50376
1974
196

50376
1974
196

N° d'ordre 459

95673

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE I

MEMOIRE

PRESENTE A L'UNIVERSITE DE LILLE I
POUR L'OBTENTION DU TITRE DE
DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE
SPECIALITE : BIOCHIMIE

par

Monique DURIEUX

RECHERCHES SUR LES GLUCIDES DE L'URINE HUMAINE

ETUDE CHIMIQUE ET IMMUNOCHIMIQUE DE 45 OLIGOSACCHARIDES ISOLES DE L'URINE DE SUJETS DE PHENOTYPE O.se.Le, O.Se.Le ET A.Se.Le.

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

Présenté devant la Commission d'Examen le 20 MAI 1974

MM. J. MONTREUIL, Président
G. STRECKER, Rapporteur
G. BISERTE,
Mlle G. SPIK, Examinateurs

SCD LILLE 1
D 030 308302 4

50376
1974
196

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

Villeneuve d'Ascq, le 25 Avril 1974

50376
1974
196

DES SCIENCES
QUES DE LILLE

DOYENS

H. LEFEBVRE, R. D

PROFESS t

et Sc s

RNOULT, Mme BEAUJ IER, DEHEUVELS,
RS, FAUVEL, FLEUR E DE FERIET,
GANOFF, LAMOTTE, , MAZET, MICHEL,
ANT, PEREZ, ROIG,

ARREAU

A RETOURNER LE

BACCHUS Pierre
BEAUFILS Jean-Pier
BECART Maurice
BIAYS Pierre
BONNEMAN Pierre nie Industrielle
BONTE Antoine
BOUCHON Pierre
BOUISSET Simon
BOURIQUET Robert
CELET Paul
CONSTANT Eugène Electronique
CORSIN Pierre
DECUYPER Marcel
DELATTRE Charles
DELHAYE Michel
DERCOURT Michel(Jean)
DURCHON Maurice
FAURE Robert
GCURET René
GABILLARD Robert
LACET Charles
GONTIER Gérard
GRUSON Laurent
GUILLAUME Jean
HUBEL Joseph
JANSRAUX Guy
LEBRUN André
LEHMANN Daniel
LENOBLE Jacqueline
LINDER Robert
LOMBARD Jacques
LOUCQUIN Michel
MILLET Pierre
NONTARIOL Frédéric
PONTREUIL Jean
PARREAU Michel
PUZET Pierre
ROUVOST Jean

s

Géologie Générale
Chimie
Sciences de la Terre
Zoologie Générale et Appliquée
Mécanique
Physique
Radio-Electricité-Electronique
Chimie Organique
Mécanique
Mathématiques
Biologie Végétale
Chimie Minérale
Physique
Electronique (Lille)
Mathématiques
Physique Expérimentale
Botanique
Sociologie
Chimie Physique
Sciences Economiques et Sociales
Chimie Appliquée
Chimie Biologique
Mathématiques Appliquées
Informatique (Lille)
Géologie Minéralogie

030 031658 3

.../...

PROFESSEURS TITULAIRES (suite)

M. SCHILTZ René	Physique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse Supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mathématiques

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BONNOT Ernest	Biologie
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. CAPURON Alfred	Chimie Minérale
M. DEPREZ Gilbert	I.U.T. Lille
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie
M. LACOSTE Louis	Biologie
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Mlle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. PANET Marius	I.E.E.A.
M. SALMER Georges	I.E.E.A.
M. SEGUIER Guy	I.U.T. Béthune

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCQ Denis	Mathématiques
M. BREZINSKI Claude	I.E.E.A.
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CARREZ Christian	I.E.E.A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COQUERY Jean- Marie	Biologie
M. COULON Jean	I.E.E.A.
Mlle DACCHARI Monique	Géographie et Aménagement Spatial
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées
M. DHAINAUT André	Biologie

.../...

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques et Sociales
DERIEUX Jean-Claude	Biologie (I.U.T.)
DOUKHAN Jean-Claude	Physique
DRIEUX Baudouin	I.E.E.A.
DUEE Gérard	Sciences de la Terre
DYMENT Arthur	Mathématiques
ESCAIG Bertrand	Physique
EVRARD Micheline	Chimie (I.U.T.)
FONTAINE Jacques-Marie	I.U.T. Lille
FOURNET Bernard	I.U.T. Lille
FROELICH Daniel	Sciences Appliquées
GAMBLIN André	Géographie
GOBLOT Rémi	Mathématiques
GOSSELIN Gabriel	Sociologie
GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
GUIGOU Jean-Louis	Sciences Economiques
HECTOR Joseph	S.E.N. Calais
HERMAN Maurice	Physique
JOURNEL Gérard	Sciences Appliquées
KOSMANN Yvette	Mathématiques
KREMBEL Jean	Chimie
LANGRAND Claude	Mathématiques
LAURENT François	Automatique
LEGRAND Denise	Mathématiques
LEGRAND Solange	Mathématiques
LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
LEROY Yves	Electronique (Lille)
LHENAFF René	Géographie
LOCQUENEUX Robert	Physique
LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
LOUCHET Pierre	I.U.T. Lille
MAHIEU Jean-Marie	Physique (I.U.T. Lille)
N'Guyen Van Chi Régine	Géographie et Aménagement Spatial
MAIZIERES Christian	I.E.E.A.
MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques et Sociales
MESSELYN Jean	Physique
MIGEON Michel	Chimie (Sciences Appliquées)
MOTZKIN Joseph	Mathématiques
MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
NICOLE Jacques	Chimie (E.N.S.C.L.)
PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
PARSY Fernand	Mathématiques
PECQUE Marcel	Chimie (Béthune)
PERROT Pierre	Chimie
PERTUZON Emile	Biologie
PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
RACZY Ladislas	Physique
ROGALSKI Marc	Mathématiques
ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
ROY Jean-Claude	Biologie
SIMON Michel	Psychologie
SLIWA Henri	Chimie
SOMME Jean	Géographie

.../...

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

le SPIK Geneviève	Chimie Biologique
STANKIEWICZ François	Sciences Economiques et Sociales
THERY Pierre	Calais
TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
TREANTON Jean-René	Sciences Economiques et Sociales
VANDORPE Bernard	Chimie Physique
VILETTE Michel	Génie Mécanique (Béthune)
WERNER Georges	Informatique (I.U.T. Lille)
WATERLOT Michel	Géologie
YVON Jean-Pierre	Mathématiques
ZINN Justin Nicole	Mathématiques

R E S U M E

Le fractionnement de quantités élevées d'urines recueillies chez des sujets de sexe masculin et de groupes sanguins connus nous a permis d'isoler 45 oligossacharides et de déterminer la structure de 18 d'entre eux.

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude sont les suivantes :

1) La structure de la plupart des oligosaccharides de l'urine humaine est directement liée au groupe sanguin de l'individu (systèmes A, B, H, Se et Le).

2) Les analogies de structure qu'ils présentent avec les oligosaccharides du lait de Femme permettent de poser en hypothèse que les uns et les autres sont synthétisés par des systèmes glycosyltransférasiques identiques.

3) Les oligosaccharides de l'urine humaine constituent enfin de précieux modèles moléculaires qui seront utilisés ultérieurement dans le cadre de travaux d'ordre immuno-chimique et d'études de la conformation des sites antigéniques des substances de groupe sanguin.

Ce travail a été réalisé sous la Direction de Monsieur Gérard STRECKER, Chargé de Recherches C.N.R.S., dans les Laboratoires de Chimie Biologique du Professeur Jean MONTREUIL à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Institut Jules DRIESSENS et Unité I.N.S.E.R.M. nº 124 de Recherches Ultrastructurales et Biochimiques sur les cellules normales et cancéreuses) et à la Faculté des Sciences de Lille. Il entre dans le cadre des activités du Laboratoire associé au C.N.R.S. nº 217 (Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués).

Nous remercions le Professeur J. MONTREUIL de l'intérêt qu'il a témoigné à ce travail et de l'aide qu'il a apporté dans sa réalisation ainsi que les Membres du Laboratoire associé au CNRS nº 217, en particulier :

Bernard FOURNET pour ses conseils concernant la chromatographie en phase gazeuse des dérivés méthylés des glucides,

Geneviève SPIK et Stéphane POUQUELET pour les hydrolyses enzymatiques qu'ils ont bien voulu effectuer sur nos préparations,

Anick POITAU, Danièle ROUX, Jean-Pierre DECOTTIGNIES et Yves LEROY pour leur précieuse collaboration technique.

TABLE DES MATIERES

	Pages
— INTRODUCTION —	1
— GENERALITES —	2
LES ANTIGENES DE GROUPE SAUNGUIN	2
A - Définitions	2
I - Notion d'Antigène de groupe sanguin	2
1 - Les antigènes cellulaires	2
2 - Les antigènes solubles	2
II - Notion d'individu "Secréteur"	3
III - Le Système Lewis "Le"	3
IV - Conclusion	3
B - Les glycolipides à activité de groupe sanguin	5
I - Structure et répartition	5
II - Propriétés	10
III - Intégration au niveau membranaire	10

C - Les glycoprotéines à activité de groupe sanguin 16

I - Structure et Propriétés

II - Localisation des glycoprotéines à activité de groupe sanguin dans les membranes cellulaires 18

D - Les oligosaccharides à activité de groupe sanguin des milieux de secrétion 22

EXTRACTION DES ANTIGENES DE GROUPE SANGUIN 24

A - Extraction à partir des liquides biologiques 24

I - Principe 24

II - Préparation des oligosaccharides à activité de groupe sanguin du lait de femme 24

III - Isolement des oligosaccharides à activité de groupe sanguin des urines 25

IV - Isolement des glycoprotéines à activité de groupe sanguin à partir d'autres liquides biologiques 32

B - Isolement et caractérisation des antigènes membranaires 32

I - Méthode de ANDO et YAMAKAWA (1973) 34

1 - Préparation des érythrocytes 34

2 - Extraction des glycolipides à activité de groupe sanguin 34

3 - Purification des glycolipides 34

4 - Résultats 34

II - Technique de KOSCIELAK (1973) 37

1 - Isolement des antigènes glycolipidiques 37

a - Isolement des stromas 37

b - Extraction des glycolipides 37

c - Séparation des glycolipides à activité de groupe sanguin 37

2 - Isolement des glycoprotéines à activité de groupe sanguin 40

a - Extraction 40

b - Résultats 40

III - Technique de HAKOMORI et JEANLOZ 43

1 - Extraction des glycolipides 43

2 - Résultats 43

BASES MOLECULAIRES DES ACTIVITES DE GROUPE SANGUIN 45

A - Principe

B - Structure des déterminants antigéniques 45

I - Méthodes 45

1 - Méthodes d'hémagglutination et de précipitation 45

2 - Exoglycosidases 46

3 - Dégradation alcaline 46

4 - Méthodes directes 46

II - Bases Moléculaires des déterminants A, B, H, Le a, Le b 46

1 - Déterminant antigénique Lewis a 46

2 - Déterminant antigénique Lewis b 49

3 - Déterminant antigénique H 50

4 - Déterminant antigénique A 50

5 - Déterminant antigénique B 51

C - Structure complète des antigènes de groupe sanguin 54

I - Principe 54

II - Résultats 54

GENETIQUE ET BIOSYNTHESE DES SUBSTANCES DE GROUPE SANGUIN 59

A - Relation génétiques dans la biosynthèse des substances A, B, H et Lewis 59

B - Relation 1 gène → 1 enzyme dans la biosynthèse des substances de groupe sanguin 61

C - Filiation métabolique des substances de groupes sanguins 64

— TRAVAUX PERSONNELS — 68

A - Matériel et Méthodes 68

I - Fractionnement des urines 68

1 - Collection des urines 68

2 - Déminéralisation sur échangeurs d'ions 68

3 - Fractionnement sur charbon 69

4 - Analyse des fractions obtenues 69

a - Chromatographie préparative 70

a_1 - Systèmes-solvants 70

a_2 - Révélation 70

b - Electrophorèse préparative 71

b_1 - Tampons utilisés 71

b_2 - Révélations 71

II - Etude de la structure des oligosaccharides isolés 71

1 - Détermination de la composition en oses 71

a - Composition centésimale 71

a_1 - Dosage des monosaccharides neutres 71

a_2 - Dosage des acides uroniques 71

a_3 - Dosage des hexosamines 72

a_4 - Dosage des acides sialiques 72

b - Identification des hexoses et détermination de leur composition molaire 72

b_1 - Hydrolyse chlorhydrique 72

b_2 - Identification et dosage chromatographique des hexoses 72

2 - Etude de la structure des oligosaccharides 73

a - Identification de l'ose terminal réducteur 73

b - Hydrolyse partielle 73

c - Dégradation alcaline 74

d - Perméthylation des oligosaccharides 74

d_1 - Protocole expérimental 74

d_2 - Contrôle de la perméthylation 75

d_3 - Hydrolyse des oligosaccharides perméthylés 75

d_4 - Fractionnement électrophorétique des hydrolysats 76

d_5 - Identification des O-méthyl-osamines 76

d_6 - Identification des éthers méthylés des monosaccharides neutres 77

III - Etude Immunochimique des oligosaccharides 77

1 - Activité A, B et H 77

a - Détermination du titre de l'antisérum 77

b - Détermination de l'activité A, B et H des oligosaccharides 78

2 - Détermination de l'activité Lewis a et Lewis b 79

B - RESULTATS 81

I - Fractionnement des urines 81

II - Isolement des oligosaccharides urinaires 81

1 - Urine de sujet O, se, Le 81

2 - Urine de sujet O, Se, Le 86

3 - Urine de sujet A, Se, Le 86

III - Etude de la structure des oligosaccharides urinaires 90

1 - Oligosaccharides isolés de l'urine d'un sujet O, se, Le 90

a - Composition molaire et nature du glucide réducteur 90

b - Hydrolyse partielle par l'acide sulfurique dilué 90

c - Perméthylation 92

d - Conclusion 92

2 - Oligosaccharides isolés de l'urine d'un sujet O, Se, Le 92

a - Oligosaccharide 1_H 93

b - Oligosaccharide 2_H 93

c - Oligosaccharide 3_H 93

d - Oligosaccharide 4_H 93

e - Oligosaccharide 5_H 95

f - Oligosaccharide 6_H 95

g - Oligosaccharide 7_H 95
h - Oligosaccharide 8_H 95
i - Oligosaccharide 9_H 95
j - Oligosaccharide 10_H 95
k - Oligosaccharide 11_H 95
l - Oligosaccharide 12_H 96
m - Oligosaccharide 13_H 96
n - Oligosaccharide 14_H 96
o - Oligosaccharide 15_H et 16_H 96
p - Oligosaccharide 17_H 97
q - Oligosaccharide 18_H 97
r - Oligosaccharide 19_H 97
s - Oligosaccharide 20_H 97
t - Oligosaccharide 21_H 97
u - Oligosaccharide 22_H 98
v - Oligosaccharide 23_H 98
w - Oligosaccharide 24_H 98
x - Oligosaccharide 25_H 100
y - Oligosaccharide 26_H 100
z - Oligosaccharide 27_H 102

3 - Oligosaccharides isolés de l'urine d'un sujet A, Se, Le 102

a - Oligosaccharides 1_A et 2_A 102
b - Oligosaccharide 3_A 102
c - Oligosaccharide 4_A 104
d - Oligosaccharide 5_A 104
e - Oligosaccharide 6_A 104
f - Oligosaccharide 7_A 104
g - Oligosaccharide 8_A 105
h - Oligosaccharide 9_A 105
i - Oligosaccharide 10_A 105
j - Oligosaccharides 11_A à 18_A 106

4 - Activités de groupes sanguins des oligosaccharides urinaires 106

C - Conclusion et discussion 109

— CONCLUSIONS GENERALES — 114

— BIBLIOGRAPHIE — 116

INTRODUCTION

Nos travaux sont le prolongement de ceux qui ont été entrepris au laboratoire par MONTREUIL et BOULANGER 1953, (1) et par MONTREUIL (1956) (2) sur les glucides des urines et qui ont conduit G. STRECKER et J. MONTREUIL (3) à démontrer que, si de nombreux oligosaccharides possédaient une origine alimentaire et que d'autres étaient les témoins du métabolisme des glycoprotéines, certains possédaient des activités de groupes sanguins et étaient donc en relation étroite avec des antigènes de membranes. Ainsi se confirmait l'hypothèse récente de MONTREUIL et STRECKER que l'urine pourrait renfermer des antigènes tissulaires divers et pourrait, en les concentrant, devenir un matériau de départ précieux pour isoler ces constituants. En outre, l'hypothèse de travail posée dès 1948 par MONTREUIL selon laquelle les urines de cancéreux pourrait bien contenir des composés glucidiques anormaux, reste acceptable car l'urine devrait logiquement renfermer des néo-antigènes de membranes provenant des cellules transformées.

Nos recherches ont plus particulièrement porté sur l'étude physico-chimique et immunochimique des oligosaccharides de l'urine. Afin de comparer leur structure avec celle des oligosaccharides du lait de femme et des antigènes de membranes isolés récemment par HAKOMORI et JEANLOZ (1964) (4) et par KOŚCIELAK et al. (1973) (5).

Nous avons choisi des sujets des groupes sanguins suivants : O Le^a Se, O Le^b Se, A Le^b Se.

L'ensemble de nos travaux nous permet de montrer l'analogie de structure qui existe entre les oligosaccharides du lait et ceux de l'urine. Une similitude de structure existe également entre ces sucres et les déterminants glucidiques des antigènes membranaires.

— G E N E R A L I T E S —

LES ANTIGENES DE GROUPE SANGUIN

A - DEFINITIONS

I - NOTION D'ANTIGENE DE GROUPE SANGUIN

Les substances de groupe sanguin A, B, O des érythrocytes sont des antigènes (agglutinogènes) qui provoquent la formation d'anticorps ou agglutinines spécifiques. On définit les différents systèmes de groupessanguins par réaction d'agglutination des hématies avec des anticorps spécifiques. Quatorze systèmes sont aujourd'hui connus, formés par la combinaison de soixante facteurs différents (RACE et SANGER, 1962)(6).

Ces substances de groupe sanguin A, B, O peuvent être divisées en deux classes de constituants quiportent des spécificités antigéniques cellulaires et les antigènes solubles.

1 - Les antigènes cellulaires :

Les substances à spécificité A, B, O extraites de la membrane des globules rouges sont des glycolipides (HAKOMORI et STRYCHARZ, 1968)(7) ; KOŚCIELAK et al. 1972)(8). Ces substances préparées par extraction éthanolique sont dites : "solubles dans l'alcool". Des macromolécules aux propriétés et spécificités identiques existent à la surface des cellules de nombreux autres tissus et font partie intégrante notamment de la membrane des cellules endothéliales qui tapissent le système cardiovasculaire (SZULMAN, 1966)(9).

2 - Les antigènes solubles :

Ce sont des glycoprotéines, comme l'ont montré (KABAT, 1956 (10) et MORGAN, 1960 (11), qui se trouvent dans les milieux de sécrétion : la

salive, le méconium, l'urine, le lait, le suc pancréatique, le suc gastrique, le liquide séminal. Un modèle biologique très apprécié des chercheurs est le liquide des kystes de l'ovaire qui est une source importante de glycoprotéines solubles dites à activité de groupes sanguins.

II - NOTION D'INDIVIDU "SECRETEUR"

La salive et les autres milieux de sécrétion de la plupart des individus contiennent des glycoprotéines à spécificité A, B ou H, suivant le phénotype du sujet :

- ces individus sont dits "sécréteurs" et représentent 75 p. 100 de la population,
- cet état est constant et génétiquement déterminé,
- les allèles Se, (sécréteur) et se, (non sécréteur) d'après CEPPELLINI, 1955 (12) et WATKINS, 1964 (13) sont portés par un locus différent du locus A, B, O. On pense d'ailleurs qu'ils sont situés sur des chromosomes différents.
- ces gênes affectent seulement la synthèse du déterminant de groupe sanguin des substances solubles. Chez les sujets non sécréteurs, les macromolécules sont aussi présentes mais ne portent pas les spécificités de groupe A, B, H.

III - LE SYSTEME LEWIS ("Le")

Le locus Lewis (Le) différent du locus sécréteur (Se) affecte la biosynthèse et la spécificité antigénique des substances à activité de groupe sanguin: CEPPELLINI, 1955 (14), CEPPELLINI, 1959 (15).

Une interaction apparaît entre le système Sécréteur et le système Lewis : la spécificité Le_a est plus marquée dans les sécrétions des individus non sécréteurs que dans celles des sujets secréteurs.

IV - CONCLUSION

Les membranes cellulaires comportent donc des glycolipides à spécificité A, B, H : elles comprennent en outre d'autres antigènes de même spéci-

ficité mais qui ne sont pas solubles dans les solvants organiques. Ce dernier type d'antigène est de nature glycoprotéinique. Ce sont les antigènes solubles qui s'absorberaient sur les membranes érythrocytaires et qui ne seraient donc présents que dans les hématies des individus sécréteurs.

B - LES GLYCOLIPIDES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN

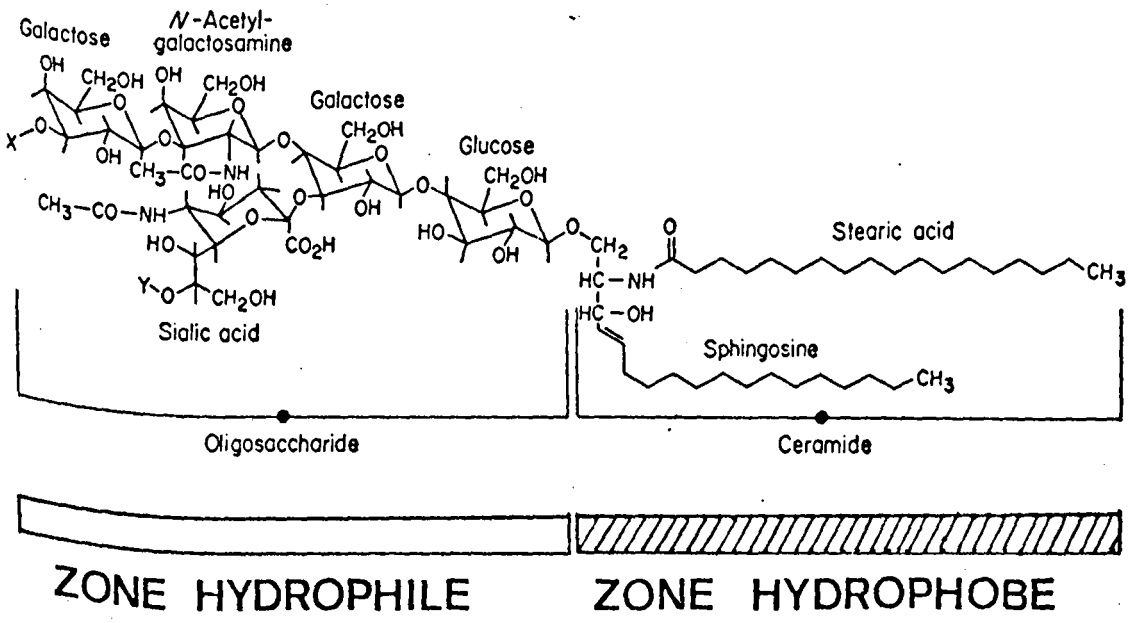
I - STRUCTURE ET REPARTITION

Les substances de groupe sanguin A, B, O, isolées de la membrane érythrocytaire sont des glycolipides: HAKOMORI, 1970 (16), HAKOMORI et STRYCHARZ, 1968 (17) YAMAKAWA et al., 1965 (18). Ils se composent d'au moins 50 p. 100 de glucides, les principaux monosaccharides rencontrés étant le D-glucose, le D-galactose, le L-fucose, la N-acétyl-D-glucosamine, la N-acétyl-galactosamine, l'acide N-acétyl-neuraminique. Le reste de la molécule est formé de sphingosine et d'acide gras. L'unité lipidique de base est le céramide : une molécule de sphingosine attachée à un acide gras par une liaison amide ; elle porte les déterminants glucidiques antigéniques (voir figure 1 p. 6). La molécule complète est biosynthétisée en conjuguant sur la fonction alcool primaire du céramide des monosaccharides ou des disaccharides.

Le tableau I (p. 7) indique la distribution des glycolipides dans les tissus humains. Les antigènes glycolipidiques représentent une infime fraction de tous les glycolipides tissulaires. Ainsi, les glycolipides de la membrane érythrocytaire ne représentent que 10 p. 100 du total des lipides soit 1 à 4 p. 100 de la masse de la membrane et le glycolipide majeur ne possède aucune activité sérologique : voir tableau II (p. 8).

Trois classes d'antigènes glycolipidiques, comme le montre le tableau III (p. 9) peuvent être distinguées :

- les cérébrosides
- les oligosidocéramides
- les gangliosides.



X, Y = H	Monosialoganglioside G_I
X = sialic acid, Y = H	Disialoganglioside G_{II}
X = H, Y = sialic acid	Disialoganglioside G_{III}
X, Y = sialic acid	Trisialoganglioside G_{IV}.

Figure 1

Structure de quelques gangliosides du cerveau (d'après VAN HEYNINGEN & MELLANBY, 1971) (19).

Glycolipides	*Nerf (a)*	*Parenchyme (b) hépatique*	*Erythrocyte (c)*	*Fibroblaste (d)*	*Glande (e)*	*Adénocarcinome (f)*
Galactocérébroside	+++	+	+	-	+	+
Glucocérébroside	±	+	+	+	+	+
Sulfatide	++	+	-	-	±	±
Lactosylcéramide	-	+	++	+	++	++
Trihésosylcéramide	-	+	+	+	+	+
Globoside	-	+++	+++	-	-	-
Hématoside	±	+++	± à +++	+++	++	++
Gangliosides	+++	±	±	+	+	+
Fucosylglycolipides ayant ou n'ayant pas d'activité de groupe sanguin	-	±	±	-	+++ (A^+, B^+)	++++ ($A^- B^-$)

* Les glycolipides de l'érythrocyte sont généralement classés en deux groupes : les globosides contenant des hexosamines, et les hématosides contenant de l'acide sialique.

(a) SVENNERHOLM, 1963 (20) et LEDEEN, 1966 (21)
(b) MAKITA et YAMAKAWA, 1966 (22) et MÅRTENSON, 1966 (23)
(c) YAMAKAWA, 1965 (24), VANCE et SWEELEY, 1967 (25)
(d) HAKOMORI et MURAKAMI, 1968 (26), HAKOMORI et al., 1968 (27)
(e) SUZUKI et al., 1967 (28), Mc KIBBIN, 1969 (29), HAKOMORI et ANDREWS, 1970 (30)
(f) HAKOMORI et JEANLOZ, 1964 (31), HAKOMORI et ANDREWS, 1970 (32).

TABLEAU II

REPARTITION DES PRINCIPAUX TYPES DE LIPIDES DANS LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE (D'APRES VAN DEENEN, 1961)(33).

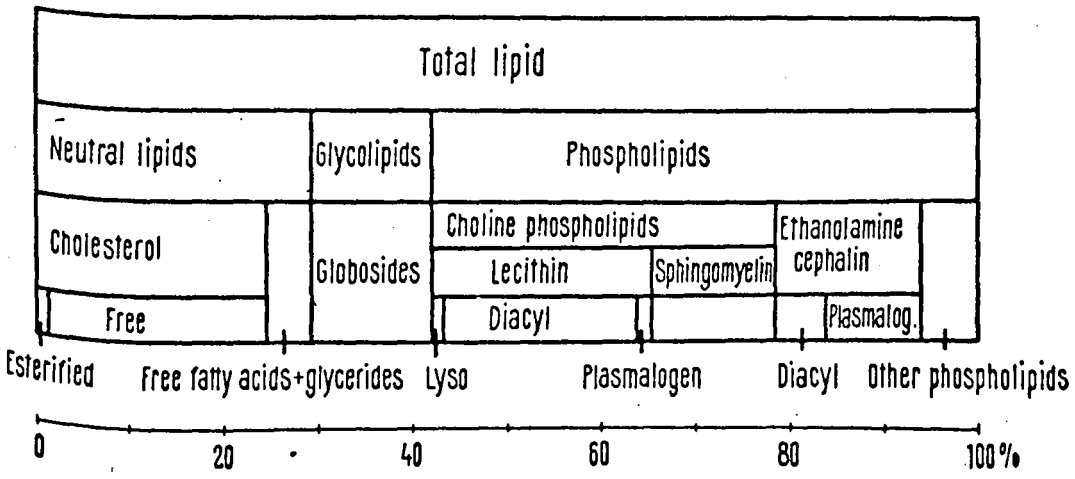


TABLEAU III

GLYCOLIPIDES SEROLOGIQUEMENT ACTIFS

EBROSIDES de gras (à très longue chaîne (C_{20}- C_{22}) saturé ou insaturé ingosine - galactose	- Composé majeur et spécifique du système nerveux - Galactocérébrosides du système nerveux: provoquent la formation d'anticorps dans certains cas d'encéphalomyélites.
GOSIDOCERAMIDES de gras (principalement l'acide lignocérique) ingosine - glucose - galactose (autres sucres neutres, hexosamines (Fuc)	- Glycolipides de l'érythrocyte, de la rate, autres tissus (tissus rénal) - Glandulaires : activité Lewis - Glycolipides caractéristiques de tumeurs
GLIOSIDES de gras ingosine - glucose - galactose - hexosamines NANA NANA NANA A : Acide N-acétyl-neuraminique)	- Gangliosides du sytème nerveux, de la rate - Activité de groupe sanguin M, N, Rhésus (D)

Ainsi les glycolipides, porteurs des déterminants antigéniques des groupes sanguins, sont constitués par des glycolipides neutres et des gangliosides dans le rapport de 1/3 dans la membrane des hématies humaines. On ne peut parler d'une véritable spécificité d'organe de ces substances. Le plus simple des glycosphingolipides; le lactosylcéramide ou cytolipide H a été mis en évidence dans les tissus tumoraux (RAPPORT, 1961 (33)*. Il a été ensuite reconnu dans le tissu rénal (MAKITA et YAMAKAWA, 1966 (34) et dans les érythrocytes (YAMAKAWA, 1965 (35), SWEELEY, 1969 (36).

La première structure de glycolipides érythrocytaires à activité de groupe sanguin a été proposée par UHLENBRUCK, 1967 (37) à la suite d'observations de KOSCIELAK, 1963 (38); voir figure 2 (p.11) ; seules des fractions lipidiques particulières de l'érythrocyte étaient "porteurs" de ces spécificités de groupe sanguin.

II - PROPRIETES

Les antigènes tissulaires sont des glycolipides possédant au moins 50 p. 100 de sucres et relativement insolubles dans l'eau.

En solution aqueuse, ces glycolipides forment facilement des micelles (Figure 3 p. 12), le pôle hydrophobe (la chaîne paraffinique de l'acigras) est orienté vers l'intérieur de la micelle qui forme ainsi une sphère, la chaîne glucidique hydroxylée est dirigée vers l'extérieur. Cette agrégation moléculaire des glycolipides cause des empêchements stériques et les déterminants antigéniques glucidiques encombrants ne sont pas accessibles pour réagir convenablement avec le site spécifique de l'anticorps correspondant. C'est la raison pour laquelle, les glycolipides ne montrent qu'une faible activité dans les réactions d'inhibition de l'hémagglutination.

III - INTEGRATION AU NIVEAU MEMBRANAIRE

Les antigènes cellulaires sont mis en évidence par des réactions d'agglutination avec les anticorps correspondants. Pour se lier avec l'anticorps spécifique, l'antigène doit être accessible.

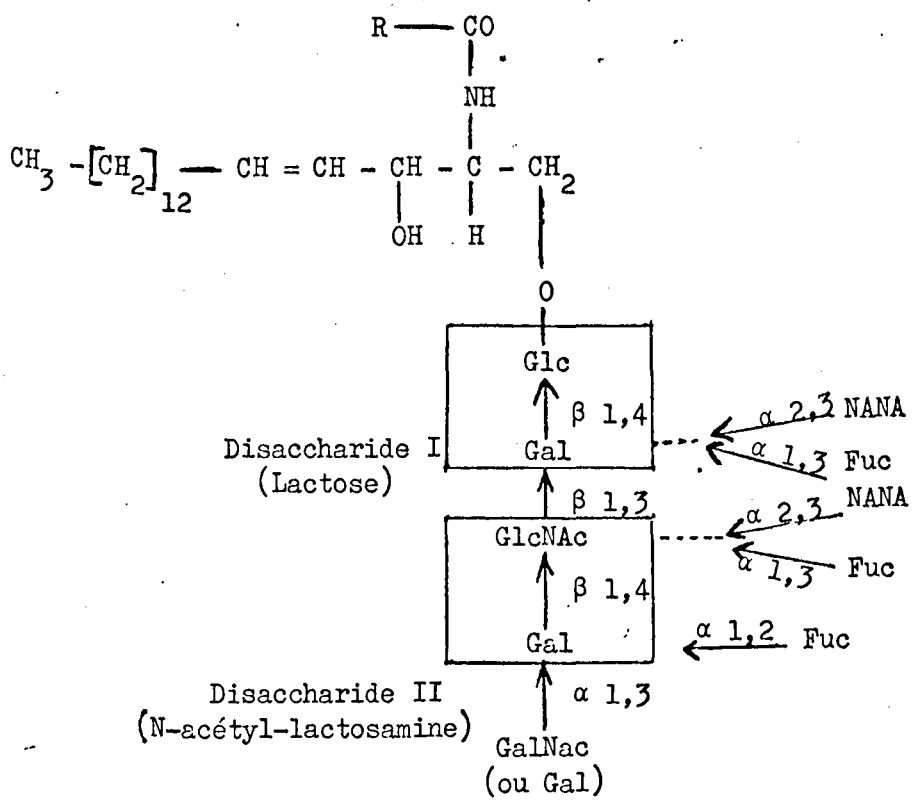


Figure 2

STRUCTURE DES GLYCOLIPIDES ERYTHROCYTAIRES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN (D'APRES ÜHLENBRUCK, 1967) (39)

L'acide N-acétyl-neuraminique est très probablement lié au résidu de galactose du lactose. Une autre possibilité est aussi indiquée sur cette figure.

R : Acide gras saturé (acide palmitique en C_{16} ou stéarique en C_{18}) ou insaturé (acide oléïque C_{18})

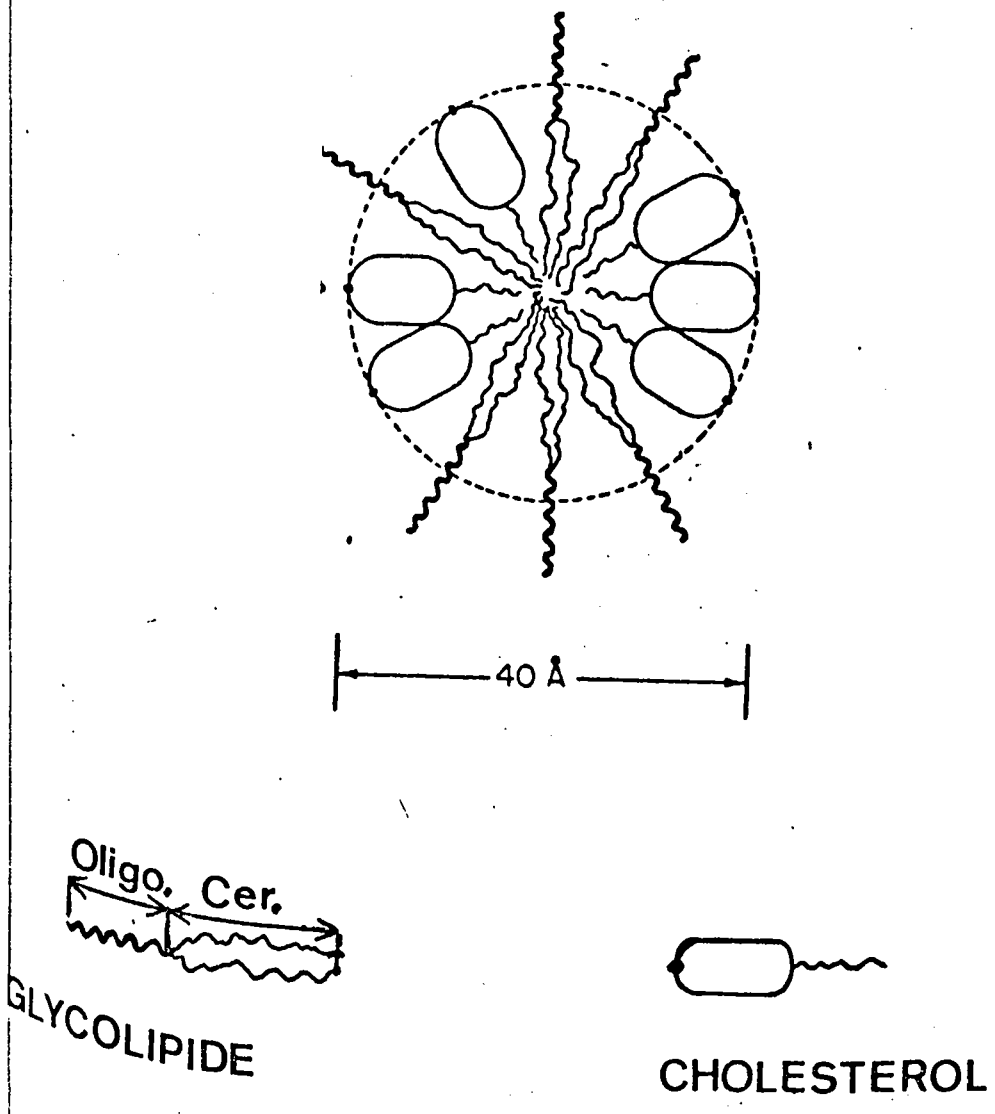


Figure 3

Structure des micelles de glycolipides et de cholestérol (d'après GLAUERT et LUCY, 1968)(40).

Oligo : Oligosaccharide

Cer : Ceramide.

Les érythrocytes sont immunogéniques, capables de provoquer la formation d'anticorps spécifiques. Ils possèdent donc sur leur membrane les déterminants antigéniques des divers groupes sanguins.

La microscopie à fluorescence et les techniques autoradiographiques ont permis à SINGER et NICOLSON, 1971 (41) d'étudier la distribution des anticorps anti-Rhésus marqués à ^{125}I sur les membranes érythrocytaires humaines rhésus positives. L'immunogénicité repose sur l'ordonnance régulière en mosaïque, de nombreux déterminants antigéniques (deux à huit), sur la surface externe de la membrane péricellulaire (stroma). Ces antigènes représentés par les groupements glucidiques tournés vers l'extérieur de la membrane sont ainsi exposés, capables de se lier avec les anticorps spécifiques. L'image dans l'espace du déterminant glucidique est importante : peu de groupements sont exposés, chaque érythrocyte peut ainsi porter une large variété d'antigènes. Il est probable que les antigènes de groupe sanguin sont formés et intégrés dans la membrane des normoblastes, donc au niveau de la moelle osseuse.

En 1970, HAKOMORI (42) faisait état de glycolipides sérologiquement actifs, isolés de l'érythrocyte et solubles en solution aqueuse. Ceci est en accord avec l'hypothèse de ZAHLER (43) qui observait en 1969, des interactions entre les lipides et les protéines à l'intérieur des membranes (figure 4 p.14). Si ces liaisons n'existaient pas, les lipides formeraient des micelles comme c'est le cas en milieu aqueux.
Il existe deux types de liaisons :

- le cholestérol et une partie des phospholipides sont maintenus à l'intérieur de la membrane par des liaisons hydrophobes entre les chaînes paraffiniques et les séquences d'acides aminés hydrophobes des protéines. Ces liaisons sont biologiquement les plus significatives.
- les phospholipides se lient également aux protéines par des liaisons polaires.

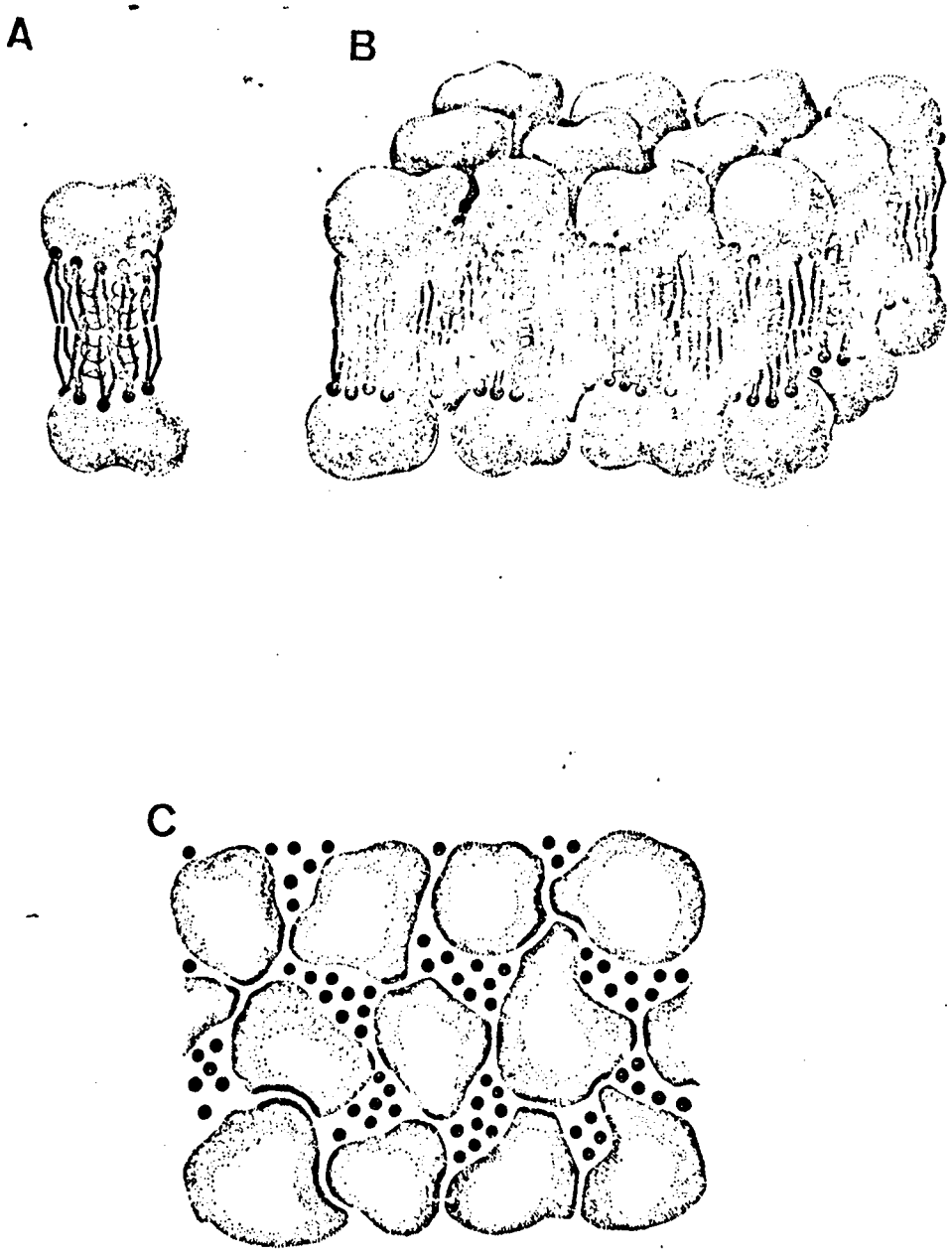


Figure 4

Structure de la membrane erythrocytaire
(d'après ZAHLER et WEIBEL, 1968)(44).

A : Sous-unité formée de deux régions hydrophiles reliées par une molécule cylindrique lipoprotéique (Interactions entre les hélices α et les phospholipides).

B : Agrégation des monoméres lipoprotéiques pour former une membrane.

C : Surface de la membrane montrant les lipides qui remplissent l'espace situé entre les sous-unités.

La membrane érythrocytaire comprend 46 à 55 p. 100 de protéines, 34 à 45 p. 100 de lipides et 10 p. 100 de glucides.

Il faut remarquer que tous les glucides membranaires sont conjugués soit à des lipides pour former des glycolipides, ou à des protéines pour former des glycoprotéines. Il semble que pour la majorité, ces glycannes soient dirigés vers l'extérieur de la membrane.

C - LES GLYCOPROTEINES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN

I - STRUCTURE ET PROPRIETES

Les substances à activité de groupe sanguin des liquides de sécrétion sont des glycoprotéines appelées parfois mucoïdes dont les propriétés sont les suivantes :

- solubilité en milieu aqueux,
- leur masse moléculaire est élevée :
  3×10^5 à 1×10^6 daltons
- la partie glucidique est importante. De telles substances contiennent généralement 85 p. 100 de sucres et 15 p. 100 d'acides aminés,
- les glycannes sont constitués par les monosaccharides suivants : D-Galactose, L-Fucose, N-Acétyl-D-Glucosamine, N-Acétyl-D-Galactosamine, Acide N-AcétylNeuraminique,
- la partie peptidique est composée de 15 acides aminés différents : 4 d'entre eux : la thréonine, la sérine, la proline, l'alanine forment les 2/3 des amino acides présents (PUSZTAI and MORGAN, 1961)(45). Les acides aminés soufrés sont absents,
- le point d'attache entre le glycanne et la protéine est de type O-glycosidique entre la sérine et la thréonine de la chaîne peptidique et la N-acétyl-galactosamine du glycanne,
- deux groupes peuvent être distingués qui diffèrent par leur localisation et leur composition, ce sont les glycoprotéines érythrocytaires et les glycoprotéines de sécrétion. Le tableau IV (p. 17) compare ces deux types de glycoprotéines.

TABLEAU IV

COPROTEINES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN : CLASSIFICATION ET COMPARAISON

(D'APRES PROKOP ET UHLENBRUCK, 1969)(46).

ques communes cularités	Glycoprotéines ABH et Lewis	Glycoprotéines des érythrocytes
	15 à 20 p. 100 surtout : Thréonine, sérine et proline	20 à 40 p. 100 surtout : thréonine, sérine et acide glutamique
he entre le a protéine	Alcali-labile (O-glycosidique avec la thréonine, la sérine) ou alcali stable (N-glycosidique avec l'asparagine)	
le glucides en Osamines	4 composants constants (Gal, Fuc et 2 hexosamines) 50 p. 100 25 - 30 p. 100	Variable suivant les espèces (Gal, Glc, Man, Fuc, 2 hexosamines) 20 - 50 p. 100 5 - 20 p. 100 (variable)
nzymes protéo-	Fragmentation avec réduction de l'activité biologique	
l'azote ques spécia- laire	Environ 5 p. 100 Soluble dans l'eau et le phénol Environ 300 000 daltons Sécrétions	5 à 9 p. 100 Soluble dans l'eau et le phénol 300 000 daltons ou plus Membranes érythrocytaires
Myxovirus al groupes	Peu ou pas Souvent du fucose Plusieurs spécificités par molécule	Peu ou pas Souvent de l'acide sialique Plusieurs spécificités par molécule

- quand elles sont isolées d'un liquide de secrétion d'un seul individu, on obtient une famille de glycoprotéines à activité de groupe sanguin, dont la taille et la composition peuvent être différentes mais possédant toujours le même déterminant antigénique.
- par coupure chimique, ces glycoprotéines donnent des mucopeptides possédant plus d'un groupement glycannique par chaîne peptidique.

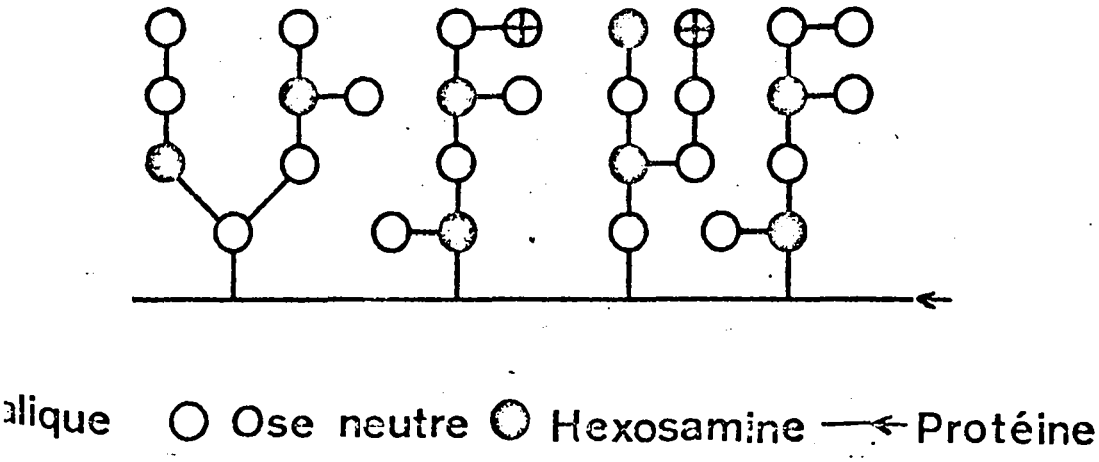
La structure de ces glycoprotéines peut être schématisée par la figure 5 (p. 19) d'après PROKOP et ULHENBRUCK, 1969 (48). D'après ce schéma, un grand nombre de chaînes glycanniques relativement courtes sont attachées par liaison covalente et à intervalles, réguliers ou non, sur une chaîne peptidique. La densité des groupements oligosaccharidiques, d'environ 300 glycannes de 7 à 8 monosaccharides par chaîne peptidique, empêche l'action des protéases, qui ne peuvent que changer la conformation de la chaîne peptidique, diminuant ainsi l'activité immunologique (JAKOWSKA, 1963 (49). La protéine apparaît ainsi, avoir un rôle de support de l'activité immunologique et assurer la distribution et l'orientation des chaînes oligosaccharidiques.

II - LOCALISATION DES GLYCOPROTEINES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN DANS LES MEMBRANES CELLULAIRES

Les érythrocytes possèdent des glycolipides à activité A, B, H et d'autres antigènes, de nature glycoprotéinique (SEGREST et al., 1973) (50), POULIK et BRON, 1969 (51). Ces derniers sont présents sur les hématies des individus secréteurs pour les substances de groupe sanguin A, B, H et à la surface des hématies de tous les individus pour le groupe M, N, S.

Les glycoproteines représentent environ 10 p. 100 des protéines totales de la membrane érythrocytaire; WINZLER, 1970 (52). Les groupements glucidiques sont des déterminants antigéniques, MORTON, 1962 (53), COOK et EYLAR, 1965 (54) ; des récepteurs de virus et de phytoagglutinines

A



B

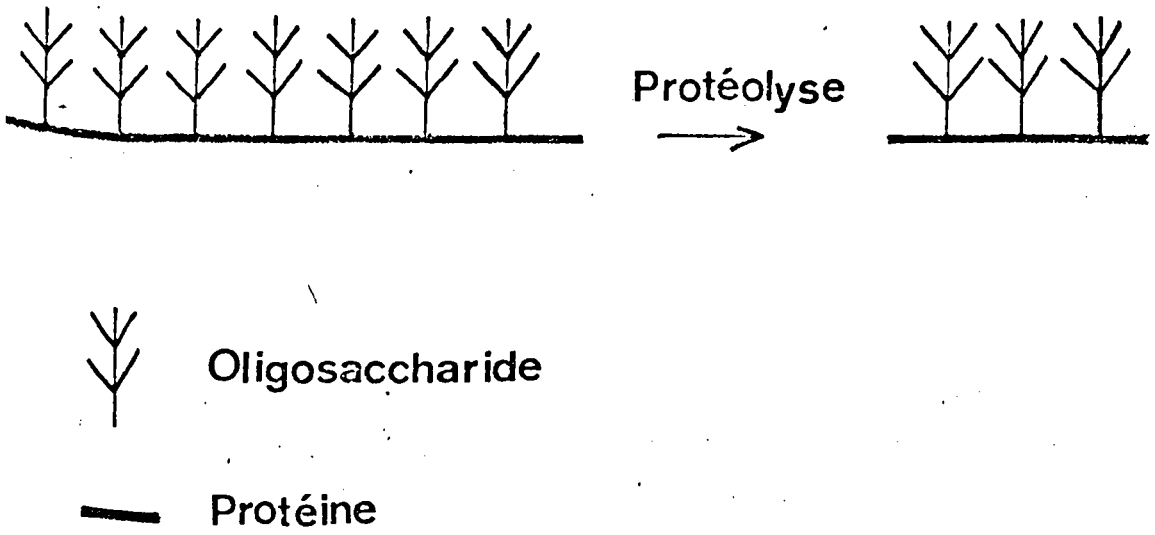


Figure 5

Structure des glycoprotéines (d'après PROKOP et UHLENBRUCK, 1969)(47).

A : Structure schématique des glycoprotéines

B : Action d'un agent protéolytique conduisant à des glycopeptides.

SPRINGER et al., 1966 (55). Nous étudierons la structure et l'intégration dans la membrane de la seule glycoprotéine membranaire connue à l'heure actuelle : la glycophorine ou glycoprotéine majeure de l' érythrocyte.

La plupart des glycannes dissociés de la membrane de l'érythrocyte font partie d'une sialoglycoprotéine. Cette sialoglycoprotéine majeure ou glycophorine a été isolée et étudiée par MARCHESI et al., 1972 (56).Elle possède une activité de groupe sanguin A, B, M et N, POULIK et LAUF, 1965 (57).

Les chaînes glycanniques représentent 60 % de la masse moléculaire de la molécule qui est de 55 000 daltons, elles sont situées au niveau de la moitié N-terminale de la protéine. Cette protéine comporte 200 amino-acides et sa structure est représentée par la figure 6 A (p. 21). Les résultats de l'utilisation d'anticorps marqués ont permis de localiser la glycoprotéine majeure de l'érythrocyte dans la membrane, ce qui est représenté par la figure 6 B (p. 21).

La région N-terminale de la molécule est déployée à l'extérieur de la cellule. Cette partie porte les déterminants antigéniques de groupe sanguin M, N, A ou B.

La région hydrophobe de la protéine pénétre à l'intérieur de la membrane, la molécule est"ancrée", maintenue par des interactions hydrophobes lipides-protéines. La partie C-terminale est exposée vers le côté intracellulaire.

A l'heure actuelle, les glycolipides occupent une place majeure en tant qu'antigènes membranaires ; le développement de la recherche sur les membranes biologiques tend à donner un rôle de plus en plus important aux glycoprotéines pour ce rôle antigénique au niveau de la membrane plasmique.

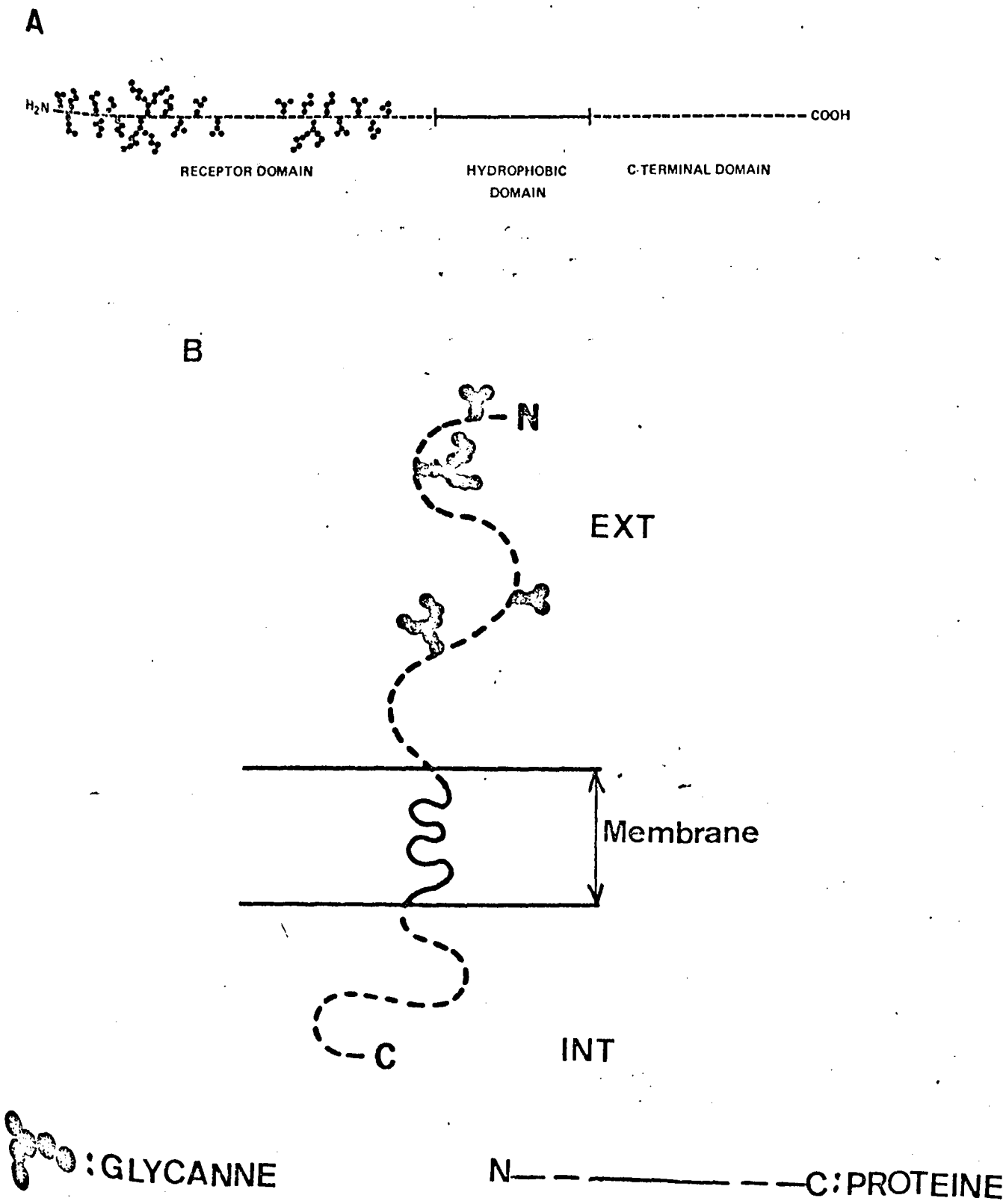


Figure 6

Topographie moléculaire de la sialoglycoprotéine majeure de l'érythrocyte (A) et sa localisation au niveau de la membrane (B) (d'après SEGREST et al., 1973) (58).

EXT : Milieu extracellulaire

INT : Milieu intracellulaire.

D - LES OLIGOSACCHARIDES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN DES MILIEUX DE SECRETION

MONTREUIL, 1957 (59) et KUHN, 1958 (60) ont isolé du lait de femme des oligosaccharides dont MORGAN et WATKINS,(1962) (60*), démontrèrent qu'ils possédaient des activités de groupes sanguins. DATE en 1958 (61) montrait la présence de ces mêmes composés dans l'urine de femmes enceintes. En 1964PRICE-EVANS et al.(62)et LUNDBLAD en 1966 (63) affirmèrent que l'excrétion de fucose lié dans les oligosaccharides de l'urine était plus élevée chez les individus sécréteurs de substances A, B, H que chez les individus non sécréteurs. Les liquides de secrétion comme l'urine et le lait renferment ainsi des oligosaccharides de faible poids moléculaire doués d'activité de groupe sanguin. Ils sont constitués de D-Galactose, D-Glucose, L-Fucose, N-Acétyl-D-Galactosamine, N-Acétyl-D-Glucosamine.

L'urine humaine renferme 150 à 300 mg d'oligosaccharides par diurèse de 24 h représentés par une mélange complexe de plus de 50 constituants. 5 à 20 mg de ce mélange sont formés d'oligosaccharides dont la présence est fonction du groupe sanguin des individus. LUNDBLAD, 1966 (64) 1967 (65) et 1968 (66) a montré qu'ils n'existaient que dans les urines de sujets sécréteurs et a décrit la structure de certains d'entre eux comme le montre le tableau V (p.23).

Les oligosaccharides majeurs de l'urine d'un sujet O sécréteur identifié par LUNDBLAD s'est révélé être le difucolactose, déjà identifié par KUHN, 1958 (68) dans le lait de femme.

Toutefois, STRECKER et MONTREUIL, 1973 (69) 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 plus élevée.

TABLEAU V

STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES ISOLES DE L'URINE HUMAINE PAR LUNDBLAD, 1968 (67)

Phénotype	Structures
A, Sécréteur	α-D-GalNAc (1 → 3) β-D-Gal (1 → 4) α-L-Fuc (1 → 2) D-Glc α-L-Fuc (1 → 3)
B, Sécréteur	α-D-Gal (1 → 3) β-D-Gal (1 → 4) α-L-Fuc (1 → 2) D-Glc α-L-Fuc (1 → 3)
O, Sécréteur	α-L-Fuc (1 → 2) – β-D-Gal (1 → 4) D-Glc α-L-Fuc (1 → 3)

EXTRACTION DES ANTIGENES DE GROUPE SANGUIN

Avant d'être en mesure d'isoler les antigènes de membrane érythrocytaire, les travaux ont porté sur l'étude des glycoprotéines de sécrétion, d'une part, et sur l'isolement à partir de milieux biologiques d'oligosaccharides à activité de groupe sanguin d'autre part.

A - EXTRACTION A PARTIR DES LIQUIDES BIOLOGIQUES

I - PRINCIPE

Les oligosaccharides à spécificité de groupe sanguin isolés jusqu'à présent des milieux biologiques sont de la taille du di au déca saccharide. Leur préparation nécessite généralement la chromatographie de tamisage moléculaire (Séphadex G 15) ou sur charbon. Leur purification associe l'électrophorèse et la chromatographie préparative sur papier.

II - PREPARATION DES OLIGOSACCHARIDES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN DU LAIT DE FEMME

Les structures sérologiquement actives du lait de femme peuvent être isolées à partir d'une fraction enrichie en oligosaccharides et polysaccharides par précipitation des protéides par le sulfate d'ammonium. L'électrophorèse à bas voltage et la chromatographie préparative sur papier ont permis à MONTREUIL, 1957 (70) et 1960 (71) de distinguer 3 classes principales d'oligosaccharides selon leur composition en monosaccharides, KUHN, 1958 (72) en utilisant la chromatographie sur colonne de charbon fait également état de cette classification.

On distingue :

- les oligosaccharides neutres, non azotés,
- les oligosaccharides neutres, azotés (à N-Acétyl-Glucosamine),

- les oligosaccharides acides contenant de l'acide N-Acétyl-Neuraminique.

Dans le tableau VI (p.26) sont indiquées la structure et l'activité des oligosaccharides neutres du lait de femme à activité de groupe sanguin déterminées par MONTREUIL, 1957 (75) et par KUHN, 1958 (76).

Nous mentionnons les différents squelettes des oligosaccharides et des polyosides dans le tableau VII (p. 27) d'après GRIMMONPREZ, 1972 (80) et KOBATA et GINSBURG, 1972 (81) qui séparent ces substances du lait de femme par chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de Séphadex G 25. Sur ces squelettes viennent se fixer les différents déterminants de groupe sanguin, le fucose qui donne les activités H, Le a, Le b ou l'acide N-Acétyl-Neuraminique qui confère les activités M, N, P, Rh : KUHN et GAUHE, 1965 (82). Ces structures de base ont une activité dite "précurseur" de groupe sanguin. Deux oligosaccharides de haute masse moléculaire ont été étudiés par DELAUTRE, 1972 (83). Leur structure est indiquée dans la partie B du tableau VII (p.27).

D'une manière générale, les osides du lait sont, en dehors du lactose, des produits de substitution du lacto-N-tétraose ou du lacto-N-neotétraose, du lacto-N-hexaose, du lacto-N-néohexaose par des résidus de fucose ou par de l'acide N-Acétyl-Neuraminique. Des produits de polymérisation de ces mêmes oligosaccharides sont entrevus : MALPRESS et HYTTEN, 1958 (84) et NICOLAI et ZILLIKEN, 1969 (85).

Les principales méthodes d'isolement de ces oligosaccharides sont résumées dans le tableau VIII (p.28). Les études jusqu'à présent ont porté sur un mélange de lait de femme. Une étude en fonction du groupe sanguin du donneur est en cours : GINSBURG et al., 1971 (89).

III - ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN DES URINES

Le tamisage moléculaire de l'urine humaine filtrée et dialysée (Sephadex G 25) a permis à LUNDBLAD, 1966 (90) de repérer des fractions riches en fucose et caractéristiques du groupe sanguin de l'individu. Ces fractions sont soumises à l'électrophorése de zone et les oligosaccharides sont isolés par chromatographie préparative sur papier.

TABLEAU VI

STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES ISOLES DU LAIT DE FEMME ET DOUES D'ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN D'APRES MONTREUIL, 1957 (73) et KUHN, 1958 (74).

A - Oligosaccharides neutres non azotés		
Structure	Nom	Activité
α-L-Fuc (1 → 2) — β-D-Gal (1 → 4) \ D-Glc / α-L-Fuc (1 → 3)	Lacto-difucotétraose	Le b
α-L-Fuc (1 → 2) — β-D-Gal (1 → 4) — D-Glc	2'-Fucosido-lactose	H
β-D-Gal (1 → 4) \ β-D-Gal (1 → 4) — D-Glc / α-L-Fuc (1 → 2)	[2'-Fucosido-3-galactosido] lactose	B

B - Oligosaccharides neutres azotés		
Structure	Nom	Activité
Fuc (1 → 2) — β-D-Gal (1 → 3) — β-D-GlcNAc (1 → 3) — β-D-Gal (1 → 4) — D-Glc	Lacto-N-fucopentaose I	H
β-D-Gal (1 → 3) \ β-D-GlcNAc (1 → 3) — β-D-Gal (1 → 4) — D-Glc / α-L-Fuc (1 → 4)	Lacto-N-fucopentaose II	Le a
Fuc (1 → 2) — β-D-Gal (1 → 3) \ β-D-GlcNAc (1 → 3) — β-D-Gal (1 → 4) — D-Glc / α-L-Fuc (1 → 4)	Lacto-N-difuco-hexaose I	Le b
β-D-Gal (1 → 3) \ β-D-GlcNAc (1 → 3) — β-D-Gal (1 → 4) \ D-Glc / α-L-Fuc (1 → 4) / α-L-Fuc (1 → 3)	Lacto-N-difuco-hexaose II	Le a

TABLEAU VII

STRUCTURE DE BASE DES OLIGOSACCHARIDES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN DU LAIT DE FEMME (D'APRES KUHN(*), 1958 (77), KOBATA et GINSBURG(**), 1972 (78) et DELAUTRE(***), 1972)(79)

(*) β-D-Gal (1→3) — β-D-GlcNAc (1→3) — β-D-Gal (1→4) — D-Glc Lacto-N-tétraose

(*) β-D-Gal (1→4) — β-D-GlcNAc (1→3) — β-D-Gal (1→4) — D-Glc Lacto-N-néotétraose

β-D-Gal (1→4) — β-D-GlcNAc (1→6) \
(*) β-D-Gal (1→4) — D-Glc Lacto-N-hexaose
β-D-Gal (1→3) — β-D-GlcNAc (1→3) /

β-D-Gal (1→4) — β-D-GlcNAc (1→6) \
(*) β-D-Gal (1→4) — D-Glc Lacto-N-néohexaose
β-D-Gal (1→4) — β-D-GlcNAc (1→3) /

α-L-Fuc (1→3) \
β-D-GlcNAc (1→6) \
(*) β-D-Gal (1→4) / β-D-Gal (1→4) — D-Glc
β-D-Gal (1→3) — β-D-GlcNAc (1→3) /

α-L-Fuc (1→3) \
(1→2) ? β-D-GlcNAc (1→6) \
(*) β-D-Gal (1→4) / β-D-Gal (1→4) — D-Glc
β-D-Gal (1→3) — β-D-GlcNAc (1→3) /

TABLEAU VIII

PRINCIPALES METHODES D'ISOLEMENT D'OLIGOSACCHARIDES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN A PARTIR DU LAIT.

rences	Principe	Résultats
hode e EUIL (86).	Chromatographie, électrophorèse sur papier d'une fraction débarrassée des protéides	Etude des oligosaccharides neutres et acides à partir d'un mélange de lait
hode e EN (87).	Chromatographie sur colonne de charbon-Célite	Etude des oligosaccharides neutres
hode e et al., (88).	Filtration sur gel de Sephadex G-25 d'un lait délipidé et filtré sur collodion	Etude des oligosaccharides en fonction du groupe sanguin du donneur (A, B, O, Lewis)

LUNDBLAD, 1967 (91), 1968 (92) a mis ainsi en évidence trois oligosaccharides spécifiques du groupe sanguin de l'individu et présents seulement dans les urines de sujets secréteurs. Ces structures sont indiquées dans le tableau V (p. 23). La distribution des fractions riches en fucose est actuellement étudiée en fonction de l'alimentation (alimentation normale, lactosurie ou saccharosurie provoquée): LUNDBLAD et al., 1973 (93). Les structures établies semblent très proches des résultats obtenus par STRECKER et MONTREUIL, 1973 (94). Ces derniers se sont penchés en outre sur les oligosaccharides de masse moléculaire plus élevée. L'application de la méthode à des urines de mélituries diverses : diabète, galactosurie et lactosurie ont permis de mettre en évidence une oligosaccharidurie systématiquement associée à ces mélituries STRECKER et al., 1973 (95). L'ensemble des résultats obtenus peut se résumer ainsi :

- diabète : les urines de sujets hyperglycémiques renferment des quantités plus élevée (5 à 10 fois le taux normal) d'oligosaccharides qui existent mais en faible quantité dans les urines de sujets sains (oligos: IV_H, V_A, VII_{Aa}, et V_B). Au contraire, le taux de ces composés est normal dans le cas d'un diabète rénal La structure des oligosaccharides excrétés dans les urines de diabétiques est liée au phénotype A, B, H et Le de l'individu.

- galactosurie congénitale du nourrisson et galactosurie provoquée : les galactosuries spontanées ou provoquées s'accompagnent de l'apparition de quantités élevées de nouveaux oligosaccharides dont les structures sont précisées dans le tableau IX (p. 30) :

oligosaccharides	II_H et VI_H	dans le cas de	sujets			O, Le^b, Se
"	III_B et VII_B	"	"	"		B, Le^b, Se
"	III_A et VII_A	"	"	"		A, Le^b, Se

L'oligosaccharide VII_A n'existe pas chez les sujets A Le (a^- b^-) Se. Cette oligosaccharidosurie n'est pas observée chez les sujets non secréteurs. De telles structures sont absentes ou existent à l'état de traces chez les sujets normaux.

- lactosurie provoquée : l'épreuve de lactosurie provoquée réalisée chez un sujet de groupe A, Le^b, Se, amène une augmentation considérable du taux des oligosaccharides III_A V_A VII_A : tableau (X p. 31).

II_H α-L-Fuc (1 → 2) — D-Gal	H
III_A α-D-GalNAc (1 → 3) \ D-Gal; α-L-Fuc (1 → 2) / D-Gal	B
III_B α-D-GalNAc (1 → 3) \ D-Gal; α-L-Fuc (1 → 2) / D-Gal	A
IV_H α-L-Fuc (1 → 2) — β-D-Gal (1 → 4) \ D-Glc; α-L-Fuc (1 → 3) / D-Glc	H, Le b
V_A α-D-GalNAc (1 → 3) \ β-D-Gal (1 → 4) \ D-Glc; α-L-Fuc (1 → 2) / β-D-Gal; α-L-Fuc (1 → 3) / D-Glc	A, Le b
V_B α-D-Gal (1 → 3) \ β-D-Gal (1 → 4) \ D-Glc; α-L-Fuc (1 → 2) / β-D-Gal; α-L-Fuc (1 → 3) / D-Glc	B, Le b
VI_H α-L-Fuc (1 → 2) — β-D-Gal (1 → 3) \ β-D-GlcNAc (1 → 4) \ D-Gal; α-L-Fuc (1 → 4) / β-D-GlcNAc; α-L-Fuc (1 → 6) / D-Gal	H, Le b
VII_A α-D-GalNAc (1 → 3) \ β-D-Gal (1 → 3) \ β-D-GlcNAc (1 → 4) \ D-Gal; α-L-Fuc (1 → 2) / β-D-Gal; α-L-Fuc (1 → 4) / β-D-GlcNAc; α-L-Fuc (1 → 6) / D-Gal	A, Le b
VII_{Aa} α-D-GalNAc (1 → 3) \ β-D-Gal (1 → 3) \ β-D-GlcNAc (1 → 3) — β-D-Gal (1 → 4) — D-Glc; α-L-Fuc (1 → 2) / β-D-Gal; α-L-Fuc (1 → 4) / β-D-GlcNAc	A, Le b
VII_B α-D-Gal (1 → 3) \ β-D-Gal (1 → 3) \ β-D-GlcNAc (1 → 4) \ D-Gal; α-L-Fuc (1 → 2) / β-D-Gal; α-L-Fuc (1 → 4) / β-D-GlcNAc; α-L-Fuc (1 → 6) / D-Gal	B, Le b

VARIATION DU TAUX DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES (en mg par diurèse de 6 h) DE SUJETS DE GROUPE A, Le^b, SECRETEURS, AU COURS DE DIVERSES MELITURIES (D'APRES STRECKER et al., 1973)(97)

Origine de l'urine	Désignation des oligosaccharides			
	III_A	V_A	VII_A	VIII_{Aa}
Sujets sains (25 cas)	0 à 0,5	0,5 à 5	0	0,2 à 1
Diabète pancréatique (6 cas)	0 à 0,5	5 à 20	0	0,5 à 6
Diabète rénal (1 cas)	traces	0,5	0	0,5
Galactosurie (8 cas)	100 à 200	0,2 à 1	10 à 25	-
Lactosurie (1 cas)	80	40	0	5

Ainsi, en appliquant les procédés de LUNDBLAD, 1966 (98) et de STRECKER et al., 1971 (99) l'isolement d'oligosaccharides de l'urine humaine a permis de montrer que :

- la structure de nombreux oligosaccharides est directement liée au groupe sanguin de l'individu,

- dans le cas de mélituries ils possèdent en position réductrice terminale le glucide qui a induit l' oligosaccharidurie (glucose dans les cas de diabète et de lactosurie ; galactose dans le cas de galactosurie).

IV - ISOLEMENT DES GLYCOPROTEINES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN A PARTIR D'AUTRES LIQUIDES BIOLOGIQUES

Des substances de groupe sanguin solubles peuvent également être isolées sous forme de glycoprotéines dont les glycannes sont attachés O-glycosidiquement à la Sérine et à la Thréonine du squelette peptidique : ANDERSON et al., 1964 (100) et KABAT et al., 1965 (101). Un des modèles les plus utilisés est celui du liquide du kyste de l'ovaire. Les glycoprotéines sont extraites suivant la méthode de ROVIS et al., 1973 (102) par dialyse, désionisation et séparation sur Bio-Gel P-2. Des études ont été également entreprises sur la mucine gastrique humaine. Par réaction de β-élimination avec NaOH 0,2 N - 1 % $NaBH_4$ appliquée sur les glycoprotéines totales, ROVIS et al., 1973 (103) ont isolé des oligosaccharides à activité A, B, H, Le a et Le b, provenant d'un mégalosaccharide de 14 à 18 sucres: LLOYD et KABAT, 1968 (104).

B - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES ANTIGENES MEMBRANAIRES

Les glycolipides antigéniques et leurs homologues glycoprotéiniques sont présents en quantités infimes dans la membrane érythocytaire. Leur isolement en quantité suffisante pour une étude chimique nécessite un volume élevé de sang. Une seconde difficulté à laquelle les chercheurs se heurtent est celle de la séparation de ces glycolipides aux propriétés similaires.

Plusieurs méthodes ont été décrites, elles reposent sur les critères suivants :

- la technique doit être simple et rapide,
- les volumes des solutions sont minimum,
- les procédés d'évaporation et de centrifugation à vitesse élevée sont évités,
- l'extraction des antigènes doit être complète.

Ces différentes méthodes ne varient que légèrement sur les formes d'extraction et de séparation chromatographiques des glycolipides. Aujourd'hui, la plupart des chercheurs utilisent des membranes érythrocytaires (stroma) obtenues par exemple, par hémolyse des globules rouges. KOŚCIELAK et ZAKRZEWSKI, 1960 (105) extrayaient les antigènes des hématies lavées. Les difficultés encourues par le traitement des stromas contenant un fort pourcentage d'hémoglobine étaient ainsi évitées. Aujourd'hui, ces problèmes méthodologiques sont résolus.

La préparation comprend les quatre étapes suivantes :

- extraction àpartirdu stroma ou des globules rougesentiers,
- concentration des glycolipides par précipitation et cristallisation,
- purification et séparation par chromatographie sur colonne,
- fractionnement par réaction de précipitation avec des anticorps spécifiques.

Aucune méthode générale n'a été établie. Les procédés décrits jusqu'à présent sont les suivants :

1 - méthode de KLENK et LAUENSTEIN, 1952 (106),

2 - méthodes de YAMAKAWA et al., 1960 (107) et ANDO et YAMAKAWA, 1973 (108),

3 - méthodes de KOŚCIELAK et ZAKRZEWSKI, 1969 (109). Le procédé de ce type le plus utilisé est celui de GROCHOWSKA et KOŚCIELAK, 1967 (110).

4 - méthode de HAKOMORI et JEANLOZ, 1961 (111).

Nous décrirons les méthodes les plus utilisées, qui ont permis d'obtenir des glycolipides à activité de groupe sanguin dans un état de pureté satisfaisante.

I - METHODE DE ANDO ET YAMAKAWA (1973)

1 - Préparation des érythrocytes

Des globules rouges de groupe sanguin connu sont hémolysés par l'acide acétique 0,3 %, lavés, puis soumis à une déshydratation par l'acétone. 1 g de membranesérythrocytairesest obtenu à partir de 100 ml d'érythrocytes.

2 - Extraction des glycolipides à activité de groupe sanguin

La méthode est décrite à la figure 7 (p.35). Les glycolipides sont extraits par un mélangediéthyléther : méthanol (1 : 1), puis chloroforme : méthanol (1 : 1) et finalement chloroforme méthanol (1 : 9). Trois classes de glycolipides ayant des solubilités différentes sont ainsi obtenues : ME, MC, M.

3 - Purification des glycolipides

Les glycolipides sont séparés et purifiés par plusieurs chromatographies successives sur colonne de gel de silice, l'élution se faisant par des mélanges $CHCl_3$/MeOH en différentes proportions. La pureté des antigènes isolés est vérifiée par chromatographie en couche mince.

4 - Résultats

- La première fraction, fraction ME , est essentiellement constituée de céramides-oligohexosides neutres (di, tri, tétrahexosides).

- Le second extrait renferme des glycolipides neutres dont la chaîne glycannique est plus longue (4 à 5 résidus monosaccharidiques).
- Les fractions MU et ML sont composés d'antigènes de groupe sanguin acides (glycolipides à acide N-Acétyl-Neuraminique).

Calculé à partir de 100 ml d'érythrocytes de groupe A, le rendement de chacune de ces fractions et les antigènes isolés sont indiqués dans le tableau XI (p.36).

- L'étude immunochimique des antigènes isolés à partir de 100 ml d'un sang de groupe A a été effectuée. ANDO et YAMAKAWA, 1973 (113) ont ainsi isolé

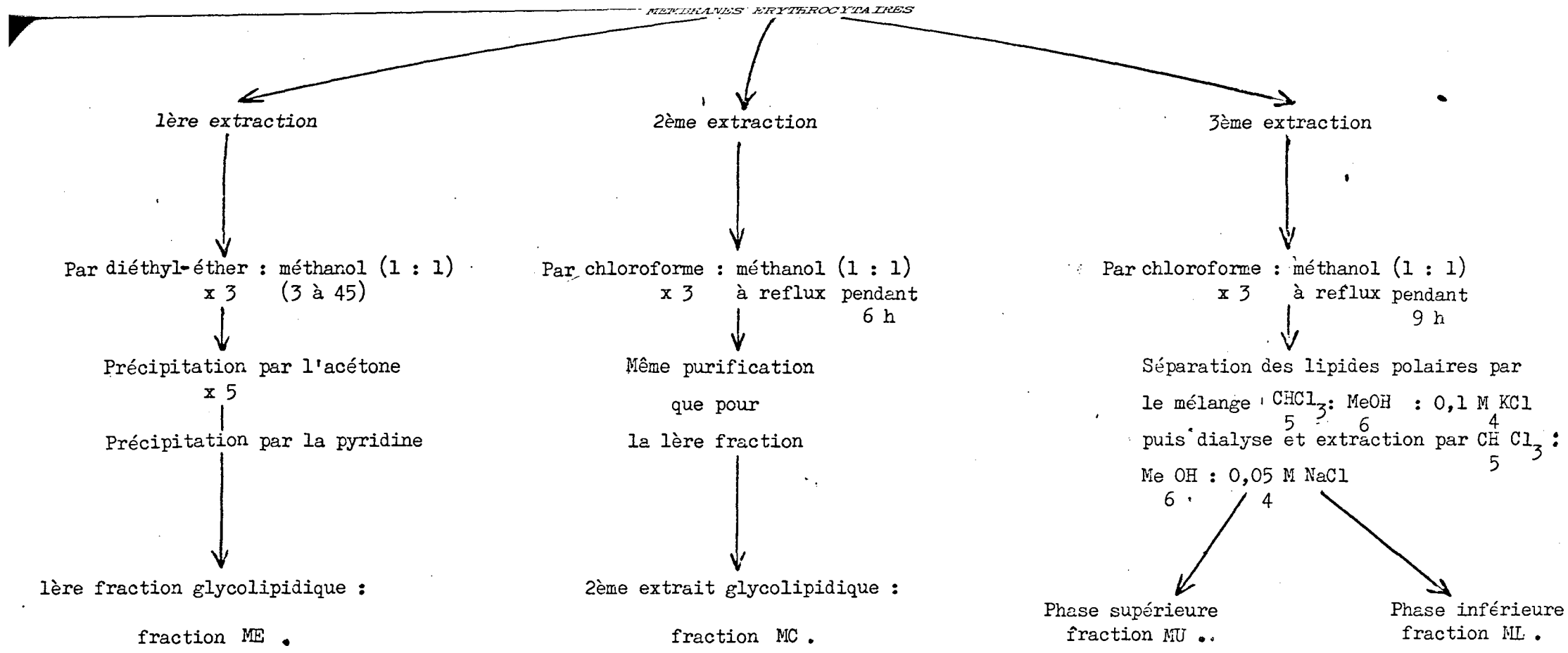


Figure 7

EXTRACTION DES GLYCOLIPIDES ERYTHROCYTAIRES PAR LA METHODE DE ANDO et YAMAKAWA (1973) (112).

Fractions	*Glycolipides isolés*	*Rendement en µg par g de stroma (100 ml de globules rouges)*	*Activité*	*Structures proposées*
Fraction ME.	C.D.H.	653		
	C.T.H.	283		
	céramide tétrasaccharidique I	9.500		$Gal \xrightarrow[1\ 3]{\beta} GlcNAc \xrightarrow[1\ 3]{\beta} Gal \xrightarrow[1\ 4]{\beta} Glc$ ↑ β 1,1 céramide
	céramide tétrasaccharidique II	175	A, B	
Fraction MC.	céramide hexasaccharidique	124	A	
Fraction M.	hématoside ou $G\ M_3$ (céramide trisaccharidique à NANA)	426		$NANA \xrightarrow[2\ 3]{} Gal \xrightarrow[1\ 4]{\beta} Glc \xrightarrow{\beta 1,1}$ céramide
	céramide pentasaccharidique à NANA			$NANA \xrightarrow[2\ 3]{} Gal \xrightarrow[1\ 4]{\beta} GlcNac \xrightarrow[1\ 3]{\beta} Gal \xrightarrow[1\ 4]{\beta} Glc$ ↑ β 1,1 céramide

un céramide hexasaccharidique dans un état de pureté jamais atteint. D'autres études ont été effectuées également à partir d'érythrocytes de groupe B. Certains glycolipides précurseurs de groupe sanguin sont présents dans les deux typesd'érythrocytes.

II - TECHNIQUE DE KOŚCIELAK (1973)

La technique de KOŚCIELAK et al., 1973 (116) permet l'isolement des antigènes glycolipides à activité A, B, H et I et de leurs homologues glycoprotéiniques.

1 - Isolement des antigènes glycolipidiques

La technique est résumée dans le tableau XII (p.38)

a) Isolement des stromas

Dans cette méthode, la membrane érythrocytaire est extraite par le mélange toluène/eau. Le rendement est de 20 à 25 g pour 100 ml d'érythrocytes.

b) Extraction des glycolipides

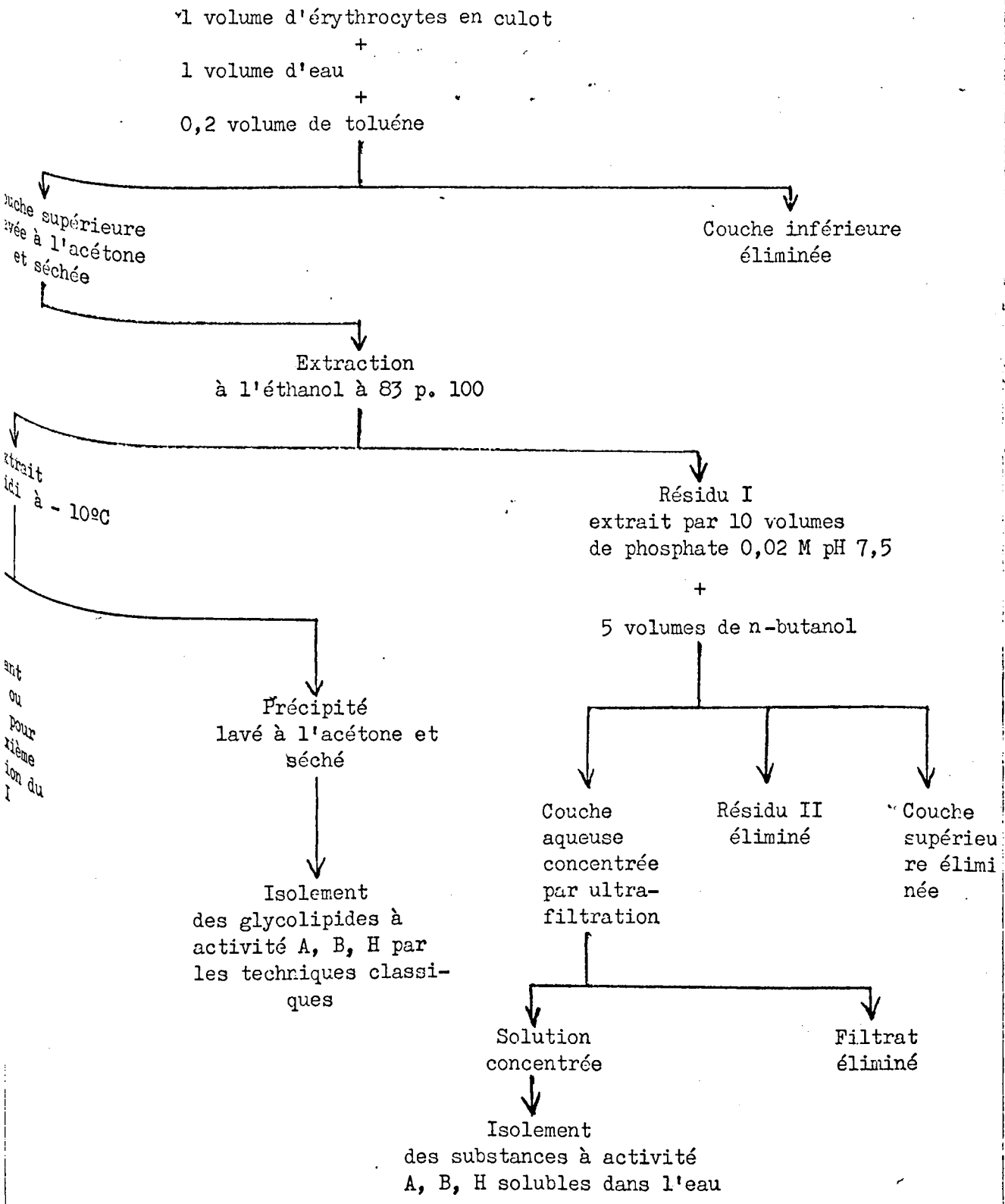
L'étape suivante est l'extraction des glycolipides par l'éthanol à 83 % suivie d'une précipitation à -10ºC. La technique est répétée plusieurs fois, l'extraction des glycolipides complexes est suivie par la teneur en acide sialique lié. Cette fraction brute de glycolipides est de l'ordre de quelques grammes pour 100 ml d'érythrocytes. Dans le tableau XIII (p.39), nous avons comparé la teneur en acide sialique lié aux glycolipides préparé suivant la méthode de KOSCIELAK, ou selon un procédé type YAMAKAWA ($CHCl_3$ - MeOH) 2 : 1 et 1 : 2 à chaud .

c) Séparation des glycolipides à activité de groupe sanguin

Les antigènes glycolipidiques sont séparés et purifiés par les techniques habituelles de chromatographie sur colonne et sur couche mince de gel de silice. Une séparation sur échangeur d'ions est parfois nécessaire.

TABLEAU XII

EMENT DES ANTIGENES ERYTHOCYTAIRES A, B, H PAR LA METHODE DE KOŚCIELAK et al., 1973 (117)



TENEUR EN ACIDE SIALIQUE LIE AUX GLYCOLIPIDES, PREPARES A PARTIR DE 100 G DE MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE PAR :

a - Ethanol à 83 %

b - $CHCl_3$ - MeOH (2 : 1 et 1 : 2) à chaud

selon KOSCIELAK et al., 1973 (118)

- a_1 : 1ère extraction
  a_2 : 2ème extraction
- b_1 : 1ère extraction
  b_2 : 2ème extraction

	a_1	a_2	$a_1 + a_2$	b_1	b_2	$b_1 + b_2$
acide sialique en mg pour 100 g de membranes	3,0	1,5	4,5	1,6	1,5	3,1

d) Résultats

Plusieurs glycolipides antigéniques de haut poids moléculaire ont été récemment caractérisés par KOŚCIELAK et al., 1973 (119). Ils contiennent soit des résidus de fucose, soit des résidus d'acide sialique. Les glycolipides à fucose possèdent une activité de groupe A B ou H suivant les érythrocytes traités. Le tableau XIV (p. 41) regroupe ces antigènes en 2 familles, I et II, contenant respectivement 1 ou 2 résidus de N-Acétyl-Glucosamine par molécule.

2 - Isolement des glycoprotéines à activité de groupe sanguin (GARDAS et KOŚCIELAK, 1973 (121)

a) Extraction

Les glycoprotéines solubles de groupe sanguin sont préparées à partir du résidu laissé après l'extraction des glycolipides et par le butanol froid, dans un tampon phosphate 0,02 M. Les protéines se rassemblent à l'interphase cependant que les derniers résidus glycolipidiques sont solubilisés dans le butanol. La phase aqueuse est ultrafiltrée et concentrée. Les substances solubles de groupes sanguins sont purifiés sur colonnes d'échangeurs d'ions (DEAE Séphadex saturée en butanol). La technique est résumée dans le tableau XI (p. 42).

b) Résultats

Les structures des glycoprotéines des membranes érythrocytaires à spécificité de groupe sanguin A, B, H sont étudiées par les techniques immunologiques et chimiques. Elles sont différentes des glycoprotéines solubles des milieux de sécrétion. La liaison glycanne-protéine est de type N-glycosidique entre l'asparagine et la chaîne glucidique. La protéine est associée à des phospholipides au niveau de la membrane. Une activité de groupe sanguin I est décelée également (KOŚCIELAK et al., 1973 (122).

FAMILLE I	H	5	α-L-Fuc (1 → 2) — β-D-Gal (1 → 4) — β-D-GlcNAc (1 → 3) — β-D-Gal (1 → 4) — D-Glc — Cer
	B	-	α-L-Fuc (1 → 2) \ β-D-Gal (1 → 4) — β-D-GlcNAc (1 → 3) — β-D-Gal (1 → 4) — D-Glc — Cer α-D-Gal (1 → 3) /
	-	85	LSnTC α-D-NANA (2 → 3) — β-D-Gal (1 → 4) — β-D-GlcNAc (1 → 3) — β-D-Gal (1 → 4) — D-Glc — Cer
FAMILLE II	H	9	α-L-Fuc (1 → 2)-β-D-Gal (1 → 4)-β-D-GlcNAc (1 → 3)-β-D-Gal (1 → 4)-β-D-GlcNAc (1 → 3)-β-D-Gal (1 → 4)-D-Glc- Cer
	B	-	α-L-Fuc (1 → 2) \ β-D-Gal (1 → 4)- β-D-GlcNAc (1 → 3) -β-D-Gal (1 → 4)-β-D-GlcNAc (1 → 3)-β-D-Gal (1 → 4)-D-Glc- Cer α-D-Gal (1 → 3) /
	-	3	α-D-NANA (2 → 3)-β-D-Gal (1 → 4)-β-D-GlcNAc (1 → 3)-β-D-Gal (1 → 4)-β-D-GlcNAc (1 → 3)-β-D-Gal (1 → 4)-D-Glc - Cer

TABLEAU XV

E DE PURIFICATION DES GLYCOPROTEINES A ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN A

(D'APRES GARDAS ET KOŚCIELAK, 1973)(123)

Fraction	Activité* unité x 10^4	Rendement (%)
euse après extraction au butanol	3,2	100
iltration	2,3	72
ée par H_2O d'une colonne de C.M. cellulose	2,1	65
ée par NaCl 0.1 M	0	0
ée par NaCl 0.1 M d'une colonne de DEAE - Séphadex	1,8	56
ée par NaCl 1 M	0,02	0,6
tographie sur DEAE-Séphadex lution par NaCla 1 M	1,5	47
r NaCl 1 M	0,26	8
action par le mélange $CHcl_3/H_2O/NH_4OH$	1,1	47

d'activité est définie comme étant la quantité de substance requise pour inhiber l'agglutination de 4 unités.

III - TECHNIQUE DE HAKOMORI ET JEANLOZ

1 - Extraction des glycolipides

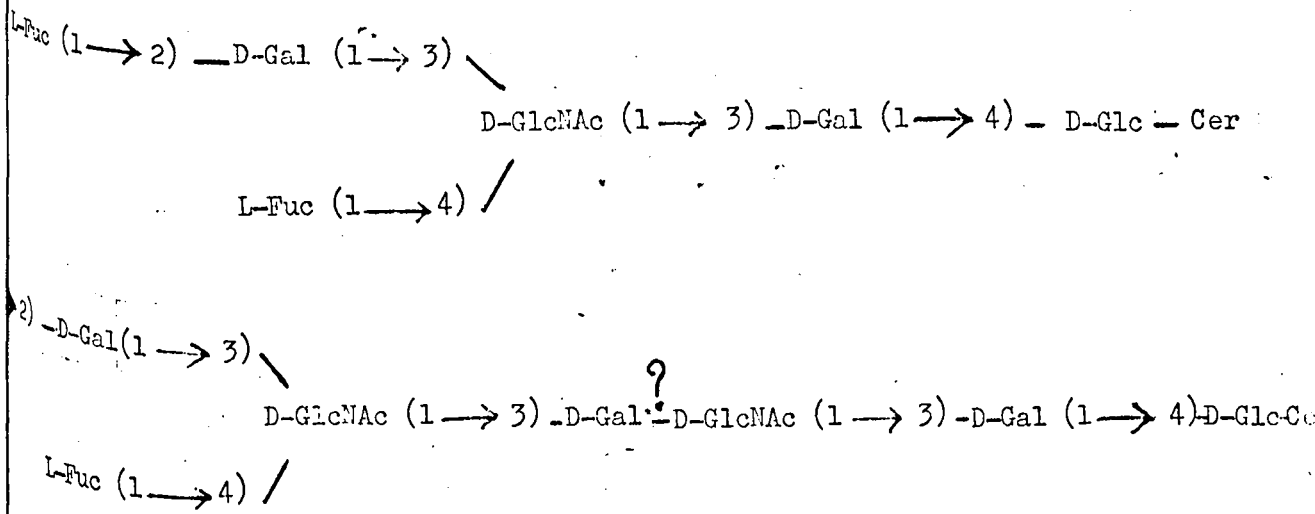
En partant soit d'érythrocytes humains de groupe A ou B HAKOMORI et JEANLOZ, 1961 (124) d'érythrocytes de groupe A_1 HAKOMORI et al., 1972 (125), ou de tissus cancéreux humains; HAKOMORI et JEANLOZ, 1964 (126) une extraction par les solvants organiques (acétone, hexane, mélanges de chloroforme et de méthanol) permet d'obtenir une fraction glycolipidique dont les composants sont séparés sur colonne de cellulose, DEAE-cellulose, chromatographie en couche mince sur silicagel H ou une colonne d'acide silicique

2 - Résultats

Ces méthodes ont permis à HAKOMORI et à ANDREWS, 1970 (127) d'isoler 2 glycolipides immunologiquement actifs d'un adénocarcinome coecal, et à HAKOMORI et al., 1972 (128) d'isoler 4 glycolipides à activité A (A^a, A^b, A^c, A^d). Ces structures sont représentées sur le tableau XVI A et B (p. 44).

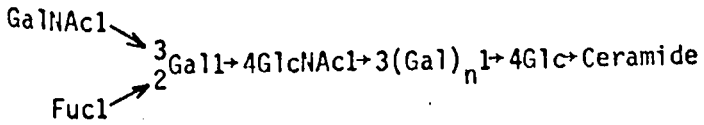
TABLEAU XVI

A - STRUCTURE DE DEUX GLYCOLIPIDES Le ^{b}ISOLES D'UN ADENOCARCINOME PAR HAKOMORI et ANDREWS, 1970 (129)

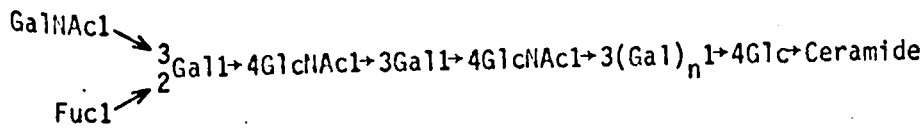


B - STRUCTURE DES VARIANTS GLYCOLIPIDIQUES A^a, A^b, A^c, A^d ISOLES PAR HAKOMORI et al., 1972 (130) A PARTIR D'ERYTHROCYTES DE GROUPE A_1

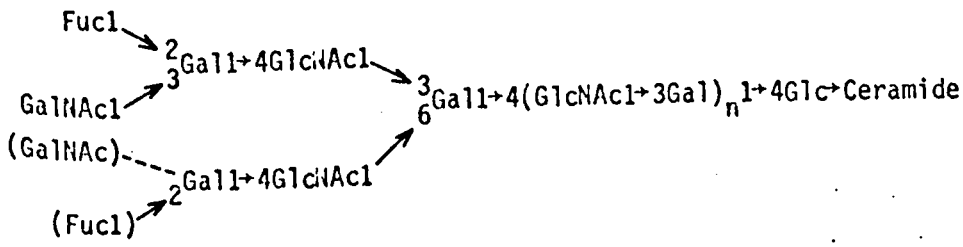
A^a



A^b



A^c



A^d

Similar to A^c but with excessive GlcNAc and with an additional branching structure.

BASES MOLECULAIRES DES ACTIVITES DE GROUPE SANGUIN

A - PRINCIPE

Les bases moléculaires des antigènes de groupe A, B, H et Le, longtemps restées obscures sont aujourd'hui connues. Les structures responsables des activités M et N ont été également établies. Seule la partie glucidique des antigènes glycolipides des membranes ou de leurs homologues glycoprotéiniques des milieux de secrétion joue un rôle dans la spécificité tandis que le polypeptide sert de support à cette action, donne à la molécule la taille nécessaire à son activité immunologique et maintient une certaine conformation spatiale.

Une analogie de structure entre les oligosaccharides des milieux de sécrétions tels l'urine et le lait et le résidu glucidique des glycolipides tissulaires ou des glycoprotéines solubles à activité de groupe sanguin, tels que les ont décrits KOSCIELAK et al., 1973 (131), HAKOMORI et al., 1972 (132) et LLOYD et KABAT, 1968 (133) est observée.

Seule l'extrémité terminale de la taille du di, tri ou tétrasaccharide constitue le site antigénique et le déterminant spécifique dans le processus d'agglutination par les anticorps correspondants.

B - STRUCTURES DES DETERMINANTS ANTIGENIQUES

I - METHODES

Ces structures sont établies en utilisant :

1) Des méthodes d'hémagglutination et de précipitation. La méthode de KABAT d'inhibition de la précipitation des antigènes solubles par les anticorps correspondants, permet de mesurer le taux d'inhibition et de comparer le pouvoir inhibiteur d'haptènes de structure voisine. Elle fournit des

renseignements sur l'existence de cette structure dans le site antigénique de la substance de groupe sanguin. Ces méthodes découlent de l'observation de LANDSTEINER qui, en 1920 notait qu'une substance dont la structure est proche et même identique au déterminant antigénique peut se combiner avec l'anticorps et ainsi inhiber de façon compétitive la réaction antigène-anticorps. Les anticorps utilisés sont des isoagglutinines humaines, des agglutinines d'origine animale ou végétale (lectines) (tableau XVII p. 47). Des sucres simples de structure connue peuvent inhiber l'agglutination des hématies par l'antisérum approprié : c'est la technique d'inhibition de l'hémagglutination. Ils peuvent également inhiber la précipitation des substances solubles de groupe sanguin par l'anticorps spécifique : c'est la méthode d'inhibition de la précipitation.

2) Des exoglycosidases qui peuvent détruire la spécificités sérologiques (voir tableau XVIII p. 48).

3) L'étude des produits de dégradation alcaline. L'étude des produits de dégradation ou d'hydrolyse ménagée de ces substances actives que l'on soumet aux méthodes d'hémagglutination et de précipitation permet d'apprécier les dimensions du site antigénique.

4) Les méthodes directes d'exploration de la structure des glucides (méthylation, oxydation periodique) complètent ou confirment cette étude. Leur application n'est possible que sur des antigénes érythrocytaires ou tissulaires isolés et purifiés, ou sur des substances solubles de groupe sanguin. Récemment, OHASHI et YAMAKAKAWA, 1973 (134)ont proposé l'ozonolyse et l'hydrolyse alcaline d'une préparation brute de lipides érythrocytaires en vue de l'obtention des oligosaccharides des glycosphingolipides. Les dérivés triméthysilylés des glycitols formés à partir des oligosaccharides sont analysés en chromatographie en phase gazeuse.

II - BASES MOLECULAIRES DES DETERMINANTS A,B,H,Le a, Le b

1) Déterminant antigénique Lewis a

L'utilisation d'oligosaccharides du lait a permis à MORGAN et WATKINS d'établir la constitution de la spécificité Le a.

Le Lacto-N-fucopentaose II (voir tableau VI p. 26) inhibe

TABLEAU XVII

SPECIFICITE DE QUELQUES PHYTOAGGLUTININES

Phytoagglutinines	Activité
Laburnum alpinum	H
Lotus tetragonolobus	H
Laburnum watereri	H
Cystisus argenteus	H
Cystisus sessilifolius	H
Cystisus lusitanicus	H
Cystisus purpureus	H
Ganista sagittalia	H
Ulex europaeus	H
Ulex gallü	H
Ulex nanus	H
Ononis spinosa	H
Laccaria laccata var. proxima	H
Dolichos biflorus belgaum	A
Vicia villosa	A
Vicia peregrina	A
Crotalaria aegyptiaca	A
Calpurnia aurea	A et B
Psylocyba spadicea	A
Vigna catjang	A
Sophira japanica	B
Achorium intybus	B
Coronilla varia	B
Hydrophorus hypothejus	B

TABLEAU XVIII

GLYCOSIDASES UTILISEES DANS LA DETERMINATION DES STRUCTURES DE SUBSTANCES ACTIVES DE GROUPES SANGUINS

Source enzymatique	Glycoproteine ou glycolipide de groupe sanguin utilisé pour l'essai	Monosaccharides libérés	Activité obtenue
is gigantea	Substance A du kyste de l'ovaire	- N-Acétyl-hexosamine - L-Fucose	
idium welchii	Substance H d'un kyste de l'ovaire	- L-Fucose - N-Acétyl-D-Glucosamine - D-Galactose	
us cereus	Substances H, Lea, Leb	- L-Fucose - D-Galactose	type XIV
cosidase de in de café	Substance B	- D-Galactose	H
onas foetus	Glycoprotéines A, B, H, et Lewis a	- D-Galactose - L-Fucose - N-Acétyl- hexosamine	type XIV
o cholerea	Substances M et N des globules rouges	- Acide N-Acétyl-neuraminique	
idium perfringens	Substance H	- L-Fucose	

fortement l'agglutination des hématies Le a par l'antisérum approprié. Le lacto-N-tétraose, quant à lui, est inactif. Le rôle d'un résidu de fucose est aussi démontré dans la spécificité Le a.

Le lacto-N-fucopentaose I est un faible inhibiteur. Ce fucose, spécificité de groupe Le a, est donc lié en $\alpha(1, 4)$ sur un résidu de GlcNAc.

Le lacto-N-difucohexaose II est un inhibiteur puissant, cependant que le lacto-N-difucohexaose I inhibe faiblement l'agglutination.

La structure $\mathrm{Gal} \xrightarrow{1\ \beta\ 3} \mathrm{GlcNAc}$ détermine donc la spécificité Le a.

$$\begin{array}{c} \mathrm{GlcNAc} \\ \uparrow \alpha\ \begin{smallmatrix}4\\1\end{smallmatrix} \\ \mathrm{Fuc} \end{array}$$

Cette activité Le a est détruite par des préparations enzymatiques de Clostridium welchii, Trichomonas foetus, Bacillus cereus et Clostridium perfringens, à spécificité Fuc $\alpha \xrightarrow{1} 4$. Une préparation purifiée partiellement de Trichomonos foetus coupe sélectivement le L-fucose lié en $\alpha \xrightarrow{1} 4$ de la GlcNAc du lacto-N-fucopentaose II. Elle est sans action sur le fucose lié en $\alpha \xrightarrow{1} 2$ du lacto-N-fucopentaose I. La preuve définitive de la spécificité a été établie grâce à l'utilisation du trisaccharide isolé par dégradation alcaline d'une substance Le a.

2) Déterminant antigénique Le b

Les fucoses du Lacto-N-difucohéxaose I et du lacto-N-difucotétraose inhibent faiblement l'agglutination des cellules Le b par un sérum humain anti Le b. Les composés à un seul fucose sont inactifs de même le lacto-N-difucohexaose II. Deux résidus de α L-fucose placés de façon adjacente constituent donc le site antigénique de la substance Le b.

L'isolement par hydrolyse acide ménagée d'une substance Le b de ce tétrasaccharide actif :

$$\begin{array}{ccc} \mathrm{Gal} & \xrightarrow{1\ \beta\ 3} & \mathrm{GlcNAc} \\ \uparrow \alpha\ \begin{smallmatrix}2\\1\end{smallmatrix} & & \uparrow \alpha\ \begin{smallmatrix}4\\1\end{smallmatrix} \\ \mathrm{Fuc} & & \mathrm{Fuc} \end{array}$$

présent également à l'extrémité non réductrice du lacto-N-difucohexaose I,

confirme la structure du déterminant Le b.

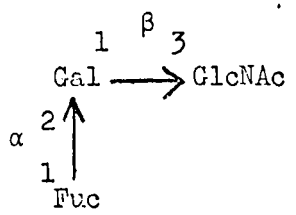
3) Déterminant antigénique H

Le sérum d'anguille et la phytoagglutinine de Lotus tetragonolobus agglutinent spécifiquement les hématies O. Cette réaction est inhibée par de faibles quantités de O-α-L fucosyl $\xrightarrow{1 \quad 2}$ Fucose.

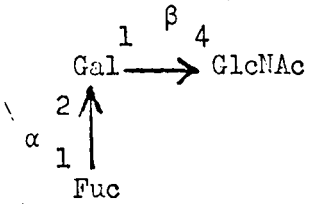
Mais le L-fucose est sans action sur les phytoagglutinines de Cytisus sessilifolius et Laburnum alpinum, le site antigénique de la substance H s'étend donc au delà de l'α-fucoside.

L'utilisation de certains oligosaccharides du lait comme inhibiteur de l'hémagglutination a permis de confirmer cette hypothèse.

Les trisaccharides :



et



sont les inhibiteurs les plus actifs de l'hémagglutination des hématies O.

En outre, une préparation enzymatique de Clostridium perfringens à spécificité fucosidase α (1,2) détruit l'activité H de ces oligosaccharides.

4) Déterminant antigénique A

Très tôt, le rôle de la N-acétyl-galactosamine dans la spécificité de groupe A a été reconnu par l'utilisation de l'agglutinine anti A de Vicia cracca qui est inhibée par ce sucre. La N-acétyl-galactosamine ne peut, par contre, inhiber l'action des isoagglutinines anti A humaines.

Cette inhibition est obtenue avec des disaccharides et mieux encore des trisaccharides provenant de l'hydrolyse partielle de substances solubles de groupe A.

Une α-N-acétyl-galactosaminidase du foie de porc (WEISSMANN et HINRICHSEN, 1969 (135)) libère la GalNAc de ces substances. L'activité A est détruite, parallèlement on note une augmentation de l'activité H (TUPPY et STAUDENBAUER, 1966 (136).

La structure des déterminants A est la suivante :

$$\text{GalNAc} \xrightarrow[1\ \ 3]{\alpha} \text{Gal} \xrightarrow[1\ \ 4]{\beta} \text{GlcNAc}$$

et

$$\text{GalNAc} \xrightarrow[1\ \ 3]{\alpha} \text{Gal} \xrightarrow[1\ \ 3]{\beta} \text{GlcNAc}$$

5) Déterminant antigénique B

Aucune phytoagglutinine strictement spécifique de la substance de groupe B n'a pu être à ce jour caractérisée. Le rôle du galactose dans la spécificité B a été démontré par la méthode de l'inhibition de la précipitation d'antigénes solubles B par un sérum humain anti B.

Une α-galactosidase extraite de la graine de café libère le galactose en position α. L'activité B est détruite et un accroissement de la spécificité H est observée (ZARNITZ et KABAT, 1960 (137) WATKINS et al., 1962 (138)

La structure des déterminants B est la suivante :

$$\text{Gal} \xrightarrow[1\ \ 3]{\alpha} \text{Gal} \xrightarrow[1\ \ 4]{\beta} \text{GlcNAc}$$

et

$$\text{Gal} \xrightarrow[1\ \ 3]{\alpha} \text{Gal} \xrightarrow[1\ \ 3]{\beta} \text{GlcNAc}$$

Nous avons rassemblé dans le tableau XIX (p. 52), les structures immunologiquement actives des polysaccharides de groupe sanguin. Les enzymes qui ont permis d'établir ces spécificités sont des exoglycosidases. En soumettant à la dégradation séquentielle et enzymatique une glycoprotéine spécifique isolée d'un donneur A ou B (Le a-, b+), une interprétation des structures chimiques qui accompagnent les changements sérologiques est obtenue tableau XX (p. 53) d'après WATKINS et al., 1962 (139).

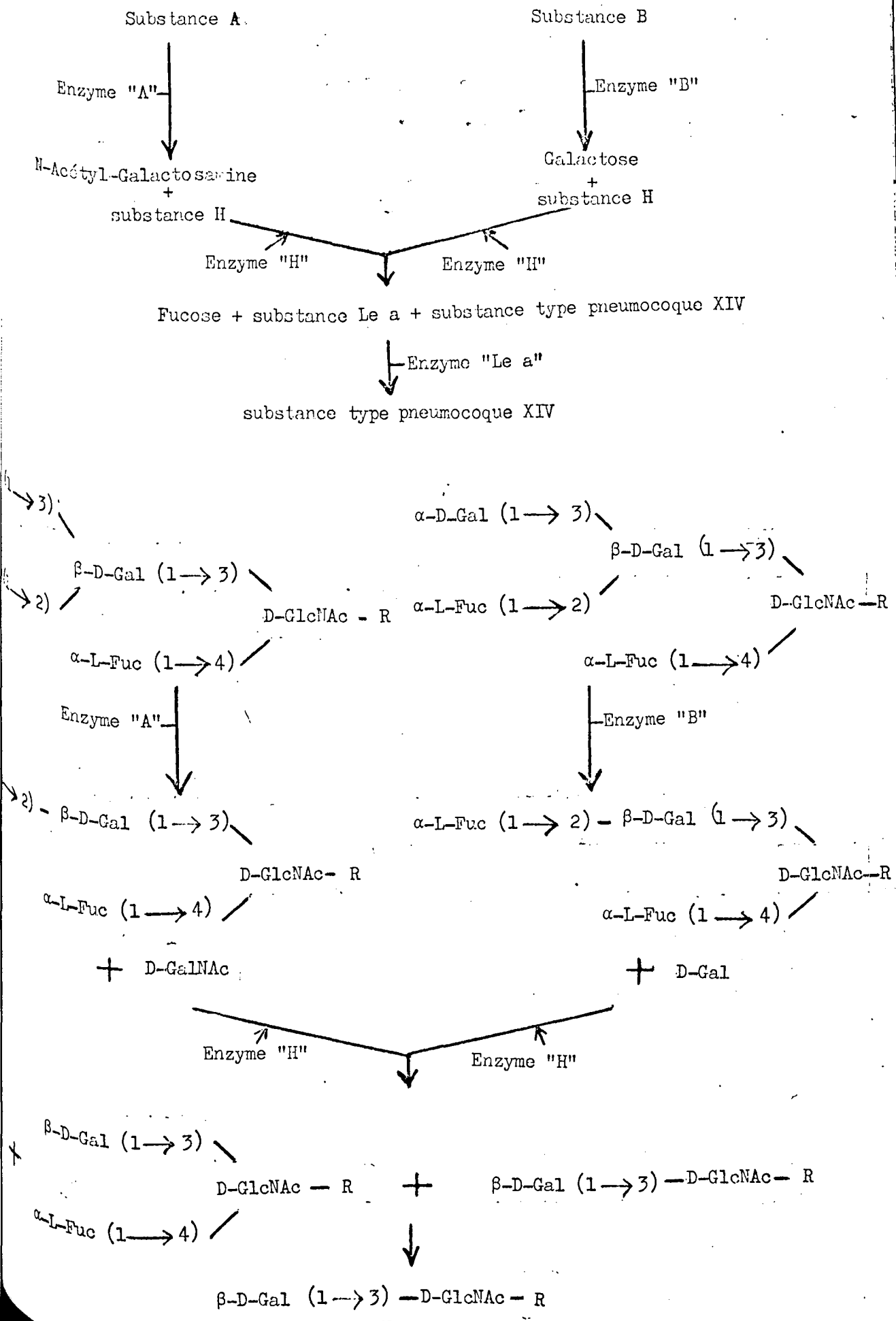
TABLEAU XIX

ATIF DES STRUCTURES IMMUNOLOGIQUEMENT ACTIVES DES POLYSACCHARIDES DES GROUPES SANGUINS

STRUCTURES	ACTIVITE				
	A	B	H	Le a	Le b
GalNAc (1 → 3) — β-D-Gal (1 → 3) — D-GlcNAc type I	++				
GalNAc (1 → 3) — β-D-Gal (1 → 4) — D-GlcNAc — R type 2	++				
GalNAc (1 → 3) ⟍ β-D-Gal (1 → 4) — D-GlcNAc — R L-Fuc (1 → 2) ⟋	+++				
GalNAc (1 → 3) ⟍ β-D-Gal (1 → 4) ⟍ L-Fuc (1 → 2) ⟋ D-GlcNAc — R α-L-Fuc (1 → 3) ⟋	+				
Fuc (1 → 2) — β-D-Gal (1 → 4) — D-GlcNAc — R	-				
Gal (1 → 3) — β-D-Gal (1 → 3) — D-GlcNAc type I		++			
Gal (1 → 3) — β-D-Gal (1 → 4) — D-GlcNAc — R type 2		++			
Gal (1 → 3) ⟍ β-D-Gal (1 → 4) — D-GlcNAc — R Fuc (1 → 2) ⟋		+++			
Gal (1 → 3) ⟍ β-D-Gal (1 → 4) ⟍ Fuc (1 → 2) ⟋ D-GlcNAc — R α-L-Fuc (1 → 3) ⟋		+			
Fuc (1 → 2) — β-D-Gal (1 → 4) — D-GlcNAc — R		-			
Fuc (1 → 2) — β-D-Gal (1 → 4) — D-GlcNAc — R			++	-	-
Fuc (1 → 2) — β-D-Gal (1 → 4) ⟍ D-GlcNAc — R α-L-Fuc (1 → 3) ⟋			±	-	-
Gal (1 → 3) ⟍ D-GlcNAc Fuc (1 → 4) ⟋				++	-
Fuc (1 → 2) — β-D-Gal (1 → 3) ⟍ D-GlcNAc α-L-Fuc (1 → 4) ⟋				±	++

TABLEAU XX

ITES SEROLOGIQUES ET STRUCTURES CHIMIQUES REVELEES PAR LA DEGRADATION ENZYMATIQUE ETELLE DES SUBSTANCES A ET B DE GROUPE SANGUIN (D'APRES WATKINS et al., 1962)(140)



C - STRUCTURES COMPLETES DES ANTIGENES DE GROUPE SANGUIN

I - PRINCIPE

Les méthodes indirectes de l'immunologie ainsi que la dégradation enzymatique permettent de préciser les bases moléculaires des déterminants de groupe sanguin. Grâce à l'utilisation des méthodes chimiques d'hydrolyse ménagées des substances elles-mêmes, les structures antigéniques complètes pourront être envisagées.

Dans le tableau XXI (p. 55) nous avons rassemblé les oligosaccharides isolés par hydrolyses partielles, acide et alcaline, d'une substance à activité A, extraite en abondance du liquide du kyste de l'ovaire.

En accord avec les précédentes observations de KABAT et LESKOWITZ, 1955 (141), le disaccharide (5) correspond à la structure immunologiquement active de la substance A. La méthode d'inhibition de l'hémagglutination confirme que le site antigénique s'étend au delà du disaccharide, les trisaccharides (6) et (7) sont plus actifs que le disaccharide (5). Les fragments ne possèdent aucune activité sérologique. Les mêmes méthodes appliquées à une substance B, H ou Le a, Le b fournissent des oligosaccharides identiques provenant donc de l'intérieur de la chaîne glycannique, commun à toutes les substances actives.

II - RESULTATS

Selon LLOYD et KABAT, 1968 (143) les substances solubles de groupe A B H, ont une structure générale qui est donnée dans le tableau XXII (p. 56). Récemment, ROVIS et al., 1973 (144) et ROVIS et al. 1973 (145) en traitant par dégradation alcaline en milieu réducteur deux glycoprotéines du kyste de l'ovaire : N-1 (d'activité Lewis a) et JS (d'activité H, et Lewis b) ont établi la structure de 19 d'oligosaccha-

COMPOSITION ET ACTIVITE SEROLOGIQUE D'UNITES OLIGOSACCHARIDIQUES OBTENUES A PARTIR DE SUBSTANCES DE GROUPE SANGUIN HUMAIN A D'APRES MORGAN et al., 1964 (142)

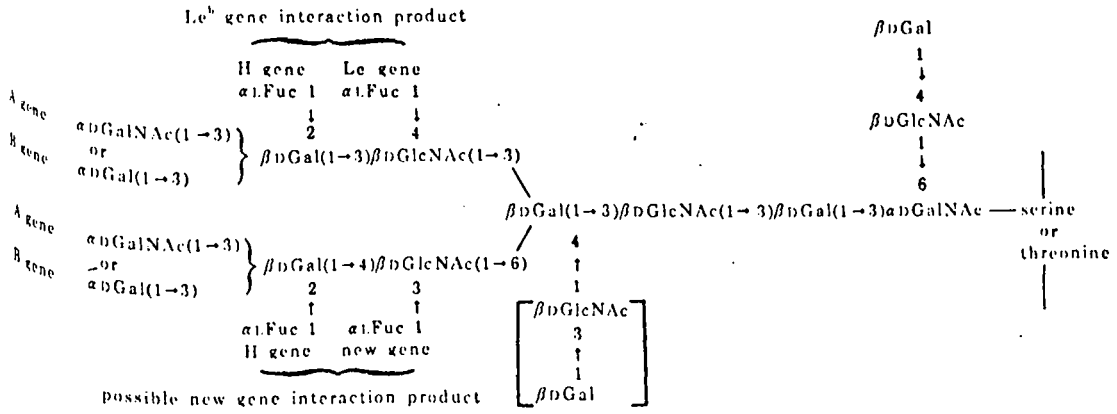
	Quantités minimun de substance donnant une inhibition (µg pour 0,1 ml) (a)	(b)
(1) O-β-D-Galactosyl (1→3)-N-Acétyl-D-Galactosamine	1000	-
(2) O-β-D-Galactosyl (1→3)-N-Acétyl-D-Glucosamine	1000	1000
(3) O-β-D-Galactosyl (1→4)-N-Acétyl-D-Glucosamine	1000	1000
(4) O-β-N-Acétyl-D-Glucosaminoyl (1→3)-D-Galactose	1000	-
(5) O-α-N-Acétyl-D-Galactosaminoyl (1→3)-D-Galactose	60	250
(6) O-α-N-Acétyl-D-Galactosaminoyl (1→3)-O-α-D-Galactosyl (1→3)-N-Acétyl-Glucosamine	60	30
(7) O-α-N-Acétyl-D-Galactosaminoyl (1→3)-O-β-D-Galactosyl (1→4)-N-Acétyl-Glucosamine	60	15
(8) Tétrasaccharide obtenu par dégradation alcaline (GalNc, Gal, GNAc, et fucose)	15	7,5

a : Inhibition de l'isoagglutination

b : Inhibition de la lyse de cellules de mouton par une hémolyse anti-A de lapin

TABLEAU XXII

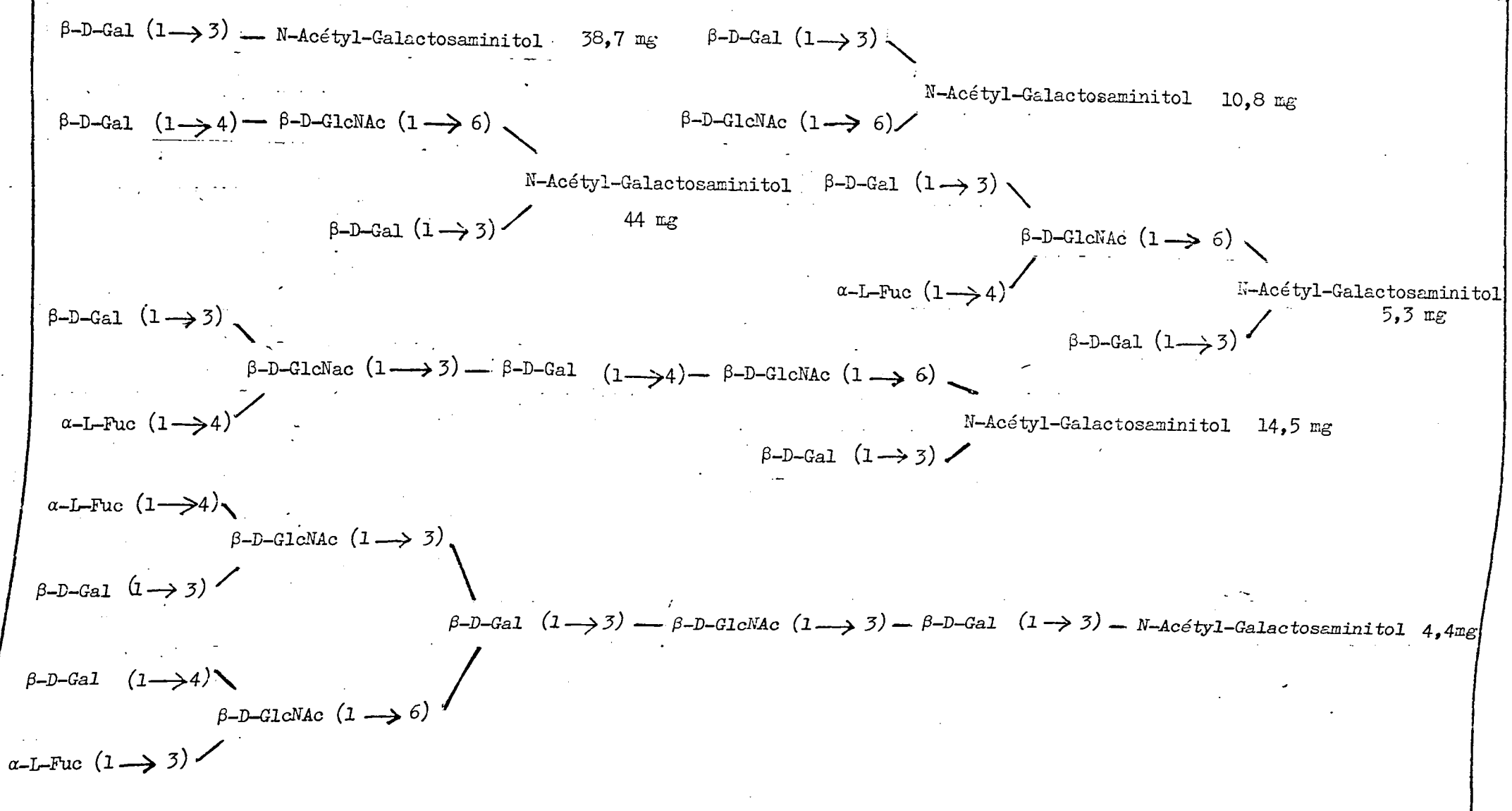
STRUCTURES GENERALE DES SUBSTANCES SOLUBLES DE GROUPES SANGUINS (D'APRES LLOYD ET KABAT) (1968)



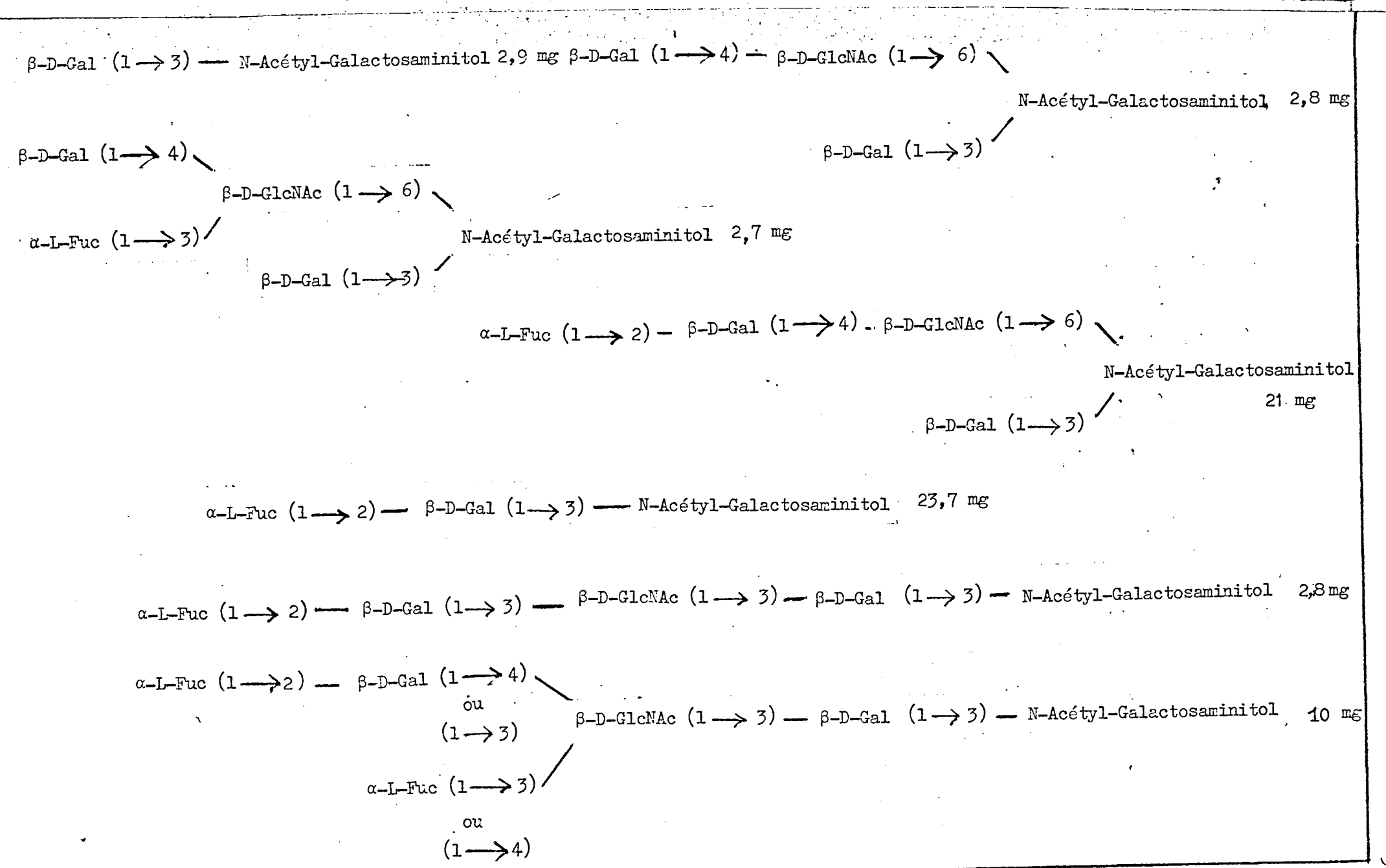
rides possédant les activités des glycoprotéines de départ. Ces structures sont données dans le tableau XXIII (p. 58).

Les substances érythrocytaires et tissulaires d'activité de groupe sanguin sont des glycolipides. La structure de certains d'entre eux a été établie voir par exemple KOSCIELAK et al., 1973 (147) : tableau XIV (p. 41) et HAKOMORI et ANDREWS, 1970 (148) : tableau XVI (p. 44).

Structures et quantités d'oligosaccharides isolés à partir de 4,56 g de la glycoprotéine M-1 (activité Le a)



Structures et quantités d'oligosaccharides isolés à partir de 2,56 gr de la glycoprotéine JS (activité H, Le b)



GENETIQUE ET BIOSYNTHESE DES SUBSTANCES DE GROUPE SANGUIN

On sait depuis les travaux de WATKINS et MORGAN, 1959 (149) que la biosynthèse des substances de groupe sanguin commence par une substance précurseur caractérisée par le chaînon β-D-Galactose 1→4 N-Acétyl-Glucosamine qui est d'ailleurs un composant de la capsule du pneumocoque de type XIV.

La biosynthèse est conforme au schéma maintenant admis : 1 gène→1 enzyme. Cette enzyme modifiant la substance précurseur suivant le génotype de l'individu.

Dans un premier temps, nous étudierons la génétique de la biosynthèse, et dans un second temps, les filiations métaboliques existant entre les diverses substances de groupe sanguin.

A - RELATIONS GENETIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES SUBSTANCES A, B, H ET LEWIS

Suivant WATKINS, 1966 (150), il est possible de distinguer 6 types d'individus distincts du point de vue génétique et du point de vue de leur réaction de leurs hématies et de leurs secrétions avec des anticorps anti-A, anti-B, anti-H, anti-Le a, anti-Le b. (Voir à ce sujet le tableau XXIV (p. 60).

Le phénotype de l'individu est sous la dépendance de 4 systèmes de gènes allèles :Sese, Hh, Lele, A, B ou O.

L'analyse de ces phénotypes a permis de préciser l'enchaînement des processus génétiques qui aboutissent à la synthèse des substances à activité de groupe sanguin. Cet enchaînement est totalement différent suivant que l'on s'adresse à une cellule muqueuse (responsable des sécré-

TABLEAU XXIV

TYPES D'INDIVIDUS QUE L'ON PEUT DISTINGUER D'APRES LES REACTIONS DE LEURS GLOBULES ROUGES ET DE LEURS SECRETIONS AVEC DES ANTICORPS ANTI-A, ANTI-B, ANTI-H, ANTI Le a et ANTI Le b (D'APRES WATKINS, 1966)(151)

Group	Probable gene combination	Antigens detectable on red cells			Specificities detectable in secretions		
		ABH	Le^a	Le^b	ABH	Le^a	Le^b
1	*ABO,* H, Se, Le*	+++	–	++	+++	+	++
2	*ABO, H, sese, Le*	+++	+++	–	–	+++	–
3	*ABO, H, Se, lele*	+++	–	–	+++	–	–
4	*ABO, H, sese, lele*	+++	–	–	–	–	–
5	*ABO, hh, Le, (Se* or *sese)*	–	+++	–	–	+++	–
6	*ABO, hh, lele (Se or sese)*	–	–	–	–	–	–

*Each individual has two of the *ABO* genes, one received from either parent. In groups 1 to 4 for the red-cell antigens, and groups 1 and 3 for the secreted substances, H activity is strong in individuals of the genotype *OO* and usually much weaker for the other *ABO* genotypes.

tions) ou à l'érythroblaste.

Suivons l'expression génétique dans une cellule muqueuse. Dans cette cellule, il y a jusqu'à 5 systèmes génétiques qui agissent successivement pour aboutir à la spécificité de groupe sanguin désiré.

En partant de la substance précurseur pneumocoque XIV, le premier système génétique qui agit est le système Lewis. Si l'activité du gène Le n'est pas indispensable à l'expression des spécificités A B et H, ces dernières n'apparaissent pas sans l'intervention du gène Se qui agit en synergie avec le gène H. Tandis que dans l'érythroblaste, le gène Se est inutile.

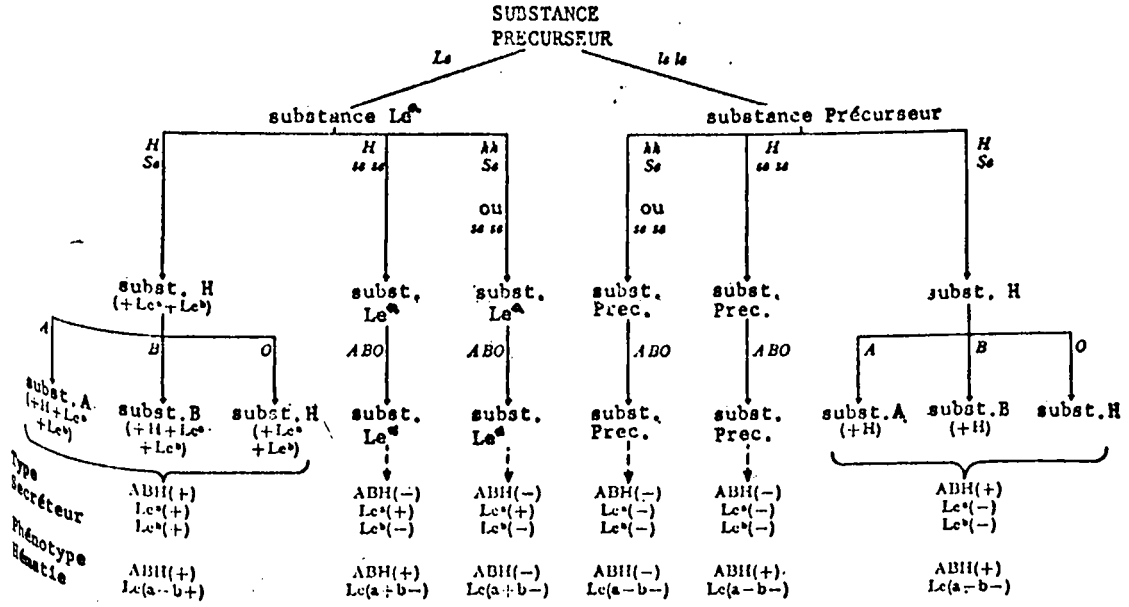
Nous avons donc ici un modèle de la différenciation cellulaire. Le gène Se indispensable à l'expression du gène H dans la salive ne l'est pas au niveau de l'érythrocyte. D'autre part, nous notons que la substance Le b ne résulte pas de l'action hypothétique d'un gène Le b mais de l'interaction du gène Le, synthétisant la substance Le a, et du gène H. La présence des deux fucoses greffés par les gènes précédents sur la chaîne polysaccharifique donne la spécificité Le b. Ceci est résumé dans le tableau XXV (p. 62) d'après WATKINS, 1966 (152).

B - LA RELATION 1 GENE ⟶ 1 ENZYME DANS LA BIOSYNTHESE DES SUBSTANCES DE GROUPE SANGUIN

Les glycosyltransférases sont des systèmes multienzymatiques catalysant la biosynthèse des chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines ou des glycolipides. On les trouve soit dans les secrétions : colostrum, lait, [KOBATA et al., 1968 (154)], soit dans les tissus : foie, SCHACHTER et al., 1970 (155), les glandes sous-maxillaires, [Mc GUIRE, 1970 (156)], la muqueuse gastrique et intestinale. Ces enzymes sont, soit associées aux membranes intracellulaires [(SCHACHTER et al., 1970 (157) et Mc GUIRE, 1970 (158)] ou sont solubles comme celles du lait ou du colostrum. L'étude des glycosyltransférases solubles du lait et celles liées

TABLEAU XXV

RELATIONS GENETIQUES POSSIBLES DANS LA BIOSYNTHESE DES SUBSTANCES A, B, H ET LEWIS (D'APRES WATKINS, 1966) (153)



aux membranes des glandes sous-maxillaires humaines et de porc (Mc GUIRE, 1970 (159) ; ZIDERMAN et al., 1967 (160) ; CARLSON, 1970 (161) ont permis de confirmer l'hypothèse de WATKINS et MORGAN, 1959 (162) concernant le rôle de glycosyltransférases spécifiques dans la biosynthèse des substances de groupes sanguins.

Ainsi le gène Lewis s'exprime par l'intermédiaire d'une fucosyltransférase, GROLLMAN et al., 1969 (163) montrent que le lait de femmes Le a+ ou Le b+, possède une fucosyltransférase spécifique que l'on ne trouve pas dans les laits des femmes Le a- ou Le b-. Le gène H contrôle la biosynthèse d'une autre fucosyltransférase ajoutant du L-Fucose par une liaison α (1,2) sur le galactose terminal de la chaîne, WATKINS, 1966 (164).

Une N-Acétyl-Galactosaminyltransférase déterminant la spécificité de groupe A a été trouvée soit sous forme soluble : lait de femme KOBATA et al., 1968 (165), ou liée aux membranes du réticulum endoplasmique des glandes sous-maxillaires humaines, HEARN et al., 1968 (166).

L'activité de cette enzyme est plus marquée chez les individus de groupe A_1 que chez les individus de groupe A_2 (SCHACHTER et al., 1971 (167).

Récemment, plusieurs glycosyltransférases impliquées dans la synthèse des glycoprotéines solubles, à activité de groupes sanguins, ont été démontrées : une D-Galactosyltransférase isolée du lait de femme (KOBATA et GINSBURG, 1970 (168)) confère l'activité B à des érythrocytes humains originellement O (PACUSZKA et KOSCIELAK, 1972 (169). In vitro, les glycosyltransférases du sérum ou de la muqueuse gastro-intestinale d'individus de type A et B contrôle la synthèse de glycolipides A et B respectivement, à partir du lacto-N-fucopentaose IV.

Une déficience enzymatique est observée lorsqu'on traite la muqueuse d'un adéno-carcinome (STELLNER et HAKOMORI, 1973 (170)).

C - FILIATION METABOLIQUE DES SUBSTANCES DE GROUPES SANGUINS

Le tableau XXVI (p. 65) représente les structures proposées par MORGAN et WATKINS, 1969 (171) pour les chaînes oligosaccharidiques à spécificité A, B, H, Le a et Le b ainsi que les enzymes impliquées.

Le tableau signale la présence de 2 motifs antigéniques communs à toutes les substances :

$$\text{type 1 : Gal} \xrightarrow[\beta]{1 \quad 3} \text{GlcNAc}$$

$$\text{type 2 : Gal} \xrightarrow[\beta]{1 \quad 4} \text{GlcNAc}$$

Le type 2 a été mis en évidence par STELLNER et al., 1973 (172) dans les glycolipides erythrocytaires d'un sujet de groupe O. La fixation d'un résidu de fucose par une liaison α (1,4) sur la N-Acétyl-D-Glucosamine conférant l'activité Le, n'est pas possible sur les motifs de type 2 comme c'est le cas dans les glycoprotéines du kyste de l'ovaire, [WATKINS, 1966 (173)] qui possèdent les motifs 1 et 2. Le motif 1 est également plus abondant dans les oligosaccharides des milieux de secrétion. Les chaînes de type 2 n'ont donc pas de spécificité sérologique.

Le tableau XXVII (p. 66) d'après WATKINS, 1966 (174) résume en fonction du génotype de l'individu l'élaboration des substances de groupes sanguins à partir du précurseur commun, de type 1 ou 2.

Il faut signaler que les antigènes de groupe sanguin Lewis des érythrocytes proviennent du plasma sanguin et ne sont pas synthétisés in situ (MAKELA et MAKELA, 1956 (176). Ces antigènes étaient des glycoproteines - pensait-on - mais, récemment MARCUS et CASS, 1969 (177) ont montré que les membranes érythrocytaires captaient des antigènes Lewis de nature glycolipidique provenant des lipoprotéines sériques.

L'érythroblaste ne synthétise que des substances à activité A, B, ou H et l'érythrocyte n'acquiert la spécificité Le a ou Le b qu'après le contact avec le sérum. Celui-ci présente cette spécificité grâce aux cellules muqueuses capables de synthétiser en grosses quantités des substances à activité A, B, H, Le a, Le b de nature glycolipidique ou glycoprotéinique.

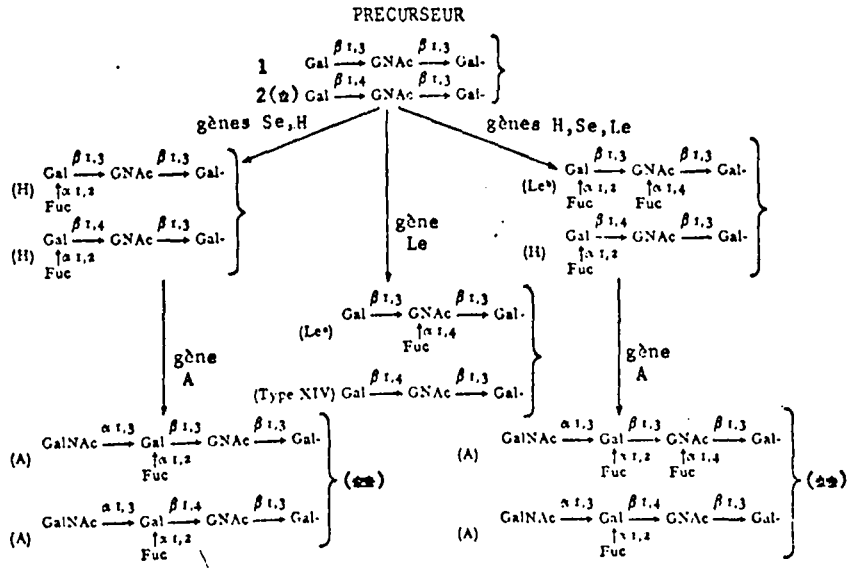
TABLEAU XXVI

ROLE GENETIQUE DE LA BIOSYNTHESE DES STRUCTURES AVEC UNE SPECIFICITE GROUPE A, B, H, Le a, et Le b (D'APRES MORGAN ET WATKINS, 1969)

Gene	Enzyme product	Chain-ending in precursor	Structure	Serological specificity
—	—	Type 1	β-Gal-(1→3)-GNAc--	—
—	—	Type 2	β-Gal-(1→4)-GNAc--	Type XIV
H	α-L-Fucosyltransferase (1)	Type 1	β-Gal-(1→3)-GNAc-- ↑1, 2 α-Fuc	H
		Type 2	β-Gal-(1→4)-GNAc-- ↑1, 2 α-Fuc	H
Le	α-L-Fucosyltransferase (2)	Type 1	β-Gal-(1→3)-GNAc-- ↑1, 4 α-Fuc	Le^a
		Type 2	β-Gal-(1→4)-GNAc--	Type XIV
H and *Le*	α-L-Fucosyltransferases (1) and (2)	Type 1	β-Gal-(1→3)-GNAc-- ↑1, 2 α-Fuc ↑1, 4 α-Fuc	Le^b
		Type 2	β-Gal-(1→4)-GNAc-- ↑1, 2 α-Fuc	H
H and *A*	α-L-Fucosyltransferase (1) and α-*N*-acetylgalactosaminyltransferase	Type 1	α-GalNAc-(1→3)-β-Gal-(1→3)-GNAc-- ↑1, 2 α-Fuc	A
		Type 2	α-GalNAc-(1→3)-β-Gal-(1→4)-GNAc-- ↑1, 2 α-Fuc	A
H and *B*	α-L-Fucosyltransferase (1) and α-D-galactosyltransferase	Type 1	α-Gal-(1→3)-β-Gal-(1→3)-GNAc-- ↑1, 2 α-Fuc	B
		Type 2	α-Gal-(1→3)-β-Gal-(1→4)-GNAc-- ↑1, 2 α-Fuc	B

TABLEAU XXVII

SCHEMA DE LA FILIATION METABOLIQUE DES SUBSTANCES DE GROUPE SANGUIN (D'APRES WATKINS, 1966)(175)



*) Les chaînes du type 2 n'ont pas de spécificité sérologique

*) La formule correspondant à la substance B s'obtient en substituant la N-acétylgalactosamine par le galactose.

— T R A V A U X P E R S O N N E L S —

A - MATERIEL ET METHODES

I - FRACTIONNEMENT DES URINES

10 litres, 20 litres, 20 litres de l'urine de sujets masculins appartenant respectivement au groupe sanguin O Le a se, O Le b Se, A Le b Se ont été fractionnés selon le procédé de STRECKER et al., 1970 (178) décrit par la figure 8 (p. 68).

1 - Collection des urines

Les urines, recueillies sur un mélange de chloroforme et de toluène (1 : 1) sont entreposés pendant 24 h à la température de + 4ºC, afin de provoquer la sédimentation d'un certain nombre de substances minérales peu solubles. Elles sont ensuite filtrées.

2 - Déminéralisation sur échangeurs d'ions (Méthode de MONTREUIL et SCRIBAN, 1952 (178*)

L'étude chromatographique des oses nécessite un "dessalage" préalable des solutions, réalisé par passages successifs 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,acétyl-osamines, polyols, lactones), "basiques" (osamines) et "acides" (acides uroniques, acides sialiques). Avant leur emploi, les échangeurs d'ions sont traités selon le mode opératoire préconisé par COHN, 1957 (179).

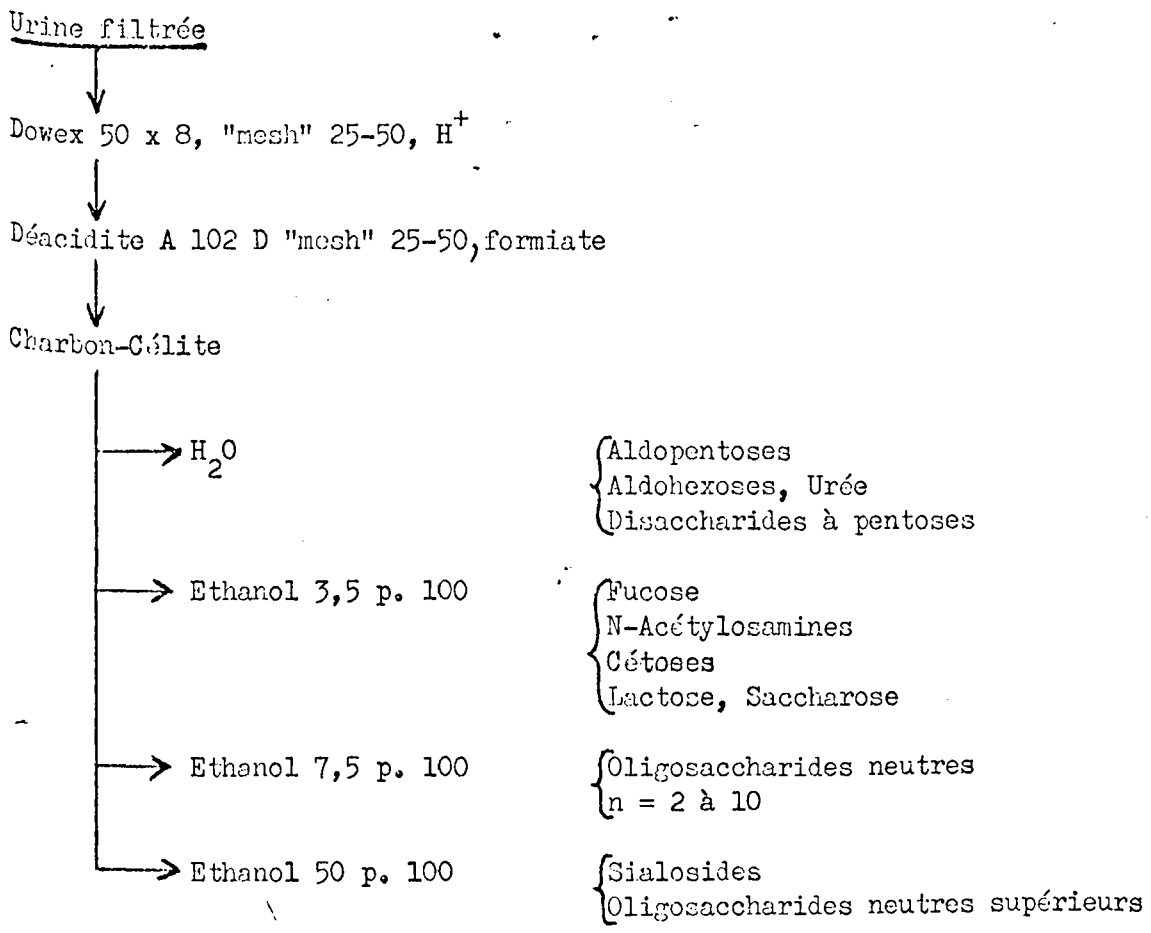


Figure 8

Procédé rapide de fractionnement des oligosaccharides urinaires.

3 - Fractionnement sur charbon

La solution effluente, concentrée à un cinquième de son volume initial est ajustée à pH 6 par l'acide acétique. Elle est ensuite fractionnée sur une colonne de charbon-célite préparée selon le procédé de WHISTLER et DURSO, 1950 (180).

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., 1969 (181). 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 de charbon et de Célite. Les solutions glucidiques peuvent alors être fractionnées sur ces colonnes : 1 g de sucres totaux pour 100 ml de charbon-Célite. 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.

4 - Analyse des fractions obtenues

Le fractionnement sur colonne de charbon-Célite permet de séparer les sucres de l'urine en 3 groupes dont l'analyse chromatographique est facilement interprétable.

La fraction à 7,5 p. 100 d'éthanol présente des variations significatives de composition en oligosaccharides d'un individu à l'autre. Ces différences sont liées en particulier à la nature du groupe sanguin. Notre intérêt s'est donc porté, en particulier, sur ces fractions. Nous avons isolé par chromatographie ou électrophorèse préparative sur papier les oligosaccharides intéressants.

a - Chromatographie préparative

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 µl) est déposée en un trait continu sur une feuille de papier Whatman nº 3. Après passage du solvant, des bandes latérales sont découpées, afin de localiser, par révélation spécifique, les différentes substances. La "languette" centrale correspondante est éluée 10 à 12 heures par de l'eau bidistillée suivant le procédé de DENT, 1933 (182). 5 à 15 mg peuvent ainsi être isolés par chromatogramme. Les solutions d'élution sont purifiées sur une micro-colonne de charbon-Célite. Les oligosaccharides sont déplacés par une solution aqueuse d'éthanol à 50 p. 100

a_1 - Systèmes-solvants

α - Système solvant de PARTRIDGE, 1948 (183) n -butanol : 4 - acide acétique : 1 -eau : 5 (v : v : v).

β - Système solvant de FISHER et NEBEL, 1955 (184) acétate d'éthyle : 5 - pyridine : 5 - acide acétique : 1 - eau : 3. (v : v : v).

a_2 - Révélations

α - Réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE, 1950 (184).

β - Réactif au chlorure de triphényltétrazolium de TREVELYAN et al., 1950 (185).

γ - Réactif au nitrate d'argent de TREVELYAN et coll. 1950 (186).

b - Electrophorèse préparative

Des oligosaccharides ont été également préparés par les techniques électrophorétiques, dans une cuve d'électrophorèse "en toit". Le dépôt de la solution glucidique se fait à 10 cm du bord de la feuille de papier Whatman nº 3.

b_1 - Tampons utilisés

α - Tampon borate à 1 p. 100 de tétraborate de sodium (pH 9,2).

β - Tampon de MICHL, 1951 (187) de pH 3,9-pyridine/acide acétique/eau (3 : 10 : 487).

b_2 - Révélations

Les révélations ont été effectuées avec le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE, 1950 (188).

II - ETUDE DE LA STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES ISOLES

1 - Détermination de la composition en oses

a - Composition centésimale

L'utilisation des procédés colorimétriques classiques a permis de déterminer la composition centésimale en chacun des types fondamentaux de glucides qui constituent les oligosaccharides isolés.

a_1 - Dosage des monosaccharides neutres

Les monosaccharides neutres ont été dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI, 1928 (189) modifiée par RIMINGTON, 1931 (190) selon le protocole de MONTREUIL et SPIK, 1968 (191).

a_2 - Dosage des acides uroniques par la méthode au carbazol de DISCHE, 1947 (192) selon le protocole de MONTREUIL et SPIK, 1968 (193).

a_3 - Dosage des hexosamines par la méthode d'ELSON et MORGAN modifiée (Procédé de BELCHER et al., 1954 (194) après hydrolyse du polysaccharide par HCl 4 N pendant 4 h à 100ºC.

a_4 - Dosage des acides sialiques

Les acides sialiques ont été dosés par la méthode à la diphénylamine de WERNER et ODIN, 1952 (195).

b - Identification des hexoses et détermination de leur composition molaire

b_1 - Hydrolyse chlorhydrique

Les hexoses sont libérés par une hydrolyse chlorhydrique : 2 à 5 mg d'oligosaccharides sont dissous dans 2 ml d'acide chlorhydrique 1,5 N et la solution est portée à 100ºC 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.

b_2 - Identification et dosage chromatographique de 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 FISCHER et NEBEL, 1955 (196) acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau (5 : 5 : 1 : 3)(v : v : v : v).

Les rapports molaires des oses neutres ont été déterminés selon le procédé de HUGUES et JEANLOZ, 1964 (197) : des carrés de papier de 5 cm de côté, encadrant les taches de glucides (révélés par le réactif au phtalate d'aniline) 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 (DATE, 1958 (198) et MONTREUIL et al., 1968 (199)). Sur chaque chromatogramme sont déposées latéralement des quantités connues et croissantes de solutions de sucres témoins :

(50, 100, 150 et 200 µg) dont l'élution constitue une gamme étalon. Les valeurs sont lues contre un témoin obtenu en éluant un carré de papier révélé, mais ne renfermant pas de glucides. La précision du procédé atteint 1 p. 100.

2 - Etude de la structure des oligosaccharides

L'étude de la séquence des oses implique :

- l'identification du monosaccharide terminal réducteur
- les hydrolyses acide et alcaline ménagées
- la perméthylation de l'oligosaccharide.

a - Identification de l'ose terminal réducteur

Le glucide terminal réducteur des oligosaccharides a été identifié en déterminant les compositions molaires avant et après réduction par la 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 borchydrure de sodium est prolongée 15 heures à + 4ºC. 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, de manière à distiller l'acide borique sous forme de borate de méthyle. La composition molaire de l'oligosaccharide réduit alors déterminée selon le procédé décrit précédemment et le glucide réducteur identifié par différence.

b - Hydrolyse partielle

L'hydrolyse partielle des oligosaccharides a été effectuée par l'action de H_2SO_4 0,5 N à 100ºC, pendant 15 minutes. Les solutions ont été déminéralisées par passage sur colonne d'échangeurs d'anions (Duolite A-40, "mesh"25-50, forme formiate) puis analysées dans le système solvant de FISCHER et NEBEL, 1955 (200)-acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) (v : v : v : v).

c - Dégradation alcaline

L'étude de la structure des oses demande la préparation d'un grand nombre d'oligosaccharides de petite masse moléculaire dont nous pouvons comparer le comportement chromatographique avec celui de sucres de structure connue. Ces oligosaccharides peuvent être obtenus par hydrolyse acide ménagée, mais aussi par l'action d'un agent alcalin dilué. Ce dernier procédé permet contrairement au précédent l'isolement d'oligosaccharides à fucose ou à acide sialique.

Le méchanisme de la dégradation alcaline des chaînes oligosaccharidiques a été établi par WHISTLER et BEMILIER, 1958 (201), BALLOU, 1954 (202). Les chaînes sont dégradées d'une façon récurrente, de l'extrémité terminale réductrice, résidu après résidu, jusqu'à ce qu'une liaison stable soit atteinte (présence d'une osamine en position 1,4 ; les liaisons 1, 1 et 1,2 sont alcali-résistantes, les liaisons 1,4 et 1,6 sont plus stables que la liaison 1,3 très labile).

Une osamine en position terminale réductrice est mise en évidence avec le réactif d'Ehrlich (présence d'un chromogène de KUHN) après traitement par un agent alcalin dilué. Une réaction négative est obtenue en présence d'un sucre aminé, en position 1,4.

On ajoute à 500 µg de l'oligosaccharide lyophilisé 500 µl de NaOH 1 N. La dégradation s'effectue à 20ºC pendant 16 h. Les produits obtenus sont purifiés par passage sur une colonne de Dowex 50 x 8, "mesh" 25-50, forme H^+

d - Perméthylation des oligosaccharides

d_1 - Protocole expérimental

Les oligosaccharides sont méthylés selon le procédé de FOURNET, 1973 (202*) qui comprend un cycle selon la méthode de KUHN, BAER et GAUHE, 1956 (202**) à la diméthylformamide, iodure de méthyle, oxyde d'argent complétécepar deux cycles de méthylation suivant la technique d'HAKOMORI, 1964 (203) dans le DMSO.* A une solution de 4 mg d'oligosaccharide dans 3 ml de DMFA on ajoute, par petites fractions échelonnées sur 30 mn, 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 20º. 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

* DMSO : diméthylsulfoxyde.

mélange est filtré et l'insoluble est lavé plusieurs fois avec du chloroforme. Le filtrat est abandonné à + 4º 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 phase 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.

d_2 - Contrôle de la perméthylation

Les oligosaccharides perméthylés sont chromatographiés sur plaques de couche mince de silicagel G (30 g de silicagel 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 minutes à 120º.

d_3 - Hydrolyse des oligosaccharides perméthylés

α - 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 80º pendant 24 h. Le méthanolysat est séché sous un lent courant d'azote.

β - Cas d'oligosaccharides contenant des monosaccharides et des osamines

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

d_4 - Fractionnement électrophorétique des hydrolysats FOURNET et al. 1973 (203*)

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, 1951 (204) 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, 1950 (205) 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, 1933 (206) 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 exciccateur.

d_5 - Identification des O-méthyl-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'hexaméthyldisilazane et de 50 µl de triméthylchorosilane. Le mélange est agité très énergiquement pendant 15 minutes 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 60 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 : 120º.

d_6 - Identification des éthers méthyliques des monosaccharides neutres*

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 verec 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/mn ; température 170°C.

III - ETUDE IMMUNOCHIMIQUE DES OLIGOSACCHARIDES

1 - Activité A, B et H

a - Détermination du titre de l'antisérum

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 immunochimique des oligosaccharides. A cet effet, 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
- 2è tube : 50 µl de sérum anti A + 50 ml de sérum physiologique
- 3è au 10è 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.

(*) Nous remercions Monsieur B. FOURNET pour les témoins des éthers méthyliques des monosaccharides qu'il a bien voulu nous fournir.

Cette manipulation est répétée jusqu'au 10è tube. On obtient alors les dilutions :

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

A chacun de ces tubes on ajoute alors 50 µl 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 :

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

Après 10 mn de contact à 20ºC, 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. 9 (p. 80). 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.

b - <u>Détermination de l'activité A, B et H des oligosaccharides</u>

On dispose 3 rangées de 10 tubes à hémolyse. Dans le 1er tube de chaque rangée sont introduits 50 µl de solution de sérum physiologique renfermant 1,5 mg d'oligosaccharide. Dans le 2è tube de la 1ère rangée, sont introduits 150 µl de solution de sérum physiologique renfermant 4,5 mg d'oligosaccharide. Du 2è au 10è tube de la 1ère rangée sont introduits 150 µl de sérum physiologique. Les dilutions sont alors réalisées comme l'indique la figure 9 (p. 80). On introduit ensuite dans chaque tube 50 µl d'antisérum respectivement A, B ou H, de titre 32. Après un repos à + 4ºC de 4 heures on ajoute dans chaque tube 50 µl 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 tours/minute : 2 mn) et les lectues sont faites comme précédemment.
Exemple : L'agglutination devient négative quand on passe du tube 6 (±) au tube 5 (-) qui renferme 92 µg d'oligosaccharide dans 150 µl de solution finale. L'activité de l'oligosaccharide est donc de 60 µg/100 µl de solution.

2 - Détermination de l'activité Lewis a et Lewis b

A 50 µl d'une solution d'oligosaccharide (de concentration décroissante), on introduit 150 µl de sérum anti Lewis a ou Lewis b (titre 16). Après un séjour de 2 heures à + 4ºC, on ajoute à chaque tube 50 µl d'hématies à 10 p. 100 de groupe O (Lewis a ou Lewis b). Les tubes sont placés à + 4ºC pendant 1 heure, puis centrifugés 2 mn à 2.000 t/mn et replacés 5 mn à + 4ºC. Les lectures sont alors effectuées comme précédemment.

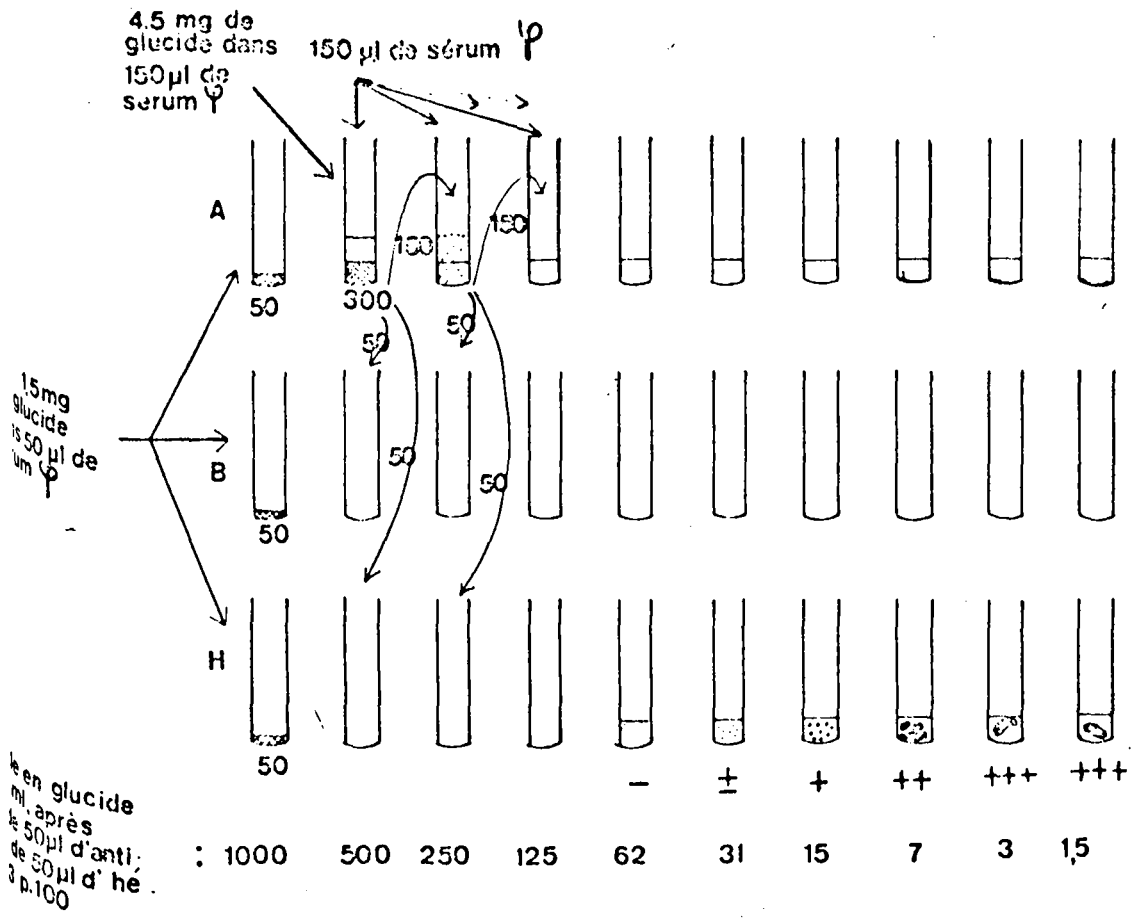


Figure 9

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

B - RESULTATS

I - FRACTIONNEMENT DES URINES

Le procédé de fractionnement sur colonne de Charbon-Célite décrit dans la figure 8 (p. 68) permet d'obtenir, de façon reproductible, des cartes chromatographiques des oligosaccharides urinaires, comme le montre la figure 10 (p. 82) qui permet de comparer la composition en glucides de deux urines de sujets respectivement de phénotypes A, Se, Le et B, Se, Le. Dans le cas d'une simple analyse chromatographique des sucres urinaires, les échantillons urinaires sont de 200 à 300 ml et les dimensions de la colonne de charbon-Célite sont de 2 x 10 cm.

Pour procéder au fractionnement des oligosaccharides de quantités d'urines de l'ordre de 10 à 20 litres, il est nécessaire d'utiliser des colonnes de charbon-Célite de dimensions supérieurs (5 x 40 cm), qui sont alors élués par des gradients de concentrations éthanoliques variables, comme le montrent les figures 11, 12 et 13 (p. 83 à 85), qui illustrent les résultats obtenus à partir d'urines de sujets respectivement de phénotypes O, se, Le ; O, Se, Le et A, Se, Le.

II - ISOLEMENT DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

1 - Urine de sujet O, se, Le

Les urines de sujets non sécréteurs ne renferment que très peu d'oligosaccharides. Nous n'avons abordé l'étude que d'un seul constituant indiqué par une flèche dans la figure 11 (p. 83) et qui a été isolé par chromatographie préparative dans le système-solvant acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3).

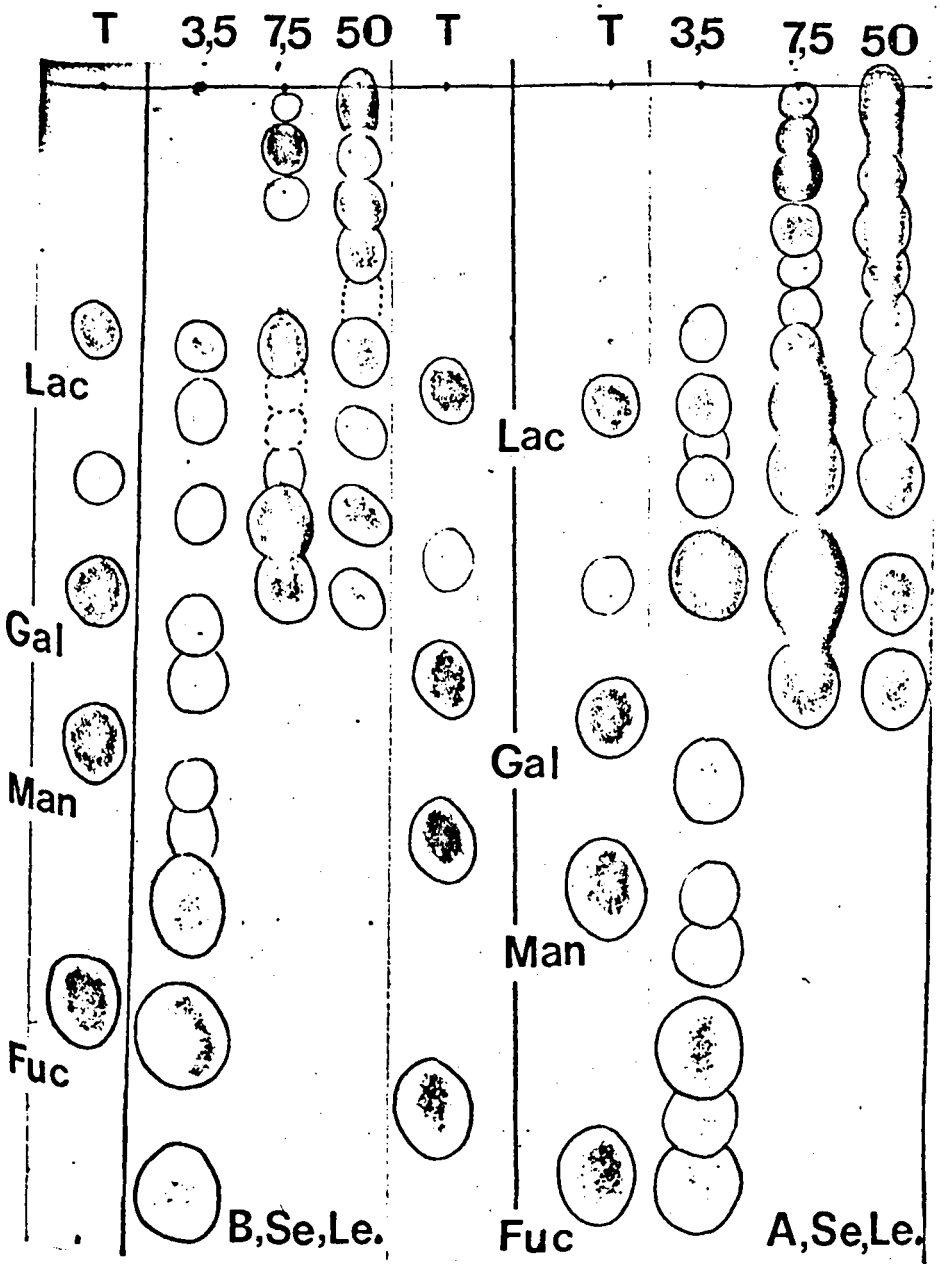


Figure 10

Cartes chromatographiques des oligosaccharides urinaires de sujets respectivement de phénotypes A, Se, Le et B, Se, Le. Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5). Papier Whatman nº 3. Durée de la chromatographie : 3 jours. Révélation à l'oxalate d'aniline. Témoins latéraux : Lac : lactose Gal : galactose, Man : mannose ; Fuc : fucose

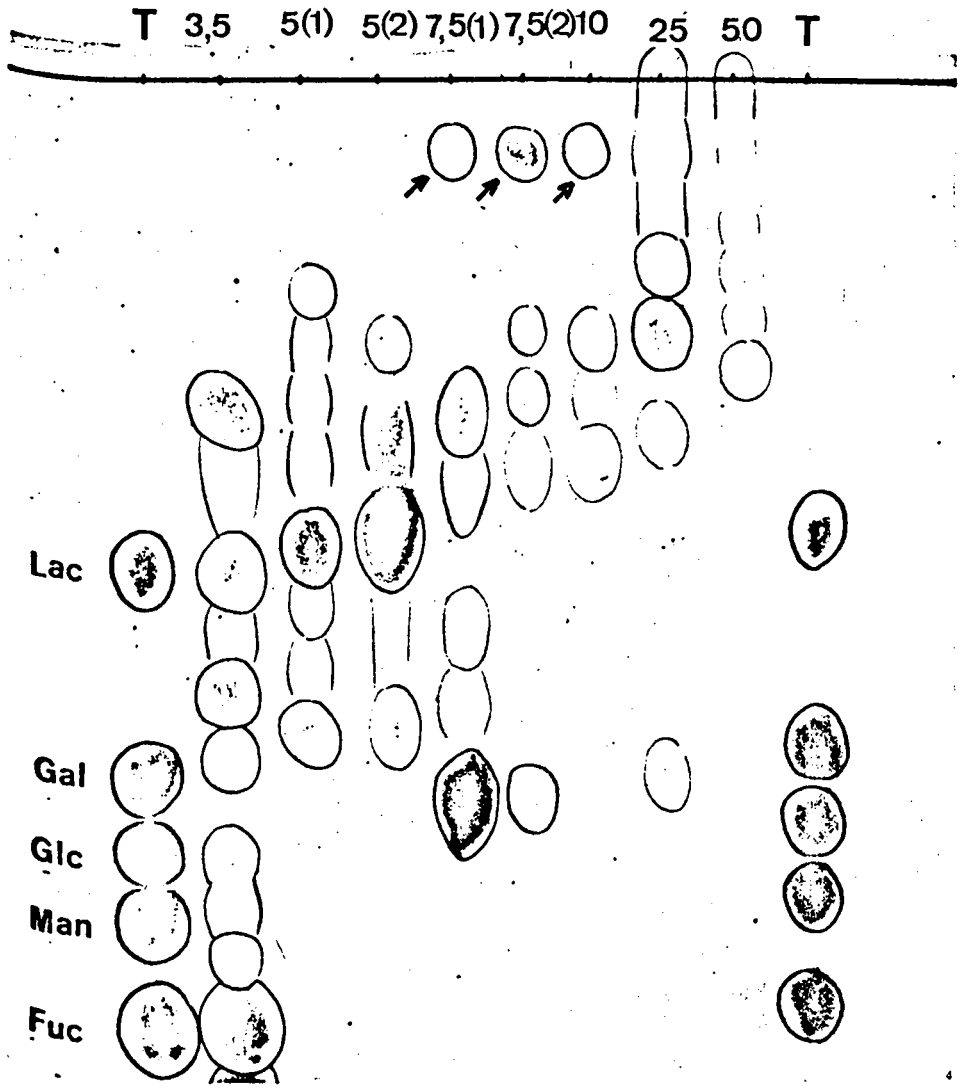


Figure 11

Fractionnement sur colonne de charbon-Célite de 10 litres d'urine d'un sujet de phénotype O, se, Le. Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) ; papier Whatman nº 3 ; durée de la chromatographie : 16 heures ; révélation à l'oxalate d'aniline. La flèche indique la position de l'oligosaccharide caractéristique de cette urine. Les nombres supérieurs indiquent les concentrations d'éthanol.

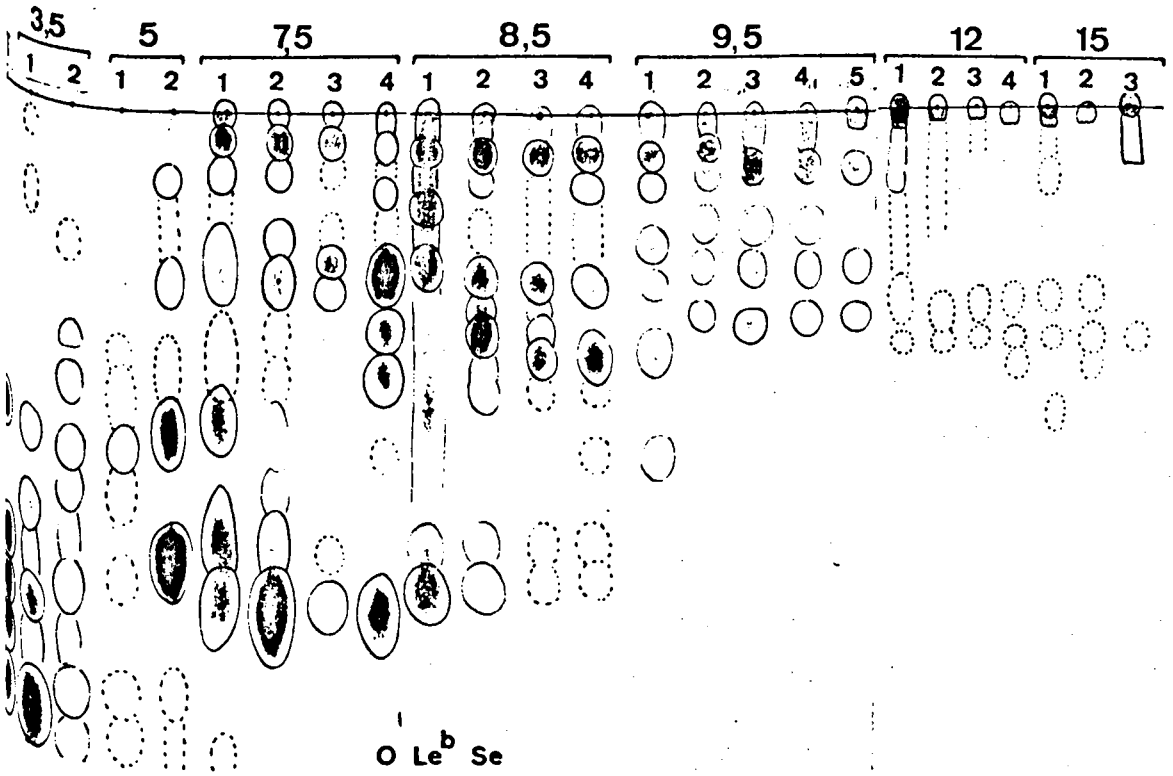


Figure 12

Fractionnement sur colonne de charbon-Célite des oligosaccharides de 20 litres d'urine d'un sujet de phénotype O, Se, Le. Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) ; papier Whatman nº 3 ; durée de la migration : 16 heures ; révélation à l'oxalate d'aniline. Les nombres supérieurs indiquent les concentrations d'éthanol.

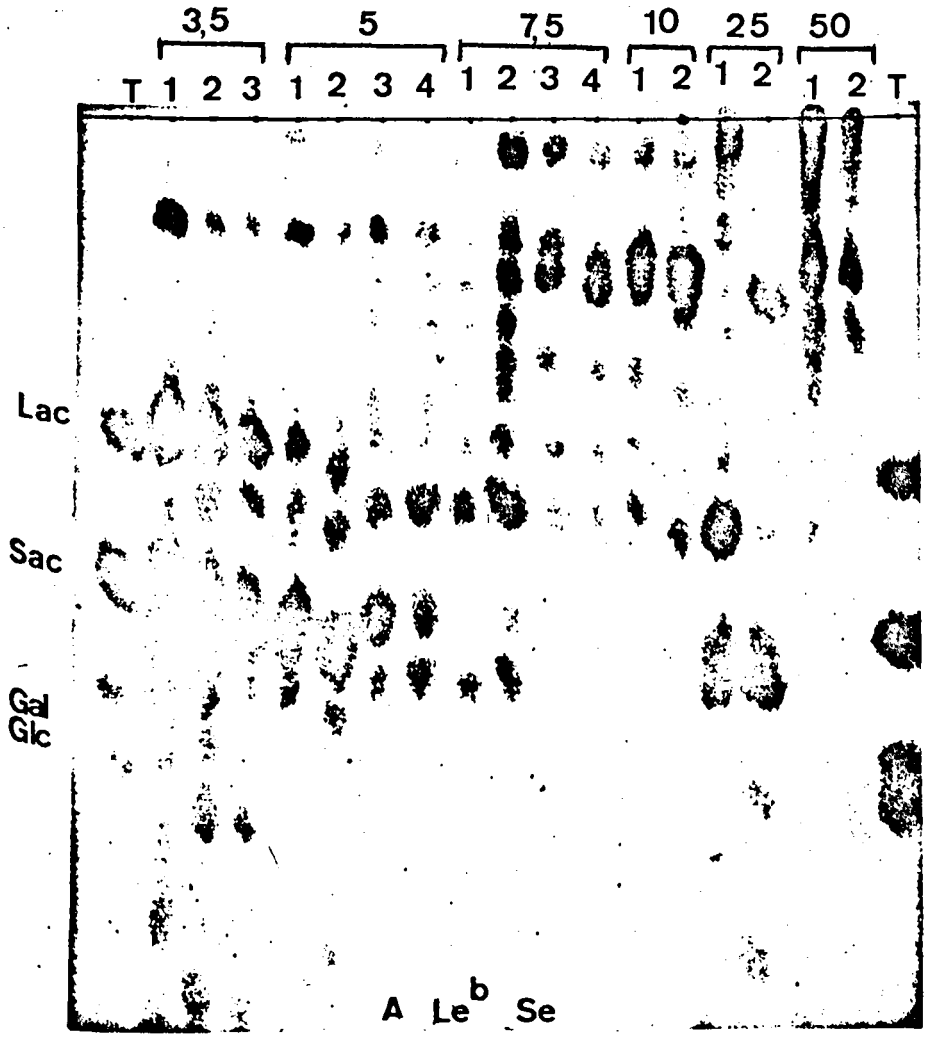


Figure 13

Fractionnement sur colonne de charbon-Célite de 20 litres d'urine d'un sujet de phénotype A, Se, Le. Système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (5 jours) ; papier Whatman nº 3 ; révélation à l'oxalate d'aniline. Les nombres supérieurs indiquent les concentrations d'éthanol.

2 - Urine de sujet O, Se, Le

Les urines de sujets sécréteurs renferment au contraire un nombre très élevé d'oligosaccharides dont le taux moyen pour chacun d'entre eux est de l'ordre de 0,2 à 5 mg par litre. Les diverses fractions éthanoliques ont été soumises successivement à des chromatographies ou électrophorèses préparatives dans les systèmes-solvants ou tampons suivants :

- 1er fractionnement : chromatographie dans le système solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3).

- 2è fractionnement : électrophorèse dans le tampon de MICHL de pH 3,9

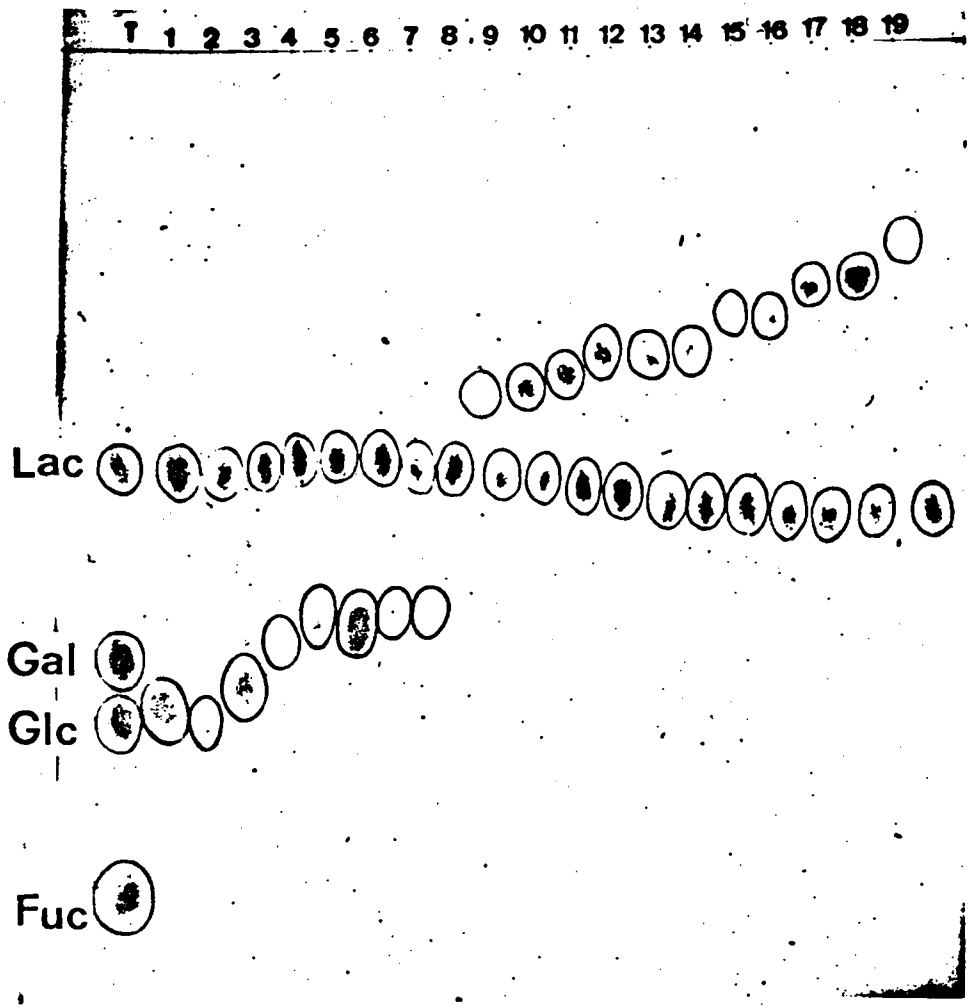
- 3è fractionnement : électrophorèse dans le tampon à 1 p. 100 de borate de sodium.

Les différents oligosaccharides isolés ont ensuite été purifiés sur des petites colonnes de charbon-Célite (1 x 2 cm) à partir desquelles les oligosaccharides sont désorbés par de l'éthanol à 50 p. 100. Cette opération a pour but d'éliminer les constituants glucidiques qui proviennent du papier et qui sont généralement riches en glucose.

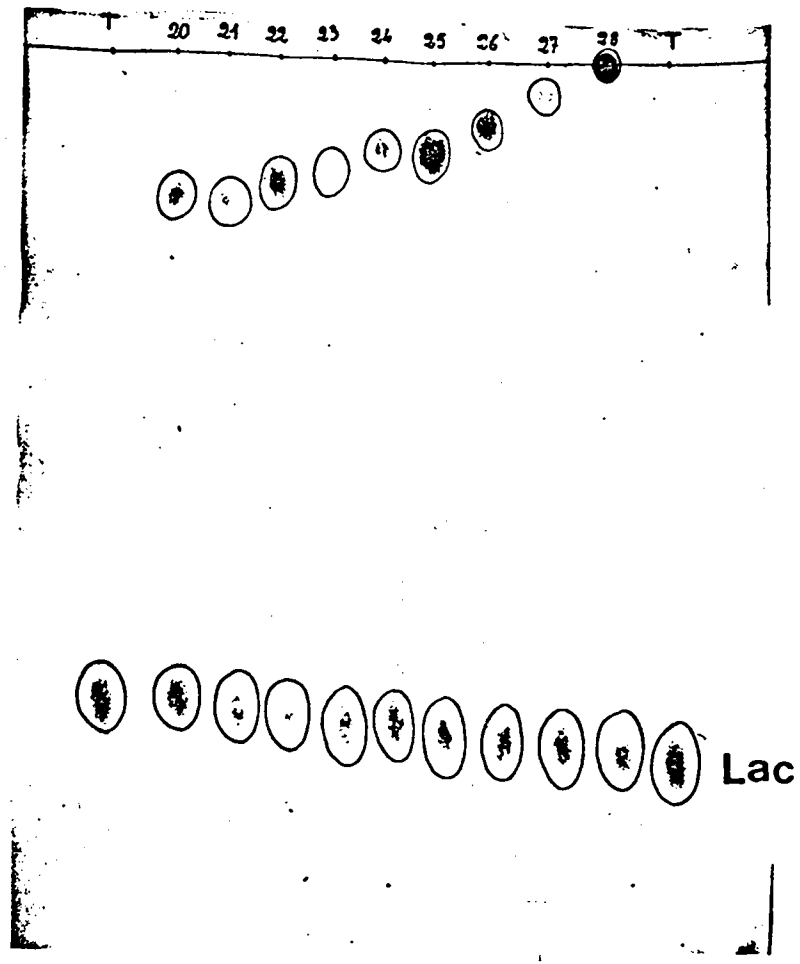
Le fractionnement de 20 litres d'urine d'un sujet de phénotype O, Se, Le nous a permis en définitive d'isoler, dans un état de pureté satisfaisant, 28 oligosaccharides (figure 14 p.87) dont le comportement chromatographique est décrit dans le tableau XVIII (p. 88).

3 - Urine de sujet A, Se, Le

Les oligosaccharides urinaires de sujet A, Se, Le ont été isolés selon un protocole expérimental identique. En définitive, 18 oligosaccharides ont été obtenus dans un état de pureté satisfaisante comme le montre la figure 15 (p. 89). Le comportement chromatographique de ces glucides est donné dans le tableau XXVIII (p. 88).



I



II

Figure 14

Chromatographie sur papier des oligosaccharides isolés de l'urine d'un sujet de phénotype O,

	Quantité isolée	R^*_{Lac}	Gal	Glc	Man	Fuc	Fru	Xyl	$GalNH_2$	$GlcNH_2$	GlcA	NANA	Glucide réducteur
1	62 mg	1,55		1				1,08					Glc
2	24 mg	1,58		1		0,96							Glc
3	47 mg	1,52		1		0,95							Glc
4	10 mg	1,47	1			1,05							Gal
5	17 mg	1,38	1		0,15					1			
6	168 mg	1,40		1			1						
7	9 mg	1,36	0,2	1	1	0,16							
8	16 mg	1,36		1		0,15							
9	40 mg	0,80	1	1,08		0,85							Glc
10	15 mg	0,78								1	1,1		GlcNAc
11	9 mg	0,75									+		
12	9,5 mg	0,69	1							0,95		0,90	GlcNAc
13	8 mg	0,69		1							0,92		Glc
14	7,5 mg	0,67	1	0,10		1,1				1			
15 16	85 mg	0,58	1	1,05		2							Glc
17	58 mg	0,55	1	1								0,98	Glc
18	11 mg	0,50	0,90							1		0,95	GlcNAc
19	7 mg	0,43	1	1,15	0,90	1,08				1			Glc
20	8 mg	0,22	2	0,8	2,12	2,20				1			
21	6 mg	0,23	2	0,1		1,95				1			Gal
22	8 mg	0,19	2	1,1	0,9	1,88				1			
23	14 mg	0,17	2			3,12				1			Gal
24	6 mg	0,13	2,1					1	1	0,15	1		Xyl
25	22 mg	0,14	2,14	1		3,11				1			Glc
26	40 mg	0,10	2,21	0,9		3				1			Glc
27	5 mg	0,05	2,20	0,93		4,05				1			Glc

* R_{Lac} : Vitesse de migration par rapport au lactose dans le système solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3).

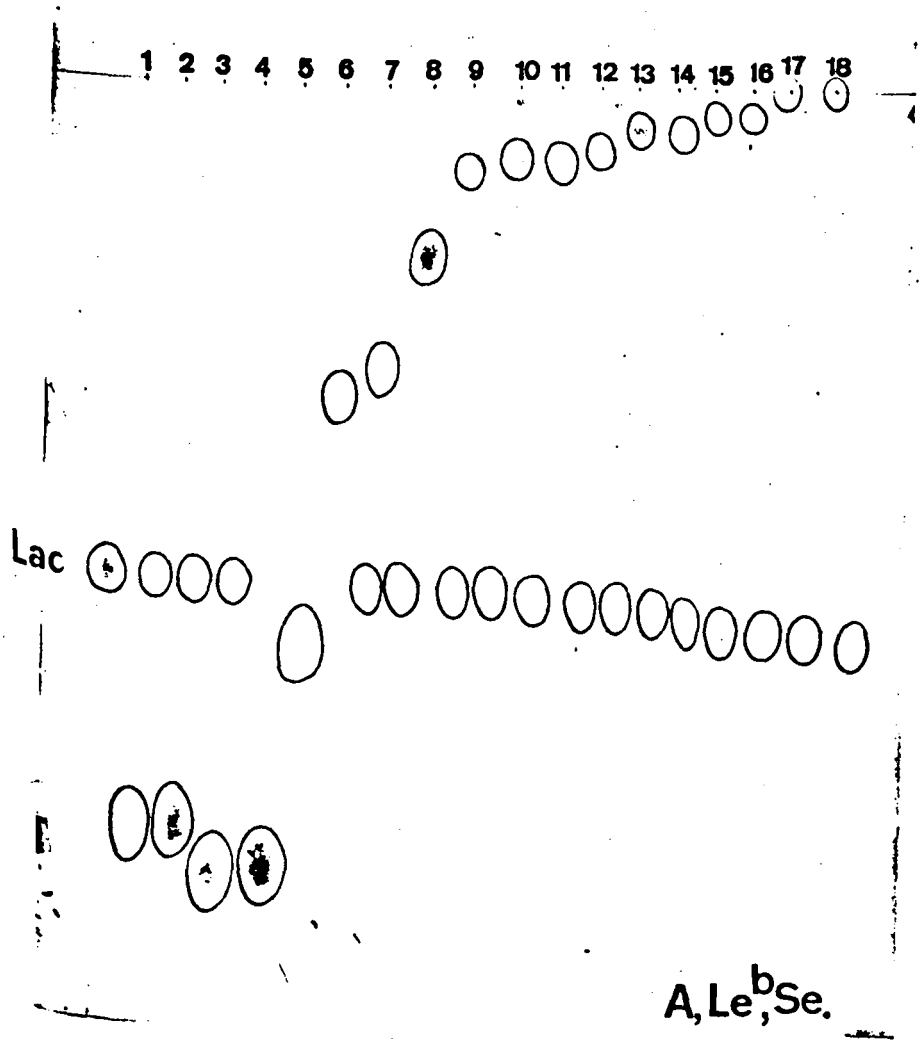


Figure 15

Chromatographie sur papier des oligosaccharides isolés de l'urine d'un sujet de phénotype A, Se, Le. Papier Whatman nº 3 ; système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) ; durée de la migration : 18 h ; révélation à l'oxalate d'aniline.

III - ETUDE DE LA STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES URINAIRES

1 - Oligosaccharides isolés de l'urine d'un sujet O, se, Le

L'urine de sujet O, se, Le ne renferme qu'un nombre peu élevé d'oligosaccharides parmi lesquels nous avons isolé un composé majeur, indiqué par une flèche dans la figure 11 (p. 83) et dénommé oligosaccharide Del. dans la suite de notre exposé (Del. : initiales du sujet O, se, Le.

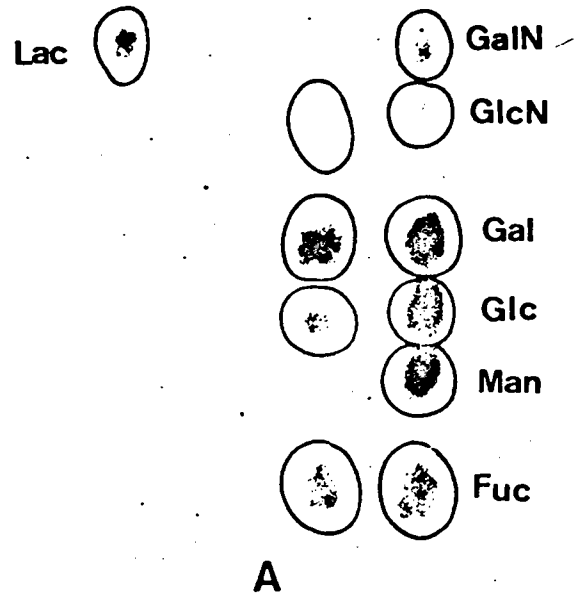
L'oligosaccharide Del. possède un comportement chromatographique identique à celui du lacto-N-difucohexaose II décrit par KUHN (207) dans la lait de femme. Nous l'avons effectivement identifié au lacto-N-difucohexaose II sur la base des résultats suivants :

a - Composition molaire et nature du glucide réducteur

L'oligosaccharide Del. renferme des hexoses et des hexosamines dans le rapport 5,25/1. L'hydrolyse chlorhydrique libère du galactose, du glucose et du fucose dans les proportions 2 : 1,15 : 2,12 (figure 16, p. 91). L'hexosamine a été identifiée à la glucosamine par chromatographie sur papier dans le système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). La réduction de l'oligosaccharide par le borohydrure de potassium provoque la disparition totale du résidu de glucose, qui portait donc la fonction réductrice du composé.

b - Hydrolyse partielle par l'acide sulfurique dilué

Les produits de l'hydrolyse ménagée de l'oligosaccharide Del. et du lacto-N-difucohexaose II du lait de femme par H_2SO_4 0,5 N à 100° pendant 15 mn ont été soumis à l'analyse chromatographique dans le système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2), durant 20 heures. Les résultats, décrits dans la figure 16 (p. 91) montrent que les oligosaccharides ainsi traités, libèrent dans des proportions



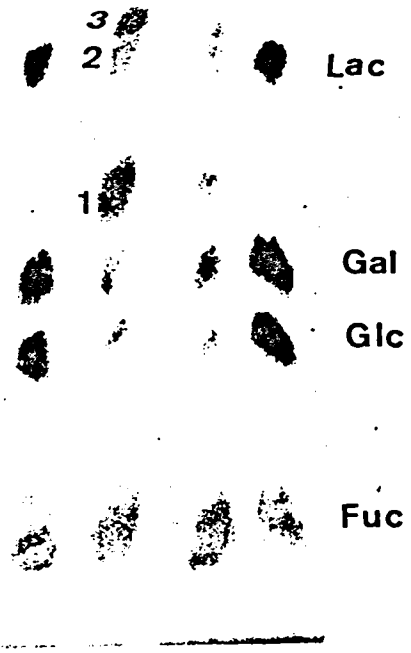


Figure 16

A – Chromatographie sur papier de l'oligosaccharide Del. (R_{Lac} = 0,155) et de ses produits d'hydrolyse (Del. H^+) par HCl 1,5 N (1,5 h ; 100º). Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). Gal N : galactosamine ; Glc N : glucosamine ; Gal : galactose : Glc : glucose ; Man : mannose ; Fuc : fucose.

B – Chromatographie sur papier des hydrolysats partiels (H_2SO_4, 0,5 N ; 100º C ; 15 mn) du lacto-N-difucohexaose I du lait de femme et de l'oligosaccharide Del. Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2) duramt 20 h ; 1 : lacto-N-biose I : 2 : lacto-N-biose II ; 3 : lactose ; 4 : lacto-N-triose II ; 5 : lacto-N-triose I 6 : lacto-N-tétraose.

identiques, du lacto-N-biose I (Gal β 1 → 3 GlcNAc), du lacto-N-biose II (GlcNAc β 1 → 3 Gal) du lactose, du lacto-N-triose II (GlcNAc β 1 → 3-Gal β 1 → 4 Glc) du lacto-N-triose I (Gal β 1 → 3 GlcNAc β 1 → 3 Gal) et du lacto-N-tétraose (Gal β 1 → 3 GlcNAc β 1 → 3 Gal β 1 → 4 Glc).

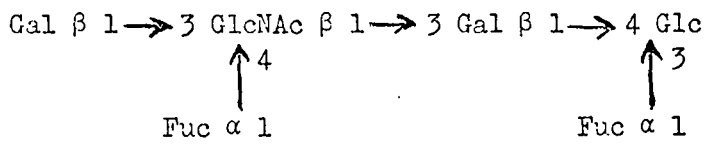
L'oligosaccharide Del. possède donc un noyau glucidique constituée par le lacto-N-tétraose.

c - Perméthylation

La perméthylation de l'oligosaccharide Del. formé conduit à la formation des éthers méthyliques suivants : méthyl -2, 3, 4 tri-O-méthylfucoside, méthyl -2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylgalactoside, méthyl-2, 4, 6-tri-O-méthylgalactoside, méthyl-2, 6-di-O-méthylglucoside et 6-mono-O-méthylglucosamine.

d - Conclusion

L'ensemble de ces résultats, associé au fait que l'oligosaccharide Del. possède en outre une activité Lewis a, permet de confirmer qu'il s'agit bien du lacto-N-difucohexaose II, dont la structure est la suivante :



2 - Oligosaccharides isolés de l'urine d'un sujet O, Se, Le.

Les quantités respectives de chaque oligosaccharide isolées à partir de 20 litres d'urine sont données dans le tableau XXVIII (p.88).

a - Oligosaccharide 1_H

L'oligosaccharide 1_H renferme du glucose et du xylose dans les proportions 1 : 1,08, et possède du glucose en position terminale réductrice. L'action de la soude 1 N, pendant 24 heures, à 20º C, libère quantitativement le xylose, comme le montre la figure 17 (p. 94) avec destruction concomittante du glucose. L'oligosaccharide 1_H correspond donc au composé suivant : Xyl α 1→3 Glc, dont la structure exacte a été précisée par LUNDBLAD et al., 1973 (208).

b - Oligosaccharide 2_H

L'oligosaccharide 2_H renferme du glucose et du fucose dans les proportions 1 : 0,96, et possède du glucose en position terminale réductrice. L'action de la soude 1 N, pendant 24 heures, à 20º C, libère totalement le fucose (Figure 17 p. 94) ce qui implique comme pour l'oligosaccharide une liaison osidique en 1→3. En outre, le résidu de fucose est libéré sous l'action de l'α-fucosidase de Turbo cornutus. L'oligosaccharide 2_H possède donc la structure suivante : Fuc α 1→3 Glc.

c - Oligosaccharide 3_H

L'oligosaccharide 3_H renferme du glucose et fucose dans les proportions 1 : 0,95 et possède le glucose en position terminale réductrice. L'action de la soude est sans effet sur ce composé, qui, d'autre part, ne réagit pas avec le réactif au chlorure de triphényl-tétrazolium, ce qui implique une liaison osidique en 1→2. L'α-fucosidase de Turbo cornutus libère comme précédemment le fucose. L'oligosaccharide 3_H possède donc la structure suivante : Fuc α 1→2 Glc.

d - Oligosaccharide 4_H

L'oligosaccharide 4_H renferme du galactose et du fucose dans les proportions 1 : 1,05 et possède le galactose en position terminale réductrice. L'action de la soude est sans effet sur cet oligosaccharide, qui ne réagit pas avec le réactif au chlorure de triphényl-tétrazolium, ce qui implique une lisaison osidique en 1→2. L'α-fucosidase de Turbo cornutus libère le fucose. L'oligosaccharide 4_H possède donc la structure suivante : Fuc α 1→2 Gal.

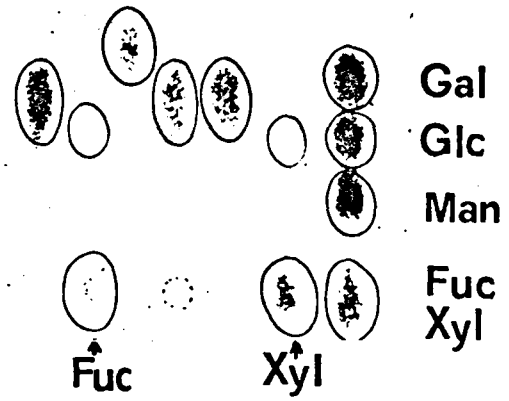


Figure 17

Chromatographie sur papier des produits obtenus par dégradation alcaline des oligosaccharides 1_H à 4_H (O, Se, Le et 1_A et 2_A (A, Se, Le)
Système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) durant 15 heures.

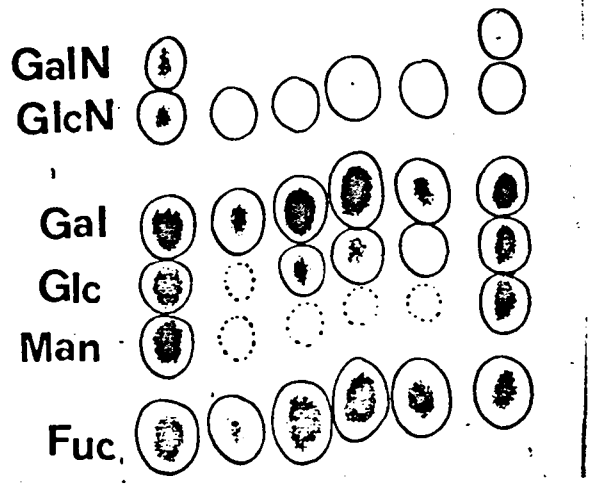


Figure 18

Chromatographie sur papier des hydrolysats chlorhydrique des oligosaccharides 21_H, 25_H, 26_H et 27_H.
Système solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3) (15 heures).

e - Oligosaccharide 5_H

Nous n'avons pas étudié la structure de l'oligosaccharide 5_H, qui renferme de la N-acétylglucosamine, du galactose et du mannose dans les proportions 1 : 1 : 0,15. Nous avons seulement noté qu'il possédait le comportement chromatographique de la N-acétyllactosamine.

f - Oligosaccharide 6_H

L'hydrolyse chlorhydrique de l'oligosaccharide 6_H ne libère que du glucose. L'hydrolyse acide ménagée (H_2SO_4 ; 0,1 N ; 100º C ; 10 mn) libère du glucose et du fructose dans des quantités équimoléculaires. L'oligosaccharide possède le comportement chromatographique du saccharose.

g - Oligosaccharide 7_H

L'oligosaccharide 7_H renferme du galactose, du glucose, du mannose et du fucose dans les proportions 0,2 : 1 : 1 : 0,16. Il s'agit donc d'un mélange de plusieurs constituants dont nous n'avons pas poursuivi l'étude.

h - Oligosaccharide 8_H

L'oligosaccharide 8_H est également constitué d'un mélange de plusieurs composés, comme en témoignent les rapports molaires en sucres : Glucose : 1 ; Fucose : 0,15.

i - Oligosaccharide 9_H

L'oligosaccharide 9_H renferme du galactose, du glucose et du fucose dans les proportions 1 : 1,08 : 0,85. Il possède le glucose en position terminale réductrice.

j - Oligosaccharide 10_H

L'oligosaccharide 10_H renferme de l'acide glycuronique et de la N-acétylglucosamine dans les proportions 1,1 : 1 et possède la N-acétylglucosamine en position terminale réductrice.

k - Oligosaccharide 11_H

Le composé 11_H possède le comportement chromatographique et les propriétés chimiques de l'acide D-glycuronique.

l - Oligosaccharide 12_H

L'oligosaccharide 12_H renferme du galactose, de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique dans les proportions 1 : 0,95 : 0,90. Il possède la N-acétylglucosamine en position terminale réductrice. L'hydrolyse ménagée par l'acide trifluoracétique 0,1 N (80º C ; 30 mn) libère un disaccharide qui possède le comportement chromatographique de la N-acétyllactosamine.

m - Oligosaccharide 13_H

L'oligosaccharide 13_H renferme du glucose et de l'acide glycuronique dans les proportions 1 : 0,92 et possède le glucose en position terminale réductrice.

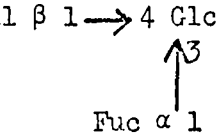
n - Oligosaccharide 14_H

L'oligosaccharide 14_H renferme du galactose, du fucose et de la N-acétylglucosamine dans les proportions 1 : 1,1 : 1.

o - Oligosaccharides 15_H et 16_H

Les oligosaccharides 15_H et 16_H renferment du galactose, du glucose et du fucose dans les proportions 1 : 1,05 : 2 et possèdent le glucose en position terminale réductrice. L'hydrolyse acide ménagée (H_2SO_4 0,1 N ; 100º C ; 20 mn) libère du lactose. L'action de la soude 1 N (18º C ; 20 h) libère du fucose, ce qui implique la présence d'un résidu fucosyl en 1→3 sur la molécule de glucose réductrice. La perméthylation des oligosaccharides 15_H et 16_H conduit à un mélange de méthyl-2,3,4 tri-O-méthylfucoside, de méthyl-3,4,6 tri-O-méthylgalactoside et de méthyl-2,6-de O-méthylglucoside.

La structure de ces oligosaccharides est donc du difucosido-lactose :



identifié précédemment par MONTREUIL, 1960 (209) dans le lait de femme et LUNDBLAD, 1968 (210) dans l'urine.

p - Oligosaccharide 17_H

L'oligosaccharide 17_H renferme du galactose, du glucose et de l'acide N-acétylneuraminique dans les proportions 1 : 1 : 0,98 et possède le glucose en position terminale réductrice. L'hydrolyse ménagée par l'acide trifluoroacétique 0,1 N (80º C ; 30 mn) libère du lactose.

q - Oligosaccharide 18_H

L'oligosaccharide 18_H renferme du galactose, de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylneuraminique dans les proportions 0,90 : 1 : 0,98. L'hydrolyse acide ménagée (acide trifluoroacétique 0,1 N 80º C ; 30 mn) libère de la N-acétyllactosamine.

r - Oligosaccharide 19_H

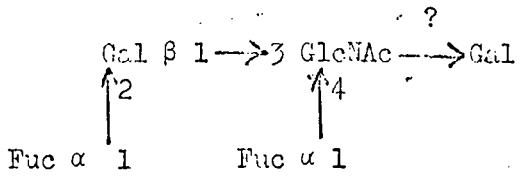
L'oligosaccharide 19_H renferme du galactose, du glucose, du mannose, du fucose et de la N-acétylglucosamine dans les proportions 1 : 1,15 : 0,90 : 1,08 : 1 et possède du glucose en position terminale réductrice. Les faibles quantités de substrat isolé ne nous ont pas permis de pousser plus loin son étude, d'autant que la présence simultanée dans une même molécule de glucose et de mannose, laisse supposer qu'il s'agit d'un mélange de plusieurs constituants.

s - Oligosaccharide 20_H

L'hydrolyse chlorhydrique de l'oligosaccharide 20_H libère du galactose, du glucose, du mannose, du fucose et de la N-acétylglucosamine dans les proportions 2 : 0,8 : 2,12 : 2,20 : 1. Il s'agit d'un mélange de plusieurs composés puisque cet oligosaccharide possède le comportement chromatographique d'un penta ou hexasaccharide.

t - Oligosaccharide 21_H

L'oligosaccharide 21_H (Figure 18 p. 94) renferme du galactose, du fucose, et la N-acétylglucosamine dans les proportions 2 : 1,95:1 et possède du galactose en position terminale réductrice. Le fait qu'il soit doué d'activité Lewis ^{b} permet de supposer une structure du type :

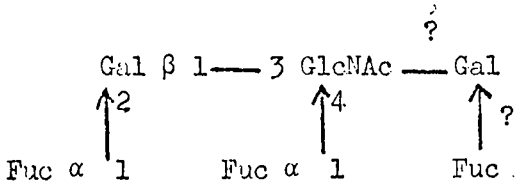


u - Oligosaccharide 22_H

L'oligosaccharide 22_H renferme su galactose, du glucose, du mannose, du fucose et de la N-acétylglucosamine dans les proportions 2 : 1,1 : 0,9 : 1,88 : 1. L'oligosaccharide 22_H qui possède le comportement chromatographique d'un penta ou hexasaccharide n'est donc en réalité qu'un mélange de plusieurs constituants.

v - Oligosaccharide 23_H

L'oligosaccharide 23_H renferme du galactose, du fucose et de la N-acétylglucosamine dans les proportions 2 : 3,12 : 1 et possède le galactose en position terminale réductrice. Compte tenu du fait qu'il possède une activité Lewis ^{b}, nous pouvons admettre qu'il possède une structure du type :



w - Oligosaccharide 24_H

L'oligosaccharide 24_H renferme du galactose, du xylose, de la N-acétylgalactosamine et de l'acide glycuronique dans les proportions 2,1 : 1 : 1 : 1 (Figure 19 p. 99) et possède le xylose en position terminale réductrice. Il correspond donc probablement à un fragment de chondroïtine sulfate (4 ou 6) et sa structure présumée est la suivante :

GalNAc β 1 → 4 GlcA β 1 → 3 Gal β 1 → 4 Gal β 1 → 4 Xyl

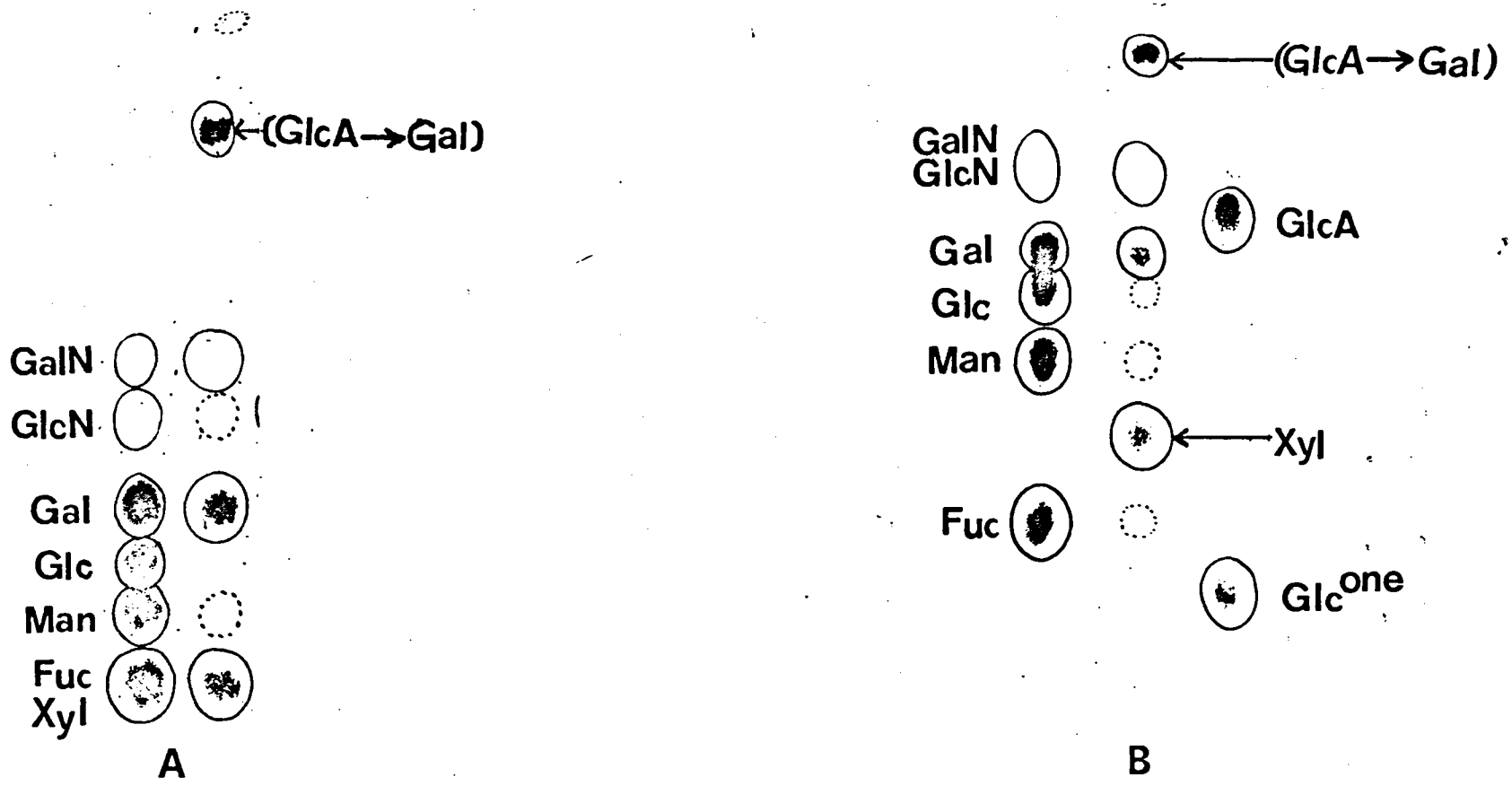


Figure 19

Chromatographie sur papier d'hydrolysat acide (ATFA 4 N : 4 h ; 100º C) de l'oligosaccharide 24_H.

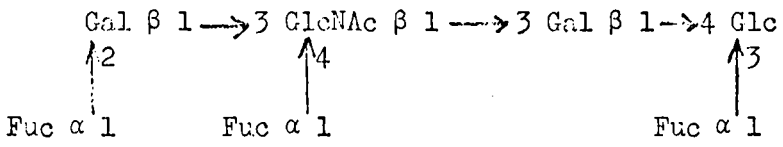
Systèmes-solvants : A : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3).

B : n-butanol/acide acétique/eau.

BIBLIOTHEQUE

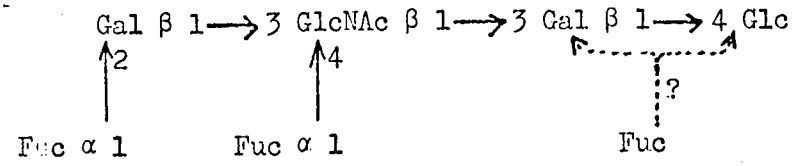
x - Oligosaccharide 25_H

L'oligosaccharide 25_H (Figure 18 p. 94) renferme du galactose, du glucose, du fucose et de la N-acétylglucosamine dans les proportions 2,14 : 1 : 3,11 : 1 et possède du glucose en position terminale réductrice. L'hydrolyse partielle par l'acide sulfurique dilué (H_2SO_4 0,5 M ; 100° C ; 15 mn) libère du lacto-N-tétraose et ses produits de dégradation : lacto-N-bioses I et II, lactose et lacto-N-trioses I et II (Figure 20 p. 101). La perméthylation de l'oligosaccharide 25_H conduit à un mélange de méthyl-2,3,4 tri-O-méthylfucoside, méthyl-3,4,6-tri-O-méthylgalactoside, méthyl 2,4,6 - tri-O-méthylgalactoside, méthyl-2,6 - di-O-méthylglucoside et 6-mono-O-méthyl glucosamine. L'oligosaccharide 25_H (voir tableau XXXI p.108) possède en outre une activité Lewis ^{b}. L'ensemble de ces résultats permet donc de lui attribuer la strcuture suivante :



y - Oligosaccharide 26_H

L'oligosaccharide 26_H (Figure 18 p. 94) renferme du galactose, du glucose, du fucose et de la N-acétylglucosamine dans les proportions 2,21 : 0,9 : 3 : 1 et possède du glucose en position terminale réductrice. L'hydrolyse ménagée par l'acide sulfurique dilué libère, comme dans le cas de l'oligosaccharide 25, du lacto-N-tétraose et ses produits de dégradation (Figure 20 p. 101). Compte tenu du fait qu'il est également doué d'activité Lewis ^{b}, nous pouvons proposet la structure partielle suivante :



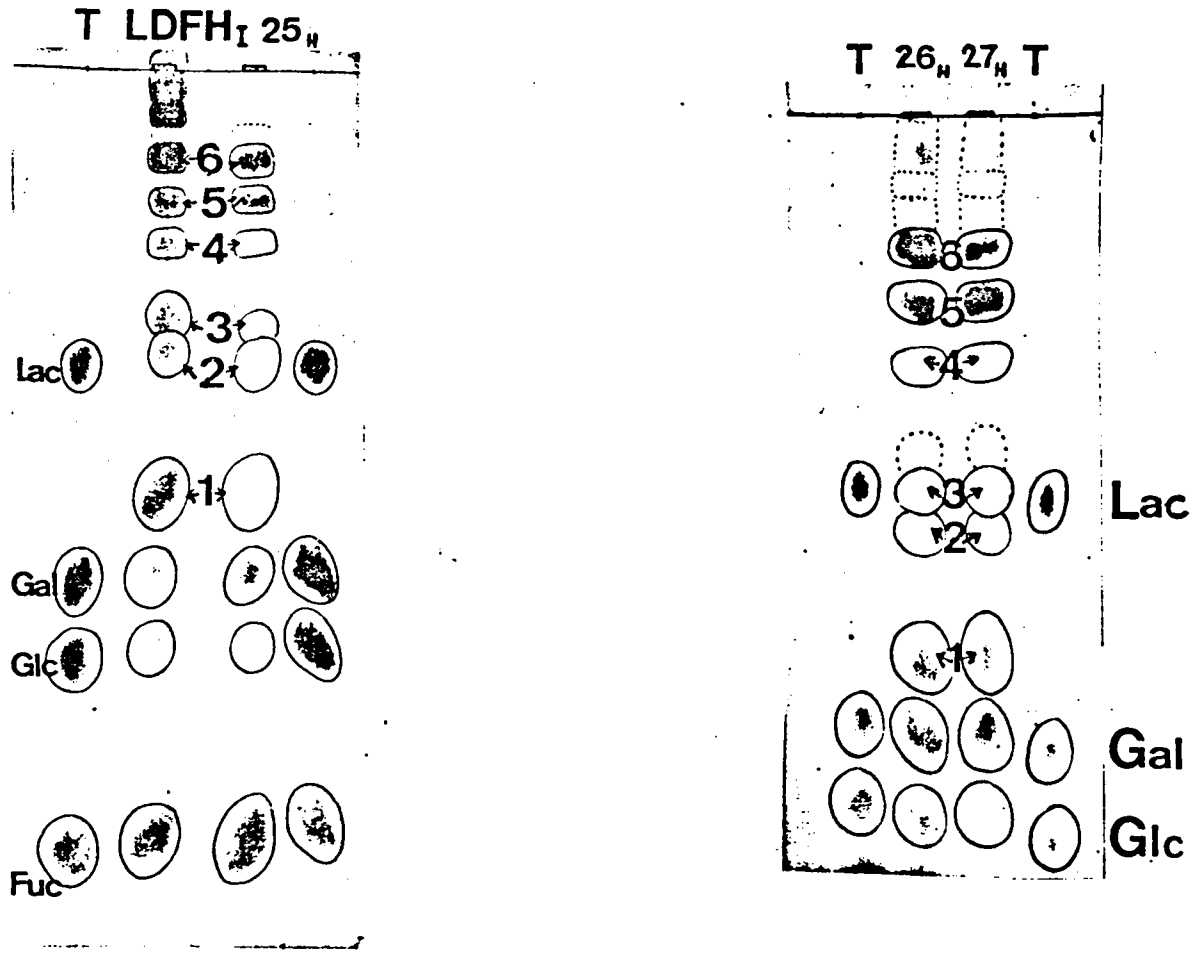


Figure 20

Chromatogramme sur papier des hydrolysats partiels (R 50 0,5 N ; 100° C ; 15 min) du lacto-N-difucohexaose I

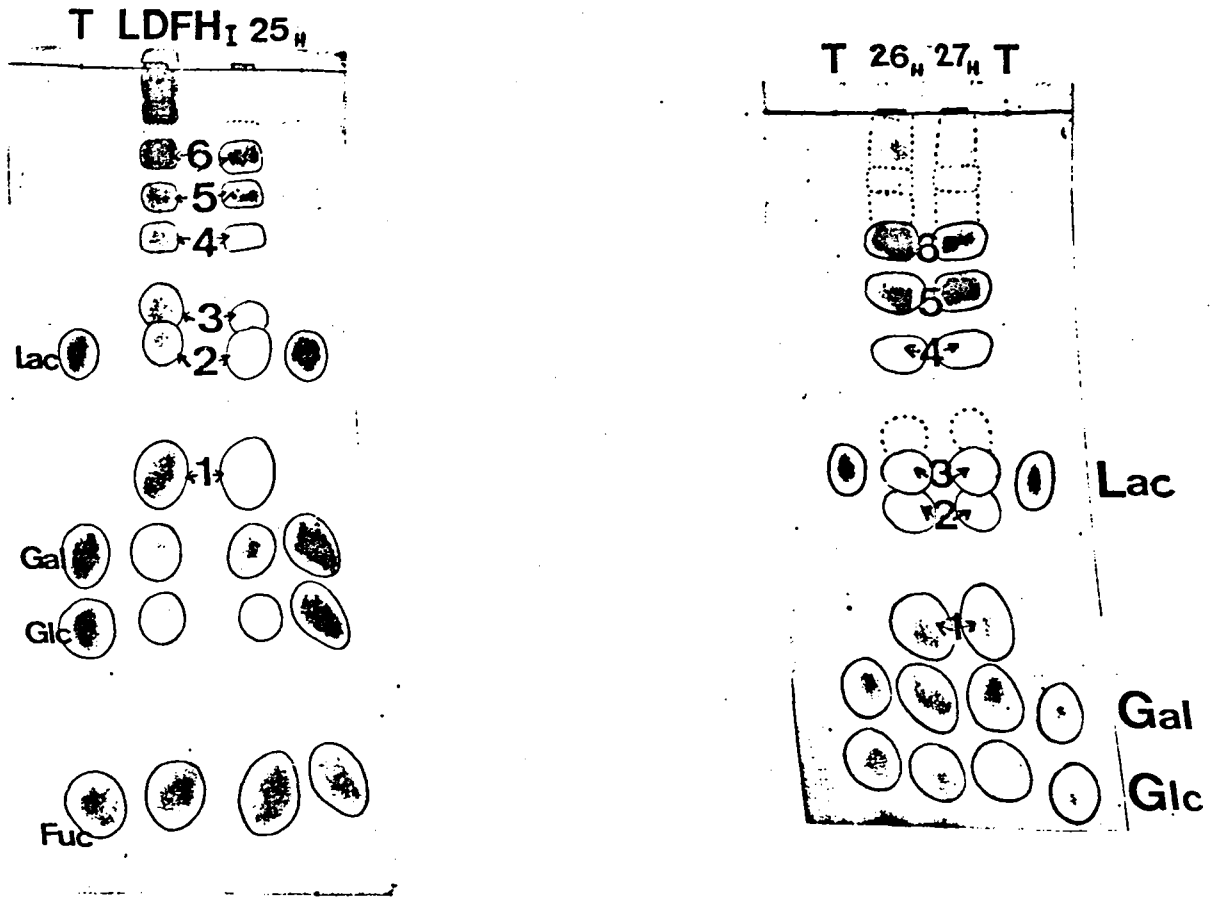
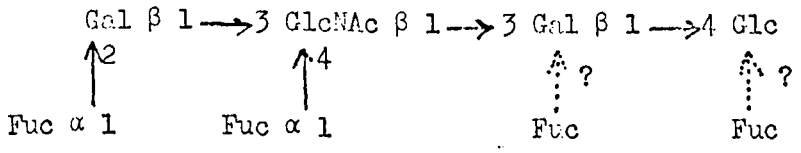


Figure 20

Chromatographie sur papier des hydrolysats partiels (H_2SO_4 0,5 N ; 100º C ; 15 min) du lacto-N-difucohexaose I (LDFH$_I$ du lait de Femme et des oligosaccharides urinaires 25$_H$, 26$_H$ et 27$_H$. Système-solvant : acétate d'éthyle/ pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3à (20 h) 1 : lacto-N-biose I ; 2 : lacto-N-biose II ; 3 : lactose 4 : lacto-N-triose I ; 5 : lacto-N-triose II ; 6 : lacto-N-tétraose.

z - Oligosaccharide 27_H

L'oligosaccharide 27_H (Figure 18 p. 94) renferme du galactose, du glucose, du fucose et de la N-acétylglucosamine dans les proportions 2,20 : 0,93 : 4,05 et possède du glucose en position terminale réductrice. L'hydrolyse ménagée par H_2SO_4 dilué libère du lacto-N-tétraose (Figure 20 p. 101) et il est doué d'autre part, d'activité Lewis ^{b}. Sa structure probable est donc du type :



3 - Oligosaccharides isolés de l'urine d'un sujet A, Se, Le.

Les quantités respectives de chaque oligosaccharide isolées à partir de 20 litres d'urine sont données dans le tableau XXIX (p. 103). Nous n'avons pas abordé l'étude des oligosaccharides acides (à acide glycuronique ou à acide N-acétylneuraminique).

a - Oligosaccharides 1_A et 2_A

Les oligosaccharides 1_A et 2_A renferment du glucose et du fucose dans les proportions 1 : 1 et possèdent le glucose en position terminale réductrice. Ils ne réagissent pas avec le réactif au chlorure de triphényltétrazolium. Le fucose est hydrolysé par l'α fucosidase de *Turbo cornutus*. Ils possèdent donc la structure suivante : Fuc α 1 → 2 Glc.

b - Oligosaccharide 3_A

L'oligosaccharide 3_A renferme du glucose et du xylose dans les proportions 1 : 0,96 et possède le glucose en position terminale réductrice. L'action de la soude 1 N pendant 24 heures à 20º C libère quantitativement le xylose. L'oligosaccharide 3_A correspond donc au composé 1_H décrit précédemment dont la structure est la suivante : Xyl α 1 → 3 Glc.

	Quantité isolée	R_{Lac} (*)	Gal	Glc	Man	Fuc	Xyl	$GalNH_2$	$GlcNH_2$	Glucide réducteur
1	12 mg	1,51		1		1,02				Glc
2	28 mg	1,50		1		1,05				Glc
3	42 mg	1,59		1			0,96			Glc
4	8 mg	1,56		1						Glc
5	42 mg	1,12	1			0,95		1		Gal
6	11 mg	0,62	0,5	1	0,4	0,8		+	++	
7	17 mg	0,57	1	1		2,1				Glc
8	105 mg	0,33	1	1,08		2,1		1		Glc
9	4 mg	0,17	2	1,11		1,96		1	1,05	Glc
10	12 mg	0,14	1,92	0,9		2		1	1,25	Glc
11	16 mg	0,14	2	0,1	0,9	2,1		1	1,1	
12	12 mg	0,12	2,1	0,95	1	2,2		1	1,16	
13	32 mg	0,08	2	1,02		2,26		1	0,92	Glc
14	8 mg	0,08	2	0,87	0,28	2,30		1	1,2	Glc
15	22 mg	0,05	1,84	1,12		3		1	1,16	Glc
16	11 mg	0,05	2,4	1	0,8	3,1		1	1,32	Glc
17	16 mg	0,01	3	1	0	3,16		1	1,6	Glc
18	36 mg	0,01	3	0,9		3,2		1	1,7	Glc

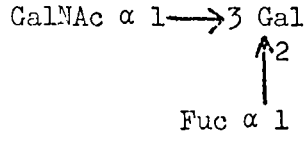
(*) R_{Lac} : Vitesse de migration dans le système-solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3)

c - Oligosaccharide 4_A

L'oligosaccharide 4_A renferme du glucose et du fucose dans les proportions 1 : 0,98 et possède le glucose en position terminale réductrice. L'action de la soude libère totalement le fucose, comme dans le cas de l'oligosaccharide 2_{II}, dont il possède le même comportement chromatographique Le fucose est également libéré sous l'action de l'α-fucosidase de *Turbo cornutus*. Le composé 4_A possède donc la structure suivante : Fuc α 1 ⟶ 3 Glc.

d - Oligosaccharide 5_A

L'oligosaccharide 5_A renferme du galactose, du fucose et de la N-acétylgalactosamine dans les rapports 1 : 0,95 : 1 et possède du galactose en position terminale réductrice. Il ne réagit pas avec le réactif au chlorure de triphényltétrazolium. La perméthylation conduit à un mélange de méthyl-2,3,4 tri-O-méthylfucoside, méthyl-4,6 - di-O-méthylgalactoside. L'hydrolyse acide ménagée (H_2SO_4 0,1 N ; 100° C ; 5 mn) conduit à un dissaccharide renfermant du galactose et de la N-acétylgalactosamine et réagissant cette fois avec le chlorure de triphényltétrazolium, ce qui implique que le fucose était précédemment lié sur le carbone n° 2 du galactose. L'oligosaccharide 5_A possède enfin une activité de groupe sanguin H et A, ce qui permet de préciser sa structure complète :

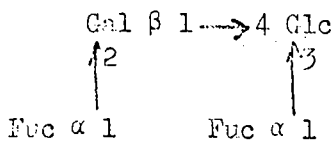


e - Oligosaccharide 6_A

L'oligosaccharide 6_A est constitué par un mélange de plusieurs constituants, comme en témoignent les valeurs des rapports molaires en glucides (Tableau XXIX p. 103).

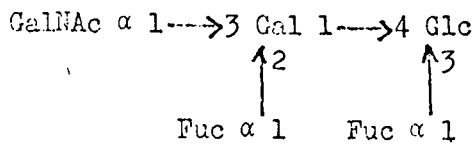
f - Oligosaccharide 7_A

L'oligosaccharide 7_A renferme du galactose, du glucose et du fucose dans les proportions 1 : 1 : 2,1 et possède le glucose en position terminale réductrice. Son comportement chromatographique est celui de 15_H. Il s'agit donc du difucolactose :



g - Oligosaccharide 8_A

L'oligosaccharide 8_A renferme du galactose, du glucose du fucose et de la N-acétylgalactosamine dans les proportions 1 : 1,08 : 2,1 : 1 et possède du glucose en position terminale réductrice. La perméthylation de 8_A conduit à un mélange de méthyl-2,3,4 - tri-O-méthylfucoside, de méthyl-4,6 - di-O-méthylgalactoside et de méthyl-2,6 -di-O-méthylglucoside. Il possède en outre une activité de groupe sanguin A. Sa structure est donc la suivante :

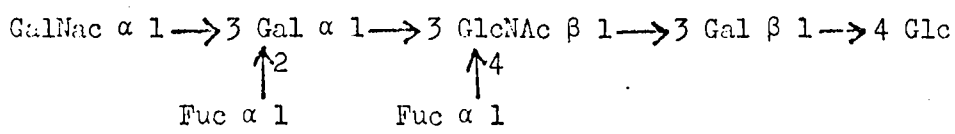


h - Oligosaccharide 9_A

L'oligosaccharide 9_A renferme du galactose, du glucose du fucose, de la N-acétylgalactosamine et de la N-acétylglucosamine dans les proportions 2 : 1,11 : 1,96 : 1 : 1,05 et possède du glucose en position terminale réductrice.

i - Oligosaccharide 10_A

L'oligosaccharide 10_A renferme du galactose, du glucose, du fucose, de la N-acétylgalactosamine et de la N-acétylglucosamine dans les proportions 1,92 : 0,9 : 2 : 1 : 1,25 et possède du glucose en position terminale réductrice. La perméthylation de 10_A conduit à un mélange de méthyl-2,3,4 - tri-O-méthylfucoside, de méthyl-2,4,6- tri-O-méthylgalactoside de méthyl-2,3,6- tri-O-méthylglucoside, de méthyl-4,6 - di-O-méthylgalactoside, de 3,4,6- tri-O-méthylgalactosamine et de 6-mono-O-méthylglucosamine. En outre, l'oligosaccharide 10_A possède une activité Le^b, ce qui permet en définitive de proposer la structure suivante :



j - Oligosaccharides 11_A à 18_A

Les 8 oligosaccharides suivants sont des oligosaccharides de haut poids moléculaire (7 à 10 résidus de monosaccharides), qui renferment en proportions variables du galactose, du glucose, du mannose, du fucose, de la N-acétylgalactosamine et de la N-acétylglucosamine (Tableau XXIX p. 103). Tous possèdent une activité Lewis^b.

4 - Activités de groupes sanguins des oligosaccharides urinaires

Les propriétés immunochimiques de la plupart des oligosaccharides urinaires sont décrites dans le tableau XXXI. Dans le cas de l'urine du sujet de phénotype O, Se, Le, la plupart des sucres possèdent une très forte activité Le^b. Les oligosaccharides isolés de l'urine du sujet A, Se, Le, possèdent également une activité Le^b, cependant très faible par rapport au sucre de référence (Lacto-N-difucohexaose I du lait de Femme). C'est le cas en particulier des constituants 11_A à 18_A, qui renferment 7 à 10 résidus de monosaccharides, dont 3 à 4 molécules de fucose. L'activité A de ces glucides n'apparaît qu'après hydrolyse sélective des résidus fucosyl par l'acide sulfurique dilué.

^{2}H: α-L-Fuc (1→3) — D-Glc

^{3}H: α-L-Fuc (1→2) — D-Glc

^{4}H: α-L-Fuc (1→2) — D-Gal

^{15}H:

α-L-Fuc (1→2) — β-D-Gal (1→4) \
D-Glc
α-L-Fuc (1→3) /

^{21}H:

α-L-Fuc (1→2) — β-D-Gal (1→3) \
D-GlcNAc (1→?) — D-Gal
α-L-Fuc (1→4) /

^{23}H:

α-L-Fuc (1→2) — β-D-Gal (1→3) \
D-GlcNAc (1→?) \
α-L-Fuc (1→4) / D-Gal
α-L-Fuc (1→?) /

^{25}H:

α-L-Fuc (1→2) β-D-Gal (1→3) \
β-D-GlcNAc (1→3) β-D-Gal (1→4) \
α-L-Fuc (1→4) / D-Glc
α-L-Fuc (1→3) /

^{26}H: 2 Fucoses

α-L-Fuc (1→2) β-D-Gal (1→3) \
β-D-GlcNAc (1→3) \
^{27}H: 3 Fucoses α-L-Fuc (1→4) / β-D-Gal (1→4) \
α-L-Fuc (1→?) ⇢ D-Glc

^{2}A: α-D-Xyl (1→3) — D-Glc

^{4}A: α-L-Fuc (1→3) — D-Glc

^{5}A:

α-D-GalNAc (1→3) \
D-Gal
α-L-Fuc (1→2) /

^{7}A:

α-L-Fuc (1→2) — β-D-Gal (1→4) \
D-Glc
α-L-Fuc (1→3) /

^{8}A:

α-D-GalNAc (1→3) \
β-D-Gal (1→4) \
α-L-Fuc (1→2) / D-Glc
α-L-Fuc (1→3) /

^{10}A:

α-D-GalNAc (1→3) \
β-D-Gal (1→3) \
α-L-Fuc (1→2) / β-D-GlcNAc (1→3) β-D-Gal (1→4) D-Glc
α-L-Fuc (1→4) /

O, sa, Le

Del:

β-D-Gal (1→3) \
β-D-GlcNAc (1→3) β-D-Gal (1→4) \
α-L-Fuc (1→4) / D-Glc
α-L-Fuc (1→3) /

Désignation de l'oligosaccharide (*)	A	H (sérum d'anguille)	Le^a	Le^b
Del	ND	1000	16	500
3_H et 1_A	ND	10	ND	ND
4_H	ND	10	ND	ND
15_H et 7_A	ND	250	300	50
21_H	ND	500	ND	1,5
23_H	ND	500	ND	1,5
25_H	ND	500	250	0,75
26_H	ND	500	ND	1,5
5_A	20	10	ND	ND
8_A	180	250	500	250
10_A	500	1000	ND	100
10_A traité par H_2SO_4 0,1N (100º C, 15 minutes)	180	ND	ND	ND
11_A à 18_A				100 à 200
Lacto-N-difucohexaose du lait de femme	ND	500	250	1,5

(*) : Les structures de ces oligosaccharides sont données dans le tableau XXX (p.)

C - CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS

Le tableau XXX (p. 107) rassemble les structures des oligosaccharides urinaires qu'il nous a été possible d'étudier. L'établissement des structures des composés 11_A à 18_A (Tableau XXIX p.103) nécessitera en effet la mise en oeuvre de méthodes très fines d'analyses, de manière à conserver suffisamment de substrat pour entreprendre ensuite leur étude immuno-chimique.

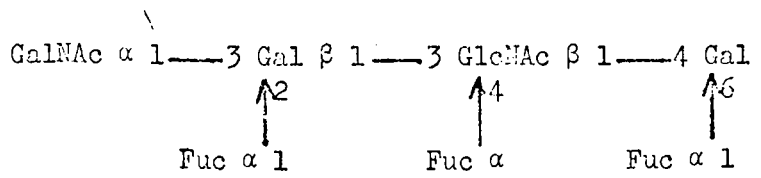
Nos résultats montrent nettement qu'il existe une analogie de structure entre les oligosaccharides du lait de Femme (Tableau VI p. 26) et ceux de l'urine, et, dans ce dernier cas, indifféremment du sexe de l'individu. L'étude comparée de la structure des oligosaccharides de sujets de phénotypes différents montre d'autre part que la présence de ces sucres est étroitement liée aux génotypes ABH, Le et Se.

La parfaite identité de structure entre oligosaccharides du lait et de l'urine n'existe que pour les composés 15_H (ou 7_A) et Del (Lacto-N-difucohexaose II). Toutefois, les oligosaccharides 25_H, 26_H et 27_H peuvent être comparés à des oligosaccharides du lait, la seule différence consistant dans leur degré de substitution par des résidus de fucose. L'oligosaccharide 25_H, par exemple, correspond à une combinaison des lacto-N-difucohexaoses I et II du lait de Femme.

Dans les urines de sujets de groupe A Se Le, nous retrouvons des structures analogues, mais substituées en outre par un résidu supplémentaire de N-acétylgalactosamine, contrairement à ce que nous observons dans le lait de Femme.

Nous pouvons donc, en définitive, considérer les oligosaccharides de l'urine comme étant les formes plus achevées des oligosaccharides du lait.

L'étude immunochimique a fourni des résultats conformes, en général, aux connaissances que nous avons de la structure des déterminants antigéniques des substances A, H et Lewis. Toutefois, il est intéressant de constater que l'oligosaccharide 10_A ne possède pas d'activité A, bien que renfermant un résidu de N-acétylgalactosamine externe. Cette activité est restaurée, d'ailleurs, après hydrolyse sélective des liaisons fucosyl. L'activité Lewis b de 10_A natif est elle-même très faible. Ce même phénomène a été décrit par STRECKER, 1973 (211) pour l'oligosaccharide de structure suivante :



et la comparaison de nos résultats permet de conclure que dans ce dernier cas l'inhibition de l'activité A n'était pas dûe à la présence du résidu Fucosyl α (1→6) absent chez le composé 10_A.

Nous confirmons donc l'existence d'une interaction entre l'expression des activités A et Le^b lorsque ces dernières coexistent dans une même molécule.

Nous savons toutefois que des substances antigéniques porteur du déterminant du type I (Gal β 1-->3 GlcNAc) sont absentes sur la surface de l'hématie (HAKOMORI, 1972 (212)).

La plupart des structures des oligosaccharides du lait et de l'urine sont en tous points comparables à celles des antigènes glycolipidiques de membranes. Certes, bon nombre de ces structures oligosaccharidiques n'ont pas encore été décrites parmi les constituants membranires, mais les travaux récents de HAKOMORI, 1972 (213) et de KOSCIELAK, 1973 (214) permettent d'identifier des composés glycolipides à copule glucidique de plus en plus complexe, et ces résultats permettent de poser en hypothèse qu'en définitive, les oligosaccharides des milieux biologiques correspondent probablement à des structures glycolipidiques qui seront ultérieurement décrites.

Pour ces raisons, d'ailleurs, les oligosaccharides de l'urine ont souvent été considérés comme les produits du catabolisme des glycolipides correspondant, ce qui implique l'existence d'une endo-β-glucosidase qui libérerait dans son intégralité la copule glucidique. Cette notion n'est pas conforme, toutefois, à ce que nous savons du catabolisme des glycolipides, tel qu'il a pu être étudié à propos des maladies lysosomales, où l'absence d'une seule exo-glycosidase (α-fucosidase, α-galactosidase, β-galactosidase, β-N-acétylhexosaminidase) provoque l'accumulation de quantités massives de glycolipides dans les tissus humains.

Aussi pensons-nous plutôt, avec STRECKER et al. 1973 (215) que les oligosaccharides de l'urine sont les produits de transglycosylation sur le glucose, et cette hypothèse est justifiée par les observations suivantes :

- Les urines de sujets hyperglycémiques renferment des quantités nettement élevées (5 à 10 fois le taux normal) d'oligosaccharides qui existent en faible quantité dans les urines de sujets sains (Tableau X p. 31) et Figure 21 p.112). Tous ces sucres possèdent du glucose en position terminale réductrice.

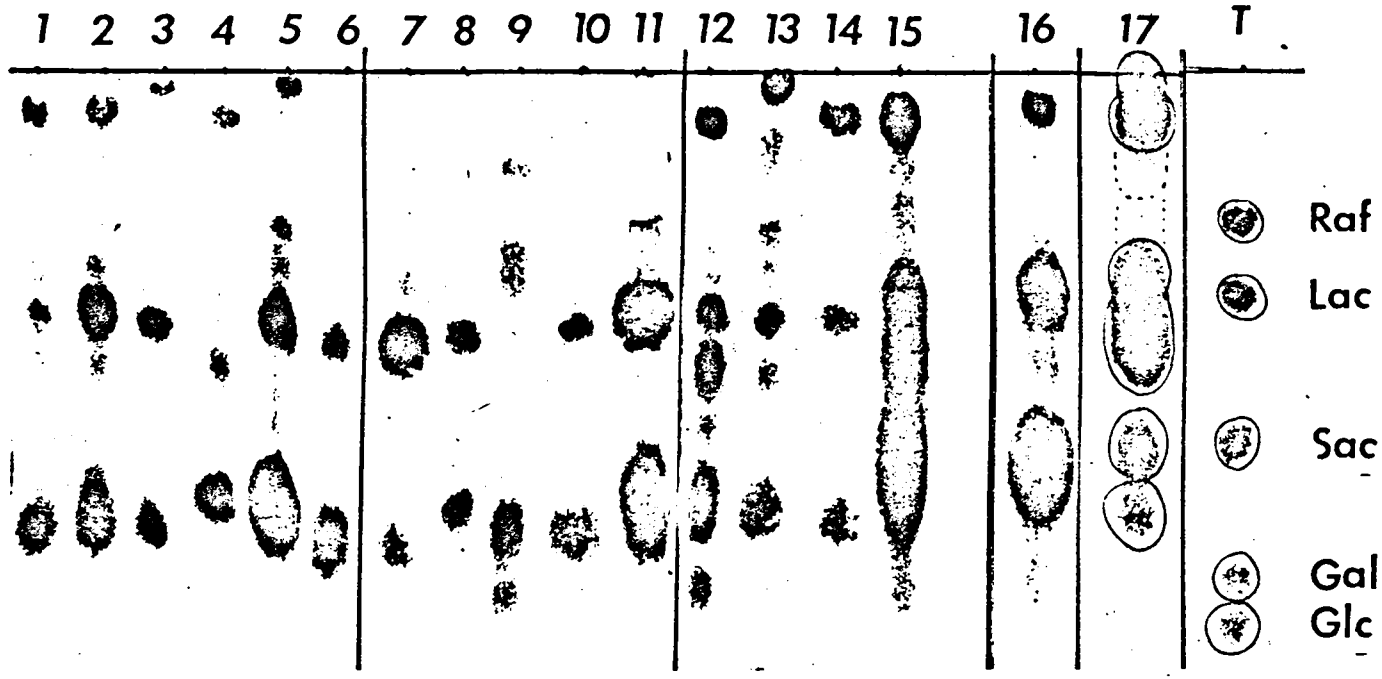


Figure 21

Chromatographie sur papier des oligosaccharides urinaires de sujets sains et méliturigues - 1 à 6 : sujets sains de groupe A ; 7 à 11 : sujets sains de groupe O ; 12 à 15 : sujets diabétiques de groupe A ; 16 : sujet diabétique de groupe B ; 17 : lactosurie provoquée chez un sujet de groupe A.

Conditions de la chromatographie : papier Whatman nº 3 ; système-solvant : n-butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) (4 jours) ; révèlation à l'oxalate d'aniline.

- L'épreuve de lactosurie provoquée s'accompagne de l'élévation du taux des oligosaccharides urinaires, qui possèdent tantôt du glucose (en réalité du lactose), tantôt du galactose en position terminale réductrice.

Ces observations ont donc permis à STRECKER et al. 1973 (216) de conclure que les surcharges glucidiques déclenchent, par un mécanisme régulateur qui reste à déterminer, des réactions de transglycosylation qui s'effectuent sur les glucides "inducteurs" (glucose, lactose, ou galactose). Ces réactions conduisent à la formation d'oligosaccharides dont la structure dépend étroitement des systèmes glycosyltransférasiques normalement impliqués dans la biosynthèse des substances de groupe sanguin. Il est d'ailleurs vraisemblable qu'un mécanisme identique de transglycosylation sur le lactose soit à l'origine, dans la glande mamaire, des oligosaccharides du lait de Femme, qui présentent, comme nous l'avons démontré, des analogies structurales avec les oligosaccharides de l'urine.

Dans les conditions physiologiques normales, le glucose est le seul monosaccharides libre de l'organisme, et sa présence presque exclusive explique que la plupart des oligosaccharides excrétés dans l'urine normale possède ce glucide en position terminale réductrice. Toutefois, l'urine humaine normale renferme également de très faibles quantités d'oligosaccharides à galactose réducteur, comme c'est le cas pour les composés 4_H, 21_H, 23_H et 5_A (Tableau XXX p.107).

Le lieu de synthèse de ces oligosaccharides demeure par contre inconnu. Les constituants urinaires ne sont en effet probablement pas d'origine sérique, puisqu'il a été montré par SCHENKEL-BRUNNER et al., (217) que l'α (1—>2) fucosyltransférase du sérum était présente même chez les sujets de génotype se/se, alors que la présence de sucres urinaires à activité de groupes sanguins est au contraire dépendante du génotype Se/Se. Le lieu de synthèse des oligosaccharides urinaires est donc à rechercher au niveau des tissus soumis à l'action du système génétique Se/se, comme c'est le cas en particulier des glandes salivaires et de la couche la plus superficielle de la muqueuse gastro-intestinale.

CONCLUSIONS GENERALES

Le fractionnement de quantités importantes d'urines recueillies chez des sujets de phénotype de groupes sanguins connus nous a permis d'isoler plus d'une quarantaine d'oligosaccharides et de déterminer la structure de 18 d'entre eux. Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude sont les suivantes :

1) La structure de la plupart des oligosaccharides de l'urine humaine est directement liée au groupe sanguin de l'individu (systèmes A, B, H, Se et Le).

2) Les analogies de structure qu'ils présentent avec les oligosaccharides du lait de Femme permettent de poser en hypothèse que les uns et les autres sont synthétisés par des systèmes glycosyltransférasiques identiques.

3) L'origine des oligosaccharides n'est probablement pas liée au catabolisme des glycolipides, mais paraît plutôt associée à des phénomènes de transglycosylation qui s'effectuent sur le glucose libre lui-même. Cette hypothèse est en tout cas la plus plausible pour expliquer les observations effectuées par STRECKER et al. 1973 (218) à propos des mélituries qui s'accompagnent d'une élèvation importante du taux des oligosaccharides urinaires.

4) Les structures des oligosaccharides urinaires sont de toute façon identiques ou voisines de celles des copules glucidiques des glycolipides des tissus glandulaires. Bien que n'étant pas des produits du catabolisme de ces derniers leur étude n'en demeure pas moins très intéressante dans la mesure où ils constitueront de précieux modèles moléculaires qui seront utilisés dans le cadre de travaux d'ordre immunochimique.

Enfin, l'urine renferme également un nombre considérable d'oligosaccharides qui renferment simultanément du fucose et de l'acide sialique et dont nous n'avons pas abordé l'étude.

Une étape ultérieure des travaux entrepris sur les constituants glucidiques urinaires consistera donc à étudier cette nouvelle classe de composés, tant d'un point de vue structural qu'immunochimique, et à rechercher parmi ces derniers de nouvelles activités de groupes sanguins appartenant à d'autres systèmes comme les systèmes Rhésus, MN, Ii, pour ne citer que les plus importants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDERSON, A., SEMO, N., SAMPSON, P., RILEY, J.G., HOFFMAN, P., & MEYER, K., 1964, J. Biol. Chem. 239, 2716 (100, p. 32).
- ANDO, S., & YAMAKAWA, T., 1973, J. Biochem., 73, 387 (108, p. 33; 112, p. 35; 113, p. 34; 114, p. 36).
- ANDO, S., KON, K., ISOBE, M., & YAMAKAWA, T., 1973, J. Biochem., 73, 893 (115, p. 36).
- BALLOU, C.E., 1954, Advan. Carbohydrate. Chem., 9, 91 (202, p. 74).
- BELCHER, R., NUTTENT, A.J., & SAMBROCK, C.N., 1954, Analyst., 79, 201 (194, p. 72).
- CARLSON, D.M., IYER, R.N., & MAYO, J., 1970, In "Blood and Tissue antigens" ed : D. AMINOFF, Academic Press, New-York, p. 229 (161, p. 63).
- CEPPELLINI, R., 1955, Proc. Intern. Blood Transfusion, 5th, Paris, p. 207 (12, p. 3; 14, p. 3).
- CEPPELLINI, R., 1959, In "Biochemistry of human genetics" Ciba Foundation Symposium p. 242 (Churchill, London), (15, p. 3).
- COHN, W.E., 1957, In "Methods in Enzymology" ed : S.P. COLOWICK & N.O. KAPLAN, Academic Press, New-York, 3, 724 (179, p. 67).
- COOK, G.M.W., & EYLAR, E.H., 1965, Biochim. Biophys. Acta., 101, 57 (54, p. 18)
- DATE, J.W., 1958, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 10, 149 (61, p. 22).
- DATE, J.W., 1958, J. Clin. Lab. Invest., 10, 149 (198, p. 72).
- DELAUTRE, M., 1972, D E A, Faculté des Sciences de Lille (79, p. 27; 83, p. 25).
- DENT, C.E., 1933, Biochem. J. 27, 1824 (182, p. 70; 206, p. 76).
- DISCHE, Z., 1947, J. Biol. Chem., 167, 189 (192, p. 71).

- FISCHER, F.G., & NEMEL, H.G., 1955, Z. Physiol. Chem., 302, 10 (184, p. 70; 196, p. 72; 200, p. 73).

- FOURNET, B., 1973, Recherches sur la méthylation des glucides. Thèse Sciences, Lille (202*, p. 74).

- FOURNET, B., LEROY, Y., & MONTREUIL, J., 1973, Colloque International du CNRS sur les glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973 (203*, p. 76).

- GINSBURG, V., KOBATA, A., HICKEY, C., & SAWICKA, T., 1971, In "Glycoproteins of blood cells and plasma" ed : G.A. JAMIESON & GREEWALT T.J., J.B. LIPPINCOTT COMPANY, Philadelphia (89, p. 25).

- GLAUERT, A.M., & LUCY, J.A., 1968, In "The Membranes" ed : A.F. DALTON, F. HAGUENAU p. 1 (40, p. 12).

- GREMONPREZ, L., 1972, Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de Lille (80, p. 25).

- GROCHOWSKA, E., & KOSCIELAK, J., 1967, 5th Int. Congr. Biochem. Abstr., p. 20 (110, p. 33).

- GROLLMAN, E.F., KOBATA, A., & GINSBURG, V., 1969, J. Clin. Invest. 48, 1489 (163, p. 63).

- HAKOMORI, S., 1964, J. Biochem., 1964, 55, 205 (203, p. 74).

- HAKOMORI, S., 1970, Chem. Phys. Lipids, 5, 96 (16, p. 5; 42, p. 13).

- HAKOMORI, S., & ANDREWS, H.D., 1970, d'après "Blood and Tissue antigens" ed : D. AMINOFF, Academic Press, New-York p. 155 (30, p. 7; 32, p. 7).

- HAKOMORI, S., & ANDREWS, H., 1970, Biochim. Biophys. Acta., 202, 225 (127, p. 43; 129, p. 44; 148, p. 57).

- HAKOMORI, S., & JEANLOZ, R.W., 1961, J. Biol. Chem., 236, 2827 (111, p. 33; 124, p. 43).

- HAKOMORI, S., & JEANLOZ, R.W., 1964, J. Biol. Chem., 239, PC 3606 (4, p. 1; 31, p. 7; 126, p. 43).

- HAKOMORI, S., & MURAKAMI, W.T., 1968, Proc. Nat. Acad. Sci., 59, 254 (26, p.

- HAKOMORI, S., STELLNER, K., WATANABE, K., 1972, Biochem. Biophys. Res. Comm., 49, 1061 (125, p. 43; 128, p. 43; 130, p. 44; 132, p. 45; 212, p.111; 213, p. 111)

- HAKOMORI, S., & STRYCHARZ, G.D., 1968, Biochemistry, 7, 1285, (7, p. 2; 17, p.5)

- HAKOMORI, S., TEATHER, C., & ANDRENS, H.D., 1968, Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 563 (27, p. 7).

- HEARN, V.M., SMITH, Z.G., & WATKINS, W.M., 1968, Biochem. J., 109, 315 (166, p. 63).

- HUGHES, R.C., & JEANLOZ, R.W., 1964, Biochemistry, 3, 1535 (197, p. 72).

- JAKOWSKA, S., 1963, Ann. New-York, Acad. Sc., 106, 161 (49, p. 18).

- KABAT, E.A., 1956, Blood Group Substances, Academic Press, New-York (10, p. 2).

- KABAT, E.A., BASSETT, E.W., PRYZWANSKY, K., LLOYD, K.O., KAPLAN, M.E., & LAYUG, E.J., 1965, Biochemistry, 4, 1632 (101, p. 32).

- KABAT, E.A., & LESKOWITZ, S., 1955, J. Am. Chem. Soc., 77, 5159 (141, p. 54).

- KLENK, E., & LAVENSTEIN, K., 1952, Z. Physiol. Chem., 291, 249 (106, p. 33).

- KOBATA, A., GINSBURG, V., & TSUDA, M., 1969, Arch. Biochem. Biophys., 130 509 (88, p. 28).

- KOBATA, A., & GINSBURG, V., 1970, J. Biol. Chem., 68, 708 (168, p. 63).

- KOBATA, A., & GINSBURG, V., 1972, J. Biol. Chem., 150, 273 (78, p. 27; 81, p.25)

- KOBATA, A., GROLIMAN, E.F., & GINSBURG, V., 1968, Arch. Biochem. Biophys., 124, 609 (154, p. 61; 165, p. 63).

- KOŚCIELAK, J., 1963, Biochim. Biophys. Acta., 78, 313 (38, p. 10).

- KOŚCIELAK, J., & ZAKRZEWSKI, K., 1960, Nature, 187, 516 (105, p. 33; 109, p. 33)

- KOŚCIELAK, J., GARDAS, A., PIASEK, A., & GREGOR, A., 1973, Congrès International sur les Glycoconjugués, CNRS, Villeneuve d'Ascq (5, p. 1; 116, p. 37; 117, p. 38; 118, p. 39; 119, p. 40; 122, p. 40; 131, p. 45).

- KOŚCIELAK, J., GARDAS, A., GORNIAK, H., PACUSZKA, T., & PIASEK, A., 1972, In "Progress in Transfusion and Transplantation" ed : P.E. SCHMIDT, p. 149, Amer. Ass. Blood. Banks (8, p. 2).

- KOŚCIELAK, J., PIASEK, A., GORNIAK, H., GADAS, A., & GREGOR, A., 1973 Eur. J. Biochem., 37, 214 (120, p. 41; 147, p. 57; 214, p. 111).

- KUHN, R., 1958, Bull. Soc. Chim. Biol., 40, 297 (60, p. 22; 68 p. 22, 72 p. 24; 74, p. 26; 76, p. 25; 77, p. 27; 87, p. 28; 207, p. 90).

- KUHN, R., BAER, H.H., & GAUHE, A., 1956, Ber, 89, 2519 (202, p. 74).

- KUHN, R., & GAUHE, A., 1965, Ber. 98, 395 (82, p. 25).

- LEDEEN, R., 1966, J. Amer. Oil. Chem. Soc., 43, 57 (21, p. 7).

- LLOYD, K.O., & KABAT, E.A., 1968, Proc. Nat. Acad. Sc., 61, 1470 (104, p. 32; 133, p. 45; 143, p. 54).

- LUNDBLAD, A., 1966, Biochim. Biophys. Acta., 130, 130 (63, p. 22; 64, p. 22; 90, p. 25; 98, p. 32).

- LUNDBLAD, A., 1967, Biochim. Biophys. Acta., 148, 151 (65, p. 22; 91, p. 29).

- LUNDBLAD, A., 1968, Biochim. Biophys. Acta., 165, 202 (66, p. 22; 67, p. 23; 92, p. 29; 210, p. 96).

- LUNDBLAD, A., & SVENSSON, S., 1973, Biochemistry, 12, 306 (208, p. 93).

- LUNDBLAD, A., HALLGREN, P., RUDMARK, A., & SVENSSON, S., 1973, Biochemistry, 12, 3341 (93, p. 29).

- MAKITA, A., & YAMAKAWA, T., 1966, J. Biochem., 51, 124 (22, p. 7; 34, p. 10).

- MARTENSSON, E., 1966, Biochim. Biophys. Acta., 116, 238 (23, p. 7).

- MÄKELA, O., & MÄKELA, P., 1956, Ann. Med. Exp. Fenn., 34, 157 (176, p. 64).

- MALPRESS, F.H., & HYTTEN, F.E., 1958, Biochem. J., 68, 708 (84, p. 25).

- MARCHESI, V.T., TILLACK, T.W., JACKSON, R.L., SEGREST, J.P., & SCOTT, R.E., 1972, Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 1445 (56, p. 20).

- MARCUS, D.M. & CASS, L.E., 1969, Science, 164, 553 (177, p. 64).

- Mc GUIRE, E.J., 1970, In "Blood and Tissue Antigens" ed : D. AMINOFF, p. 411 Academic Press, New-York (156, p. 61; 158, p. 61; 159, p. 63).

- Mc KIBBIN, J.M., 1969, Biochemistry, 8, 679 (29, p. 7).

- MICHL, H., 1951, Monatsch. Chem., 82, 489 (187, p. 71; 204, p. 76).

- MONTREUIL, J., 1956, 3è Colloque Hôp. St Jean, Bruges 1955 209 (2, p. 1).

- MONTREUIL, J., 1957, Bull. Soc. Chim. Biol., 39, 995 (59, p. 22; 70, p. 24, 75, p. 25; 86, p. 28).

- MONTREUIL, J., 1960, Bull. Soc. Chim. Biol., 42, 1399 (71, p. 24; 209, p. 96).

- MONTREUIL, J., & BOULANGER, P., 1953, C.R. Acad. Sci., 236, 337. (1, p. 1).

- MONTREUIL, J., & SCRIBAN, R., 1952, Bull. Soc. Chim. Biol., 34, 674 (178*, p. 67).

- MONTREUIL, J., & SPIK, G., Monog. Lab. Chim. Biol., Faculté des Sciences de Lille éd : vol 1 (1963), vol 2 (1968) (191, p. 71; 193, p. 71).

- MORGAN, W.T.J., 1960, Proc. Roy. Soc. London, 151, 308 (11, p. 2).

- MORGAN, W.T.J., PAINTER, T.J., & WATKINS, W.M., 1964, Proc. 9th Congr. Intern. Soc. Blood. Transfusion, Mexico, 1962, p. 237 (60*, p. 22; 142, p. 55).

- MORGAN, W.T.J., & WATKINS, W.M., 1969, Brit. Med. Bull., 25, 30 (171, p. 64).

- MORTON, J.A., 1962, Brit. J. Haematol., 8, 136 (53, p. 18).

- NICOLAI, H.V., & ZILLIKEN, F., 1969, Z. Physiol. Chem., 350, 10 (85, p. 25).

- NICOLSON, G., & SINGER, S.J., 1971, Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 942 (41, p. 13).

- OHASI, M., & YAMAKAWA, T., 1973, J. Lipid. Res., 14, 698 (134, p. 46).

- PACUSZKA, T., & KOSCIELAK, J., 1972, Eur. J. Biochem., 31, 574 (169, p. 63).

- PARTRIDGE, S.M., 1950, Biochem. Soc. Symp., 3, 52 (184*, p. 70; 188, p. 71; 205, p. 76).

- PARTRIDGE, S.M., 1948, Biochem. J., 42, 238 (183, p. 70).

- POULIK, M.D., & BRON, C., 1969, In "Red Cell Membrane" ed : G.A. JAMIESON, T.J. GREENWALT, LIPPINCOTT COMPANY, Philadelphia p. 131 (51, p. 18).

- POULIK, MD.D., & LAVF, P.K., 1965, Nature, 208, 894 (57, p. 20).

- PRICE-EVANS, D.A., Mc CONNELL, R.B., & DONOHOE, W.T.A., 1964, J.Lab. Clin. Med., 64, 381 (62, p. 22).

- PROKOP, O., & UHLENBRUCK, G., 1969, Human Blood and Serum Groups, Mac LAREN AND SONS, London (46, p. 17, 47, p. 19, 48, p. 18).

- PUSZTAI, A., & MORGAN, W.T.J., 1961, Biochem. J., 80, 107 (15, p. 16).

- RACE, R.R. & SANGER, R., 1962, In "Blood Groups in Man" BLACK WELL, Oxford p. 239 (6, p. 2).

- RAFFORT, M.M., & GRAF, L., 1961, Cancer Research, 21, 1225 (33, p. 10).

- RAMINGTON, C., 1931, Biochem. J. 25, 1092, (190, p. 71).

- ROVIS, L., ANDERSON, R., KABAT, E.A., GRUEZO, F., & LIAO, J., 1973, Biochemistry, 12, 1955 (102, p. 32).

- ROVIS, L., ANDERSON, B. & KABAT, E.A., 1973, Congrès International sur les Glycoconjugués, CNRS, Villeneuve d'Ascq (103, p. 32).

- ROVIS, L., ANDERSON, B., GRUEZO, F., & LIAO, J., 1973, Biochemistry, 12, 5340 (144, p. 54; 146, p. 58).

- ROVIS, L., KABAT, E.A., PEREIRA, M.E., & FEIZI, T., 1973, Biochemistry, 12, 5355 (145, p. 54).

- SCHACHTER, H., JABBAL, I., HUDGIN, R.L., PINTERIC, L., Mc GUIRE, E.J., & ROSEMAN, S., 1970, J. Biol. Chem., 245, 1090 (155, p. 61; 157, p. 61; 167, p. 63).

- SEGREST, J.P., KAHANE, I., JACKSON, R.L., & MARCHESI, V.T., 1973, Arch. Biochem. Biophys., 155, 167 (50, p. 18; 58, p. 21).

- SCHENKEL-BRUNNER, H., CHESTER, M.A., & WATKINS, W.M., 1972, Eur. J. Biochem., 30, 269 (217, p. 113).

- SPIK, G., STRECKER, G., & MONTREUIL, J., 1969, Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 1287 (181, p. 69).

- SPRINGER, G.F., NAGAI, Y., & TEGTMEYER, H., 1966, Biochemistry., 5, 3254 (55, p. 20).

- STELLNER, K., & HAKOMORI, S., 1973, Biochim. Biophys. Res. Comm., 55, 439 (170, p. 63).

- STELLNER, K., WATANABE, K., & HAKOMORI, S., 1973, Biochemistry, 12, 656 (172, p. 64).

- STRECKER, G., & MONTREUIL, J., 1969, Z. Physiol. Chem., 350, 14 (3, p. 1).

- STRECKER, G., & MONTREUIL, J., 1973, C.R. Acad. Sc., 277, 1393 (69, p. 22; 94, p. 29; 96, p. 30).

- STRECKER, G., BAYARD, B., & MONTREUIL, J., 1971, C.R. 6ème Symp. Intern. Chromatog. Electroph., Bruxelles, 1970, Press. Acad. Eur. p. 324 (99, p. 32; 178, p. 67).

- STRECKER, G., FOURNET, B., RIAZI-FARZAD, T., BOUQUELET, S., & MONTREUIL, J., 1973, Colloque International sur les Glycoconjugués, CNRS, Villeneuve d'Ascq (211, p. 110; 215, p. 111; 216, p. 113; 218, p. 114).

- STRECKER, G., TRENTESAUX-CHAUVET, C., RIAZI-FARZAD, T., FOURNET, B., BOUQUELET, S., & MONTREUIL, J., 1973, C.R. Acad. Sc., 277, 1569 (95, p. 29; 96, p. 30; 97, p. 31).

- SUZUKI, C., NAKITA, A., & YOSIZAWA, A., 1967, Proc. Jap. Conf. Biochem. Lipid., 9, 58 (28, p. 7).

- SVENNERHOLM, L., 1963, J. Lipids. Res., 5, 145 (20, p. 7).

- SWEELEY, C.C., & DAWSON, G., 1969, In "Red Cell Membrane, Structure and Function" ed : JAMESON G.A. et J.J. GREENWALT, LIPPINCOTT COMPANY, Philadelphia p. 172 (36, p. 10).

- SZULMAN, A.E., 1966, Ann. Rev. Med., 17, 307 (9, p. 2).

- TILLMANS, J., & PHILIPPI, K., 1928, Biochem. Z., 215, 36 (189, p. 71).

- TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P., & HARRISON, J.S., 1950, Nature, 166, 444 (185, p. 70; 186, p. 70).

- TUPPY, H., & STAUDENBAUER, W.L., 1966, Biochemistry, 5, 1742 (136, p. 51).

- UHLENBRUCK, G., 1967, Bibl. Haemat., 27, 1 (37, p. 10; 39, p. 11).

- VANCE, D.E., & SWEELEY, C.C., 1967, J. Lipid. Res., 8, 621 (25, p. 7).

- VAN DEENEN, L.L.M., 1964, In "The Blood Cell" ed : C. BISHOP et D.M. SARGENOR, Academic Press, New-York, p. 301 (33, p. 8).

- VAN HEYNINGEN, W.E., & MELLANBY, J., 1971, In "Microbiological Toxines" vol. 2 A, p. 69, Academic Press, New-York (19, p. 6).

- WATKINS, W.M., 1964, In "The Red Blood Cell" ed : C. BISHOP et D.M. SARGENOR, Academic Press, New-York, p. 349 (13, p. 3).

- WATKINS, W.M., 1966, Science, 152, 172 (150, p. 59; 151, p. 60; 152, p. 61; 153, p. 62; 164, p. 63; 173, p. 64; 174, p. 64; 175, p. 66).

- WATKINS, W.M., & MORGAN, W.T.J., 1969, Vox. Sang., 4, 97 (149, p. 59; 162, p. 63)

- WATKINS, W.M., ZARNITZ, M.L., & KABAT, E.A., 1962, Nature, 195, 1204 (138, p. 51 139, p. 51; 140, p. 53).

- WEISSMAN, B., & HINRICHSEN, D.F., 1969, Biochemistry, 8, 2034 (135, p. 51).

- WERNER, J., & ODIN, L., 1952, Acta. Soc. Med. Upsalensis, 57, 230 (195, p. 72).

- WHISTLER, R.L., & BEMILLER, J.N., 1958, Advan. Carbohydrate.Chem., 13, 289, (201, p. 74).

- WHISTLER, R.L., & DURSO, D.F., 1950, J. Am. Chem. Soc., 72, 677 (180, p. 69).

- WINZLER, R.J., 1970, Int. Rev. Cytol., 29, 77 (52, p. 18).

- YAMAKAWA, T., NISHIMURA, S., & KAMIMURA, M., 1965, Jap. J. Exp. Med., 35, 201 (18, p. 5).

- YAMAKAWA, T., 1965, In "Lipids" 16th Colloq. Ges. Physiol. Chem., MOSBACH, Baden Springer-Verlag, Berlin p. 85 (24, p. 7, 35, p. 10).

- YAMAKAWA, T., IRIE, R., & IWANAGA, M., 1960, J. Biochem., 48, 490 (107, p. 33).

- ZAHLER, P.H., 1969, Experientia, 25, 449 (43, p. 13).

- ZAHLER, P.H., & WEIBEL, E.R., 1969, Protides. Biol. Fluids. Proc. Colloq. Bruges, 16, 71 (44, p. 14).

- ZARNITZ, M.L., & KABAT, E.A., 1960, J. Am. Chem. Soc., 82, 3953 (137, p. 51).

- ZIDERMAN, D., GOMBERTZ, S., SMITA, Z.G., & WATKINS, W.M., 1967, Biochem. Biophys. Res. Comm., 29, 56 (160, p. 63).

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE