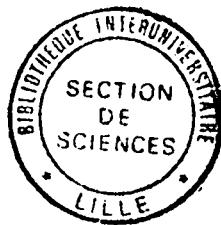


50376
1973
243



50376
1973
243

N° d'ordre 86

M E M O I R E

présenté à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I

pour l'obtention du titre de

Docteur d'Université

Spécialité : BIOCHIMIE

par

Madame Tahereh RIAZI-FARZAD

RECHERCHES SUR LES OLIGOSACCHARIDES DE L'URINE HUMAINE

- I - Mise en évidence d'une oligosaccharidosurie accompagnant la galactosurie provoquée.
- II - Détermination de la structure et étude immunochimique des oligosaccharides excrétés au cours de la galactosurie provoquée.

Présenté le 7 FEVRIER 1973 devant la Commission

Jury : M. J. MONTREUIL, Président

Mlle G. SPIK, Rapporteur

MM. B. FOURNET et G. STRECKER, Examineurs

SCD LILLE 1



D 030 304163 5

50376
1973
243



50376
1973
243

N° d'ordre 86

M E M O I R E

présenté à l'Université des Sciences et Techniques de Lille

pour l'obtention du grade de

Docteur d'Université

Spécialité : Biochimie

par

Madame Tahéré ~~RIAZI~~ FARZAD

RECHERCHES SUR LES OLIGOSACCHARIDES DE L'URINE HUMAINE

- I - Mise en évidence d'une oligosaccharidosurie accompagnant la galactosurie provoquée.
- II - Détermination de la structure et étude immunochimique des oligosaccharides excrétés au cours de la galactosurie provoquée.

PRESENTE LE 7 FEVRIER 73 DEVANT LA COMMISSION

M. J. MONTREUIL, Président

Mlle G. SPIK, Rapporteur

MM. B. FOURNET et G. STRECKER, Examineurs

T A B L E des M A T I E R E S

Pages

INTRODUCTION

1

GENERALITES

4

I - <u>LES GLUCIDES LIBRES DE L'URINE NORMALE</u>	4
A - <u>LES MONOSACCHARIDES URINAIRES</u>	4
B - <u>LES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES</u>	4
II - <u>LES GLUCIDES LIBRES DES URINES PATHOLOGIQUES. LES MELITURIES</u>	7

TRAVAUX PERSONNELS

13

1² MISE EN EVIDENCE D'UNE OLIGOSACCHARIDOSURIE AU
COURS DE L'EPREUVE DE GALACTOSURIE PROVOQUEE

14

I - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	14
A - <u>EPREUVE DE GALACTOSURIE PROVOQUEE</u>	14
B - <u>PREPARATION DES EXTRAITS URINAIRES</u>	14
1 - <u>Procédé de MALLEVAIS-GOUBET et al.</u>	14
2 - <u>Procédé de STRECKER et al.</u>	15
C - <u>ANALYSES DES FRACTIONS OBTENUES</u>	15
1 - <u>Analyses quantitatives</u>	15
2 - <u>Analyses qualitatives</u>	15
II - <u>RESULTATS</u>	16

<u>MISE EN EVIDENCE D'UNE OLIGOSACCHARIDOSURIE AU COURS DE L'EPREUVE DE GALACTOSURIE PROVOQUEE</u>	16		
1 - <u>Analyses quantitatives</u>	16		
2 - <u>Analyses qualitatives</u>	16		
3 - <u>Etude de l'excrétion des oligosaccharides urinaires induite par une surcharge de galactose en fonction du temps</u>	16		
4 - <u>Etude de l'excrétion des oligosaccharides induite par une épreuve de galactosurie provoquée en fonction de la nature du groupe sanguin du sujet</u>	20		
 <u>III - CONCLUSIONS</u>	 20		
<table border="1" style="margin: auto;"> <tr> <td style="padding: 10px;"> 2^e ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET IMMUNOCHIMIQUE DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES EXCRETES DURANT L'EPREUVE DE GALACTOSURIE PROVOQUEE </td> <td style="vertical-align: middle; padding-left: 20px;">22</td> </tr> </table>		2 ^e ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET IMMUNOCHIMIQUE DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES EXCRETES DURANT L'EPREUVE DE GALACTOSURIE PROVOQUEE	22
2 ^e ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET IMMUNOCHIMIQUE DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES EXCRETES DURANT L'EPREUVE DE GALACTOSURIE PROVOQUEE	22		
 <u>I - MATERIEL ET METHODES</u>	 22		
A - <u>ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES</u>	22		
B - <u>ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES OLIGOSACCHARIDES</u>	22		
1 - <u>Détermination de la composition centésimale</u>	22		
2 - <u>Détermination de la composition molaire en glucides</u>	23		
3 - <u>Identification du glucide réducteur</u>	23		
4 - <u>Oxydation periodique</u>	23		
5 - <u>Perméthylation</u>	24		
6 - <u>Hydrolyses enzymatiques</u>	24		
C - <u>ETUDE DES PROPRIETES IMMUNOCHIMIQUES</u>	25		
 <u>II - RESULTATS</u>	 25		
A - <u>ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES</u>	25		
B - <u>ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES OLIGOSACCHARIDES</u>	25		
1 - <u>Composition centésimale et molaire</u>	25		
2 - <u>Révélation au chlorure de triphényl tétrazolium</u>	28		
3 - <u>Oxydation periodique</u>	28		
4 - <u>Perméthylation</u>	31		
5 - <u>Hydrolyses enzymatiques</u>	35		

C - <u>ETUDE DES PROPRIETES IMMUNOCHIMIQUES</u>	36
III - <u>CONCLUSIONS</u>	38
3 ^e DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES	40
4 ^e APPENDICE TECHNIQUE	47
I - <u>PREPARATION DES RESINES</u>	48
II - <u>PREPARATION DES COLONNES DE CHARBON CELITE</u>	49
III - <u>DOSAGES COLORIMETRIQUES DES GLUCIDES</u>	50
A - <u>DOSAGE DES HEXOSES PAR LA METHODE A L'ORCINOL</u>	50
B - <u>DOSAGE DES ACIDES URONIQUES PAR LA METHODE AU CARBAZOL SULFURIQUE</u>	52
C - <u>DOSAGE DES HEXOSAMINES PAR LA METHODE D'ELSON ET MORGAN</u>	54
D - <u>DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES PAR LA METHODE A LA DIPHENYLAMINE</u>	56
IV - <u>TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES</u>	56
A - <u>CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE</u>	56
1 - <u>Systèmes-solvants</u>	57
2 - <u>Révélations</u>	57
B - <u>IDENTIFICATION DES HEXOSES ET DETERMINATION DE LEUR COMPOSITION MOLAIRE</u>	58
1 - <u>Hydrolyse chlorhydrique</u>	58
2 - <u>Identification et dosage chromatographique des hexoses</u>	59
V - <u>IDENTIFICATION DU GLUCIDE TERMINAL REDUCTEUR</u>	59
VI - <u>OXYDATION PERIODIQUE</u>	60

VII - <u>PERMETHYLATION DES OLIGOSACCHARIDES</u>	60
1 ^o - <u>PROCEDE DE METHYLATION</u>	60
2 ^o - <u>CONTROLE DE LA PERMETHYLATION</u>	61
3 ^o - <u>HYDROLYSE DES OLIGOSACCHARIDES PERMETHYLES</u>	61
4 ^o - <u>FRACTIONNEMENT ELECTROPHORETIQUE DES HYDROLYSATS</u>	62
5 ^o - <u>IDENTIFICATION DES O-METHYL-OSAMINES</u>	62
6 ^o - <u>IDENTIFICATION DES ETHERS METHYLIQUES DES HEXOSES</u>	63
VIII - <u>ETUDE IMMUNOCHIMIQUE DES OLIGOSACCHARIDES</u>	63
A - <u>ACTIVITES A, B ET H</u>	63
B - <u>ACTIVITES LEWIS a ET LEWIS b</u>	65
5 ^o BIBLIOGRAPHIE	67

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

L'étude des glucides libres de l'urine dans des conditions physiologiques a longtemps posé un certain nombre de problèmes de méthodologie. Il s'agit, en effet, de mettre en évidence des substances qui n'existent qu'en très faibles quantités, et qui, d'autre part, se trouvent en solution saline concentrée. Si faible soit-elle, l'élimination urinaire de glucides est loin d'être nulle, et les quantités excrétées journalièrement par un individu normal sont de l'ordre de 0,2 à 0,5 g de monosaccharides (MONTREUIL et BOULANGER (1) ; FLEURY et EBERHARD (2)) et de 0,150 à 0,300 g d'oligosaccharides (STRECKER) (3).

L'analyse chromatographique d'échantillons urinaires nécessite leur concentration préalable : 50 à 100 fois pour la mise en évidence des monosaccharides et 500 à 1 000 fois pour celle des oligosaccharides. Dans ces conditions, la purification des échantillons urinaires sur des résines échangeuses d'ions est donc indispensable (MONTREUIL et BOULANGER (4)). Cette purification est par contre inutile dans le cas de l'étude des urines pathologiques, qui peuvent renfermer plusieurs dizaines de grammes de sucre, et qui doivent être même parfois diluées avant l'analyse chromatographique.

L'étude des oligosaccharides présents dans les urines pathologiques est donc très délicate, mais a été rendue possible grâce à la méthode de fractionnement des glucides urinaires sur charbon-Celite de STRECKER, BAYARD et MONTREUIL (5), qui permet d'isoler les oligosaccharides urinaires même en présence de quantités massives de glucose ou de galactose. STRECKER et al. (6) avaient ainsi pu observer que le taux des oligosaccharides était considérablement accru dans l'urine d'un jeune enfant qui avait subi une épreuve de galactosurie provoquée, et que cette oligosaccharidurie était due à l'apparition de sucres nouveaux.

Nos travaux ont consisté, dans un premier temps, à vérifier cette observation chez un certain nombre de sujets soumis à une épreuve de galactosurie provoquée, puis à montrer que l'oligosaccharidurie était liée à la nature du groupe sanguin du sujet (système ABO, Lewis et Sécréteur).

Puis, dans un second temps, nous avons entrepris l'étude physico-chimique et immuno-chimique des oligosaccharides et montré qu'ils possédaient la structure de substances de groupe sanguin.

GENERALITES

I - LES GLUCIDES LIBRES DE L'URINE NORMALE

A - LES MONOSACCHARIDES URINAIRES

L'urine humaine renferme 0,2 à 0,5 g de sucres réducteurs, par diurèse de 24 h, exprimés en glucose. Ce léger pouvoir réducteur est dû à la présence d'un nombre élevé de glucides, dont le taux moyen est de l'ordre de quelques mg. La plupart de ces glucides ont été identifiés par chromatographie sur papier par MONTREUIL et BOULANGER (7) et WHITE et HESS (8) et sur la base de l'étude de leurs propriétés physico-chimiques par STRECKER (9) et STRECKER et MONTREUIL (10). La liste complète de ces monosaccharides est donnée dans le tableau I (p. 5).

B - LES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

L'urine humaine renferme 150 à 300 mg d'oligosaccharides (par diurèse de 24 h), représentés par un mélange complexe de plus de 50 constituants. STRECKER (11) et STRECKER, BAYARD et MONTREUIL (12) ont caractérisé 37 d'entre eux, dont la liste est donnée dans le tableau II ; p. 6. Ils peuvent être classés d'après leur composition en glucides en 7 groupes :

1. Oligosaccharides d'origine alimentaire : lactose, saccharose, maltose.
2. Oligosaccharides à pentoses : Xyl→ Glc ; Ara→ Ara ; Rib→ Rib ; Xyl→ Xyl, etc..., d'origine alimentaire probable.
3. Oligosaccharides possédant la composition d'oligosaccharides du lait de Femme : (Fuc, Gal) → Glc ; (2 Fuc, Gal) → Glc ; (2 Fuc, 2 Gal) → Glc.
4. Oligosaccharides renfermant du mannose et de la N-acétylglucosamine, d'origine glycoprotéinique.
5. Oligosaccharides renfermant simultanément du galactose, du fucose, de la N-acétylgalactosamine et du glucose en position terminale réductrice, qui seraient les produits de dégradation de glycolipides.
6. Oligosaccharides acides renfermant de l'acide N-acétylneuraminique, qui proviennent du métabolisme des gangliosides (sialyllactose) ou des glycoprotéines (sialyllactosamine).

TABLEAU I

Monosaccharides identifiés dans l'urine humaine par STRECKER (13)
et STRECKER et MONTREUIL (14).

<u>Nature du glucide</u>	<u>Quantité excrétée</u> (en mg/24 h)
<u>Aldoses :</u>	
D-galactose	1,5 à 8
D-glucose	10 à 50
D-mannose	1,5 à 8
L-arabinose	20 à 50
D-xylose	5 à 50
L-fucose	2 à 10
<u>Cétoses :</u>	
L-xylulose	2 à 8
Ribulose	1 à 5
D-allulose	10 à 40
D-fructose	10 à 50
3-céto-fructose	2,5 à 10
4-desoxy-fructose	2 à 10
allo-heptulose	1 à 5
D-alto-heptulose	4 à 10
D-manno-heptulose	5 à 10
<u>N-acétylhexosamines :</u>	
N-acétylgalactosamine	1
N-acétylglucosamine	1
<u>Acides sialiques :</u>	
Acide N-acétylneuraminique	5 à 10
<u>Acides uroniques :</u>	
Acide glucuronique	5 à 20

TABLEAU II

Oligosaccharides identifiés dans l'urine humaine par STRECKER (15)
et STRECKER, BAYARD et MONTREUIL (16).

Osides neutres non azotés

- 1 : Glc ↔ Fru (saccharose)
2 : (Glc, 2 Fru)
3 : (Glc, 3 Fru)
4 : Xyl ↔ Xyl
5 : Ara ↔ Ara
6 : Rib ↔ Rib
7 : Xyl → Glc
8 : Gal → Gal
9 : Gal → Glc (lactose)
10 : Gal → Glc
11 : Gal → Glc
12 : (3 Glc) → Glc
13 : Fuc → Glc
14 : (Fuc, Gal) → Glc
15 : (Gal, 2 Fuc) → Glc
16 : (2 Gal, 2 Fuc) → Glc

Osides neutres azotés1^o à N-acétylglucosamine

- 17 : (Gal, Fuc) → GlcNAc
18 : (2 Gal, Man, Fuc, GlcNAc) → Gal
19 : (2 Gal, 2 Fuc, Man) → GlcNAc
20 : (Man, GlcNAc) → GlcNAc

2^o à N-acétylgalactosamine

- 21 : (Gal, GalNAc) → Glc
22 : (Gal, Fuc, GalNAc) → Glc
23 : (Gal, Fuc, GalNAc) → Glc
24 : (2 Gal, Fuc, GalNAc) → Glc
25 : (Gal, 2 Fuc, GalNAc) → Glc
26 : (Fuc, GalNAc) → Gal

Osides acides1^o à acide glucuronique

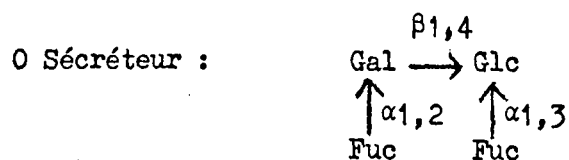
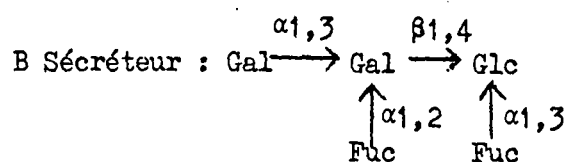
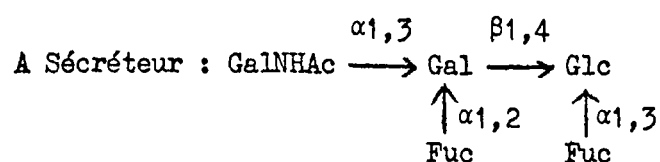
- 27 : GlcUA → Glc
28 : GlcUA → Glc
29 : 2 GlcUA → Glc
30 : GlcAU → GlcNAc
31 : (GlcUA, GlcNAc) → Glc
32 : (GlcUA, GlcNAc) → Glc

2^o à acide N-acétylneuraminique

- 33 : ANAN → Gal
34 : ANAN → Gal → Glc
35 : ANAN → Gal → Glc
36 : ANAN → Gal → GlcNAc
37 : ANAN → Gal → GlcNAc

7. Oligosaccharides acides renfermant de l'acide glucuronique, de la N-acétylglucosamine et du glucose, qui pourraient être considérés comme des produits du métabolisme des glycosamino-glycannes, s'il ne se posait le problème de la présence de glucose en position terminale réductrice.

Les oligosaccharides du groupe 5 existent dans l'urine en quantité appréciable (5 à 20 mg par diurèse de 24 h) et leur présence dans l'urine est fonction du groupe sanguin des individus. LUNDBLAD (17) a montré qu'ils n'existaient que dans les urines de sujets sécréteurs et décrit les structures suivantes :



Toutefois, STRECKER, CHAUVET et MONTREUIL (18) ont montré que ces oligosaccharides étaient parfois absents des urines de sujets sécréteurs, et que, par contre, l'urine renfermait un grand nombre d'autres oligosaccharides à activité de groupe sanguin, de masse moléculaire élevée (Fig. 1 ; p. 8).

II - LES GLUCIDES LIBRES DES URINES PATHOLOGIQUES. LES MELITURIES

Le terme de méliturie désigne la présence de quantités élevées de sucres dans l'urine, quelle qu'en soit la cause. Ce terme est longtemps resté synonyme de glycosurie, mais un grand nombre de mélituries est actuellement connu, comme le montre le tableau II (p. 9) que nous avons emprunté à COTTE et al. (19), en le complétant toutefois par des données récentes de la littérature. Ces mélituries sont souvent le fait de simples

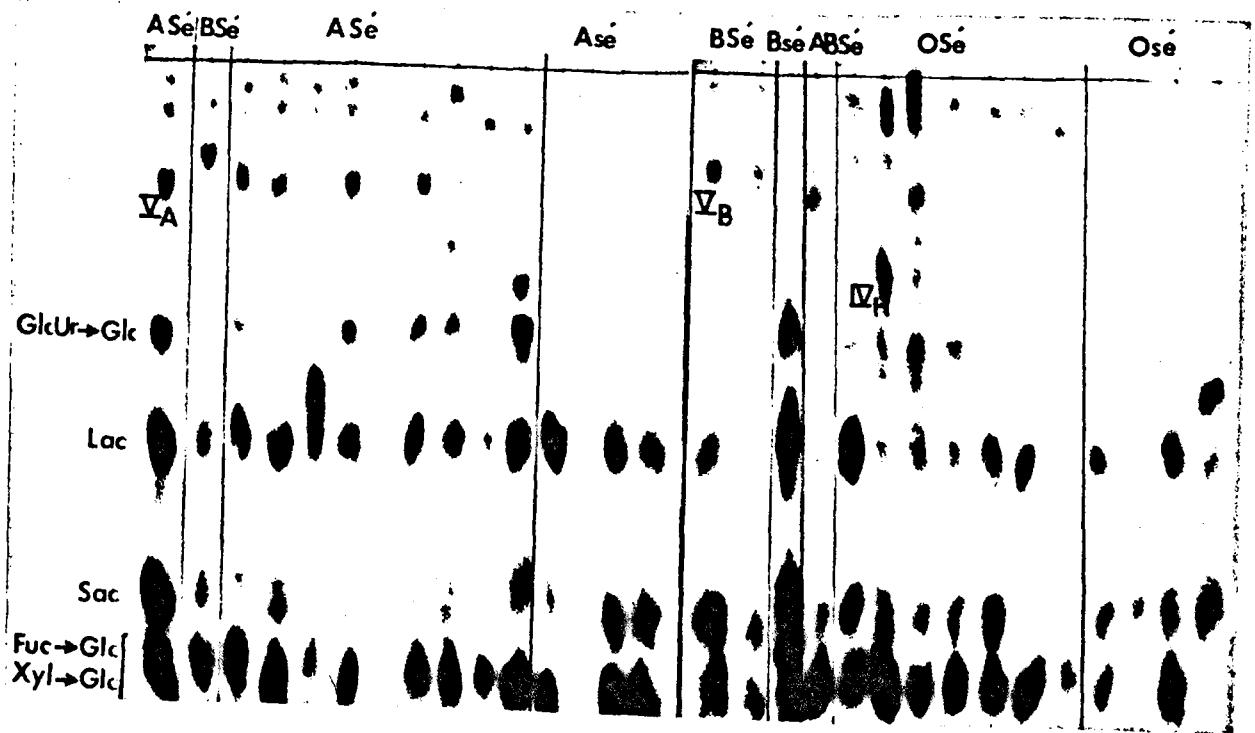


Figure 1

Variations de la composition en oligosaccharides de l'urine en fonction du groupe sanguin d'après STRECKER et al. (20). Sé : Sécréteur ; sé : non Sécréteur. Conditions de la chromatographie : Papier Whatman n° 3 ; système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) ; révélation à l'oxalate d'aniline.

TABEAU III

Classification des mélituries d'après COTTE, COLLOMBEL et MATHIEU (21)

	Mélituries physiologiques			Mélituries pathologiques secondaires			Mélituries pathologiques primitives	
	Surcharge alimentaire	Immaturité	Femme enceinte	Trouble hépatique	Trouble intestinal	Trouble rénal	Mélituries primitives bénignes	Mélituries primitives graves
Glycosuries non diabétiques						- Diabète rénal - De Toni, Debré - Franconi - Wilson - Löwe		
Galactosuries		Galactosurie néonatale		Galactosurie hépatique				Intolérance congénitale (déficit en transférase)
Fructosuries	Fructosurie alimentaire	Fructosurie néonatale		Fructosurie hépatique			Fructosurie essentielle (déficit en fructo-kinase)	Intolérance congénitale (déficit en phospho-1-fructo-aldolase)
Lactosuries		Lactosurie néonatale	Lactosurie de la femme enceinte		Lactosurie par entérite			Intolérance congénitale (déficit en lactose)

Maltosuries	de bière							ce congénitale (déficit en maltose)
Saccharosuries	Saccharosurie des gourmands				Saccharosurie par entérite		Saccharosurie endogène (présence d'un enzyme anormal	Intolérance congénitale (déficit en saccharose)
Pentosuries	Pentosurie alimentaire						Xylulosurie	
Heptulosurie	Mannoheptulosurie (consommation d'avocats)							
Sialurie et N-acétylhexosaminurie								Dysfonctionnement possible d'un gène régulateur
	MONTREUIL et al. (22), FONTAINE et al. (23) et STRECKER et al. (24)							
Manno-N-acétylglucosamino-oligosaccharidosurie associée à une gangliosidose à GM 2								
	(STRECKER et MONTREUIL (25))							

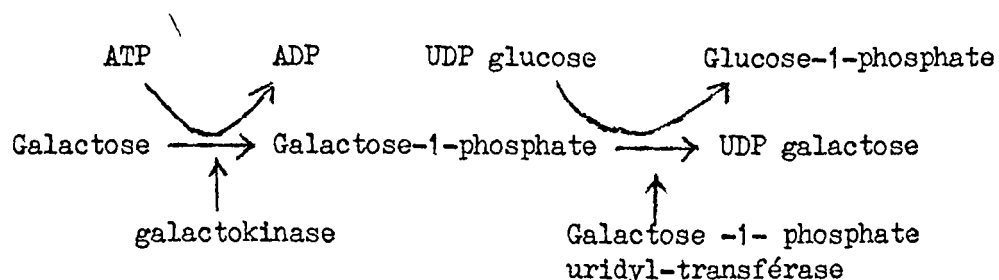
phénomènes d'intolérance alimentaire, mais également celui d'affections pathologiques et génotypiques graves. Parmi ces affections, nous donnerons une place prépondérante à la galactosémie du nourrisson, dont la découverte allait donner une importance croissante à une nouvelle classe de maladies métaboliques, dont l'intérêt génétique et pédiatrique est devenu très important. Deux cas de galactosémies sont à distinguer :

1. La galactosémie par insuffisance hépatique

Dans ce cas, une altération cellulaire globale (hépatite aigüe ou chronique) s'accompagne d'une difficulté de métabolisme du galactose. Une rétention du galactose-1-phosphate s'observe alors dans les cellules hépatiques, accompagnée de l'élimination urinaire de galactose.

2. La galactosémie congénitale du nourrisson

Cette maladie est liée à un déficit en galactose-1-phosphate-uridyl-transférase et se transmet comme un gène autosomique récessif. Toutes les cellules de l'organisme accumulent du galactose-1-phosphate, et plus particulièrement les hématies. Le schéma ci-dessous explique le mécanisme de cette accumulation :



Le schéma de la figure 2 (p.11) permet de replacer le métabolisme du galactose dans la grande voie glycolytique générale.

L'accumulation de galactose-1-phosphate dans les cellules de l'organisme est la cause de manifestations cliniques graves : troubles digestifs (vomissements, anorexie) ; anomalies hépatiques (ictère, hépatomégalie, déficit du complexe prothrombique, lésions cellulaires) ; cataracte amenant une cécité complète ; retard du développement psycho-moteur.

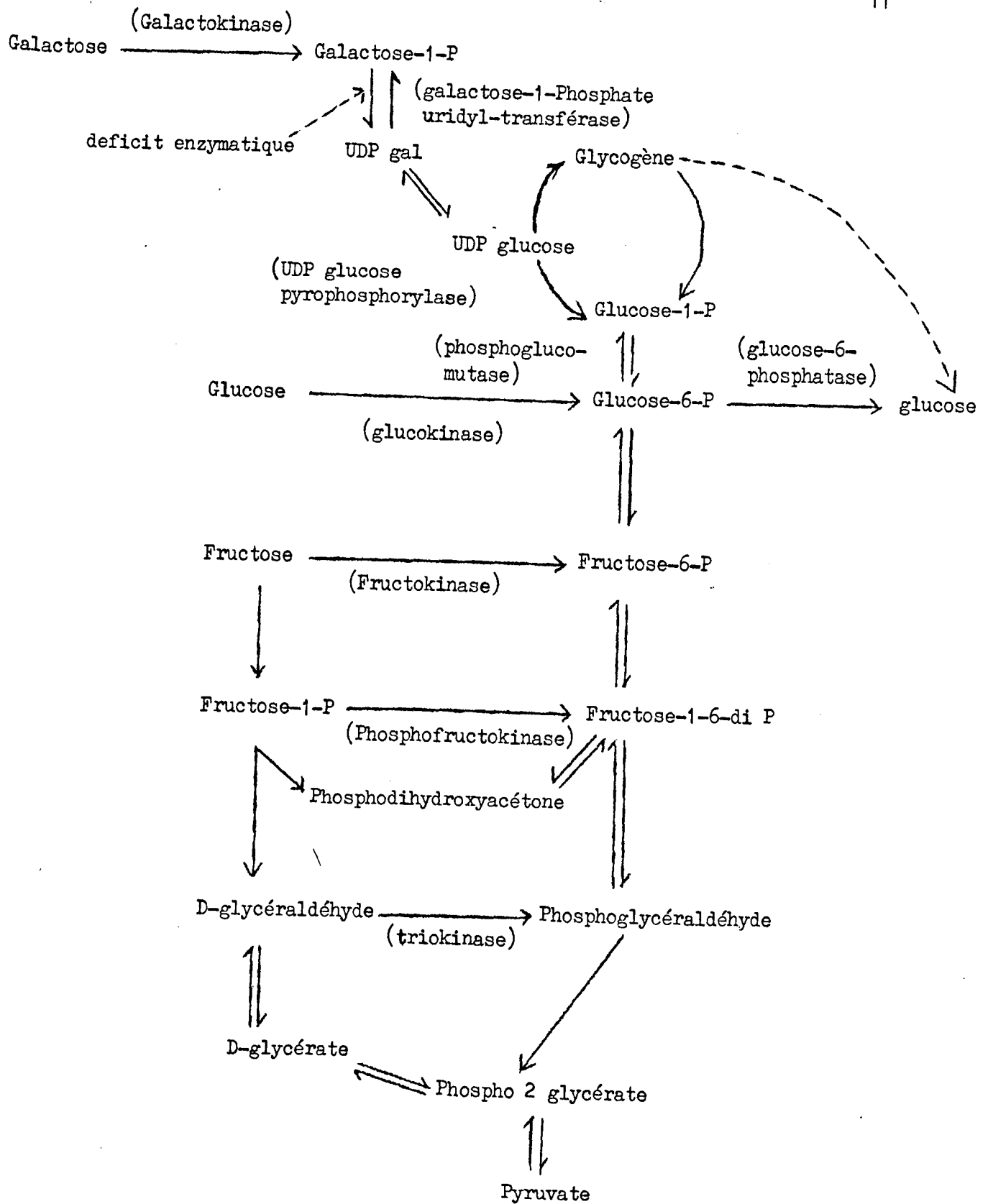


Figure 2

Insertion du métabolisme du galactose dans la grande voie glycolytique générale.

TRAVAUX PERSONNELS

- 1^o MISE EN EVIDENCE D'UNE OLIGOSACCHARIDOSURIE AU COURS DE L'EPREUVE DE GALACTOSURIE PROVOQUEE

- 2^o DETERMINATION DE LA STRUCTURE ET ETUDE IMMUNOCHIMIQUE DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES EXCRETES DURANT L'EPREUVE DE GALACTOSURIE PROVOQUEE

1° MISE EN EVIDENCE D'UNE OLIGOSACCHARIDOSURIE AU COURS DE
L'EPREUVE DE GALACTOSURIE PROVOQUEE

I - MATERIEL ET METHODES

A - EPREUVE DE GALACTOSURIE PROVOQUEE

Les épreuves de galactosurie provoquée ont été pratiquées chez des 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. Des urines de référence sont recueillies durant les heures qui précèdent la surcharge en sucre. Les échantillons urinaires, additionnés d'un mélange de chloroforme et de toluène, sont entreposés 24 h à 2° C.

B - PREPARATION DES EXTRAITS URINAIRES

Les urines ont été fractionnés selon deux procédés différents suivant la nature des glucides étudiés. Le procédé de MALLEVAIS-GOUBET et al. (27) permet de fractionner et de doser sélectivement, d'une part, les glucides conjugués (glycoprotides) et, d'autre part, les oligo et les monosaccharides urinaires. Le procédé de STRECKER et al. (28) est un procédé de routine d'étude comparée des oligosaccharides urinaires.

1. Procédé de MALLEVAIS-GOUBET et al. (29)

Les urines, préalablement maintenues pendant 24 h à 4° C, sont filtrées et concentrées 10 fois par lyophilisation. Elles sont ensuite ajustées à pH 6 et traitées à - 15° C, par 9 volumes d'éthanol absolu pendant 30 mn. On recueille par centrifugation un précipité qui est dialysé pendant 3 jours contre de l'eau distillée. On obtient donc, par ce procédé, 3 fractions : la fraction adialysable du précipité éthanolique

("fraction glycoprotidique") ; la fraction dialysable du précipité éthanolique ("fraction oligosaccharidique") et la solution éthanolique surnageante ("fraction monosaccharidique").

2. Procédé de STRECKER et al. (30)

Un volume d'urine correspondant à une diurèse de 24 h, ou parfois de 6 h, est recueilli sur un mélange de chloroforme et de toluène, puis filtrée après un séjour de 24 h à 2° C. Une quantité d'urine correspondant au 1/5 d'une diurèse de 24 h est ensuite déminéralisée par passage sur des échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme H⁺ ; 2 cm x 40 cm) puis d'anions (Déacidite A-102 D ; "mesh" 25-50 ; forme formiate ; 2 cm x 40 cm). La solution effluente est passée sur une colonne de charbon-Celite (2 cm x 10 cm), préparée selon le procédé de WHISTLER et DURSO (31), qui est ensuite éluee, successivement, par 500 ml d'eau, puis par des volumes égaux d'éthanol à 3,5, 7,5 et 50 p. 100.

C - ANALYSES DES FRACTIONS OBTENUES

1. Analyses quantitatives

La composition en glucides totaux des fractions décrites ci-dessus a été déterminée par l'application des méthodes colorimétriques suivantes : les hexoses totaux, par le procédé à l'orcinol sulfurique de TILLSMANS et PHILIPPI (32), modifié par RIMINGTON (33) et selon le protocole expérimental décrit par MONTREUIL et SPIK (34) et SPIK et MONTREUIL (35) ; les acides uroniques, par la méthode au carbazole sulfurique de DISCHE (36), selon le mode opératoire de MONTREUIL et SPIK (37) ; les osamines, par la technique de BELCHER, NUTTENT et SAMBROOK (38), après une hydrolyse chlorhydrique (HCl 4 N ; 100° C ; 4 h) effectuée en tubes scellés sous vide ; les acides sialiques conjugués, par la méthode à la diphenylamine de WERNER et ODIN (39).

2. Analyses qualitatives

Les fractions éthanoliques désorbées de la colonne de charbon-Celite ont été soumises à l'analyse chromatographique sur papier Whatman n° 3, dans les systèmes-solvants de PARTRIDGE (40) : n-butanol/ acide acétique/eau (4 : 1 : 5) et de FISHER et NEBEL (41) : acétate d'éthyle/

pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). Les révélations ont été effectuées à l'aide du réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (42).

II - RESULTATS

MISE EN EVIDENCE D'UNE OLIGOSACCHARIDOSURIE AU COURS DE L'EPREUVE DE GALACTOSURIE PROVOQUEE

L'étude quantitative et qualitative de la composition glucidique des urines avant et après une épreuve de surcharge en galactose, nous a conduit aux résultats suivants :

1. Analyses quantitatives

Les résultats rassemblés dans le tableau IV (p. 17) montrent que l'épreuve de galactosurie provoquée est responsable d'une augmentation du taux des glucides libres de l'urine, tandis que celui des sucres conjugués (glycoprotides) demeure inchangé. L'augmentation du taux des glucides libres porte surtout sur la fraction monosaccharidique, et plus faiblement, sur la fraction oligosaccharidique.

2. Analyses qualitatives

L'analyse chromatographique de la fraction monosaccharidique montre que l'augmentation porte exclusivement sur le galactose. Par contre, l'augmentation du taux des oligosaccharides s'explique par la présence de 2 nouveaux composés, numérotés 1 et 2 dans la figure 3 (p. 18).

3. Etude de l'excrétion des oligosaccharides urinaires induite par une surcharge de galactose en fonction du temps.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons réalisé une épreuve de galactosurie provoquée chez un sujet dont l'urine était recueillie toutes les heures après l'ingestion de galactose. L'analyse des glucides des fractions monosaccharidiques et oligosaccharidiques montré (Fig. 4 ; p. 19) que l'apparition des nouveaux oligosaccharides (numérotés 1 et 2) correspond à peu près à l'élimination du galactose. Toutefois, le taux maximum du galactose urinaire se situe entre 1 à 2 heures, tandis que celui des oligosaccharides se place au bout de la 4e heure. Le taux de galactose urinaire revient à la normale dès la 4e heure, tandis que les oligosaccharides

TABLEAU IV

Composition en glucides urinaires (en mg) excrétés durant les 8 heures qui précèdent (urine A) et qui suivent une épreuve de galactosurie provoquée (urine B), chez un sujet de groupe A Lewis b Secréteur.

	: Adialysable du pré- : cipité alcoolique : (glycoprotides) :		: Dialysable du pré- : cipité alcoolique : (oligosaccharides) :		: Surnageant alcoolique (monosaccharides) :	
	: A	: B	: A	: B	: A	: B
exoses	: 25	: 28	: 42	: 265	: 230	: 2 500
acides uroniques	: 6	: 5,5	: 16	: 22	: 140	: 190
amines	: 15	: 16	: 6	: 75	: traces	: traces
acides sialiques	: 21	: 18	: 12	: 11	: traces	: traces

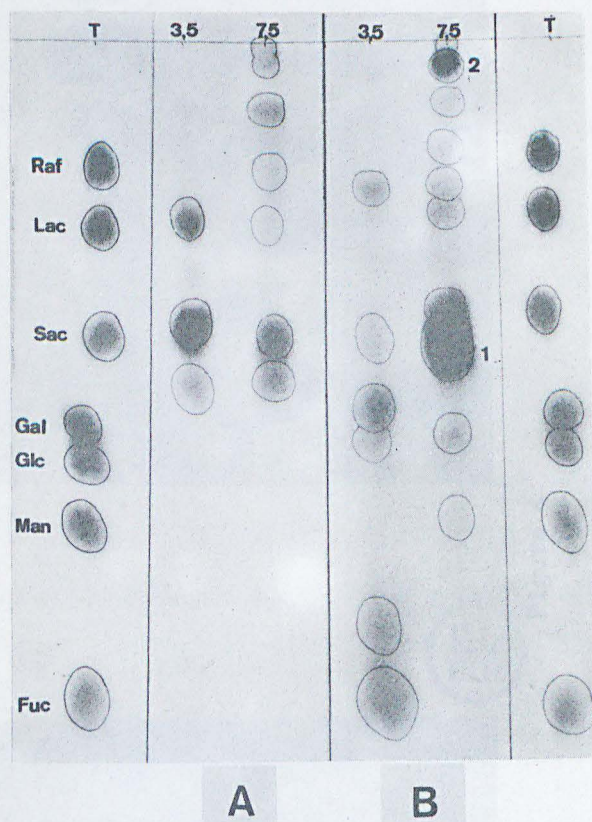


Figure 3

Analyse chromatographique des fractions à 3,5 et 7,5 p. 100 d'éthanol désorbées de la colonne de charbon-Celite. Papier Whatman n° 3. Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Révélation à l'oxalate d'aniline. A : urine normale. B : urine après une épreuve de galactosurie provoquée. T : solution témoin de sucres purs. Raf : raffinose ; Lac : lactose ; Sac : saccharose ; Gal : galactose ; Glc : glucose ; Man : mannose ; Fuc : fucose. 1 et 2 : oligosaccharides absents de l'urine normale.

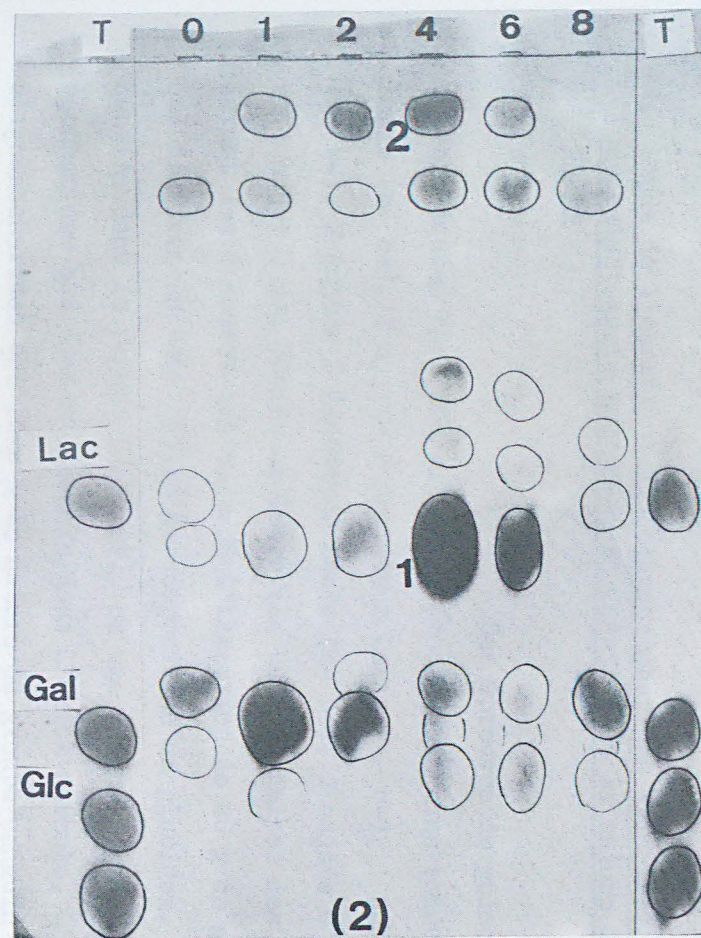
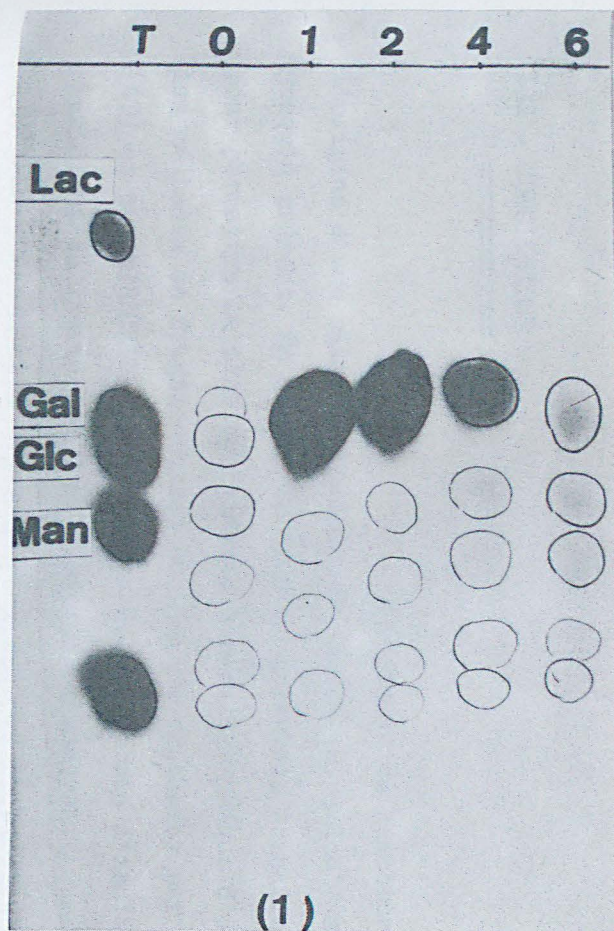


Figure 4

Epreuve de galactosurie provoquée. Variations de la composition glucidique de l'urine en fonction du temps. (1) : fraction monosaccharidique ; (2) : fraction oligosaccharidosurique. Les chiffres 1 et 2 indiquent les nouveaux oligosaccharides. Conditions de la chromatographie : Papier Whatman n° 3 ; systèmes-solvants : (1) : *n*-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) (48 h) ; (2) : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) (18 h) ; révélation à l'oxalate d'aniline ; T : solution témoin de sucres purs (voir Figure 3). 0 : urine avant l'épreuve de galactosurie provoquée ; 1 : temps 0 à 1 h après la prise orale de 40 g de galactose ; 2 : temps 1 à 2 h ; 4 : temps 2 à 4 h ; etc..

sont encore éliminés entre la 4e et la 6e heure. La composition en glucides de l'urine revient à la normale en 6 heures.

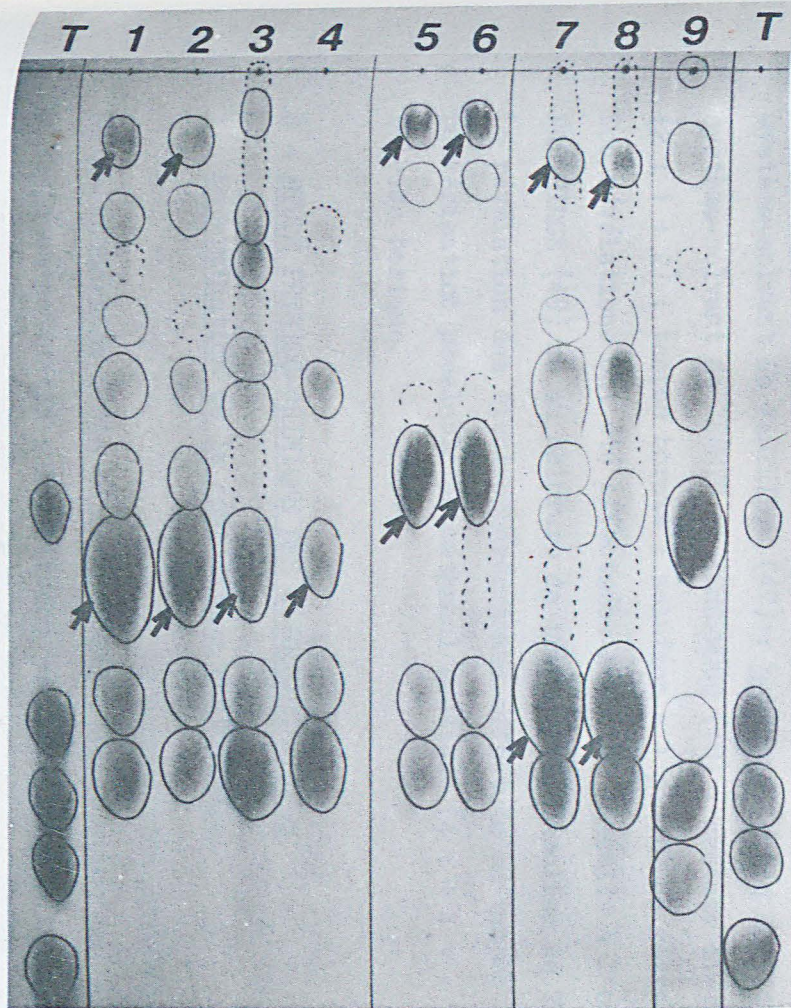
4. Etude de l'excrétion des oligosaccharides urinaires induite par une épreuve de galactosurie provoquée en fonction de la nature du groupe sanguin du sujet

Des épreuves de galactosurie provoquée ont été pratiquées chez des sujets de groupes sanguins connus : 2 sujets A Sécréteur Lewis (a- b+), 2 sujets A Sécréteur Lewis (a- b-), 1 sujet A non Sécréteur Lewis (a+ b-), 2 sujets B Sécréteur Lewis (a- b+), 2 sujets O Sécréteur Lewis (a- b+) et 1 sujet O non Sécréteur Lewis (a+ b-). L'analyse des urines recueillies durant les 6 heures qui suivent l'ingestion de 40 g de galactose, montrent des différences très nettes de composition en glucides. Ces résultats sont décrits dans la figure 5 (p. 21), où une flèche signale la présence des oligosaccharides qui étaient absents dans l'urine normale. L'apparition de nouveaux oligosaccharides est liée à la nature du groupe sanguin des sujets, et l'oligosaccharidosurie est particulièrement intense chez les sujets sécréteurs. La répartition inégale des oligosaccharides prouve que leur excrétion dans l'urine est sous la dépendance des trois phénotypes suivants : système ABO (H), système Sécréteur et système Lewis.

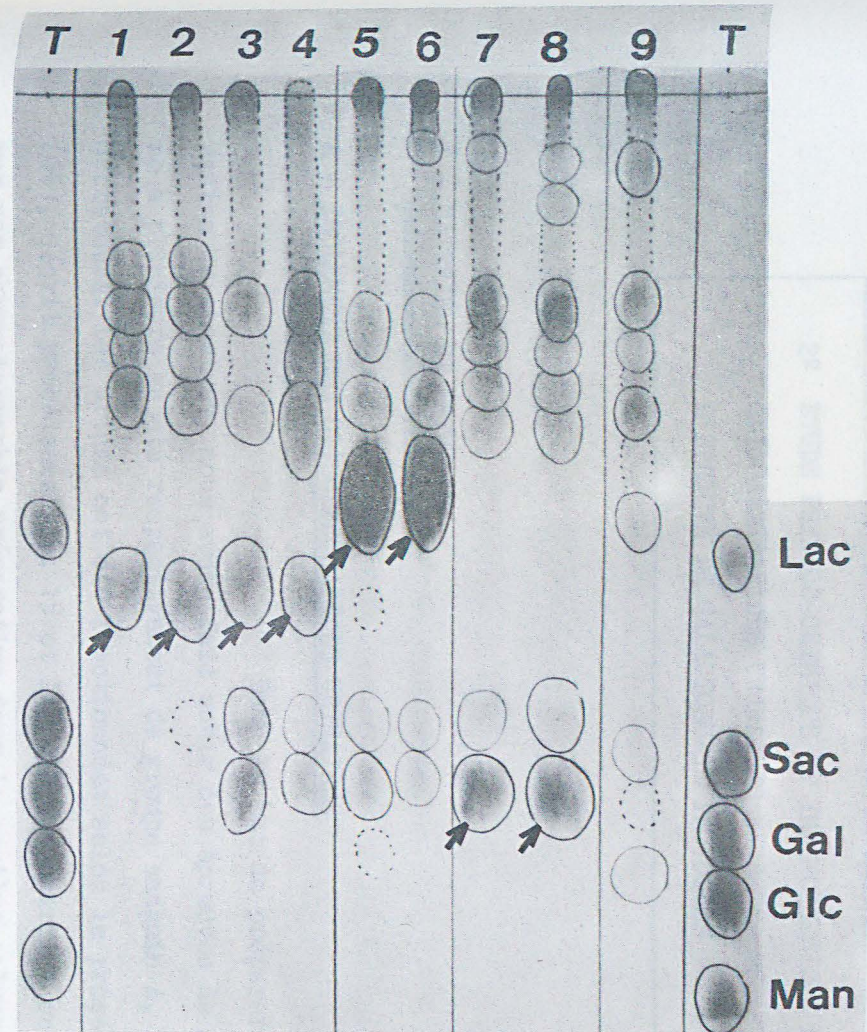
III - CONCLUSIONS

L'épreuve de galactosurie provoquée est à l'origine d'une oligosaccharidosurie discrète, qui n'avait jamais été soupçonnée jusqu'à présent. En effet, le taux de galactose urinaire est alors trop élevé pour permettre la mise en évidence chromatographique d'oligosaccharides, mais les méthodes de fractionnement de l'urine proposées par MALLEVAIS-GOUBET et al. (43) et par STRECKER et al. (44) nous ont permis d'isoler la fraction oligosaccharidique de l'urine et d'en effectuer l'analyse.

Cette oligosaccharidosurie est dépendante des groupes sanguins des systèmes ABO, Sécréteur et Lewis. Ces résultats nous ont donc incités à pousser plus loin nos recherches et à isoler à l'état pur ces nouveaux oligosaccharides afin d'étudier leurs propriétés physico-chimiques et immunologiques.



a



b

Figure 5

Chromatographie sur papier des oligosaccharides urinaires de sujets ayant subi une épreuve de galactosurie provoquée. Papier Whatman n° 3 ; système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). Révélation à l'oxalate d'aniline. T : solution témoin de sucres purs. Planche (a) : Elution du charbon par l'alcool à 7,5 p. 100 ; Planche (b) : Elution du charbon par l'éthanol à 50 p. 100. Les flèches indiquent les oligosaccharides absents de l'urine normale. Groupes sanguins : 1 et 2 : A Se Le (a - b +) ; 3 et 4 : A Se Le (a - b -) ; 5 et 6 : B Se Le (a - b +) ; 7 et 8 : 0 Se Le (a - b +) ; 9 : 0 se Le (a + b -).

2° ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET IMMUNOCHIMIQUE DES
OLIGOSACCHARIDES URINAIRES EXCRETES DURANT
L'EPREUVE DE GALACTOSURIE PROVOQUEE

I - MATERIEL ET METHODES

A - ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

Dans le but de préparer des quantités suffisantes de substrat, nous avons fait subir des épreuves de surcharge en galactose à plusieurs sujets respectivement de groupe sanguin A, B et O Lewis (a- b+) Sécréteurs. Les urines ont été fractionnées selon le procédé de STRECKER et al. (45), décrit précédemment p. 15 et les oligosaccharides ont été isolés à l'état pur par chromatographie préparative dans le système-solvant de FISHER et NEBEL (46) : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). L'état de pureté des préparations ainsi obtenues a été vérifié par chromatographie ou électrophorèse sur papier dans les systèmes-solvants ou tampons suivants : système-solvant de PARTRIDGE (47) : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) ; système-solvant de JERMYN et ISHERWOOD (48) : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2) ; tampon boraté : solution à 1 p. 100 de tétraborate de sodium. Les révélations ont été effectuées avec les réactifs à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (49) ou au chlorure de triphényltétrazolium de TREVELYAN et al. (50). La révélation des électrophorégrammes effectués en tampon boraté nécessite la pulvérisation préalable de méthanol acétique (4 : 1 ; v : v) afin d'éliminer l'acide borique.

B - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES OLIGOSACCHARIDES

1. Détermination de la composition centésimale

La composition centésimale en glucides des oligosaccharides a été déterminée par l'application des méthodes colorimétriques classiques suivantes : les hexoses par la méthode à l'orcinol sulfurique de

TILLMANS et PHILIPPI (51), modifiée par RIMINGTON (52) suivant le protocole expérimental de SPIK et MONTREUIL (53) ; les osamines, par la technique de BELCHER et coll. (54), après une hydrolyse chlorhydrique (HCl 4 N ; 100° C ; pendant 4 heures) effectuée en tubes scellés sous vide.

La composition en glucides des solutions témoins était la même que celle des oligosaccharides (voir appendice technique).

2. Détermination de la composition molaire en glucides

La composition molaire en monosaccharides a été déterminée après hydrolyse chlorhydrique (HCl 1,5 N ; 1,5 h à 100° C) des oligosaccharides. Après purification sur résine échangeuse d'anions (Déacidite A-102 D, "mesh" 25-50 ; forme formiate), les hydrolysats chlorhydriques sont repris par un petit volume d'eau distillée et soumis à l'analyse chromatographique dans le système-solvant de FISHER et NEBEL (55) : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3).

Les rapports molaires des glucides neutres (galactose, glucose et fucose) ont été effectués en appliquant la méthode de DATE (56), modifiée par MONTREUIL et SPIK (57) : révélation par le réactif au phtalate d'aniline et élution des colorations obtenues par une solution d'éthanol à 20 p. 100 d'acide chlorhydrique 0,1 N (voir appendice technique).

3. Identification du glucide en position terminale réductrice

Le glucide en position réductrice terminale a été identifié en déterminant les rapports molaires en glucides neutres et la composition centésimale en glucides neutres et osamines, après réduction de l'oligosaccharide par le borohydrure de sodium. Le protocole expérimental est décrit dans l'appendice technique, p. 59.

4. Oxydation periodique

L'oxydation periodique des oligosaccharides a été effectuée dans les conditions définies par MARINETTI et ROUSER (58) et par GLICK et al. (59). Après réduction du polyaldéhyde formé par le borohydrure de sodium, les glucides non oxydés par l'acide périodique et les polyols libérés après une hydrolyse acide ont été identifiés par chromatographie sur papier et révélation des polyols par le réactif au nitrate d'argent de TREVELYAN et coll. (60). Le protocole expérimental est décrit par l'appendice technique.

5. Perméthylation des oligosaccharides

Les oligosaccharides ont été perméthylés selon la méthode de KUHN, BAER et GAUHE (61), complétée par deux cycles de méthylation selon la méthode de HAKOMORI (62). Le contrôle de la perméthylation a été effectué par chromatographie sur couche mince de Silicagel G, dans le système-solvant : chloroforme/méthanol (9 : 1). La révélation d'une seule tache montre que la molécule a été totalement méthylée.

Les oligosaccharides perméthylés sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique 4 N (100° C ; 4 h), et l'acide chlorhydrique éliminé par distillation sous vide.

Les monosaccharides perméthylés neutres (hexoses) et basiques (osamines) ont été ensuite séparés par électrophorèse préparative sur papier Whatman n° 3 M.M., dans le tampon de MICHL (63) de pH 3,9 : pyridine/acide acétique/eau (3 : 10 : 487).

Les monosaccharides neutres méthylés ainsi obtenus ont été analysés, après méthylosidation, par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de Carbowax 6 000, à 3 p. 100 sur Chromosorb W, "mesh" 60-80. Les osamines méthylées ont été identifiées, après silylation, par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de silicone OV 17 à 3 p. 100 sur Chromosorb W, "mesh" 100-120.

Les protocoles expérimentaux détaillés de ces méthodes sont décrits dans l'appendice technique (p. 60).

6. Hydrolyse enzymatique

Les actions de l' α -D-galactosidase de Fenugrec (*Trigonellum foenum graecum*) de la β -D-galactosidase de foie de boeuf et de la β -D-acétylglucosaminidase de la rate de boeuf ont été étudiées sur les oligosaccharides B₁, B₂ et O₂.

Les hydrolyses enzymatiques sont réalisées de la façon suivante : A 100 μ l d'une solution renfermant une μ mole d'oligosaccharide, on ajoute 600 μ l d'une solution tampon phosphate disodique 0,1 M-acide citrique 0,05 M dont le pH est de 5,3 pour l' α -D-galactosidase, 4,3 pour la β -D-galactosidase et 4,2 pour la β -N-acétylglucosaminidase ; enfin, on ajoute 300 μ l de la solution enzymatique soit 20 m.U. pour l' α -D-galactosidase, 18 m. U. pour la β -D-galactosidase et 3 m.U. pour la β -N-acétylglucosaminidase. Le mélange est porté à 37° C pendant 24 heures. La réaction est arrêtée par chauffage de 3 minutes à 78° C

Une m.Unité (m.U.) est la quantité d'enzyme qui libère une nanomole de p-nitrophénol par minute à 37° C.

Après l'action successive des différentes enzymes, les hydrolysats sont purifiés sur des colonnes (1 x 3 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50 X 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide) et d'échangeurs d'anions (Duolite A 102 D ; "mesh" 25-50 ; forme acétate). Les solutions effluentes sont soumises à la chromatographie sur papier (W_1 , solvant de JERMYN et ISHERWOOD, une nuit) (voir p. 22).

C - ETUDE DES PROPRIETES IMMUNOCHIMIQUES

L'activité de groupe sanguin des oligosaccharides a été déterminée par neutralisation de l'anticorps correspondant après mise en contact. Les résultats sont exprimés par la quantité (exprimée en microgrammes de substance dans 100 μ l de solution) qui inhibe totalement la réaction d'agglutination d'hématies d'un groupe sanguin donné par l'anticorps correspondant. Les activités A, B, O, Lewis a et Lewis b ont ainsi été mesurées. Les protocoles expérimentaux sont décrits dans l'appendice technique (p. 63).

II - RESULTATS

A - ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES OBTENUS APRES UNE EPREUVE DE GALACTOSURIE PROVOQUEE

Nous avons isolé, à partir d'urines de sujets de groupes sanguins A, B ou O, Lewis (a- b+) Sécréteurs, les 6 oligosaccharides indiqués par une flèche dans la figure 5 (p. 21). Nous avons adopté la dénomination suivante : O_1 et O_2 , A_1 et A_2 , B_1 et B_2 (oligosaccharides isolés respectivement de l'urine d'un sujet de groupe O, A et B). Le chiffre 1 correspond au composé qui possède la vitesse de migration la plus élevée.

Ces oligosaccharides ont été obtenus dans un état de pureté satisfaisant comme le montre la figure 6 (p. 26). Leur comportement chromatographique est donné dans le tableau V (p. 27).

B - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES OLIGOSACCHARIDES

1 - Composition centésimale et molaire

La composition centésimale et molaire des 6 oligosaccharides urinaires est donnée dans le tableau V (p. 27). Ces résultats permettent de préciser leur masse moléculaire : O_1 est un disaccharide ; A_1 et B_1 sont des trisaccharides ; O_2 est un hexasaccharide ; A_2 et B_2 sont des heptasaccharides.

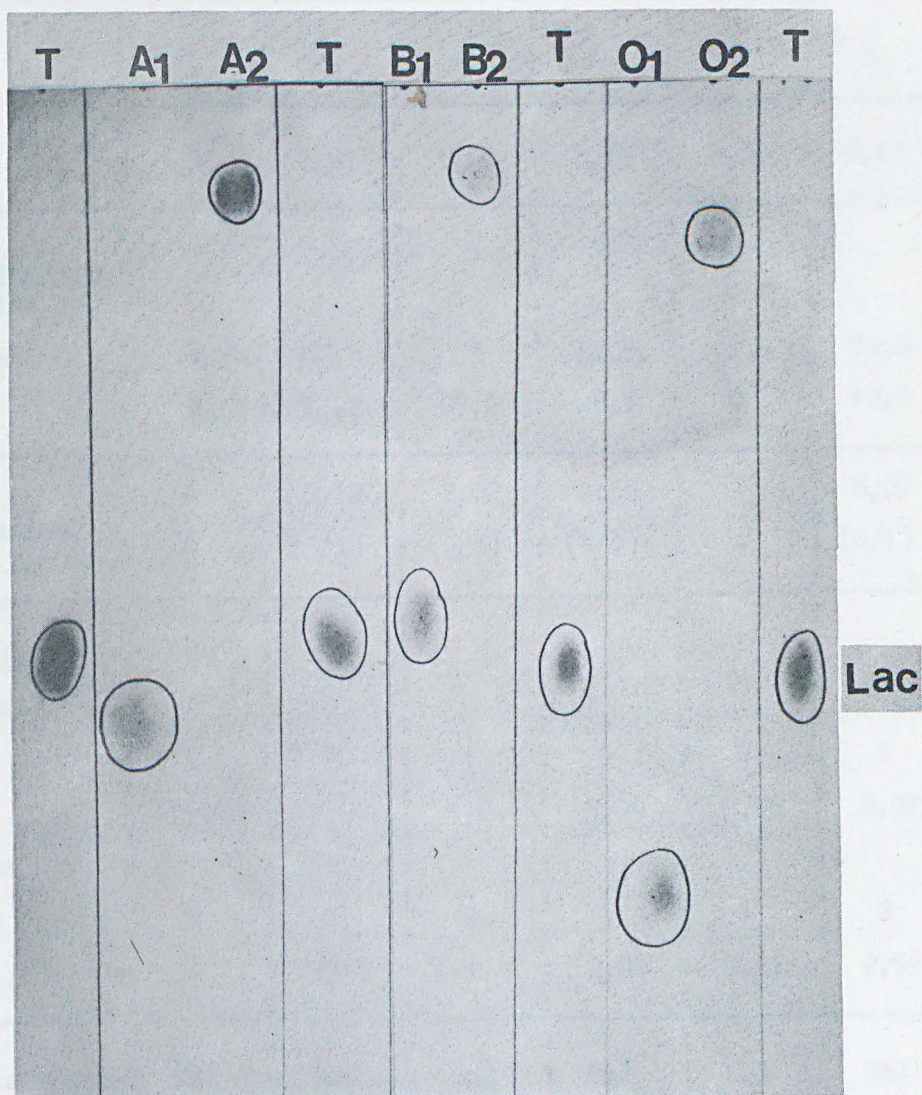


Figure 6

Chromatographie sur papier des oligosaccharides urinaires obtenus après une épreuve de galactosurie provoquée. Papier Whatman n° 3. Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). Révélation à l'oxalate d'aniline. T : solution témoin de lactose.

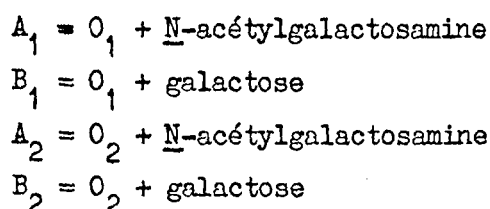
TABLEAU V

Composition centésimale et molaire des oligosaccharides urinaires

	O ₁	O ₂	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂
R _L (*)	1,38	0,27	1,14	0,19	0,90	0,15
<u>Composition centésimale</u> (en p. 100 de poids sec)						
oses "neutres"	74	67,8	55	67,5	82,5	75,8
osamines	0	13,2	27,2	26,7	0	12,6
<u>Rapport oses/osamines</u>	-	5,12 (5/1)	2,02 (2/1)	2,53 (5/2)	-	6,01 (6/1)
<u>Composition molaire</u>						
Avant réduction						
Galactose	1	2	1	2	2	3
Fucose	1,05	3,08	1,0	3,09	0,95	2,97
Après réduction						
Galactose	0	1	0	1	1	2
Fucose	+	2,85	+	2,90	0,92	2,92
Nature du glucide réduc- teur	Gal	Gal	Gal	Gal	Gal	Gal
Nombre de résidus glu- cidiques	2	6	3	7	3	7
Réaction avec le chlo- rure de triphényltétra- zolium	-	+	-	+	-	+

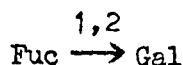
(*) R_L : vitesse de migration par rapport au lactose, dans le système solvant :
acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3).

L'hydrolyse chlorhydrique montre, en outre, que ces oligosaccharides sont essentiellement constitués de galactose, de fucose, de N-acétylglucosamine et de N-acétylgalactosamine (Fig. 7 ; p.29). Ils possèdent tous le galactose en position terminale réductrice. La présence d'un résidu supplémentaire de N-acétylgalactosamine ou de galactose suivant que le sujet est de groupe A ou B laisse présager une origine commune à tous ces oligosaccharides, en relation avec la nature du groupe sanguin et permet de supposer les analogies de structures suivantes :



2. Révélation au chlorure de triphényltétrazolium (Fig. 8 ; p. 30)

Le réactif au chlorure de triphényltétrazolium est spécifique des sucres réducteurs, à la condition, toutefois, que le carbone en α de la fonction réductrice porte une fonction alcoolique. Dans le cas des 6 oligosaccharides urinaires, seuls fournissent une réaction positive les composés O_2 , A_2 et B_2 . Ce résultat permet de conclure que le carbone n° 2 du galactose réducteur terminal n'est pas substitué. Au contraire, le carbone n° 2 des oligosaccharides O_1 , A_1 et B_1 est substitué. Le disaccharide O_1 possède de ce fait la structure suivante :



D'autre part, les trisaccharides A_1 et B_1 fournissent, après hydrolyse ménagée par H_2SO_4 0,05 N, des disaccharides qui réagissent avec le réactif au chlorure de triphényltétrazolium. Ils possèdent donc le fucose en position 1 \rightarrow 2 sur le galactose.

3. Oxydation périodique

Les résultats obtenus peuvent se résumer de la manière suivante : l'hydrolyse chlorhydrique du polyaldéhyde réduit par le borohydrure de sodium libre, dans le cas de l'oligosaccharide O_2 , uniquement de la glucosamine, et dans le cas des oligosaccharides A_2 et B_2 , de la glucosamine et du galactose, dans les proportions relatives 1 : 1 (Fig. 9 ; p. 30).

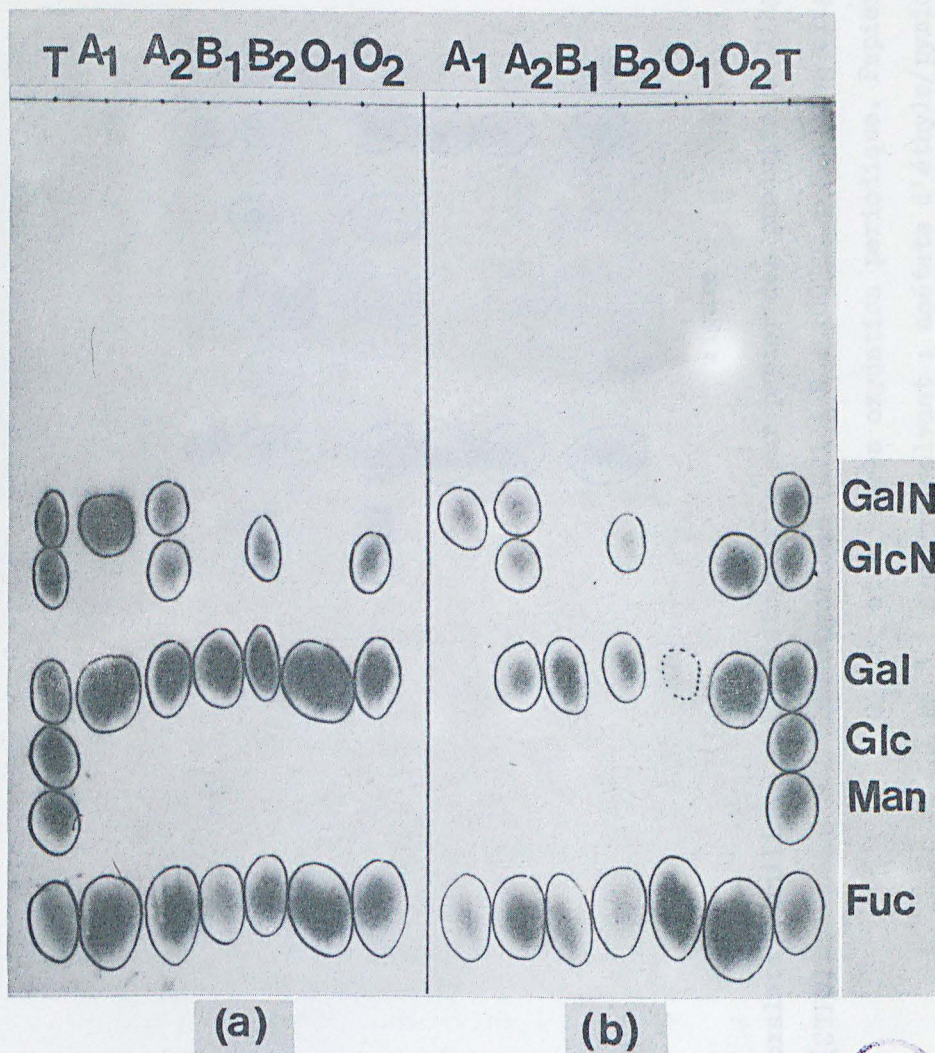


Figure 7

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydriques (HCl 1,5 N ; 1,5 h à 100° C) des oligosaccharides urinaires, avant réduction (a) et après réduction par BH₄K (b). Papier Whatman n° 3 ; système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) ; révélation à l'oxalate d'aniline. T : solution témoin de sucres purs. GalN : galactosamine ; GlcN : glucosamine ; Gal : galactose ; Glc : glucose ; Man : mannose ; Fuc : fucose.

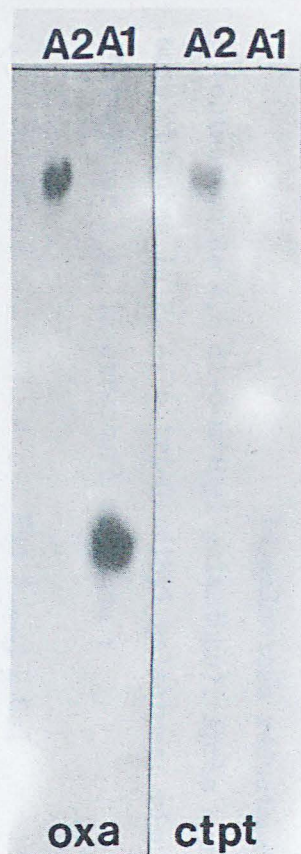


Figure 8

Révélation des oligosaccharides A_1 et A_2 à l'oxalate d'aniline (OXA) et au chlorure de triphényltétrazolium (CTPT).

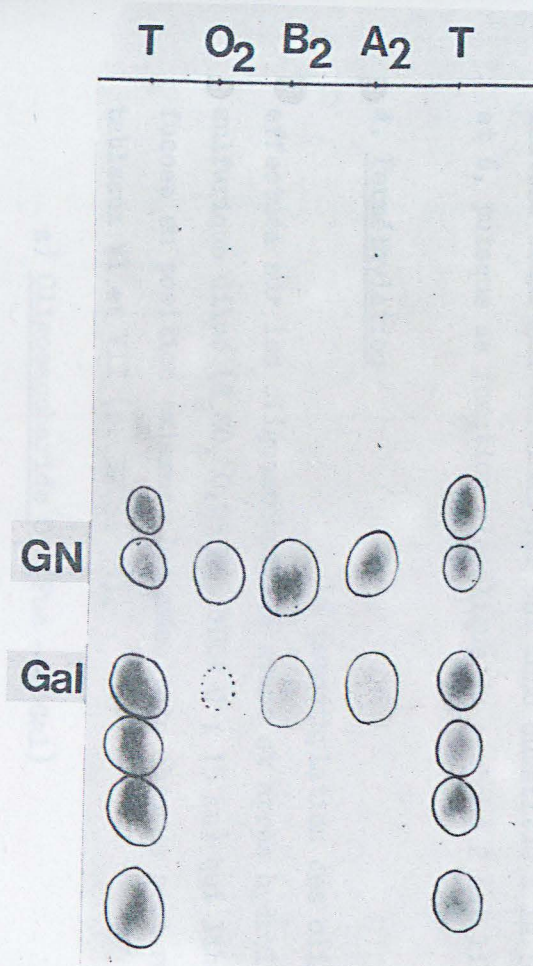


Figure 9

Chromatographie sur papier des produits de l'hydrolyse chlorhydrique (HCl 1 N ; $100^\circ C$; 1 h) des oligosaccharides O_2 , B_2 et A_2 après oxydation periodique. Papier Whatman n° 3 ; système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). Révélation à l'oxalate d'aniline. GN : glucosamine ; Gal : galactose.

Parmi les produits de dégradation de O₂, A₂ et B₂ (polyols provenant de la réduction du polyaldéhyde), nous caractérisons du glycérol et de l'érythritol. La présence d'érythritol est un résultat très significatif.: en effet, il ne peut provenir ni du fucose, ni des N-acétylosamines. Il ne peut provenir que du galactose réducteur terminal qui est donc substitué à la fois en 3 et 4 ou en 4 et 6, puisque sa fonction alcoolique du carbone 2 est libre.

4. Perméthylation

La perméthylation des oligosaccharides a été effectuée sur les oligosaccharides avant et après hydrolyse ménagée par l'acide sulfurique dilué (H₂SO₄ 0,05 N ; 100° C ; 15 mn) qui libère sélectivement le fucose en position externe. Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux VI et VII (p. 32 et 33).

a) Oligosaccharide O₁ (Fuc → Gal)

Ce disaccharide conduit la formation de perméthylfucose et de 3, 4, 6 tri-O-méthyl galactose. Nous confirmons donc ainsi la structure proposée p. 28, c'est-à-dire :



b) Oligosaccharide A₁ (Fuc, GalNHAc) → Gal

Le fucose et la N-acétylgalactosamine sont en position externe non réductrice (obtention des dérivés correspondants perméthylés).

Le galactose réducteur est substitué en 2 et en 3 (obtention de 4,6 di-O-méthyl galactose). Après hydrolyse sélective du fucose, nous obtenons le 2, 4, 6 tri-O-méthyl galactose, résultat qui permet donc d'attribuer à A₁ la structure suivante :

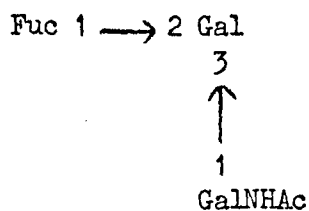


TABLEAU VI

Identification par chromatographie en phase gazeuse (a) (b) des éthers méthyliques des osamines présents dans les hydrolysats des oligosaccharides O₁, O₂, B₁, B₂, A₁ et A₂.

Nature des éthers méthyliques des osamines	t _r (c)	Nature de l'oligosaccharide							
		A ₁ natif	A ₁ défucosylé	O ₁ natif	O ₁ défucosylé	A ₂ natif	A ₂ défucosylé	B ₂ natif	B ₂ défucosylé
3,4,6-tri-O-méthyl- galactosamine	1	+	+			+	+		
4,6-di-O-méthylgluco- samine	1,03; 1,18				+		+		+
6-mono-O-méthylgluco- samine	1,73; 1,89			+		+		+	

(a) sous la forme de leur dérivé de silylation

(b) conditions expérimentales : Appareil Aerograph 1 200 ; détection par ionisation de flamme ; colonne de verre (0,2 x 180 cm) ; phase stationnaire : 3 % de silicone OV17 sur chromosorb W ("mesh" 100-120) ; température : 120° ; gaz vecteur : azote (débit : 20 ml/min).

(c) Temps de rétention relatif à ~~la 3,4,6 Tri-O-méthyl galactosamine~~

la 3,4,6 Tri-O-méthyl galactosamine

Identification par chromatographie en phase gazeuse (a) (b) des éthers
hydrolysats des oligosaccharides O₁, O₂, B₁, B₂, A₁ et A₂

Nature des éthers méthyliques des monosaccharides neutres	: t _r (c) :	: :			
		: O ₁ :	: A ₁ :	: A ₁ :	: :
		: natif :	: natif :	: défucosylé :	: :
Méthyl-2,3,4-tri-O-méthylfucoside	: 1 :	: + :	: + :	: :	: :
Méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthylgalactoside	: 1,64 :	: :	: :	: :	: :
Méthyl-3,4,6-tri-O-méthylgalactoside	: 2,38 :	: + :	: :	: :	: :
Méthyl-4,6-di-O-méthylgalactoside	: 3,47 :	: :	: + :	: :	: :
Méthyl-2,3-di-O-méthylgalactoside	: 4,70 :	: :	: :	: :	: :
Méthyl-2,4,6-tri-O-méthylgalactoside	: 2,60 :	: :	: :	: + :	: :
Méthyl-2,3,6-tri-O-méthylgalactoside	: 2,64 :	: :	: :	: :	: :

(a) Sous la forme de méthylglycosides

(b) Conditions expérimentales : Appareil Aerograph 9 200 ; détection par ionisation
Carbowax 6 000 sur chromosorb W HMDS ("mesh" 60-80) ; température : 170°

(c) Temps de rétention relatif au 2,3,4-tri-O-méthylfucoside.

BT

esthériques des monosaccharides neutres présents dans les

Nature des oligosaccharides

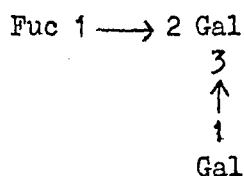
	B ₁	O ₂	O ₂	A ₂	A ₂	B ₂	B ₂
	défucosylé	natif	défucosylé	natif	défucosylé	natif	défucosylé
	:	:	:	:	:	:	:
	:	+	:	:	+	:	:
+	:	:	:	:	:	:	:
	:	:	+	:	:	:	+
	:	:	:	:	:	:	:
	:	+	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	+	:	+	:
+	:	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	+	:	+
	:	:	+	:	:	:	+
	:	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:	:

Flamme, colonne de verre (0,2 x 300 cm) ; phase stationnaire : 3 % de
 vecteur : azote (débit : 30 ml/min).

c) Oligosaccharide B₁ (Fuc, Gal) \rightarrow Gal

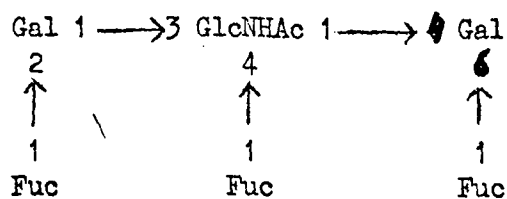
Des observations identiques ont été effectuées, toutefois le perméthyl galactose remplace ici la perméthylgalactosamine.

B₁ possède donc la structure suivante :



d) Oligosaccharide O₂ (3 Fuc, Gal, GlcNHAc) \rightarrow Gal

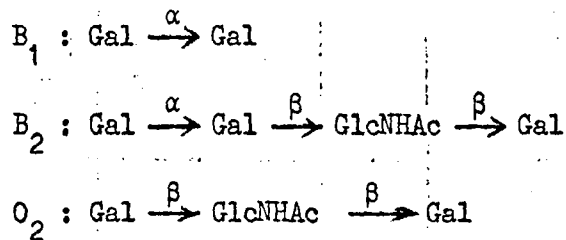
La perméthylation de l'oligosaccharide natif conduit à du perméthyl fucose, du 3,4,6 tri-O-méthyl galactose, du 2,3 di-O-méthyl galactose et de la 6-mono-O-méthyl glucosamine. Après défucosylation, apparaissent du perméthylgalactose, du 2,3,6-O-tri-méthylgalactose et de la 4,6-di-O-méthylglucosamine. O₂ possède donc la structure suivante :



e) Oligosaccharide A₂ (3 Fuc, Gal, GlcNHAc, GalNHAc) \rightarrow Gal

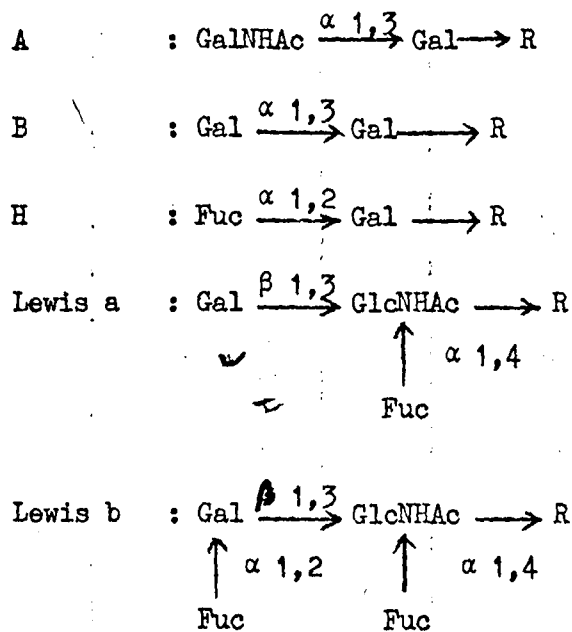
La perméthylation de l'oligosaccharide natif conduit à du perméthylfucose, du 4,6-di-O-méthylgalactose, du 2,3-di-O-méthylgalactose, de la perméthylgalactosamine et de 6-O-mono-glucosamine. Après défucosylation, nous obtenons du 2,4,6-tri-O-méthylgalactose, du 2,3,6-tri-O-méthylgalactose, de la perméthylgalactosamine et de la 4,6-di-méthylglucosamine. Ce résultat laisse subsister une ambiguïté concernant les substitutions par le fucose des deux molécules de galactose. Toutefois, A₂ fournit une réaction positive avec le réactif au chlorure de triphényltétrazolium, ce qui permet de situer le 2,3-di-O-méthylgalactose en position terminale réductrice.

L'ensemble de ces résultats permet donc de conclure aux enchaînements glucidiques suivants :



C - ETUDE DES PROPRIETES IMMUNOCHIMIQUES

L'activité de groupe sanguin des oligosaccharides urinaires a été exprimée par la quantité minimum de substance, en μg pour 100 μl de solution, qui inhibe totalement l'action des hémagglutinines. Les conditions expérimentales utilisées sont décrites p. 63 (appendice technique). Ces conditions sont identiques à celles utilisées par la plupart des auteurs. Nous avons également déterminé l'activité de groupe sanguin de certains oligosaccharides de structure connue, afin de posséder des valeurs de référence (oligosaccharides urinaires à activité A ou B, de LUNDBLAD (64) et lacto-N-difucohexaose I isolé du lait par KUHN (65) et par MONTREUIL (66)). Nous savons, depuis les travaux de WATKINS et MORGAN (67) que les activités de groupe sanguin ABO (H) et Lewis a ou b sont liées aux structures glucidiques suivantes :



D'autre part, la présence simultanée de fucose en $\alpha 1,2$ sur le galactose et $\alpha 1,4$ sur la N-acétylglucosamine masque à la fois l'activité H et Lewis a, pour faire apparaître l'activité Lewis b.

Les résultats rassemblés dans le tableau VIII (p. 37), soulèvent un certain nombre de remarques:

TABLEAU VIII

Quantités minimales d'oligosaccharides urinaires capables d'inhiber l'agglutination des hématies, exprimées en $\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$

Désignation de l'oligosaccharide	Système antigène-anticorps				
	Hématies A ₁ -anti A humain	Hématies B-anti B humain	Hématies O-anti H du sérum d'anguille	Hématies O Le ^a -anti Le ^a humain	Hématies O Le ^b -anti Le ^b humain
O ₁ : Fuc 1 $\xrightarrow{\alpha}$ 2 Gal	> 1 000	> 1 000	10	ND	> 1 000
O ₂ : Gal 1 $\xrightarrow{\beta}$ 3 GlcNHAc 1 $\xrightarrow{\beta}$ 4 Gal 2 4 6 ↑ α ↑ α ↑ α 1 1 1 Fuc Fuc Fuc	(a) > 1 000 (b) ND (c)	> 1 000 ND	1 000 650	350 ND	3,5 2,5
A ₁ : GalNHAc 1 $\xrightarrow{\alpha}$ 3 Gal 2 ↑ α 1 Fuc	(a) 60 (b) 80	> 1 000 ND	10 30	ND ND	> 1 000 ND
A ₂ : GalNHAc 1 $\xrightarrow{\alpha}$ 3 Gal 1 $\xrightarrow{\beta}$ 3 GlcNHAc 1 $\xrightarrow{\beta}$ 4 Gal 2 4 6 ↑ α ↑ α ↑ α 1 1 1 Fuc Fuc Fuc	(a) 1 000 (b) 900	> 1 000 ND	> 1 000 ND	150 ND	100 100
			> 1 000	> 1 000	> 1 000

	> 1 000	> 1 000	> 1 000	> 1 000	> 1 000
$\begin{array}{c} \text{Fuc} \\ \text{Fuc} \\ \text{B}_2 : \text{Gal } 1 \xrightarrow{\alpha} 3 \text{ Gal } 1 \xrightarrow{\beta} 3 \text{ GlcNHAc } 1 \xrightarrow{\beta} 4 \text{ Gal} \\ \begin{array}{ccc} 2 & 4 & 6 \\ \uparrow \alpha & \uparrow \alpha & \uparrow \alpha \\ 1 & 1 & 1 \\ \text{Fuc} & \text{Fuc} & \text{Fuc} \end{array} \end{array}$	> 1 000	900	> 1 000	300	5
B_2 après hydrolyse par H_2SO_4 0,05 N (100° C ; 15 mn)	> 1 000	250	ND	ND	ND
Témoins de références(d)					
$\begin{array}{c} \text{I GalNHAc } 1 \xrightarrow{\alpha} 3 \text{ Gal } 1 \xrightarrow{\beta} 4 \text{ Glc} \\ \begin{array}{cc} 2 & 3 \\ \uparrow \alpha & \uparrow \alpha \\ 1 & 1 \\ \text{Fuc} & \text{Fuc} \end{array} \end{array}$	(a) 180	> 1 000	180	1 000	100
	(b) 360	ND	180	ND	350
I hydrolysé par H_2SO_4 0,05 N (100° C ; 15 mn)	180	> 1 000	> 1 000	ND	ND
$\begin{array}{c} \text{II Gal } 1 \xrightarrow{\alpha} 3 \text{ Gal } 1 \xrightarrow{\beta} 4 \text{ Glc} \\ \begin{array}{cc} 2 & 3 \\ \uparrow \alpha & \uparrow \alpha \\ 1 & 1 \\ \text{Fuc} & \text{Fuc} \end{array} \end{array}$	> 1 000	160	80	> 1 000	100
II hydrolysé par H_2SO_4 0,05 N (100° C ; 15 mn)	> 1 000	160	> 1 000	ND	ND
Lacto-N-difucohexaose I (e)					
$\begin{array}{c} \text{Gal } 1 \xrightarrow{\beta} 3 \text{ GlcNHAc } 1 \xrightarrow{\beta} 3 \text{ Gal } 1 \xrightarrow{\beta} 4 \text{ Glc} \\ \begin{array}{cc} 2 & 4 \\ \uparrow \alpha & \uparrow \alpha \\ 1 & 1 \\ \text{Fuc} & \text{Fuc} \end{array} \end{array}$	> 1 000	> 1 000	> 1 000	250	1,5

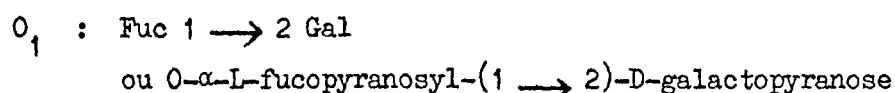
(a) et (b) : valeurs déterminées avec des lots d'hématies et d'antisérum différents ; (c) : ND : valeurs non déterminées ; (d) : I et II : oligosaccharides isolés de l'urine normale de sujets A et B Sécréteurs ; (e) : isolé du lait de Femme.

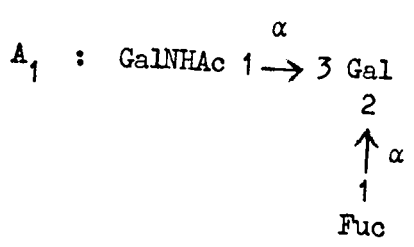
L'oligosaccharide O_1 possède une activité H qui correspond à la liaison α 1,2 du fucose. L'oligosaccharide A_1 possède simultanément une activité A et une activité H. L'oligosaccharide B_1 possède les activités B et H. L'oligosaccharide O_2 ne possède pas d'activité H qui est masquée par une très forte activité Lewis b. L'activité Lewis a est également absente. L'oligosaccharide A_2 ne possède pas d'activité A, bien que la N-acétylgalactosamine soit en position externe. Seule est décelable une activité Lewis b peu intense. L'absence d'activité A pourrait s'expliquer par le fait que la N-acétylgalactosamine peut ne pas être liée en α 1,3 mais en β 1,3. Or, après hydrolyse ménagée par H_2SO_4 0,05 N, qui libère sélectivement le fucose, nous observons l'apparition de l'activité A. Notons, toutefois, que l'oligosaccharide (I), qui possède une certaine analogie de structure a bien une activité A, malgré la présence de deux résidus de fucose, dont l'un est lié en α 1,3 sur le glucose. L'oligosaccharide B_2 possède également une activité B, démasquée par l'hydrolyse sélective des résidus fucosyl.

Ces résultats permettent de préciser les anoméries des monosaccharides en position externe non réductrice : les molécules de fucose sont donc liées en α sur le galactose ou la N-acétylglucosamine, de même que le galactose ou la N-acétylgalactosamine externe des oligosaccharides A_2 et B_2 . Seule l'anomérie du fucose lié en β sur le galactose réducteur n'a pu être précisée. Nous admettrons provisoirement qu'il est également lié en α , seule anomérie décrite jusqu'à présent dans la littérature.

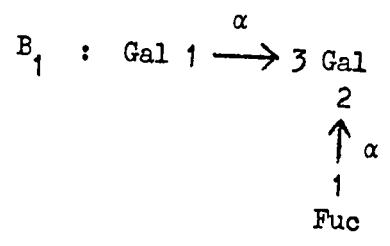
III - CONCLUSIONS

L'étude de la structure des oligosaccharides urinaires excrétés au cours d'une épreuve de galactosurie provoquée nous permet de leur attribuer les formules suivantes :

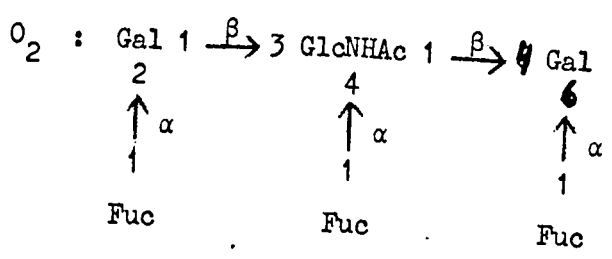




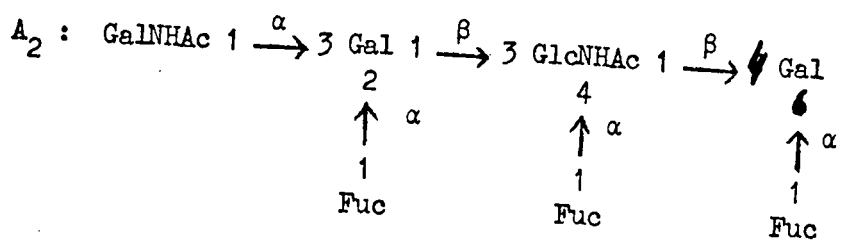
ou O-α-D-2 desoxy-2 acétamido-galactopyranosyl (1 → 3) [O-α-L-fucopyranosyl (1 → 2)]-D-galactopyranose



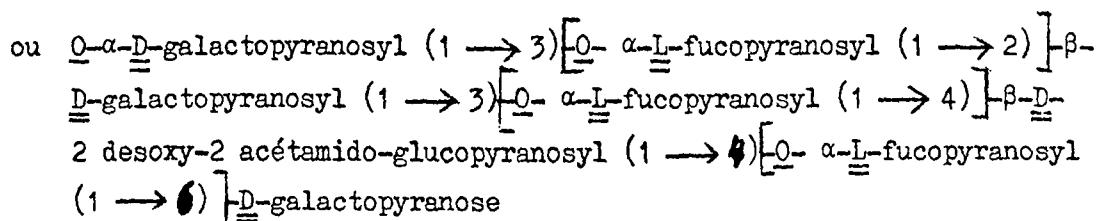
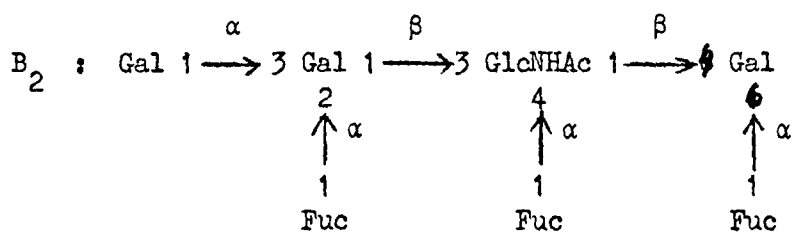
ou O-α-D-galactopyranosyl (1 → 3) [O-α-L-fucopyranosyl (1 → 2)]-D-galactopyranose



ou O-α-L-fucopyranosyl (1 → 2)-O-β-D-galactopyranosyl (1 → 3) [O-α-L-fucopyranosyl (1 → 4)]-β-D-2 desoxy-2 acétamido-glucopyranosyl (1 → 4) [O-α-L-fucopyranosyl (1 → 6)]-D-galactopyranose



ou O-α-D-2 desoxy-2 acétamido-galactopyranosyl (1 → 3) [O-α-L-fucopyranosyl (1 → 2)]-β-D-galactopyranosyl (1 → 3) [O-α-L-fucopyranosyl (1 → 4)]-β-D-2 desoxy-2 acétamido-glucopyranosyl (1 → 4) [O-α-L-fucopyranosyl (1 → 6)]-D-galactopyranose

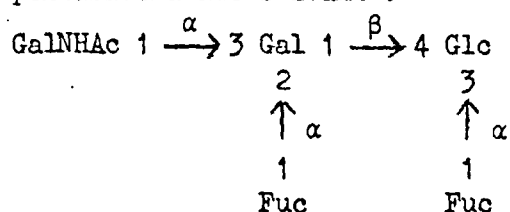


L'étude immuno-chimique de ces oligosaccharides montre qu'un même composé peut posséder à la fois une activité A (ou B) et H. L'hexasaccharide O_2 , qui possède les glucides immuno-dominants de groupe H (Fuc $1 \xrightarrow{\alpha} 2$ Gal) et de groupe Lewis a (Fuc $1 \xrightarrow{\alpha} 4$ GlcNHAc) possède exclusivement une activité Lewis b. Les heptasaccharides A_2 et B_2 , qui possèdent les trois sucres immuno-dominants de groupe A (ou B), H et Lewis a, ne possèdent qu'une activité Lewis b. L'hydrolyse partielle par l'acide sulfurique diluée permet de faire apparaître l'activité A (ou B) et ce résultat démontrerait donc qu'il existe une interaction entre la N-acétylgalactosamine (ou le galactose) et les résidus fucosyl. La faible activité Lewis b de A_2 , par rapport à B_2 montre, en outre, que l'interaction entre la galactosamine et le fucose est plus importante que celle observée entre le galactose et le fucose.

3^e

DISCUSSION

La description de ce phénomène d'oligosaccharidosurie induite par une surcharge en galactose soulève un certain nombre de problèmes qui ont trait à l'origine des oligosaccharides et à leurs propriétés immuno-chimiques. Parallèlement à ces travaux, STRECKER, CHAUVET et MONTREUIL (68) ont montré que d'autres mélturies étaient également à l'origine d'une oligosaccharidosurie, observée seulement chez des sujets sécréteurs. Ainsi, dans le cas du diabète, le pentasaccharide suivant :



dont le taux normal est d'environ 5 mg par diurèse de 24 h, voit son taux augmenté de 5 à 20 fois (Fig. 10 ; p. 42). La lactosurie provoquée est également à l'origine de l'augmentation du taux des oligosaccharides urinaires. Dans le cas de la galactosurie provoquée, les oligosaccharides qui apparaissent dans l'urine sont absents de l'urine normale. Toutefois, le point commun de tous ces composés est de posséder une activité de groupe sanguin ABH et Lewis qui résultent de l'activité de glycosyl-transférases spécifiques. Il existe, en outre, certaines analogies de structure entre les glucides de l'urine et ceux du lait de Femme (Fig. 11 ; p. 43) qui peuvent faire supposer à un mécanisme commun de biosynthèse. Dans le cas du lait de Femme, ce serait alors la synthèse de quantités élevées de lactose qui induirait la formation d'oligosaccharides dont le rôle est encore inconnu. Le problème reste posé de savoir si ces oligosaccharides urinaires sont les produits du catabolisme de substances de groupe sanguin tissulaires ou érythrocytaires, ou, au contraire, des composés qui ont été synthétisés dans le sérum sous l'action de glycosyl transférases solubles. Le second problème est d'ordre immunochimique. Les oligosaccharides A₂ et B₂, en effet, n'inhibent pas l'agglutination d'hématies A ou B par des sérums anti A ou anti B humain, bien qu'ils possèdent un résidu α-N-acétyl-galactosaminyl ou α-galactosyl terminal, ces deux activités étant masquées par l'activité Lewis b. LLOYD, KABAT et ROSENFELD (69) avaient déjà montré, en 1966, que le pouvoir inhibiteur de l'agglutination variait, pour un oligosaccharide, selon le nombre de molécules de fucose (Tableau IX ; p. 44). Toutefois, les oligosaccharides étudiés par LLOYD et KABAT (70) correspondent au déterminant de type II : liaison Gal 1 $\xrightarrow{\beta}$ 4 GlcNHAc.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'étude quantitative et qualitative de la composition en sucres des urines, avant et après des épreuves de surcharge en galactose, nous ont conduit aux résultats suivants :

- 1 - L'épreuve de galactosurie provoquée est à l'origine d'une oligosaccharidosurie caractérisée par l'élimination dans l'urine d'oligosaccharides absents de l'urine normale.

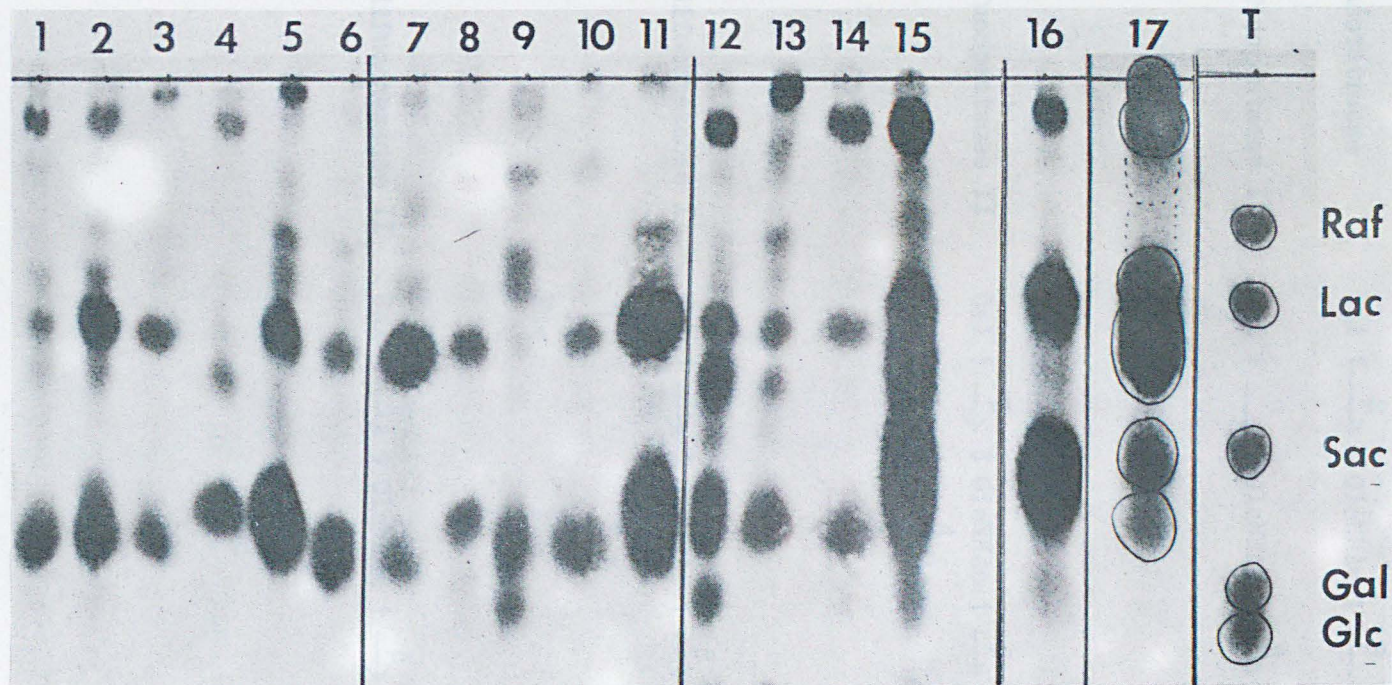


Figure 10

Chromatographie sur papier des oligosaccharides de la fraction éthanolique à 7,5 p. 100 d'urines de sujets normaux et pathologiques. 1 à 6 : urines normales de sujets de groupe A ; 7 à 11 : urines normales de sujets de groupe O ; 12 à 15 : diabète (groupe A) ; 16 : sialurie (groupe A) ; 17 : lactosurie provoquée (groupe A). Conditions de la chromatographie : Papier Whatman n° 3 ; système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) (3 jours). Révélation à l'oxalate d'aniline. T : solution témoin de sucres purs : Raf : raffinose ; Lac : lactose ; Sac : saccharose ; Gal : galactose ; Glc : glucose.

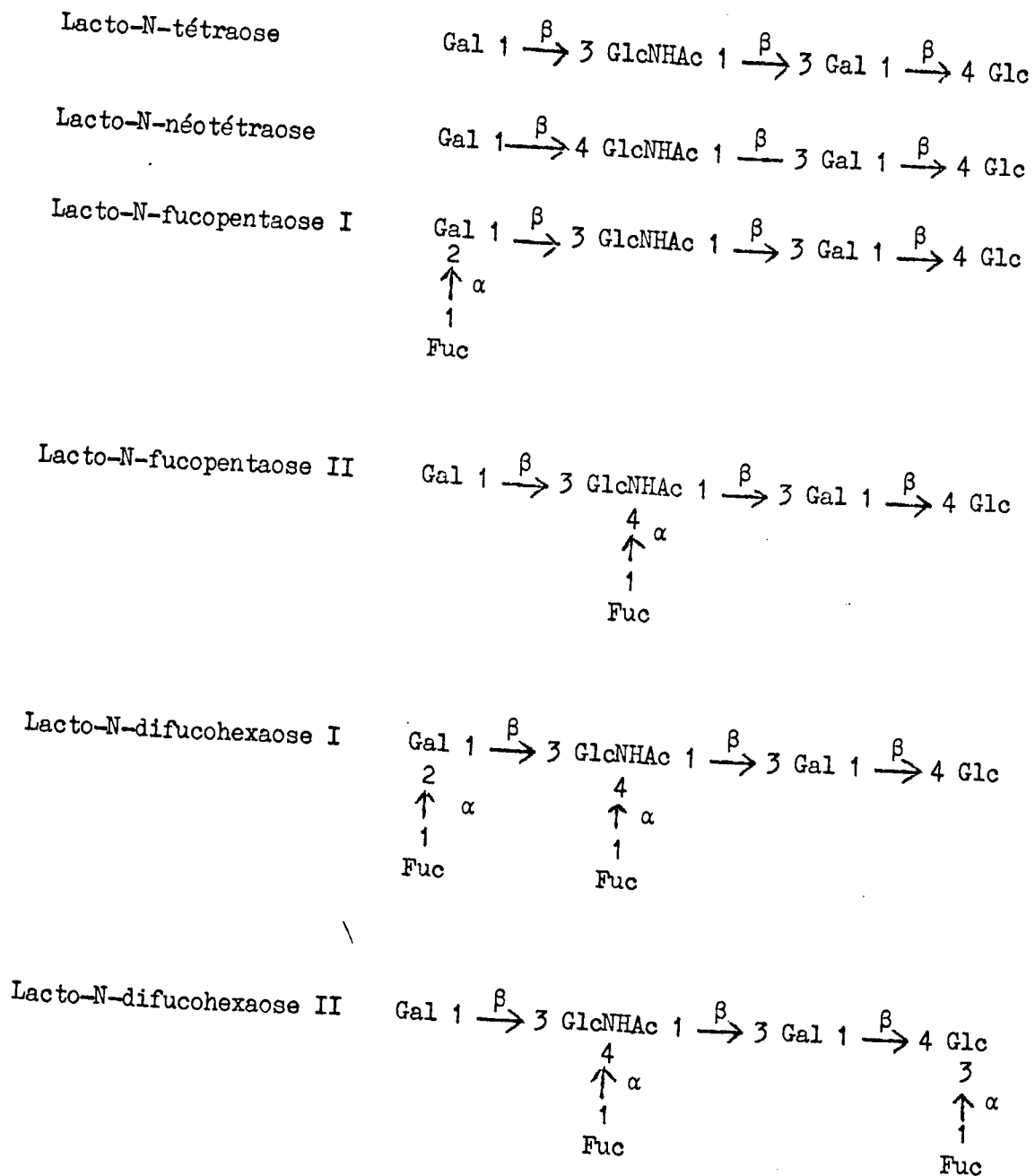


Figure 11

Structure de quelques oligosaccharides du lait de Femme.

Propriétés immunochimiques d'oligosaccharides obtenus par hydrolyse alcaline de substance soluble de groupe sanguin (LLOYD et KABAT) (70).

	Activité de groupe sanguin (en $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$)			
	A	H _(Ulex)	Le ^a	Le ^b
GalNHAc 1 $\xrightarrow{\alpha}$ 3 Gal 1 $\xrightarrow{\beta}$ 3 GlcNHAc	900			
Fuc 1 ↓ α 2				
GalNHAc 1 \rightarrow 3 Gal 1 \rightarrow 4 GlcNHAc 1 $\xrightarrow{\beta}$ 3 ou Galactitol (*)	232	> 1 000	> 2 000	500
Fuc 1 ↓ α 2				
GalNHAc 1 $\xrightarrow{\alpha}$ 3 Gal 1 $\xrightarrow{\beta}$ 4 GlcNHAc 1 \rightarrow 6 Galactitol	236	> 1 000	> 2 000	500
Fuc Fuc 1 1 ↓ α α ↓ ? 2				
GalNHAc 1 $\xrightarrow{\alpha}$ 3 Gal 1 $\xrightarrow{\beta}$ 4 GlcNHAc \longrightarrow R (**)	> 515	> 2 000	980	490
Fuc 1 ↓ α 2				
GalNHAc 1 $\xrightarrow{\alpha}$ 3 Gal 1 $\xrightarrow{\beta}$ 4 GlcNHAc \longrightarrow R (**)	178	> 1 000	> 1 000	500

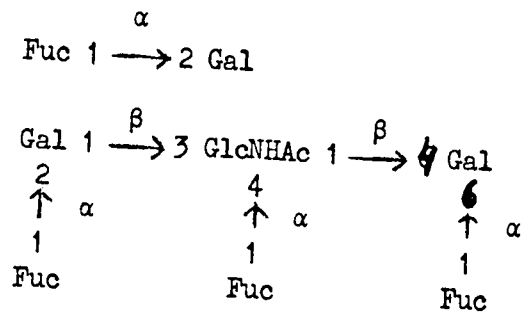
(**) R = CH₂OH - CHOH = CH - CH = CHOH - CH₂OH

(*) Les 2 oligosaccharides (1 \rightarrow 3) et (1 \rightarrow 4) ont la même activité.

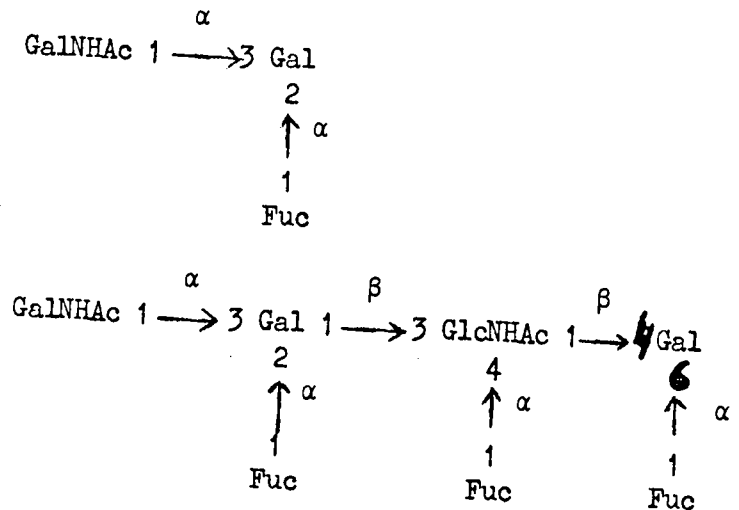
- 2 - La présence de ces nouveaux sucres dans l'urine est sous la dépendance des gènes A B H, Se et Le.
- 3 - L'étude physico-chimique de ces oligosaccharides nous a permis d'établir les structures suivantes :

Groupe sanguinOligosaccharide

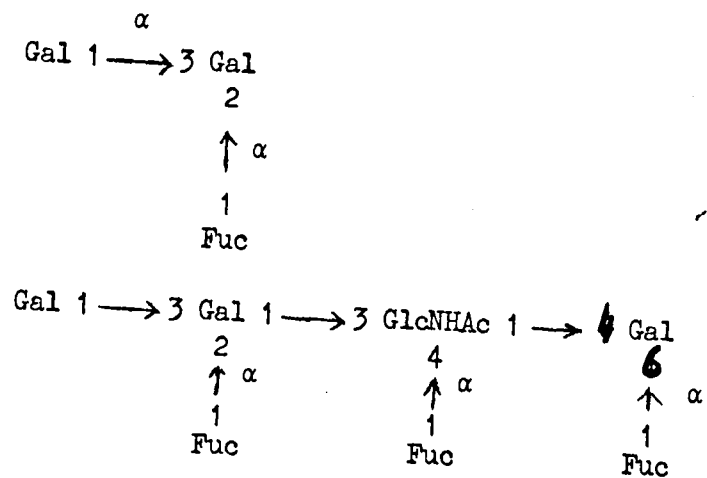
O Se Le (a- b+)



A Se Le (a- b+)



B Se Le (a- b+)



4 - L'étude immunochimique montre qu'il existe une interaction entre la N-acétylgalactosamine ou le galactose responsable des activités A ou B et les résidus fucosyl responsables de l'activité Le^b.

L'origine de ces oligosaccharides, qui est certes, liée au métabolisme des substances solubles de groupe sanguin, demeure inconnue. Ce phénomène, toutefois, n'est pas unique puisqu'une oligosaccharidosurie accompagne également d'autres mélturies comme le diabète et la lactosurie.

I - PREPARATION DES RESINES

L'étude chromatographique des oses nécessite un "dessalage" préalable des solutions, réalisé par passage successif sur des colonnes de résines échangeuses de cations (Dowex 50, "mesh" 25-50 ; forme H^+) et d'anions (Duolite A-40 ; "mesh" 25-50 ; forme formiate). Ce mode opératoire permet en outre un fractionnement des dérivés glucidiques en composés "neutres" (oses, acétylosamines, polyols, lactones), "basiques" (osamines) et "acides" (acides uroniques, acides sialiques).

Préparation des résines

Avant leur emploi, les échangeurs d'ions sont traités selon le mode opératoire préconisé par COHN (71) : agitation pendant plusieurs heures à la température du laboratoire, successivement avec de l'eau, un mélange d'acétone et d'eau (v : v), de l'acétone, de l'éther de pétrole, de l'acétone, un mélange d'acétone et d'eau (v : v) et de l'eau.

Ils sont ensuite éventuellement tamisés et introduits dans des colonnes de verre.

L'échangeur de cations est utilisé sous sa forme acide, par passage d'un volume d'acide chlorhydrique 3 N, correspondant à 3 fois la capacité de l'échangeur, exprimée en litres d' HCl 3 N, suivi d'un lavage soigneux à l'eau distillée, jusqu'à ce que le pH du liquide effluent atteigne 6. La forme formiate de l'échangeur d'anions est obtenue par le passage d'un volume de soude 3 N, correspondant à 3 fois la capacité de l'échangeur exprimée en litres de soude 3 N, suivi d'un lavage à l'eau distillée, puis du passage d'un volume d'acide formique pur, égal à 3 fois celui de la résine. Enfin, un lavage soigneux à l'eau distillée amène le pH de l'effluent à neutralité.

II - PREPARATION DES COLONNES DE CHARBON-CELITE

Les colonnes de charbon-Celite ont été préparées selon le procédé de WHISTLER et DURSO (72). Le charbon (ACTIVIT X 100) est tout d'abord traité par HCl pur de manière à le désactiver partiellement et à éliminer les impuretés (ions minéraux et substances organiques). Il est ensuite filtré sous vide sur BUCHNER et soigneusement rincé par de l'eau distillée. Ce lavage est extrêmement important, car la moindre trace d'acide chlorhydrique risque, au moment de la concentration à siccité des effluents glucidiques, de conduire à des réactions de destruction ou de transosidation des sucres (SPIK et al.) (73). La formation de grumeaux de charbon provoque en particulier la rétention de l'acide chlorhydrique. Le charbon, lavé une première fois, sera donc séché à plat sur une feuille de papier filtre, puis écrasé de manière à éliminer ces grumeaux. Il sera ensuite relavé abondamment et séché plusieurs fois de suite. Enfin, les particules trop fines de charbon qui risquent d'empêcher un écoulement normal des colonnes sont éliminées par décantations successives. La Celite est également traitée par l'acide chlorhydrique pur, puis lavée comme le charbon.

Les colonnes sont montées en mélangeant des volumes égaux de suspensions charbon et de Celite. Les solutions glucidiques peuvent alors être fractionnées sur ces colonnes : 1 g de sucres totaux pour 100 ml de charbon-Celite. La concentration en sucre ne doit pas dépasser 2 à 5 p. 100. Les glucides sont alors désorbés par le passage d'eau distillée (monosaccharides) et d'éthanol de concentration croissante (1,5 - 3,5 - 5 - 7,5 - 10 et 50 p. 100).

III - DOSAGES COLORIMETRIQUES DES GLUCIDES

A - DOSAGE DES HEXOSES PAR LA METHODE A L'ORCINOL de TILLMANS et PHILIPPI (74), modifiée par RIMINGTON (75), selon le protocole de MONTREUIL et SPIK (76). MONTREUIL et SPIK (77) ont montré que les acides uroniques donnaient, comme les hexoses, une coloration à l'orcinoI sulfurique. Ils ont donc proposé d'apporter un terme de correction applicable lorsque les solutions renferment à la fois des hexoses et des acides uroniques.

REACTIFS :

1° Solution d'orcinoI

OrcinoI : 1,5 g

H₂SO₄ à 30 p. 100 (v : v) : q.s.p. 100 ml

La solution d'orcinoI doit être conservée à 0° C et dans des flacons en verre pyrex. Généralement, elle laisse déposer des cristaux que l'on redissout au bain-marie.

2° Solution d'acide sulfurique à 60 p. 100

3° Solution d'oses pour "témoins internes"

a) Solution-mère contenant 200 mg d'oses totaux p. 100 ml d'eau bidistillée.

b) Solution-mère contenant 181,4 mg de glucuronolactone p. 100 ml d'eau bidistillée.

c) Solution-témoin contenant 200 µg d'acide glucuronique p. ml, obtenu en diluant au dixième la solution a.

d) Solution-témoin contenant 200 µg d'acide glucuronique p. ml, obtenue en diluant au dixième la solution-mère b.

Nota.- Toutes ces solutions sont additionnées de quelques gouttes de chloroforme et d'une goutte d'acide chlorhydrique concentré avant d'être complétées au volume convenable. Elles sont conservées à froid.

DEVELOPPEMENT DE LA COLORATION

Dans des tubes à essais très propres de même diamètre sont introduits 1 ml de la solution à doser (ou une quantité de poudre accompagnée de l'addition de 1 ml d'eau bidistillée) renfermant au maximum 400 µg d'oses totaux, 2 ml de la solution d'orcinol (réactif 1) et 15 ml de la solution d'acide sulfurique à 60 p. 100 (réactif 2). Les solutions sont mélangées soigneusement à l'aide d'un agitateur de verre aplati à l'une de ses extrémités. Les tubes sont ensuite maintenus 20 minutes exactement dans un bain marie réglé à 80° C ± 2° C. Les tubes sont refroidis sous un courant d'eau et placés à l'obscurité pendant 45 mn. L'absorbance de chacune de ces solutions est déterminée à 510 nm.

PROTOCOLE DE DOSAGE DES OSES TOTAUX1er cas : en l'absence d'acides uroniques

Les dosages sont effectués sur des séries de 3 tubes contenant chacun :

1ère série : 1 ml d'eau bidistillée

2ème série : 1 ml de solution titrée renfermant 200 µg d'hexoses totaux p. ml.

Séries suivantes : 1 ml des solutions à doser.

La quantité d'oses totaux présents dans la solution est donnée, en mg p. ml, par la formule suivante :

$$\frac{Ax}{A_{200} \times 5}$$

où Ax = absorbance de la solution à doser

A₂₀₀ = absorbance de 200 µg d'ose (s) pur (s) de la solution témoin.

2ème cas : en présence d'acides uroniques

Les dosages sont effectués sur des séries de 3 tubes contenant chacun :

1ère série : 1 ml d'eau bidistillée

2ème série : 1 ml de solution titrée renfermant 200 µg d'hexoses

3ème série : 1 ml de solution titrée renfermant 200 µg d'acide uronique p. ml.

Grâce aux résultats fournis par le dosage des acides uroniques par le carbazol sulfurique (voir p. 54), la teneur en mg d'oses totaux p. ml de la solution est donnée par la formule suivante :

$$\frac{4 \alpha c - \beta b}{5 (4 \alpha c - \delta b)}$$

où :

- α : absorbance de 1 ml de la solution à doser avec l'orcinol sulfurique.
- c : absorbance de 50 μ g d'acide uronique avec le carbazol sulfurique (voir p. 54).
- β : absorbance de 1 ml de la solution à doser avec le carbazol sulfurique (voir p. 54).
- b : absorbance de 200 μ g d'acide uronique avec l'orcinol sulfurique.
- a : absorbance de 200 μ g d'oses avec l'orcinol sulfurique.
- d : absorbance de 200 μ g d'oses avec le carbazol sulfurique (voir p. 54).

REMARQUE

Il faut tenir compte du fait que les différents hexoses (galactose, glucose, mannose, fucose) fournissent avec le réactif à l'orcinol sulfurique des absorbances molaires différentes. Il est donc nécessaire d'utiliser des "témoins internes" dont la composition qualitative et quantitative en oses soit identique à celle de la substance étudiée. Cette composition aura été préalablement déterminée par l'analyse chromatographique quantitative (voir p. 59).

B - DOSAGE DES ACIDES URONIQUES PAR LA METHODE AU CARBAZOL de DISCHE (78), selon le protocole de MONTREUIL et SPIK (79).

Les hexoses interfèrent dans ce dosage et il est donc nécessaire d'apporter un terme de correction, en dosant simultanément les hexoses par l'orcinol sulfurique.

REACTIFS

- 1 - Acide sulfurique concentré
- 2 - Solution de carbazol

Carbazol (*) : 0,1 g

Ethanol absolu : q.s.p. 100 ml

La solution est conservée à 0° C et renouvelée tous les mois.

(*) Carbazol PROLABO (réf. 22 501)

3 - Solution mère de glucuronolactone

Glucuronolactone : 90,7 mg

Eau bidistillée : q.s.p. 200 ml

4 - Solution témoin contenant 50 µg d'acide glucuronique p. ml obtenue en diluant au dixième la solution mère.

5 - Solution témoin contenant 200 µg d'oses totaux p. ml.

DEVELOPPEMENT DE LA COLORATION

Dans des tubes à essais de même diamètre, on introduit 1 ml de solution à doser (renfermant au maximum 50 à 100 µg d'acide glucuronique) et 6 ml d'acide sulfurique concentré. Les tubes sont refroidis dans un bain d'eau glacée. L'acide sulfurique est ajouté lentement et régulièrement le long des parois du tube. Les tubes sont agités avec une tige de verre aplatie à une extrémité et maintenus ensuite pendant 20 mn très exactement dans un bain marie bouillant.

Les tubes sont ensuite refroidis rapidement et 0,2 ml de la solution alcoolique de carbazol est alors ajouté. Le mélange est soigneusement agité.

Une coloration pourpre se développe qui augmente d'intensité à l'obscurité. Après un séjour de 3 heures à l'obscurité, la mesure des absorbances est effectuée à 530 nm.

PROTOCOLE DE DOSAGE DES ACIDES URONIQUES

Les dosages sont réalisés sur des séries de 3 tubes contenant chacun :

1ère série : 1 ml d'eau bidistillée

2ème série : 1 ml de solution titrée renfermant 50 µg d'acides uroniques totaux p. ml.

Séries suivantes : 1 ml des solutions à doser.

La quantité d'acides uroniques totaux présents dans la solution est donnée, en mg p. ml, par la formule suivante :

$$\frac{A_x}{A_{50} \times 20}$$

où A_x : absorbance de la solution à doser

A_{50} : absorbance de 50 µg d'acide uronique de la solution témoin.

2ème cas : en présence d'hexoses

Les déterminations sont effectuées sur des séries de 3 tubes contenant chacun :

1ère série : 1 ml d'eau bidistillée

2ème série : 1 ml de solution titrée renfermant 50 µg d'acides uroniques totaux p. ml.

3ème série : 1 ml de solution titrée renfermant 200 µg d'hexoses totaux p. ml

Séries suivantes : 1 ml de solution à doser.

La quantité d'acides uroniques totaux est donnée, en mg p. ml par la formule suivante (voir p. 52) :

$$\frac{\beta a - \alpha d}{5(4 ac - bd)}$$

C - DOSAGE COLORIMETRIQUE DES HEXOSAMINES par la méthode d'ELSON et MORGAN modifiée (Procédé de BELCHER et coll.) (80)

La méthode de dosage des osamines selon le principe d'ELSON et MORGAN n'est applicable qu'aux osamines libres. Les différentes étapes du dosage seront donc les suivantes :

1 - Hydrolyse chlorhydrique du polysaccharide

1 ml de la solution de glycoprotéine ou d'oligosaccharide, correspond à des quantités comprises entre 500 et 1 500 µg d'osamines totales, est additionné de 2 ml d'acide chlorhydrique redistillé 5,6 N. Le tube, scellé sous vide, est maintenu à 100° C pendant des temps variant de 2 à 4 heures. Après refroidissement, l'hydrolysat est évaporé à siccité sous pression réduite, et le résidu sec est repris par 15 ml d'eau bidistillée.

2 - Dosage des osamines

a) Réactifs

α) Solution alcaline d'acétyl-acétone

Acétyl-acétone : 2 ml

Solution de carbonate de sodium anhydre 1,25 N : q.s.p. 50 ml

A préparer extemporanément.

2 - Réactif d'Ehrlich

p-diméthylaminobenzaldehyde : 1,6 g

Acide chlorhydrique pur concentré q.s.p. : 30 ml

3 - Solutions titrées d'hexosamines

- Solution mère contenant 60 mg de chlorhydrate de glucosamine p. 100 ml d'eau bidistillée.

- Solution témoin contenant 50 μ g p. ml, obtenue en diluant au dixième la solution mère précédente.

b) Développement de la coloration. Dans des tubes à essais sont introduits successivement 1 ml de la solution à doser renfermant au maximum 100 μ g de glucosamine, 1 ml de la solution d'acétyl-acétone et 2 ml d'eau bidistillée. Les tubes sont agités, bouchés hermétiquement et placés dans un bain-marie bouillant pendant 10 mn. Ils sont ensuite refroidis et additionnés de 5 ml d'éthanol absolu. Après agitation, les tubes sont placés de nouveau dans un bain-marie réglé à $75^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ pendant 5 mn. 1 ml de réactif d'Ehrlich est alors ajouté lentement à l'aide d'une burette graduée et les tubes sont maintenus encore 30 mn à 75°C . Ils sont ensuite refroidis et de nouveau additionnés de 5 ml d'éthanol absolu. Après une agitation soigneuse, ils sont laissés pendant 30 mn à l'obscurité. Les mesures des absorbances sont effectuées à 520 nm.

c) Protocole de dosage des osamines. Les dosages sont effectués sur des séries de 3 tubes contenant chacun :

1ère série : 1 ml d'eau bidistillée

2ème série : 1 ml de solution renfermant 50 μ g d'osamines totales p. ml

Séries suivantes : 1 ml des solutions à doser.

La quantité d'osamines totales présentes dans la solution est donnée, en mg p. ml, par la formule suivante :

$$\frac{A_x}{A_{50} \times 20}$$

où

A_x : absorbance de la solution à doser.

A_{50} : absorbance de 50 μ g d'osamines de la solution témoin.

D - DOSAGE COLORIMETRIQUE DES ACIDES SIALIQUES PAR LA DIPHENYLAMINE selon le procédé de WERNER et ODIN (81)

REACTIFS

- 1°) Solution aqueuse d'acide trichloracétique à 15 p. 100
- 2°) Réactif à la diphenylamine. Dissoudre 5 g de diphenylamine dans un mélange de 450 ml d'acide acétique et 50 ml d'acide sulfurique.
- 3°) Solution titrée d'acide sialique. Solution d'acide N-acétylneuraminique à 100 µg p. 1 ml

DEVELOPPEMENT DE LA COLORATION

Dans des tubes à essais, on introduit successivement 2 ml de solution renfermant 50 à 100 µg d'acide sialique, 1 ml d'acide trichloracétique à 15 p. 100 et 6 ml de réactif à la diphenylamine. Après agitation, les tubes sont portés 30 mn à 100° C, puis refroidis et placés à l'obscurité pendant 30 mn. Les lectures sont effectuées à 530 nm.

La quantité d'acide sialique, en mg p. ml, est donnée par la formule suivante :

$$\frac{A_x}{A_{100} \times 10}$$

où

A_x : absorbance donnée par 1 ml de la solution à doser.

A_{100} : absorbance donnée par 100 µg d'acide sialique.

IV - TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

A - CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE

L'isolement de faibles quantités de sucres peut être effectuée à l'aide de la chromatographie préparative sur papier. A cet effet, la solution glucidique (300 à 500 mm³) est déposée en un trait continu sur une feuille de papier Whatman n° 3. Après passage du solvant, des bandes latérales sont découpées, afin de localiser, par révélation spécifique, les différentes substances. La "languette" centrale correspondante est éluee 10 à 12 heures par de l'eau bidistillée. 5 à 15 mg peuvent ainsi être isolés par chromatogramme.

1) SYSTEMES-SOLVANTSa) Système-solvant de PARTRIDGE (82)

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

Après agitation, deux phases sont obtenues. La phase inférieure aqueuse est utilisée pour saturer la cuve. La phase supérieure organique est utilisée pour éluer le chromatogramme. La durée de chromatographie sur papier Whatman n° 3 est de 30 heures pour la séparation des trioses et des tétraoses, de 48 heures pour les pentoses et les hexoses, de 4 à 6 jours pour les oligosaccharides.

b) Système-solvant de JERMYN et ISHERWOOD (83)

- acétate d'éthyle : 2
- pyridine : 1
- eau : 2

La phase supérieure est utilisée comme solvant. Ce système-solvant réalise en moins de 15 heures une séparation des monosaccharides. En outre, il permet une excellente résolution du galactose et du glucose.

c) Système-solvant de FISHER et NEBEL (84)

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

Ce système-solvant possède les mêmes propriétés que le précédent. Il permet, en outre, de séparer la galactosamine de la glucosamine.

2) REVELATIONSa) Réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (85)

- solution A : aniline : 2 ml
- éthanol : 100 ml

- solution B : acide oxalique : 2,5 g
- eau q.s.p. : 100 ml

Le réactif est préparé en mélangeant 2 volumes de la solution A et 3 volumes de la solution B.

Après un chauffage à l'étuve à 105° C, pendant 10 mn, les glucides donnent des colorations qui varient avec leur nature :

- aldohexoses : brun
- aldopentoses : rouge
- 6-desoxyhexoses : brun-jaune

b) Réactif au chlorure de triphényltétrazolium de TREVELYAN et al. (86).

- Chlorure de triphényltétrazolium : 2 g
- Solution méthanolique de soude 0,5 N : 100 ml

Après pulvérisation, les chromatogrammes sont maintenus 30 mn à 70° C. Le chlorure de triphényltétrazolium, incolore, est réduit en triphényl-formazan rouge. Les sucres réducteurs seuls réagissent, à la condition cependant que la fonction alcoolique du carbone voisin du groupement réducteur soit libre.

c) Réactif au nitrate d'argent de TREVELYAN et coll. (87)

- Solution A : solution aqueuse saturée
de nitrate d'argent : 1 ml
acétone : 200 ml

De l'eau distillée est ajoutée goutte à goutte en quantité juste suffisante pour redissoudre le précipité formé.

- Solution B : solution aqueuse de soude : 5 ml
à 40 p. 100 ml
éthanol à 95 p. 100 : 200 ml

Le chromatogramme est imbibé par trempage dans la solution A, puis maintenu à l'obscurité 15 mn. Il est ensuite rapidement trempé dans la solution B. L'emplacemement des sucres est immédiatement marqué par l'apparition de taches noires sur un fond légèrement brun. Les polyols se révèlent également. Le chromatogramme est ensuite fixé par trempage dans l'ammoniaque à 5 p. 100.

B - IDENTIFICATION DES HEXOSES ET DETERMINATION DE LEUR COMPOSITION MOLAIRE

1) HYDROLYSE CHLORHYDRIQUE

Les hexoses sont libérés par une hydrolyse chlorhydrique : 2 à 5 mg d'oligosaccharide sont dissous dans 2 ml d'acide chlorhydrique 1,5 N et la solution est portée à 100° C durant 1,5 heure. Les hydrolysats sont ensuite dilués à une normalité d'environ 0,1 N et purifiés par passage sur une colonne d'échangeur d'anion (Déacidite A-102 D ; "mesh" 25-50 ; forme formiate ; 2 cm x 15 cm). Le liquide effluent est concentré à siccité sous pression réduite.

2) IDENTIFICATION ET DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE DES HEXOSES

Le résidu sec des hydrolysats chlorhydriques est repris par 0,1 à 0,2 ml d'eau bidistillée et soumis à l'analyse chromatographique dans le système-solvant de FISHER et NEBEL (88) acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau (5 : 5 : 1 : 3).

Les rapports molaires des oses neutres ont été déterminés selon le procédé de DATE (89) modifié par MONTREUIL et coll. (90) : des carrés de papier de 5 cm de côté, encadrant les taches de glucides révélés par le réactif au phtalate d'aniline (acide phtalique : 1,32 g ; aniline : 0,90 ml ; butanol saturé d'eau : q.s.p. 100 ml ; pulvérisation du réactif et chauffage à 100° C pendant 10 minutes) sont découpés et élués par une solution d'éthanol à 20 p. 100 d'acide chlorhydrique 0,1 N, pendant 4 heures et l'absorbance des solutions est mesurée à 390 nm. Sur chaque chromatogramme sont déposées latéralement des quantités connues et croissantes de sucres témoins (50, 100, 150 et 200 µg) dont l'éluion constitue une gamme étalon. Les valeurs sont lues contre un témoin obtenu en éluant un carré de papier révélé, mais ne renfermant pas de glucide. La précision du procédé atteint 1 p. 100.

V - IDENTIFICATION DU GLUCIDE TERMINAL REDUCTEUR

Le glucide terminal réducteur des oligosaccharides a été identifié en déterminant les compositions molaires avant et après réduction par le borohydrure de sodium. Le protocole expérimental est le suivant :

A 2 à 5 mg d'oligosaccharide, en solution dans 5 ml d'eau bidistillée, sont ajoutés à 5 ml de solution aqueuse de borohydrure de sodium à 0,5 p. 100. L'action du borohydrure de sodium est prolongée 15 heures à + 4° C. La réaction est alors arrêtée en décomposant le borohydrure en excès par quelques gouttes d'acide acétique. La solution est ensuite purifiée par déminéralisation sur échangeur de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 25-50 ; forme acide ; 2 x 15 cm). La solution effluente est évaporée à siccité et le résidu est repris plusieurs fois par quelques ml de méthanol acétique (5 : 1 ; v : v) que l'on évapore chaque fois, de manière à distiller l'acide borique sous forme de borate de méthyle. La composition molaire de l'oligosaccharide réduit est alors déterminée selon le procédé décrit précédemment et le glucide réducteur identifié par différence.

VI - OXYDATION PERIODIQUE

Les oligosaccharides sont oxydés par l'acide periodique selon les conditions définies par MARINETTI et ROUSER (91) et par GLICK (92).

A une solution de 6 mg d'oligosaccharide dans 2,8 ml d'eau bidistillée, on ajoute 6 ml de tampon (acétate de Na 0,1 M) de pH 5 et 1,2 ml de metaperiodate de sodium 0,086 M. L'oxydation est arrêtée au bout de 60 heures par l'addition de quelques gouttes d'éthylène-glycol. Les ions IO_3^- sont précipités par l'addition d'une solution d'acétate de baryum 0,1 M. Après un repos de 4 heures, la solution est centrifugée et purifiée sur une colonne (1 x 10 cm) de Dowex 50 X 8 ("mesh" 25-50 ; forme H^+) pour éliminer les ions métalliques. L'effluent est évaporé à siccité, redissous dans 5 ml d'eau et réduit par 50 mg de borohydrure de sodium, à 4° C, pendant 15 heures. La solution est ensuite amenée à pH 5,5 par l'addition d'acide acétique 2 N et purifiée par un passage sur une colonne (1 x 10 cm) de Dowex 50 X 8 ("mesh" 25-50 ; forme acide). L'effluent est évaporé à siccité sous pression réduite et le résidu sec est traité par le méthanol acétique afin d'éliminer l'acide borique (voir p. 59). Le résidu sec est ensuite repris par 1 ml d'acide chlorhydrique 1,5 N pendant 2 heures à 100° C. L'hydrolysate est ensuite purifié sur une colonne de Déacidite A-102 D ("mesh" 25-50 ; forme formiate ; 2 cm x 15 cm) qui élimine les ions Cl^- . L'effluent est évaporé à siccité sous pression réduite et soumis à la chromatographie sur papier Whatman n° 3, dans les systèmes-solvants suivants : n-butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) pendant 18 heures (identification des polyols, révélés au nitrate d'argent) ; acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau (5 : 5 : 1 : 3), pendant 18 heures (identification des hexoses et des hexosamines, révélés à l'oxalate d'aniline).

VII - PERMETHYLATION DES OLIGOSACCHARIDES

1°) PROCEDE DE PERMETHYLATION

Les oligosaccharides sont méthylés par la méthode de KUHN, BAER et GAUHE (93) à la diméthylformamide, iodure de méthyle, oxyde d'argent complétée par deux cycles de méthylation suivant la technique d'HAKOMORI (94), dans le diméthylsulfoxyde.

A une solution de 4 mg d'oligosaccharide dans 3 ml de DMFA on ajoute, par petites fractions échelonnées sur 30 min, 0,5 ml d'iodure de méthyle et 0,5 g d'oxyde d'argent. Le mélange, maintenu à l'obscurité, est agité pendant 24 h à 20°. On ajoute alors 0,25 ml d'iodure de méthyle et 250 mg d'oxyde d'argent et on agite encore pendant 8 h. Puis le mélange est filtré et l'insoluble est lavé plusieurs fois avec du chloroforme. Le filtrat est abandonné à + 4° pendant 24 h pour précipiter les sels d'argent colloïdaux et les formyl-dérivés qui cristallisent et qui sont éliminés par filtration, il est ensuite lavé 3 fois avec de l'eau distillée, séché sur sulfate de sodium anhydre et évaporé à siccité sous pression réduite.

Le résidu repris par 0,5 ml de DMSO est additionné à la solution de diméthylsulfinyl carbanion formé en mélangeant 80 mg d'hydrure de sodium à 5 ml de DMSO. Le tout est agité 6 h sous un lent courant d'azote. Puis 1 ml d'iodure de méthyle est ajouté et le mélange est agité toute la nuit.

La réaction est arrêtée en additionnant 10 ml d'eau distillée au mélange et les oligosaccharides sont extraits par 5 fois 5 ml de chloroforme. Les phases chloroformiques sont lavées par 3 fois 10 ml de thiosulfate de sodium, séchées sur sulfate de sodium anhydre et évaporées à siccité sous pression réduite.

2°) CONTROLE DE LA PERMETHYLATION

Les oligosaccharides perméthylés sont chromatographiés sur plaques de couche mince de silicagel G (30 g de silicagel G pour 60 ml d'eau, plaque de 4 x 10 cm). Le développement est effectué dans le système-solvant chloroforme-méthanol (9 : 1). Les oligosaccharides sont révélés par pulvérisation d'une solution à 5 p. 100 d'acide sulfurique dans l'eau distillée et chauffage 5 min à 120°.

3°) HYDROLYSE DES OLIGOSACCHARIDES PERMETHYLES

a) Cas d'oligosaccharide ne contenant que des monosaccharides neutres.

Les oligosaccharides méthylés ne contenant que des monosaccharides neutres sont méthanolysés par 1 ml de mélange méthanol/acide chlorhydrique N à 80° pendant 24 h. Le méthanolysat est séché sous un lent courant d'azote.

b) Cas d'oligosaccharides contenant des monosaccharides neutres et des osamines

Ces oligosaccharides sont hydrolysés par de l'acide chlorhydrique 4 N à 100° pendant 4 h. L'acide chlorhydrique est éliminé par codistillation avec l'éthanol à l'évaporateur rotatif.

4°) FRACTIONNEMENT ELECTROPHORETIQUE DES HYDROLYSATS

Les hydrolysats sont soumis à une électrophorèse préparative sur papier réalisée dans les conditions expérimentales suivantes : cuve électrophorétique en toit ; papier Whatman 3 MM ; tampon de MICHL (95) de pH 3,9 (pyridine/acide acétique/eau 3 : 10 : 487) ; 7 V/cm pendant 15 h. La révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (96) et par le réactif à la ninhydrine permet de localiser la bande "basique" des O-méthyl-osamines et la bande "neutre" des monosaccharides neutres méthylés. Ces deux fractions sont éluées selon la méthode de DENT (97) par de l'eau distillée additionnée de quelques gouttes d'acide acétique et les éluats sont évaporés à siccité dans un évaporateur rotatif pris en exsiccateur.

5°) IDENTIFICATION DES O-METHYL-OSAMINES

Le mélange des dérivés méthylés des osamines est soumis directement à l'analyse chromatographique selon le mode opératoire décrit ci-dessous :

0,1 mg des composés de la bande électrophorétique "basique" sont dissous dans 100 µl de pyridine anhydre que l'on additionne de 50 µl d'hexaméthylidisilazane et de 50 µl de triméthylchlorosilane. Le mélange est agité très énergiquement pendant 15 min puis séché sous courant d'azote. Le résidu est repris par 1 ml d'heptane et la solution obtenue est centrifugée. Le surnageant est séché sous courant d'azote. Le résidu sec est repris par 50 µl d'heptane et 1 µl de solution est soumis à la chromatographie en phase gazeuse dans les conditions expérimentales suivantes : chromatographe Aerograph 1 200 muni d'un détecteur à ionisation de flamme ; colonne de verre de 0,3 x 180 cm ; chromosorb W ("mesh" 100-120) contenant 3 % en poids de silicone OV 17 ; débit du gaz vecteur (azote) : 20 ml/min ; température : 120°.

6^o) IDENTIFICATION DES ETHERS METHYLIQUES DES MONOSACCHARIDESNEUTRES

Les méthyl glycosides des éthers méthyliques des monosaccharides neutres obtenus par méthanolyse des oligosaccharides perméthylés ou par méthyl glycosilation des éthers méthyliques de la bande électrophorétique "neutre" sont identifiés, par une chromatographie en phase gazeuse réalisée dans les conditions suivantes : chromatographe Aerograph 1 200, colonne de verre 0,3 x 300 cm, remplie de chromosorb W ("mesh" 60-80) contenant 3 % en poids de Carbowax 6 000 ; débit du gaz vecteur (azote) : 20 ml/min ; température 170^o C.

VIII - ETUDE IMMUNOCHEMIQUE DES OLIGOSACCHARIDESA - ACTIVITE A, B et H1^o) DETERMINATION DU TITRE DE L'ANTISERUM

Les antisérums suivants ont été utilisés :

- anti A humain, titre habituel 128
- anti B humain, titre habituel 64
- anti H du sérum d'anguille, titre habituel 32

Il est toutefois nécessaire de vérifier les titres des antisérums afin de standardiser les procédés d'étude immunochemique des oligosaccharides.

A cet effect, on réalise l'expérience suivante :

On dispose une série de 10 tubes à hémolyse, numérotés de 1 à 10 :

1er tube : 50 µl de sérum anti A

2e tube : 50 µl de sérum anti A + 50 µl de sérum physiologique

3e au 10e tube : 50 µl de sérum physiologique

Après légère agitation, 50 µl du tube 2 sont ajoutés au tube 3. Celui-ci est agité et 50 µl sont alors déposés dans le tube 4. Cette manipulation est répétée jusqu'au 10e tube. On obtient alors les dilutions :

$$1 - \frac{1}{2} - \frac{1}{4} \dots\dots\dots \frac{1}{512}$$

A chacun de ces tubes on ajoute alors 50 μ l d'une suspension d'hématies A, préalablement lavées dans le sérum physiologique, et à la concentration de 3 p. 100. Les dilutions des antisérums deviennent alors :

$$\frac{1}{2} - \frac{1}{4} - \frac{1}{8} \dots\dots\dots \frac{1}{1024}$$

Après 10 mn de contact à 20° C, les tubes sont centrifugés pendant 2 mn à 2 000 tours/minute. Le degré d'agglutination est alors lu en remettant en suspension les culots d'hématies. Une agglutination franche est caractérisée par la flottaison d'un culot unique, notée par 3 croix (+++). Lorsque la dilution augmente, les culots se fragmentent (Fig. 12 ; p. 66). Lorsque l'agglutination n'apparaît plus, il est possible de définir le titre qui est l'inverse de la dilution de l'antisérum à laquelle ne se produit plus d'agglutination des hématies. Le titre utilisé dans la détermination de l'activité de groupe sanguin des oligosaccharides est de 32. Dans le cas d'un sérum anti A de titre 128, le titre 32 est obtenu en diluant 1 volume de sérum avec 2 volumes de sérum physiologique.

2°) DETERMINATION DE L'ACTIVITE A, B ET H DES OLIGOSACCHARIDES

On dispose 3 rangées de 10 tubes à hémolyse. Dans le 1er tube de chaque rangée sont introduits 50 μ l de solution de sérum physiologique renfermant 1,5 mg d'oligosaccharide. Dans le 2e tube de la 1ère rangée, sont introduits 150 μ l de solution de sérum physiologique renfermant 4,5 mg d'oligosaccharide. Du 2e au 10e tube de la 1ère rangée sont introduits 150 μ l de sérum physiologique. Les dilutions sont alors réalisées comme l'indique la figure 12 (p. 66). On introduit ensuite dans chaque tube 50 μ l d'antisérum respectivement A, B ou H, de titre 32. Après un repos à + 4° C de 4 heures, on ajoute dans chaque tube 50 μ l d'une suspension d'hématies lavées (3 lavages dans le sérum physiologique) à 3 p. 100. Après un contact de 10 mn, les tubes sont centrifugés (2 000 t/mn ; 2 mn) et les lectures sont faites comme précédemment.

Exemple : L'agglutination devient négative quand on passe du tube 6 (+) au tube 5 (-), qui renferme 92 μ g d'oligosaccharide dans 150 μ l de solution finale. L'activité de l'oligosaccharide est donc de 60 μ g/100 μ l de solution.

B - DETERMINATION DE L'ACTIVITE LEWIS a et LEWIS b

A 50 μ l d'une solution d'oligosaccharide (de concentration décroissante), on introduit 150 μ l de sérum anti Lewis a ou Lewis b (titre 16). Après un séjour de 2 heures à + 4  C, on ajoute à chaque tube 50 μ l d'hématies à 10 p. 100 de groupe O (Lewis a ou Lewis b). Les tubes sont placés à + 4  C pendant 1 heure, puis centrifugés 2 mn à 2 000 t/mn et replacés 5 mn à + 4  C. Les lectures sont alors effectuées comme précédemment.

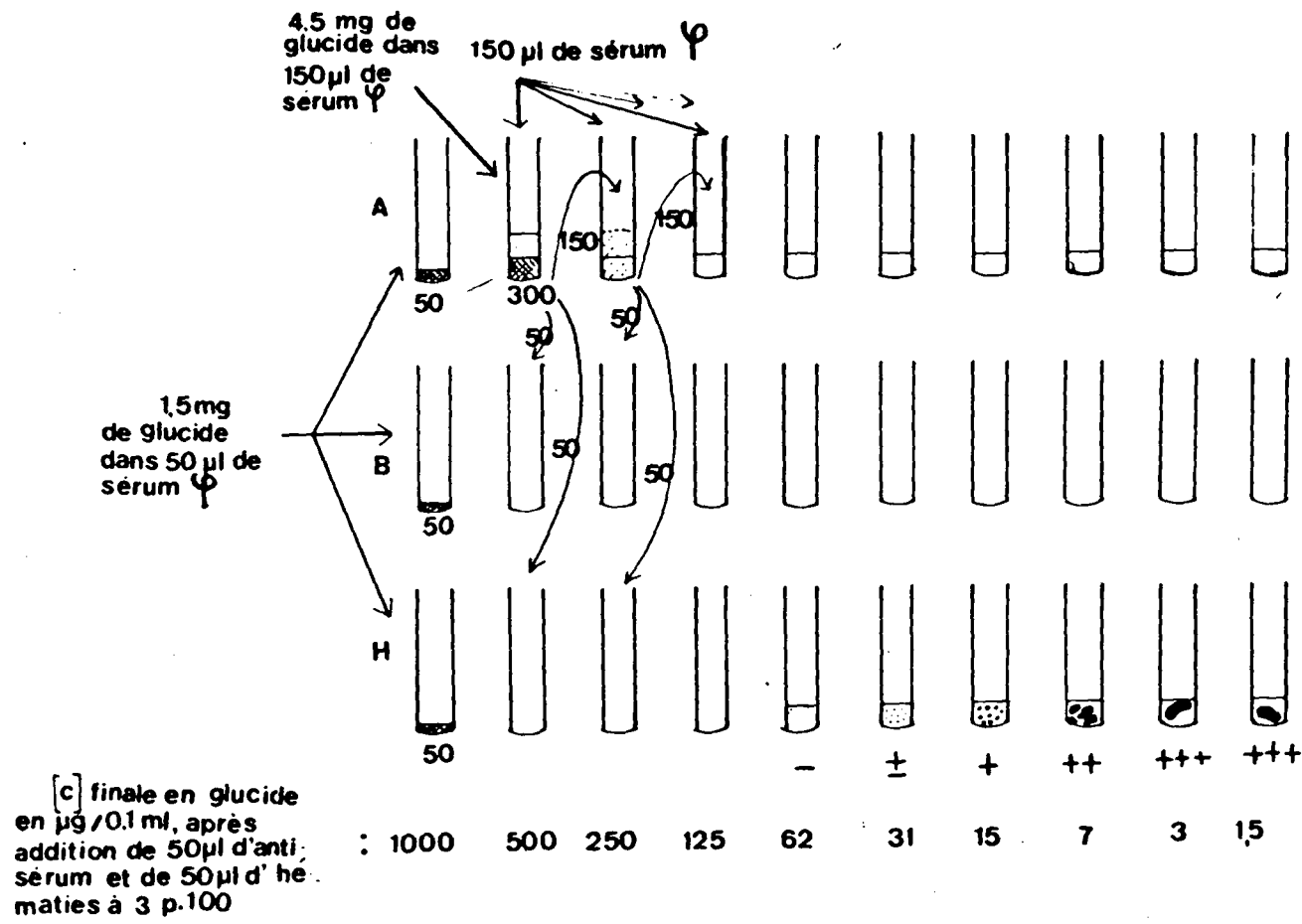


Figure 12

Disposition des tubes à hémolyses pour la détermination de l'activité A, B ou H d'un oligosaccharide.

52

BIBLIOGRAPHIE

- BELCHER, R., NUTTENT, A.J. et SAMBROOK, C.N., Analyst., 1954, 79, 201 (38, 54, 80)
- COHN, W.E., in COLOWICK, S.P. and KAPLAN, N.O., Methods in Enzymology, Acad. Press. éd. New-York, 1957, 3, 724 (71)
- COTTE, J., COLLOMBEL, C. et MATHIEU, M., La Revue du Praticien, 1965, 15, 1951 (19, 21)
- DATE, J.W., J. Clin. Lab. Invest., 1958, 10, 149 (56, 89)
- DENT, C.E., Biochem. J., 1933, 27, 1824 (97)
- DISCHE, Z., J. Biol. Chem., 1947, 167, 189 (36, 78)
- FISHER, F.G. et NEBEL, H.G., Z. Physiol. Chem., 1955, 302, 10 (41, 46, 55, 84 88)
- FLEURY, P. et EBERHARD, R., Ann. Biol. Clin., 1965, 23, 1175 (2)
- FONTAINE, G., BISERTE, G., MONTREUIL, J., DUPONT, A. et FARRIAUX, J.P. avec la collaboration de STRECKER, G., SPIK, G., PUVION, E., PUVION-DUTILLEUL, F., SEZILLE, G. et PICQUE, M.T., Helv. Paediat. Acta, 1968, 23, suppl. XVII (23)
- GLICK, M.C., CHEN, I.W. et ZILLIKEN, F., J. Biol. Chem., 1962, 237, 981 (59, 92)
- HAKOMORI, S., J. Biochem., 1964, 55, 205 (62, 94)
- JERMYN, M.A. et ISHERWOOD, F.A., Biochem. J., 1949, 44, 402 (48, 83)
- KUHN, R., BAER, H.H. et GAUHE, A., Ber., 1956, 89, 2519 (61)
- KUHN, R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 297 (65, 93)

- KALCKAR, H.M., BRAGANCA, B. et MUCH-PETERSON, A., Nature, 1953, 172, 1038 (26)
- LLOYD, K.O., KABAT, E.A. et ROSENFELD, R.E., Biochemistry, 1966, 5, 1502 (69, 70)
- LUNDBLAD, A., in Blood and Tissue Antigens, AMINOFF, D. éd, Acad. Press., New-York, 1970, 427 (17, 64)
- MALLEVAIS-GOUBET, B., SPIK, G., LOIEZ-HENNETTE, A., STRECKER, G., VAILLANT-DELACROIX, F. et MONTREUIL, J., Clin. Chim. Acta (sous presse) (27, 29, 43)
- MARINETTI, G.V. et ROUSER, G., J. Am. Chem. Soc., 1965, 77, 5345 (58, 91)
- MICHL, H., Monatsh. Chem., 1951, 82, 489 (63, 95)
- MONTREUIL, J., Bull. Soc. Chim. Soc., 1957, 39, 395 (66)
- MONTREUIL, J., BISERTE, G., STRECKER, G., SPIK, G., FONTAINE, G. et FARRIAUX, J.P., Clin. Chim. Acta, 1968, 21, 61 (22)
- MONTREUIL, J. et BOULANGER, P., C.R. Acad. Sci., 1953, 236, 337 (1, 4, 7)
- MONTREUIL, J. et SPIK, G., Microdosage des glucides, Monog. Lab. Chim. Biol., Fac. Sci., Lille éd., 1968, 1 (34, 37, 76, 77, 79).
- MONTREUIL, J. et SPIK, G., Dosages chromatographiques et électrochromatographiques des monosaccharides, Monog. Lab. Chim. Biol., Fac. Sci. Lille éd., 1968, 2 (57, 90)
- PARTRIDGE, S.M., Biochem. J., 1948, 42, 238 (40, 47, 82)
- PARTRIDGE, S.M., Biochem. Soc. Symp., 1950, 3, 52 (42, 49, 85, 96)
- RIMINGTON, C., Biochem. J., 1931, 25, 1092 (33, 52, 75)
- SPIK, G. et MONTREUIL, J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 50 (35, 53)

- SPIK, G., STRECKER, G. et MONTREUIL, J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 51, 1287 (73)
- STRECKER, G., Les glucides de l'urine humaine, Thèse Sci., Lille, 1970 (3, 9, 11, 13, 15)
- STRECKER, G., BAYARD, B. et MONTREUIL, J., C.R. 6e Symp. Intern. Chromatog. Electroph. Bruxelles 1970, Presses Acad. Eur. éd., Bruxelles, 1971 p. 324 (5, 12, 16, 28, 30, 44, 45)
- STRECKER, G., CHAUVET C. et MONTREUIL J., Clin. Chim. Acta, 1973 (sous presse) (6, 18, 68)
- STRECKER, G. et MONTREUIL, J., Z. Physiol. Chem., 1969, 350, 14 (10, 14)
- STRECKER, G. et MONTREUIL, J., Clin. Chim. Acta, 1971, 33, 255 (24)
- STRECKER, G. et MONTREUIL, J., Clin. Chim. Acta, 1971, 33, 395 (25)
- TILLSMANS, J. et PHILIPPI, K., Biochem. Z., 1928, 215, 36 (32, 51, 74)
- TREVELYAN, W.E., PROTOR, D.P. et HARRISON, J.S., Nature, 1950, 166, 444 (50, 60, 86, 87)
- WATKINS, W.M. et MORGAN, W.T.J., Vox Sanguinis, 1962, 7, 129 (67)
- WERNER, J. et ODIN, L., Acta. Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230 (39, 81)
- WHISTLER, R.L. et DURSO, D.F., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 677, (31, 72)
- WHITE, A.A. et HESS, W.C., Arch. Biochem. Biophys., 1956, 64, 57 (8)

