 853, (426).
- SCHMID K., BINETTE J.P., KAMIYAMA S., PFISTER V. et TAKAHASHI S., *Biochemistry*, 1962, 1, 959, (421).
- SCHMID K., ISHIGURO M., EMURA J., ISEMURA S., KAUFMANN H. et MOTOYAMA T., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1971, 42, 280, (423).

- SCHMID L., Ber., 1925,58, 1963, (114).
- SCHMID L. et BECKER B., Ber., 1925,58, 1966, (85).
- SCHMID L., WASCHKAU A. et LUDWIG E., Monatsh., 1928,49, 107, (85).
- SCHULTZE H.E. et HEREMANS J.F., Molecular Biology of Human Proteins. Elsevier, 1966, I, (436).
- SEGARD E., 2eme Thèse Doct.Sci., Lille, 1964, (76, 194, 209).
- SMITH E.L., BROWN D.M., WEIMER H.E. et WINZLER R.J., J.Biol. Chem., 1950, 185, 569, (420).
- SMITH F., STACEY M. et WILSON P.I., J. Chem. Soc., 1944, 131, (404).
- SMITHIES O., Nature, 1957, 180, 1482, (437).
- SPIK G., Thèse Doct.Sci., Lille, 1968, (442, 443, 453, 476).
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C.R.Acad.Sci., 1965, 260, 4282, (456).
- SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J., C.R.Acad.Sci., 1965, 261, 1137, (446, 447, 456).
- STACEY M. et WOOLLEY J.M., J.Chem.Soc., 1940, 184, (56, 65, 67).
- STACEY M. et WOOLLEY J.M., J.Chem.Soc., 1942, 550, (59, 63, 66, 68).
- STAUB E.M. et TINELLI R., Bull.Soc.Chim.Biol., 1957, 39, 65, (1).
- STRECKER G., Communication personnelle, (197, 414, 487, 488, 489).
- STRECKER G., BAYARD B. et MONTREUIL J., Chromatographie Symposium VI Bruxelles 1970, Presses Acad.Eur.ed.Bruxelles 1971, p.324, (483).
- STEWART T.S., MENDERSHAUSEN P.B. et BALLOU C.E., Biochemistry, 1968, 7, 1843, (351, 369).
- STOFFYN P., STOFFYN A. et ORR J.C., Abstr.Papers, Amer.Chem.Soc., 1969, 157, (181).
- SRIVASTAVA H.C., HARSHE S.N. et SINGH P.P., Indian J.Chem., 1963, 1, 304, (162, 165).
- SVENNERHOLM E. et SVENNERHOLM L., Nature, 1958, 181, 1154, (237).
- SWEELEY C.C., BENTLEY R., MAKITA M. et WELLS W.W., J.Amer.Chem.Soc., 1963, 85, 2497, (231, 284, 384, 391, 392).
- SWIDERSKI J. et TEMERIUZ A., Carbohyd.Res., 1966, 3, 225, (271).
- TAKERKART G., Diplome d'études approfondies, Lille 1968, (195, 394, 410).
- TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem.Z., 1929, 215, 36, (220).
- TREVELYAN W.E., PROCTOR D.P. et HARRISSON J.S., Nature, 1950, 444, 166, (505).
- UNRAU A.M. et CHOY Y.M., Carbohyd.Res., 1970, 14, 151, (44, 371).
- VIEBOCK F. et BRECKER C., Ber.dtsch.Chem.Ges., 1930, 63, 3207, (36, 206, 208).
- VOLLMERT B., Makromol.Chem., 1950, 5, 101, (109).
- WADMAN W.H., ANDERSON A.B. et HASSID W.Z., J.Amer.Chem.Soc., 1954, 76, 4097, (45).
- WAGH P.V., BORNSTEIN I. et WINZLER R.J., J.Biol.Chem., 1969, 244, 3, 658, (425, 431, 475).

- WALKER H.G., GEE M. et Mac CREADY R.M., *J.Org.Chem.*, 1962, 27, 2100, (146).
- WALLENFELS K., *Naturwissenschaften*, 1950, 37, 491, (327, 336, 400).
- WALLENFELS K., BECHTLER G., KUHN R., TRISCHMANN H. et EGGE H., *Angew.Chem.Intern.ed.Eng.*, 1963, 2, 515, (133, 204, 269).
- WALLENFELS K., BECHTLER G., KUHN R., TRISCHMANN H. et EGGE H., *Angew.Chem.*, 1963, 75, 1014, (321).
- WATKINS W.M. et MORGAN W.T.J., *Vox Sang.*, 1962, 7, 125, (490).
- WHELAN W.J. et MORGAN K., *Chem.Ind.(London)*, 1954, 78, (272).
- WERNER I. et ODIN L., *Acta Soc.Med.Upsaliensis*, 1952, 57, 230, (224).
- WEST E.S. et HOLDEN R.F., *J.Amer.Chem.Soc.*, 1934, 56, 930, (22, 58).
- WHISTLER R.L. et CONRAD H.E., *J.Amer.Chem.Soc.*, 1954, 76, 1673, (30).
- WHISTLER R.L. et DURSO D.F., *J.Amer.Chem.Soc.*, 1950, 72, 677, (465, 496).
- WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1963, 2, 146, (390).
- WHITE T., *J.Chem.Soc.*, 1940, 428, (239).
- WHITE E.V., *J.Amer.Chem.Soc.*, 1941, 63, 2871, (32, 34).
- WHITE G.F., MORRISON A.B. et ANDERSON E.G.E., *J.Amer.Chem.Soc.*, 1924, 46, 961, (87).
- WICKBERG B., *Acta Chem.Scand.*, 1958, 12, 615, (319).
- WHICKBERG B., *Methods Carbohydrate Chem.*, 1962, 1, 31, (317, 320).
- WICKSTROM A.E., COURTOIS J.E. et LE DIZET P., *Bull.Soc.Chim.France*, 1956, 827, (311).
- WILLIAMS S.C. et JONES J.K.N., *Can.J.Chem.*, 1967, 45, 275, (290, 346, 359, 365).
- WILLIAMSON A.W., *J.Chem.Soc.*, 1852, 4, 229, (86).
- YAMAGUCHI H., IKENAKA T. et MATSUSHIMA Y., *J.Biochem.*, 1970, 68, 843, (72, 279).
- YAMAGUCHI H., IKENAKA T. et MATSUSHIMA Y., *J.Biochem.*, 1971, 70, 4, 587, (73, 482).
- YAMASHINA I. et MAKINO M., *J.Biochem.*, 1962, 51, 359, (216).
- YAMASHINA I. et YAMAUCHI T., *J.Biochem.*, 1969, 66, 213, (422, 457).
- ZEISEL S., *Monatsch.*, 1885, 6, 989, (35, 205).

APPENDICE TECHNIQUE

La bibliographie (p. 260) et la table des matières (p. 244) de l'Appendice technique sont indépendantes de la première partie du mémoire.

TABLE DES MATIERES
DE
L'APPENDICE TECHNIQUE

I- TECHNIQUES ORIGINALES DE METHYLATION

A-Protocole expérimental original de PURDIE et IRVINE	246
B-Protocole expérimental original de HAWORTH	247
C-Protocole expérimental de méthylation d'un gluco- mannane peracétylé (BISHOP et COOPER)	247
D-Protocole expérimental de méthylation du méthyl- glucoside sous la forme de son sel de Thallium (FEAR et MENZIES)	248
E-Protocole expérimental de méthylation d'un complexe arabane-acide pectique sous la forme de son sel de Thallium (HIRST et JONES)	249
F-Protocole expérimental de méthylation de l'amylose et de l'amylopectine dans l'ammoniac liquide (HODGE, KARJALA et HILBERT)	250
G-Protocole expérimental de méthylation de la N-acétyl- glucosamine par le diazométhane (KUHN et BAER)	250
H-Protocole expérimental de méthylation du méthyl- 2,3,4-tri-O-acétyl- α - <u>D</u> -mannopyranoside par le diazométhane (GROS et GRUNEIRO)	251
I-Protocole expérimental de méthylation de la peracétyl- glucosamine (KUHN et TRISCHMANN)	252
J-Protocole expérimental de méthylation d'un polysaccharide (PARIKH et JONES)	252
K-Protocole expérimental de méthylation d'un cérébroside (HAKOMORI)	253

II- <u>PREPARATION OU PURIFICATION DES SOLVANTS ET DES MATIERES PREMIERES</u>	254
A - Acide iodhydrique	254
B - Oxyde d'argent	254
C - Méthanol anhydre	254
D - Pyridine anhydre	254
E - Ether éthylique anhydre et sans peroxyde	254
F - Méthanolate de sodium	255
G - Hydrure de sodium exempt d'huile et méthylsulfinyne carbanion	255
H - Diazométhane	255
I - Réactif d'ELSON-MORGAN	256
III- <u>TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES</u>	257
A - Préparation du charbon Celite	257
B - Désactivation du Chromosorb W	257
C - Préparation du Kieselguhr pour la chromatographie en phase gazeuse	258
D - Imprégnation du support par la phase stationnaire pour la chromatographie en phase gazeuse	258
E - Chromatographie sur gel de Silice	259
IV- <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	260

I - TECHNIQUES ORIGINALES DE METHYLATION

A - PROTOCOLE EXPERIMENTAL ORIGINAL DE PURDIE et IRVINE (1).

Une mole de méthyl- α -D-glucoside préparé suivant le procédé de FISCHER (2) est dissoute dans 6 ou 7 fois son poids de méthanol. On ajoute ensuite 10 moles d'iodure de méthyle et 5 moles d'oxyde d'argent sec, en plusieurs additions successives, en respectant les proportions entre iodure de méthyle et oxyde d'argent. Chaque addition est marquée par une légère augmentation de la température du milieu réactionnel. Quand tous les réactifs sont additionnés, la méthylation se termine par un chauffage au bain-marie à reflux. Après refroidissement, le mélange réactionnel est filtré et le précipité argentique, sur lequel est adsorbée une proportion importante de dérivés méthylés, est lavé sur filtre par du méthanol chaud. Les filtrats contenant du méthyl- α -glucoside non modifié et des produits de méthylation correspondants, sont évaporés à siccité. Les dérivés méthylés sont extraits à l'éther. Après séchage sur sulfate de sodium anhydre, les phases étherées sont évaporées et laissent un sirop bouillant sous pression réduite (14mm de mercure) entre 157 et 165°C. Plusieurs distillations fractionnées permettent d'obtenir une fraction bouillant à 167-170°C sous 17mm de mercure et constituant le principal produit de la réaction.

L'analyse montre qu'il s'agit d'un dérivé tri-O-méthylé. Ce dérivé partiellement méthylé est perméthylé par l'iodure de méthyle qui joue alors le rôle de solvant de méthylation et d'agent de méthylation. Une mole de triméthyl-éther est dissoute dans 5 moles d'iodure de méthyle et 2,5 moles d'oxyde d'argent sont ajoutées par petites portions. 5 moles d'iodure de méthyle et 2,5 moles d'oxyde d'argent sont de nouveau additionnées par petites portions. Quand tous les réactifs sont ajoutés, le mélange réactionnel est chauffé quelques heures au bain-marie. Après refroidissement, les sels d'argent sont éliminés par filtration et lavés sur filtre par de l'éther. Les phases étherées séchées sur sulfate de sodium anhydre sont évaporées jusqu'à l'obtention d'un sirop. Ce résidu final est distillé sous pression réduite (20 mm de mercure) et la fraction de point d'ébullition : 144-152° est recueillie. Cette fraction est soumise à l'hydrolyse par de l'acide chlorhydrique à 8p.100 à 100°C pendant une demi-heure. La solution noirâtre obtenue est neutralisée par de la soude et les produits méthylés

extraits à l'éther. Les phases étherées, séchées par le sulfate de sodium anhydre, sont évaporées jusqu'à l'obtention d'un sirop. Ce sirop est distillé sous pression réduite (20mm de mercure) et la fraction passant à 182-185°C cristallise en longues aiguilles. Le point de fusion de ces cristaux est de 81-83°.

Ce perméthyl-glucose constitue le premier monosaccharide méthylé pur, isolé à l'état cristallisé.

B - PROTOCOLE EXPERIMENTAL ORIGINAL DE HAWORTH (3)

Le monosaccharide ou son dérivé est dissous dans le minimum d'eau et introduit dans un flacon muni d'un agitateur mécanique, d'un condenseur et de deux orifices par lesquels seront additionnés la soude et le sulfate de méthyle. L'ensemble est porté à 70°C. On ajoute alors, sous agitation vigoureuse, 3 fois la quantité théorique de sulfate de méthyle et de soude à 30 p.100. L'addition de ces réactifs doit être faite de manière telle qu'une légère alcalinité subsiste pendant toute la durée de l'opération. Le mélange est agité vigoureusement pendant 1 heure. En fin de réaction, la température du bain-marie est portée à 100°C pendant 0,5h. La solution est refroidie et les éthers méthyliques sont extraits par le chloroforme. Après évaporation de ce dernier le résidu obtenu peut être soumis à une deuxième méthylation.

L'auteur précise que dans la plupart des cas, le matériel retenu dans la phase aqueuse après extraction chloroformique est pratiquement nul. Cette solution aqueuse peut être concentrée, neutralisée, désionisée et soumise à la méthylation. De plus, HAWORTH indique qu'aucun produit de dégradation n'apparaît lors de la méthylation en présence de soude, le pouvoir rotatoire ayant toujours des valeurs optimales ou étant comparables aux valeurs déjà précisées.

C - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE METHYLATION D'UN GLUCOMANNANE PERACETYLE (BISHOP et COOPER) (4)

1,5g de glucomannane est acétylé par 30 ml d'anhydride acétique dans 45 ml de pyridine. Le mélange est additionné d'eau et le précipité obtenu est centrifugé, lavé à l'eau et séché sous vide. Le produit obtenu est dissous dans 25 ml de tétrahydrofurane redistillé et additionné de 17g de soude et de 20 ml de sulfate de méthyle, ajouté goutte à goutte,

sous agitation. Le mélange est traité une nouvelle fois par les mêmes quantités de réactifs, puis porté à l'ébullition à reflux pendant une heure. Dix additions de soude et de sulfate de méthyle sont ensuite réalisées pendant 4 jours, avec agitation continue. On ajoute, de temps à autre, du tétrahydrofurane pour maintenir la fluidité du milieu. On traite ensuite à reflux pendant une heure. Au refroidissement apparait un précipité que l'on recueille par filtration et que l'on dissout dans l'eau. La solution aqueuse filtrée est extraite pendant 24 heures par le chloroforme. Les phases aqueuses sont évaporées à sec et les résidus sont extraits à nouveau par le chloroforme et le méthanol.

D - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE METHYLATION DU METHYL-GLUCOSIDE SOUS LA FORME DE SON SEL DE THALLIUM (FEAR et MENZIES) (5).

1 - Préparation du sel de thallium du méthyl- α -glucoside.

21,6g de méthyl- α -glucoside dissous dans 13 ml d'eau sont additionnés à 206 ml d'hydroxyde de thallium 1,62 N (*). Le mélange réactionnel est porté ensuite à ébullition pour concentrer au demi la solution de départ.

2 - Méthylation du sel de thallium du méthyl- α -glucoside.

Le composé jaune obtenu (76,8g) est traité à reflux pendant cinq heures par l'iodure de méthyle. La réaction est alors complète, l'excès d'iodure de méthyle est évaporé et le résidu extrait par du méthanol. A partir de 36,5g de sel de thallium les auteurs obtiennent 9,8g de méthyl-tri-O-méthyl-glucosides sous forme de sirop.

(*) - L'hydroxyde de thallium peut être préparé soit :

- a) Par barbotage d'oxygène dans de l'eau bouillante contenant du thallium métallique (la réaction, très lente, est suivie d'un dosage acidimétrique d'une quantité aliquote).
- b) à partir du sulfate de thallium en présence de baryte suivie de l'élimination du précipité de sulfate de baryum.
- c) par passage de sels de thallium sur une résine échangeuse d'anions.

E - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE METHYLATION D'UN COMPLEXE ARABANE-ACIDE PECTIQUE SOUS LA FORME DE SON SEL DE THALLIUM (HIRST et JONES)(6).

30g de polysaccharide sont mis à gonfler dans l'eau et à la masse ainsi obtenue, 450 ml d'hydroxyde de thallium N sont ajoutés sous agitation énergique et à l'obscurité. Après un séjour de 2 heures à 20°C, le mélange réactionnel est filtré , le résidu est lavé à l'alcool et séché à 60°C sous vide.

Le composé jaune citron (98g contenant 49g de thallium dosable par l'acide sulfurique en présence de phénol-phtaléine) est pulvérisé et traité à reflux pendant 12h par de l'iodure de méthyle contenant une petite quantité de méthanol anhydre. Le solvant est ensuite éliminé à 30°C sous pression réduite (10mm) et le résidu solide d'iodure de thallium et de polysaccharide partiellement méthylé est repris par 200ml d'une solution benzénique d'éthoxyde de thallium (*) à 30p.100. Après quelques minutes d'agitation, le benzène est distillé à 30°C sous pression réduite (10mm) et le résidu obtenu est pulvérisé puis traité par de l'iodure de méthyle dans les mêmes conditions que précédemment. L'iodure de méthyle est enfin éliminé et le polysaccharide méthylé est séparé de l'iodure de thallium par ébullition dans le méthanol.

(*) L'éthoxyde de thallium peut être préparé de plusieurs manières :

- a) Agitation de l'hydroxyde de thallium (67g) dans de l'éthanol (20 ml) à 20°C. Après 10 minutes, l'éthanol est décanté. L'opération est répétée trois fois.
- b) Agitation de l'oxyde de thallium (456g) dans la formaldehyde (180ml, d : 1,084). Lorsque la réaction est terminée, on filtre et le filtrat est neutralisé avec de l'acide formique. Le formiate de thallium (50g) dissous dans son propre poids d'eau est porté à l'ébullition avec une solution éthanolique (150ml) de sodium (8g). L'éthoxyde de thallium doit être conservé en ampoules scellées dans l'éthanol et à l'obscurité.

F - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE METHYLATION DE L'AMYLOSE ET DE L'AMYLOPECTINE
DANS L'AMMONIAC LIQUIDE (HODGE, KARJALA et HILBERT) (7).

10g d'amidon sec sont agités avec 600ml d'ammoniac liquide anhydre dans un vase de DEWAR. La température du mélange réactionnel est de -35°C . Sept additions successives de sodium et d'iodure de méthyle sont ensuite effectuées. Le métal alcalin sera additionné de telle façon que la quantité de sodium libre présent dans le mélange réactionnel soit consommée en 15 minutes (visible par la coloration bleue du mélange réactionnel) par l'addition goutte à goutte d'iodure de méthyle. Les quantités de sodium ajoutées par petits fragments et par unité de glucose sont les suivantes : 2 et 1,8 atomes pour les étapes 1 et 2, les additions ultérieures étant de 1,4 atome, 0,8, 1,4, 1 et 0,8 atomes par unité de glucose. En aucun cas les réactions de substitution du métal alcalin ne devront excéder une heure. Les additions ultérieures de sodium se font dans les conditions suivantes : 1,8 atome de sodium par unité de glucose puis 1,4 et 0,8 atomes de sodium.

L' amidon méthylé insoluble est séparé par aspiration du liquide surnageant et le résidu solide est lavé avec de l'ammoniac liquide. On procède ensuite à de nouveaux traitements par 1,4, puis 1, puis 0,8 atome de sodium par molécule de glucose.

Si de nouveaux traitements sont nécessaires, on recueille le composé insoluble et on réalise des additions de sodium de 1, puis de 0,8 atome de sodium par molécule de glucose.

La fin de la méthylation est marquée par l'apparition d'une coloration bleue persistante lors de l'addition, au milieu réactionnel, de sodium en excès.

Le résidu final est séché à l'air, puis sous vide; il est ensuite purifié par des extractions à l'eau chaude suivies d'une cristallisation par l'addition d'éther de pétrole à partir de la solution chloroformique. Poids final : 10 à 11 grammes.

G - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE METHYLATION DE LA N-ACÉTYLGLUCOSAMINE PAR LE
DIAZOMETHANE (KUHN et BAER) (8).

Une solution de 2g de N-acétylglucosamine dans l'eau (25ml) et le méthanol (100ml) refroidie de 0°C est traitée avec du diazométhane obtenu

à partir de 20g de N-nitroso-N-méthylurée en solution dans 200ml d'éther. Un dégagement important d'azote se produit et la solution se décolore en revenant progressivement à la température ordinaire en une nuit. Le résidu obtenu par évaporation sous pression réduite est dissous dans 20ml de méthanol et quelques gouttes d'eau. Une nouvelle méthylation est réalisée en une nuit, avec une solution étherée de diazométhane préparée à partir de 8g de N-nitroso-N-méthylurée. L'excès de réactif est alors détruit par addition d'une petite quantité d'acide acétique et la solution est évaporée sous pression réduite. (Une aliquote du produit obtenu analysée par chromatographie sur papier dans le système solvant pyridine-acétate d'éthyle-eau (1 : 2 : 2 v/v) révèle la présence d'une petite quantité de N-acétylglucosamine et d'un produit majeur de mobilité chromatographique plus élevée). Le produit séché sous vide est dissous dans une quantité minimale de méthanol sec (environ 10ml) et on ajoute lentement de l'éther sec pour obtenir un précipité persistant (environ 6 volumes). Le précipité initialement amorphe devient granuleux en le triturant avec de l'éther. Il est dissous dans le n-butanol chaud (3ml). Le méthyl-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranoside cristallisé à froid en aiguilles. Après deux recristallisations dans l'éthanol absolu, le poids de méthylglucoside obtenu est de 1g.

La chromatographie sur colonne de charbon (Darco G-60, 80g) et de celite 535 (80g) du produit brut fournit, par élution à l'aide d'un gradient de concentration croissante en éthanol, le méthyl-β-D-N-acétylglucosaminide pur.

H - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE METHYLATION DU METHYL-2,3,4-TRI-O-ACETYL-α-D-MANNOPYRANOSIDE PAR LE DIAZOMETHANE (GROS et GRUNEIRO) (9).

1g du dérivé acétylé du méthyl-mannoside est dissous dans 10ml de dichlorométhane. On maintient la solution à 0°C et on additionne 0,05ml du mélange éther trifluorure de bore. Une solution de diazométhane dans le dichlorométhane est alors ajoutée jusqu'à ce que la coloration jaune persiste dans le milieu. Après 30mn à 0°C, le précipité de polyméthylène est filtré et le filtrat évaporé. Le résidu obtenu cristallise spontanément.

Le méthyl 6-mono-O-méthyl-α-D-mannoside est préparé par desacétylation. 2g du méthyl-2,3,4-tri-O-acétyl-6-mono-O-méthyl-α-D-mannoside dissous dans 40 ml de méthanol sont traités par 1 ml de méthoxyde de sodium 0,9M

pendant 12h à 25°C. La solution est alors neutralisée par de la Dowex 50w (forme H⁺). Après filtration, l'éther méthylique est isolé par évaporation et cristallisation dans l'éthanol.

I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE METHYLATION DE LA PERACETHYLGLUCOSAMINE (KUHN et TRISCHMANN) (10).

4g de penta-O-acétyl-D-glucosamine, préparés par action de l'anhydride acétique en présence de chlorure de zinc ou de pyridine sur la D-glucosamine sont dissous dans 40ml de diméthylformamide. On ajoute 20ml d'iodure de méthyle et 10g de baryte hydratée (Ba(OH)₂, 8H₂O). Le mélange est maintenu 5h à 0°C. On ajoute alors 15ml d'iodure de méthyle et 15g d'oxyde de baryum. Le mélange est maintenu 2h à 0°C, puis 30h à 20°C. A la suspension obtenue, on ajoute 30ml d'une solution saturée en chlorure de sodium et l'on extrait 5 fois par un volume égal de chloroforme. La phase organique est lavée par une solution de thiosulfate de sodium, filtrée et évaporée à un sirop sous pression réduite.

J - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE METHYLATION D'UN POLYSACCHARIDE (PARIKH et JONES) (11).

3,5g de polysaccharide sec sont dissous à chaud dans le diméthylsulfoxyde. La suspension est alors refroidie à 20°C, 15g d'oxyde de baryum et 60ml d'iodure de méthyl sont additionnés. Le mélange est agité 48h à 30°C. Les sels inorganiques sont ensuite précipités par addition de chloroforme et la solution est centrifugée. La phase organique est lavée par une solution aqueuse de thiosulfate de sodium à 15p.100 (2x30ml) puis par de l'eau distillée (25ml). Elle est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Une évaporation trop poussée du DMSO se traduit par une dégradation du polysaccharide. La solution du polysaccharide méthylé du DMSO est alors soumise à trois traitements successifs avec de l'iodure de méthyl et de l'oxyde d'argent selon la technique de PURDIE. Le sirop obtenu après évaporation examiné en spectroscopie Infra-Rouge ne montre plus de bande d'absorption dans la région 3400-3600 cm⁻¹ ce qui permet de conclure à une méthylation totale du polysaccharide.

K - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE METHYLATION D'UN CEREBROSIDE (HAKOMORI) (12).

20 à 50mg de cérébroside sont dissous dans quelques ml de diméthylsulfoxyde et l'on agite à la température ordinaire en faisant passer un courant lent d'azote. Une quantité de méthyl sulfinyle carbanion, équivalente au nombre d'hydroxyles présents dans le cérébroside, est alors ajoutée.

Le carbanion est préparé selon les conditions de CHAYKOVSKY et COREY en dissolvant de l'hydrure de sodium dans le diméthylsulfoxyde. La quantité d'hydrure de sodium est rigoureusement équivalente au nombre d'hydroxyles présents dans le cérébroside.

Le mélange est agité sous courant d'azote, pendant dix minutes, puis un excès d'iodure de méthyle est additionné et l'agitation est poursuivie pendant vingt minutes.

Le mélange réactionnel est alors dilué avec de l'eau distillée et l'on extrait le cérébrosine méthylé par le chloroforme. Les phases chloroformiques rassemblées sont lavées à l'eau, puis évaporées sous vide. Le résidu est repris par quelques ml d'un mélange éther/éther de pétrole. La solution résultante lavée par l'eau pour éliminer les traces de diméthylsulfoxyde est enfin évaporée sous azote.

Dans ces conditions l'auteur n'obtient pas de bande d'absorption à $3200-3700\text{ cm}^{-1}$ en spectroscopie Infra-Rouge.

II - PREPARATION OU PURIFICATION DES SOLVANTS ET DES MATIERES PREMIERES

A - DISTILLATION DE L'ACIDE IODHYDRIQUE

150 ml d'acide iodhydrique (densité 1,5), additionnés de 3 ml d'acide hypophosphoreux à 50 p. 100 sont distillés dans un appareil en verre, sous un courant lent de gaz carbonique. Le distillat passant à 127°C est recueilli par fraction de 10 ml dans des tubes en verre Pyrex qui sont immédiatement soudés. L'acide iodhydrique, dont la densité atteint alors 1,7, peut être conservé à basse température pendant plusieurs semaines.

B - PREPARATION DE L'OXYDE D'ARGENT

L'oxyde d'argent utilisé dans les réactions de méthylation est préparé extemporanément à l'abri de la lumière selon le procédé de WHISTLER et WOLFROM (13). La baryte hydratée (100 g) est dissoute dans 1 l d'eau chaude. Cette solution est filtrée à chaud, le filtrat est additionné lentement à une solution chaude de nitrate d'argent (100 g dans 500 ml d'eau). Le précipité formé d'oxyde d'argent est recueilli sur Buchner et est lavé abondamment à l'eau bouillante jusqu'à disparition des ions Ba^{++} (le filtrat ne doit plus donner de précipité de sulfate de baryum par addition d'acide sulfurique). L'oxyde d'argent ainsi préparé est séché à l'étuve sous vide à 50°C.

C - PREPARATION DU METHANOL ANHYDRE

Le méthanol employé dans les réactions de méthanolyse ou de méthylglycosilation est deshydraté de la manière suivante : 1 l de méthanol est chauffé à reflux, pendant 4 h, en présence de 50 g de tournure de magnésium, puis distillé à 64,5°C en atmosphère anhydre et conservé dans des flacons bien bouchés.

D - PREPARATION DE LA PYRIDINE ANHYDRE

La pyridine du commerce est chauffée à reflux, pendant 4 h, en présence de baryte anhydre ; elle est ensuite distillée en atmosphère anhydre et conservée sur potasse.

E - PREPARATION D'ETHER ETHYLIQUE ANHYDRE ET SANS PEROXYDE

L'éther éthylique commercial (5 l) est maintenu pendant une semaine sur du chlorure de calcium anhydre ; on effectue cette opération trois fois en changeant à chaque fois le chlorure de calcium. L'éther est ensuite siphonné, puis abandonné sur sodium pendant une semaine au moins. Cette dernière opération permet d'éliminer les dernières traces d'eau et de détruire les peroxydes présents dans l'éther éthylique.

F - PREPARATION DU METHANOLATE DE SODIUM

Le méthanolate de sodium utilisé dans les réactions de O-désacétylation est préparé de façon extemporanée en dissolvant des copeaux de sodium (0,5 g) dans du méthanol anhydre (100 ml).

G - PRÉPARATION DE L'HYDRURE DE SODIUM EXEMPT D'HUILE ET DU METHYL-SULFINYLE CARBANION (SANFORD et CONRAD) (14)

Dans un ballon de 300 ml à trois ouvertures, dont l'une est fermée par une capsule de caoutchouc, est introduit 1,5 g d'hydrure de sodium (mélange à 55 p. 100 avec de l'huile minérale). L'hydrure de sodium est lavé par trois fois sous agitation avec 30 ml de n-pentane. Après le troisième lavage le ballon est fermé d'une part, par un thermomètre et d'autre part, par un condenseur bouché et la solution de n-pentane résiduelle est éliminée par évacuation successive à l'aide d'une pompe à vide par une aiguille hypodermique placée dans la capsule de caoutchouc. Après chaque évacuation le ballon est placé sous azote. Le bouchon du condenseur est alors enlevé et on fait passer un lent courant d'azote par l'intermédiaire de l'aiguille hypodermique. L'hydrure de sodium exempt d'huile peut alors servir pour préparer le méthyl-sulfinyl carbanion ; 15 ml de diméthylsulfoxyde, distillés sur hydrure de calcium et stockés sur tamis moléculaire sec (LINDE, type 4 A, Union Carbide Corp., Linde Div., New York, N.Y.) sont introduits dans le ballon. La solution est chauffée à 50°C sous agitation jusqu'à ce qu'elle devienne verte.

H -PREPARATION DU DIAZOMETHANE

Le diazométhane est préparé extemporanément à partir de la N-nitroso-N-méthylurée, par le procédé de ARNDT (15). Dans un Erlenmeyer de 250 ml, 30 ml de potasse à 40 p. 100 sont mélangés avec 100 ml de dichlorométhane. La solution obtenue est refroidie à 0°C et gardée à cette température durant l'addition de 10 g de N-nitroso-N-méthylurée pulvérisés. La phase organique est rapidement séparée et la phase aqueuse extraite une fois avec 10 ml de dichlorométhane. La solution de dichlorométhane est séchée 3 h à 5°C sur potasse. Le rendement en diazométhane est d'environ 2,8 g.

I - REACTIF D'ELSON et MORGAN ADAPTE A L'AUTO-ANALYSEUR TECHNICON POUR LE REPERAGE DES OSAMINES METHYLEES

- Solution tamponée d'acétylacétone

Acétylacétone..... 7 ml

Solution de phosphate monosodique 0,66 M.... 100 ml

Cette solution est stable pendant 24 h

- Solution de soude 1,66 M

- Solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde

p-diméthylaminobenzaldéhyde..... 3,2 g

Ethanol..... 210 ml

HCl pur R.P..... 30 ml

Cette solution est préparée extemporanément

III - TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

A - DESACTIVATION DU CHARBON ET LAVAGE DE LA CELITE POUR LA CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION DES OLIGOSACCHARIDES

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

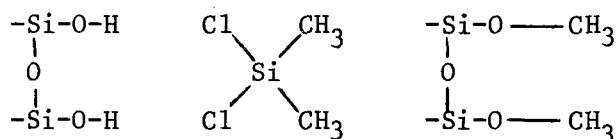
500 g de Celite sont mis en suspension dans de l'eau distillée et les impuretés sont éliminées par plusieurs décantations successives. La Celite est enfin séchée à 37°C.

B - DESACTIVATION DU CHROMOSORB W

L'utilisation de supports à faible teneur en phase stationnaire (moins de 5 p. 100) conduit à des adsorption des solutés par le support, ce qui se traduit par des pics trainants ou des anomalies dans les volumes de rétention. L'adsorption est surtout marquée pour les composés polaires et il semble que les groupes hydroxyles des composés siliceux soient responsables de cette adsorption. C'est pour ces raisons que le Chromosorb W est traité par le diméthylchlorosilane ou l'hexaméthylidisilazane.

- Traitement du support par le diméthylchlorosilane (DMCS)

Ce traitement remplace les groupements hydroxyles libres par les groupements silyl :



Le mode opératoire est le suivant : on fait barboter un courant d'azote dans une fiole de DURAND de petite capacité contenant 20 ml de diméthylchlorosilane. Cette fiole est reliée à un tube en "U" contenant le Chromosorb. Un temps de passage de 2 h à la température ambiante permet une bonne désactivation. Le support est enfin lavé au méthanol anhydre et séché à l'étuve à 100°C.

- Traitement du support par l'hexaméthylidisilazane (HMDS)

Le schéma de réaction est le suivant :



Le mode opératoire est le suivant : on fait bouillir le Chromosorb à reflux dans une solution à 5 p. 100 d'HMDS dans l'éther de pétrole pendant 1 h. On ajoute ensuite du n-propanol et le mélange est laissé 30 h au repos. Après un reflux d'une heure, le solvant est évaporé.

C - UTILISATION DU KIESELGUHR COMME SUPPORT DE PHASE STATIONNAIRE

Avant d'être imprégné par la phase liquide, le Kieselguhr (MERCK for gas chromatography) est agité 3 h à 80°C avec de la soude 2-N, lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralité puis agité avec de l'acide chlorhydrique concentré pendant 3 h à 80°C et lavé à l'eau distillée jusqu'à élimination complète des ions chlorures. Enfin le Kieselguhr est séché à 160°C et tamisé afin d'utiliser des grains dont le diamètre est compris entre I25 et I75 .

D - IMPREGNATION DU SUPPORT AVEC LA PHASE STATIONNAIRE ET TECHNIQUE DE REMPLISSAGE DES COLONNES

I - Imprégnation

La phase stationnaire (par exemple la silicone OV I7) est dissoute dans un solvant dont la nature est précisée par le fabricant. Pour confectionner une colonne de Chromosorb W AW HMDS à 3 p. 100 de silicone OV I7, le mode opératoire est le suivant : 3 g de silicone OV I7, dissous sous agitation et en chauffant légèrement dans 40 ml d'acétone, sont additionnés dans un ballon d'évaporateur rotatif contenant 100 g de Chromosorb W AW HMDS dans 200 ml d'acétone. Le mélange est agité de manière à répartir la phase stationnaire sur le support. Le solvant est alors éliminé, sous pression réduite, en ayant soin de régler à petite vitesse la rotation du ballon d'évaporation pour éviter de briser les grains de Chromosorb. La phase ainsi obtenue est répartie dans un plat et placée à l'étuve à 50°C.

2 - Remplissage des colonnes

L'une des extrémités de la colonne, munie d'un tampon de laine de verre, est reliée à une trompe à eau. Un entonnoir est fixé à l'autre extrémité. La phase est introduite par petites fractions en agitant la colonne. Lorsque celle-ci est complètement remplie, l'entonnoir est enlevé et un tampon de laine de verre est placé au sommet de la colonne. Celle-ci peut alors être conditionnée dans le four du chromatographe à une température supérieure de 20°C à la température d'utilisation, pendant 1 nuit, en ayant soin de faire passer le gaz vecteur.

E - PURIFICATION DES ETHERS PERMETHYLES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SILICE

Dans un bécher de 1000 ml on met en suspension sous agitation énergique 300 ml de Silicagel purifié (MERCK 70-325 "mesh") dans 500 ml de solvant. Le gel de silice ainsi obtenu est introduit dans une colonne de verre (3x80 cm) dont l'extrémité inférieure est fermée par un tampon de laine de verre. Le support chromatographique est tassé par passage de solvant pendant une nuit.

1 g de substance à purifier, dissous dans le minimum de solvant (5 à 10 ml), est injecté en haut de la colonne. Les produits sont élués par le solvant choisi avec un débit de 2 ml/mn, puis fractionnés tous les 5 ml.

BIBLIOGRAPHIE
DE
L'APPENDICE TECHNIQUE

- ARNDT F., *Org.Synthesis*, 1943,2,165, (1).
- BISHOP C.T. et COOPER F.P., *Can.J.Chem.*,1960,38,793, (4).
- FEAR C.M. et MENZIES R.C., *J.Chem.Soc.*,1926,937, (5).
- FISCHER E., *Ber.*,1895,28,1145, (2).
- GROS E.G. et GRUNEIRO E.M., *Carbohyd.Res.*,1970,14,409, (9).
- HAKOMORI S.I., *J.Biochem. (Tokyo)*,1964,55,205, (12)
- HAWORTH W.N., *J.Chem.Soc.*,1915,107,8, (3).
- HODGE J.E., KARJALA S.A. et HILBERT G.E., *J.Amer.Chem.Soc.*,1951,73,3312, (7).
- HIRST E.L. et JONES J.K.N., *J.Chem.Soc.*,1938,496, (6)
- KUHN R. et BAER H.H., *Chem.Ber.*,1953,86,724, (8).
- KUHN R. et TRISCHMANN H., *Chem.Ber.*,1963,96,284, (10).
- PARIKH V.M. et JONES J.K.N., *Can.J.Chem.*,1966,44,327, (11).
- PURDIE T. et IRVINE J.C., *J.Chem.Soc.*,1903,83,1021, (1).
- SANDFORD P.A. et CONRAD H.E., *Biochemistry*,1966,5,1508, (14).
- WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L., *Methods in Carbohydrate Chemistry*,1963,2,146,(13).