

MISE EN ÉVIDENCE DE DÉRIVÉS DE L'ACIDE NEURAMINIQUE DANS DES GLYCOPROTÉINES VÉGÉTALES

RICHARD BOURBOUZE, CHARBEL AKIKI, ISABELLE CHARDON-LORIAUX ET FRANÇOIS PERCHERON

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 av. de l'Observatoire, F-75006 Paris (France)

(Reçu le 22 juillet 1981; accepté le 11 décembre 1981)

ABSTRACT

The evidence for neuraminic acid as a constituent of isolated plant glycoproteins was established by colorimetric and enzymic assay, gas–liquid chromatography–mass spectrometry, and radioactive labeling of glycoproteins containing a terminal sialic acid residue in the carbohydrate chains.

SOMMAIRE

La présence d'acide neuraminique comme constituant de glycoprotéines végétales a été établie par dosage colorimétrique et enzymatique, chromatographie gaz–liquide–spectrométrie de masse, et marquage radioactif de glycoprotéines contenant un résidu d'acide sialique terminal dans la capule glycanique.

INTRODUCTION

Les résidus d'acides *N*-acylneuraminiques, ou acides sialiques, occupent en général l'extrémité non réductrice des chaînes oligosaccharidiques et jouent un rôle important dans les activités biologiques des glycoconjugués solubles et membranaires; ils sont ainsi largement présents dans les glycoprotéines et glycolipides des vertébrés, chez certains invertébrés et quelques bactéries¹.

Les acides sialiques en revanche n'ont pas été identifiés chez les végétaux. La présence d'acides sialiques dans des extraits de plantes a été signalée^{2,3} puis discutée; il a été en effet démontré que lors des analyses colorimétriques et chromatographiques usuelles, divers composés (L-rhamnose, L-fucose, acides 2-céto-3-désoxyaldoniques, acide shikimique, acide quinique) étaient susceptibles de présenter des propriétés comparables à celles des acides sialiques^{4–6}.

Les glycoprotéines végétales ont donné lieu à peu d'investigations, et seules quelques-unes d'entre-elles ont été caractérisées; contrairement aux glycoprotéines d'origine animale, leur structure glycanique s'est révélée exempte d'acides sialiques⁷. Des travaux antérieurs avaient laissé soupçonner la richesse en glycoprotéines des graines de sarrasin (*Fagopyrum esculentum*)^{8,9}, et nous avons entrepris l'isolement

et la caractérisation de glycoprotéines végétales affines de la concanavaline A à partir de ce matériel¹⁰. Au niveau de ces glycoprotéines, la présence de dérivés de l'acide neuraminique a pu être envisagée à l'aide de méthodes chimiques et enzymatiques, puis confirmée par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse.

Les résultats obtenus semblent constituer à notre connaissance la première mise en évidence de dérivés de l'acide neuraminique, ou acides sialiques, chez des glycoprotéines végétales.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Caractérisation des glycoprotéines. — Les glycoprotéines ont été préparées par chromatographie d'affinité sur Con A-Sephrose à partir des protéines hydrosolubles des graines de sarrasin selon le protocole précédemment décrit¹⁰. Celui-ci implique plusieurs dialyses et trois étapes chromatographiques à partir de l'extrait végétal aqueux (successivement chromatographie sur HA-Ultrogel, Con A-Sephrose et Sephadex G 25), rendant peu probable la contamination de la fraction glycoprotéique éluée dans le domaine d'exclusion du Sephadex G-25 par des composés exogènes de faibles poids moléculaire.

La contamination bactérienne d'un matériel végétal doit être envisagée, car l'acide sialique a été caractérisé sous forme d'homopolymère, tel l'acide colominique, chez certaines bactéries^{11,12}. Un apport exogène en acide sialique par contamination bactérienne ou glycolipidique des glycoprotéines semble devoir être écarté; l'ensemencement en eau peptonée par le broyat des graines de sarrasin ne met en évidence qu'une très légère contamination, et exclusivement par des germes Gram positif. Après épuisement de la fraction glycoprotéique par un mélange chloroforme-méthanol 2:1 (v/v), on n'observe pas la formation d'un composé chromogène pour la réaction à l'acide periodique-acide thiobarbiturique au niveau de la phase organique, indice de l'absence de matériel glycolipidique à acide sialique associé aux glycoprotéines¹³.

L'analyse par électrofocalisation de ces glycoprotéines révèle une forte hétérogénéité; on identifie une population de bandes protéiques se répartissant dans toute la gamme du gradient¹⁰ de pH 3,5-9,5. La teneur en oses totaux de cette population de glycoprotéines est de 10,5% et se décompose en mannose, galactose, 2-acétamido-2-désoxyglucose, glucose, fucose, rhamnose, arabinose et xylose dans un rapport molaire de 11:6,5:3,75:2,75:2,25:1:1:0,7.

Les résultats présentés concernant la mise en évidence de dérivés de l'acide neuraminique au niveau de cette fraction glycoprotéique ont donc été obtenus à partir d'une population hétérogène de glycoprotéines affines de la concanavaline A. Cependant, ces glycoprotéines ont été isolées des autres composants des graines de sarrasin et bien caractérisées. Ce matériel d'étude diffère donc notablement des données antérieures et contestées de la littérature signalant la présence d'acides sialiques chez les plantes, qui portent sur des extraits végétaux bruts^{2,3}.

Teneur en acides sialiques des glycoprotéines déterminée par dosages colori-

métriques et enzymatiques. — La teneur en acides sialiques des glycoprotéines a été estimée, après action de la neuraminidase, selon la méthode de Hammond et Papermester¹⁴; celle-ci accroît considérablement la sensibilité de la méthode colorimétrique de Warren¹⁵ par détection en fluorescence du composé chromogène formé avec l'acide thiobarbiturique après oxydation periodique des acides sialiques.

De nombreux composés ont été signalés comme susceptibles d'interférer avec la méthode à l'acide periodique-acide thiobarbiturique^{16,17}. Dans le but d'éliminer notamment l'interférence du malonaldéhyde et de l'acétaldéhyde, résultant de l'oxydation periodique de 2-désoxy sucres, de certains lipides insaturés et du L-fucose, nous avons repris la modification de la méthode de Warren proposée par Codington *et al.*¹⁸. Cette modification implique un dosage différentiel, seul étant pris en compte, pour l'estimation de la teneur en acides sialiques des échantillons ayant subi l'action de la neuraminidase, le composé qui après réduction par le borohydrure de sodium ne donne plus de composé chromogène lors de la réaction à l'acide periodique-acide thiobarbiturique. Par ce procédé, on obtient une teneur en acides sialiques de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de glycoprotéines, soit 0,05 % en poids. En l'absence de la modification apportée par Codington *et al.*¹⁸ à la réaction de Warren, on obtient une teneur surestimée de 1,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de glycoprotéines en acides sialiques, probablement imputable aux pentoses qu'elles renferment.

Il est à noter que l'on constate une forte augmentation de la teneur relative en acides sialiques au cours du protocole d'isolement des glycoprotéines. Les protéines hydrosolubles des graines de sarrasin, à partir desquelles sont isolées les glycoprotéines par chromatographie sur Con A-Sephrose, ne renferment que 0,05 μg d'acides sialiques/mg de protéines. En outre, une réaction de Warren non modifiée, appliquée à cette fraction protéique, conduit à une estimation quinze fois plus élevée en acides sialiques.

Ces données révèlent une concentration notable de la teneur en acides sialiques par chromatographie d'affinité sur Con A-Sephrose et confirment l'omniprésence de substances interférentes à la réaction acide periodique-acide thiobarbiturique chez les végétaux.

Le dosage enzymatique a été réalisé à l'aide de la *N*-acétylneuraminatase lyase (*N*-acétylneuraminatase pyruvate-lyase, EC 4.1.3.3) couplée à la lactate deshydrogénase dans les conditions décrites par Schauer *et al.*¹⁹; la quantité de NADH oxydé au cours de la réaction a été estimée par fluorimétrie. Deux systèmes d'étalonnage ont été utilisés, à partir d'acide *N*-acétylneuraminique et de mucine, afin de relier la quantité de NADH oxydé à la concentration initiale en acides sialiques dans le milieu réactionnel. La mucine sous-maxillaire de veau (5 % en acides sialiques liés) a été utilisée comme sialoglycoprotéine de référence et traitée par la neuraminidase parallèlement aux échantillons de glycoprotéines végétales. Les résultats obtenus en fonction de ces deux systèmes étalons sont concordants; la quantité de NADH oxydé obtenue à partir d'échantillons de 15 mg de glycoprotéines correspond à celle observée pour 7,4 μg d'acide *N*-acétylneuraminique, ou libérés à partir de 0,220 mg de mucine

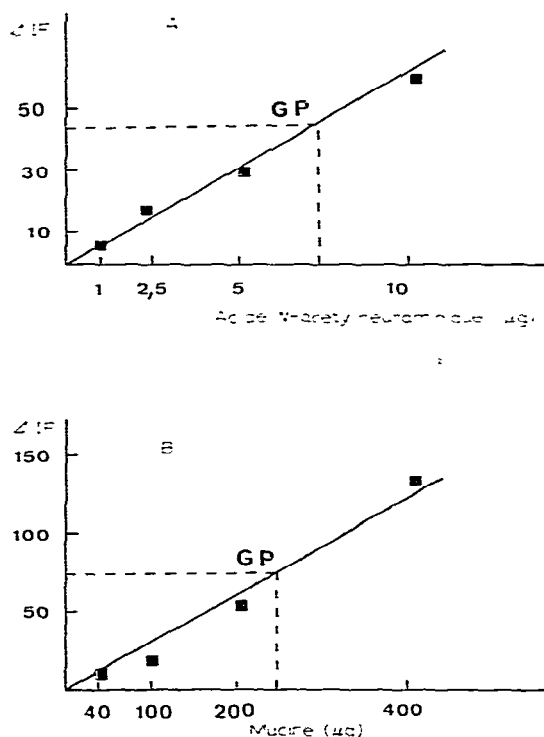


Fig. 1. Estimation de la teneur en acides sialiques d'échantillons de 15 mg de glycoprotéines (GP) ayant subi l'action de la neuraminidase. La quantité d'acides sialiques libérés est évaluée à l'aide de la *N*-acétylneuraminatase lyase couplée à la lactate deshydrogénase comparativement à deux systèmes d'étalonnage: (A) Variation de l'intensité de fluorescence, correspondant à la quantité de NADH oxydé, en fonction de la concentration en acide *N*-acétylneuraminique. (B) Variation de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration initiale en mucine (5% en acides sialiques liés) traitée par la neuraminidase.

(Fig. 1). Cette méthode enzymatique très spécifique confirme la teneur en acides sialiques de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de glycoprotéines de la méthode colorimétrique.

Chromatographie phase gazeuse-spectrométrie de masse. — L'analyse en chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée à partir des dérivés trifluoracétylés des méthyl-glycosides obtenus après méthanolyse des glycoprotéines, suivant les conditions décrites par Zanetta *et al.*²⁰. Dans des conditions identiques, l'acide *N*-acétylneuraminique de référence conduit à l'ester méthylique du méthyl-glycoside de l'acide *N*-trifluoracétylneuraminique pertrifluoracétylé. La formation de ce dérivé peut impliquer une *N*-désacétylation au cours de la méthanolyse, suivie d'une *N*-trifluoracétylation et pertrifluoracétylation au cours de la dérivation trifluoracétique. En chromatographie en phase gazeuse, ce dérivé présente une température de rétention de 180° sur une colonne capillaire de 25 m imprégnée de CP-Sil 5 avec une programmation de température de 5°/min.

La fragmentation de ce pic en spectrométrie de masse est représentée par la

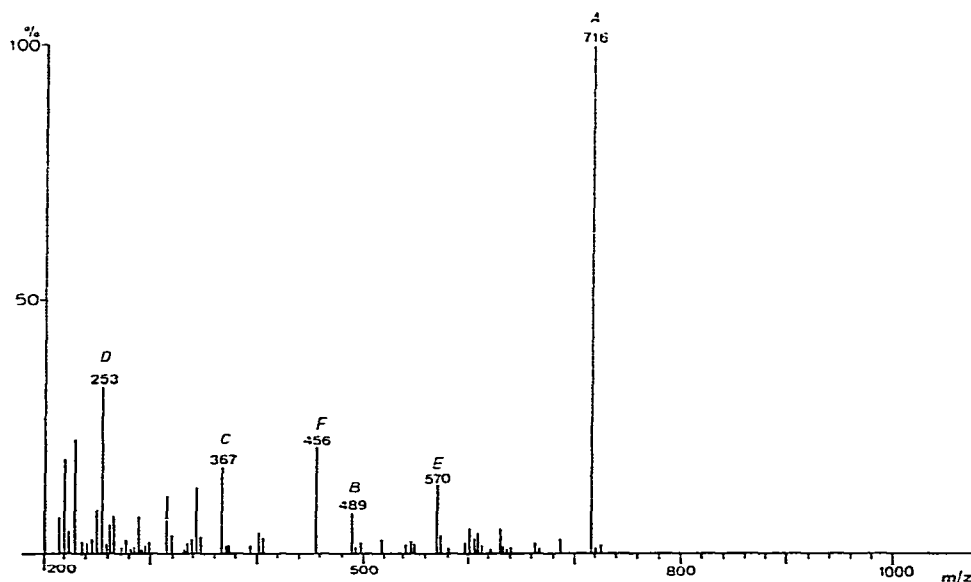


Fig. 2. Spectre de masse de l'ester méthylique du méthyl-glycoside de l'acide *N*-trifluoracétylneuraminique pertrifluoracétylé.

Fig. 2. Celle-ci montre en particulier un fragment A correspondant à la masse la plus élevée à m/z 716. Ce fragment A doit provenir de l'élimination du groupe carboxyle-1 de la molécule dont la masse moléculaire peut être estimée à 775, et qui ne donne pas lieu à un ion moléculaire observable sur le spectre de masse. Cette élimination a déjà été notée par Kochetkov *et al.*²¹ avec les dérivés acétylés d'acides sialiques. D'autres fragments importants du spectre de masse peuvent être déduits de cet ion majoritaire: le fragment B ($A - CF_3CO_2H - CF_3CO_2$) à m/z 489; le fragment C à m/z 367 par coupure simultanée entre les liaisons C-5-C-6 et C-2-O-6, type de coupure également observé par Kochetkov *et al.*²¹; le fragment D à m/z 253 pourrait être déduit de C par perte d'un radical CF_3CO_2H ou coupure de la liaison C-7-C-8. En

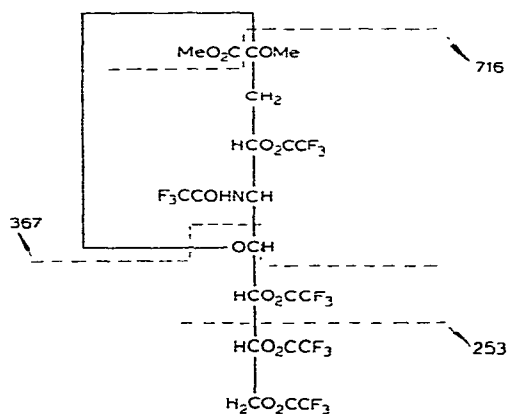


Schéma 1

ce qui concerne les fragments *E* ($A - CF_3CO_2H - CH_3OH$) à m/z 570 et *F* ($A - 2 \times CF_3CO_2H - CH_3OH$) à m/z 456, leur interprétation reste incertaine car l'élimination simultanée de CH_3OH et CO_2CH_3 de C-2 n'a pas été précédemment signalée (voir Schéma 1).

La chromatographie en phase gazeuse de l'échantillon de glycoprotéines fournit un pic qui sort à la même température de rétention de 180° que l'acide *N*-acétylneuraminique de référence, et dont le spectre de fragmentation est identique à celui de la Fig. 2. Les glycoprotéines de sarrasin semblent donc bien renfermer de l'acide neuraminique ou un de ses dérivés sialiques. On ne peut en effet identifier à partir de ces résultats le dérivé de l'acide neuraminique de départ, puisqu'une *N*-désacylation et même une *O*-désacylation a pu se produire au cours de la méthanolyse.

Marquage radioactif des sialoglycoprotéines. — La méthode générale de marquage radioactif des sialoglycoprotéines décrites par Van Lenten et Ashwell²² a été utilisée afin de préciser la présence de ces dérivés de l'acide neuraminique en tant que constituants de la chaîne oligosaccharidique des glycoprotéines.

Un échantillon de glycoprotéines est soumis à une oxydation périodique ménagée puis réduit par du borohydrure tritié; dans ces conditions, les acides sialiques en position terminale des chaînes glycaniques sont convertis en leurs analogues marqués en C-7 et C-8. Ces résidus radiomarqués sont libérés par hydrolyse sulfurique et identifiés par chromatographie sur papier en présence des témoins correspondants. Le chromatogramme des produits d'hydrolyse d'un échantillon de glycoprotéines

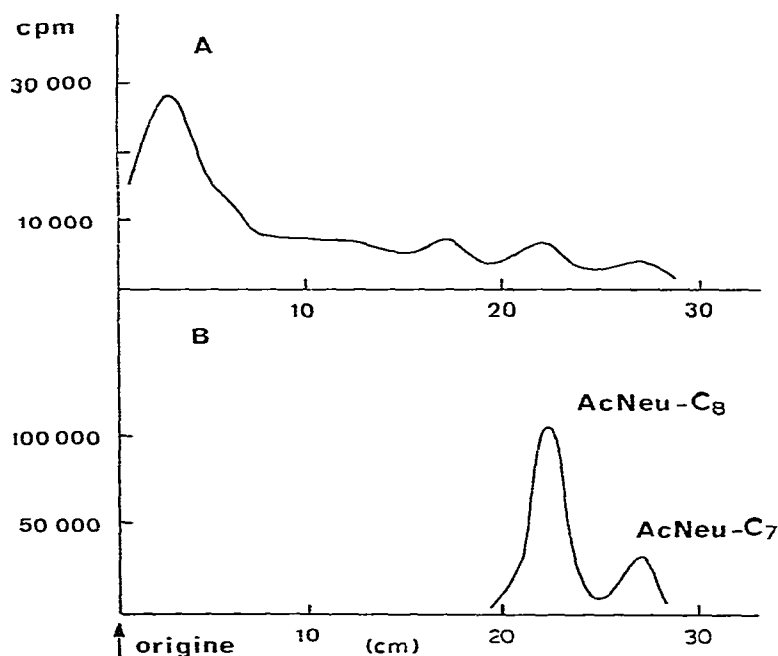


Fig. 3. Chromatographie sur papier pendant une nuit dans le système solvant acétate de butyle-acide acétique-eau 3:2:1 (v/v) et comptage après découpe des bandes de papier en fractions de 1 cm: (A) Chromatogramme des produits solubles marqués après hydrolyse sulfurique des glycoprotéines tritiées. (B) Chromatogramme des analogues en C-7 et C-8 d'acides *N*-acétylneuraminiques tritiés.

révèle des résidus marqués dont la distance de migration de deux d'entre-eux correspond à celle d'un mélange témoin d'homologues en C-7 et C-8 d'acide *N*-acétyl-neuraminique tritiés (Fig. 3).

Données complémentaires concernant la présence de sialoglycoconjugués chez les plantes. — Cet ensemble de données, dosage colorimétrique et enzymatique, analyse en chromatographie phase gazeuse-spectrométrie de masse et marquage radioactif, constituent un ensemble de présomptions en faveur de la présence de dérivés de l'acide neuraminique au niveau d'une fraction glycoprotéique bien caractérisée. Ces glycoprotéines ont été isolées à partir des "albumines", glycoprotéines hydrosolubles considérées comme issues du cytoplasme, des graines de sarrasin.

Des données analogues ont pu être obtenues à partir d'une autre fraction glycoprotéique des graines de sarrasin, préparées à partir des "globulines", protéines solubles en milieu salin considérées comme issues des structures de réserve. Ces glycoprotéines non hydrosolubles affines de la concanavoline A ont été isolées selon le protocole précédemment décrit¹⁰ avec quelques modifications nécessitées par des impératifs de solubilité. Cette nouvelle fraction glycoprotéique révèle en électrofocalisation un profil protéique également complexe, mais différent de celui des glycoprotéines hydrosolubles: sa teneur en oses totaux est de 2,6% et se décompose en mannose, 2-acétamido-2-désoxyglucose, galactose, glucose, arabinose, xylose et rhamnose dans un rapport molaire de 19:8,5:1:1:1:0,9:0,4.

Ces glycoprotéines non hydrosolubles ont une teneur de 0,20 μ g d'acides sialiques/mg de protéines, soit de 0,02% en poids. Après méthanolyse et dérivation trifluoroacétique, on obtient un spectre de fragmentation en chromatographie phase gazeuse-spectrométrie de masse superposable à celui obtenu précédemment et représenté par la Fig. 2. Ces deux fractions glycoprotéiques affines de la concanavoline A, séparées initialement uniquement en fonction de leur critère de solubilité, sont bien différenciées tant en ce qui concerne leur hétérogénéité protéique que la composition en oses de leurs parties glycaniques; elles semblent renfermer toutes les deux des sialoglycoconjugués. Ces deux fractions glycoprotéiques ont été isolées à partir des graines non germées de sarrasin. Au cours du processus de germination, on observe une disparition précoce de ces glycoprotéines, et parallèlement l'absence d'acides sialiques décelables au niveau des protéines des graines germées. Cette disparition précoce au cours du processus de germination des glycoprotéines affines de la concanavoline A des graines de sarrasin peut correspondre à un rôle métabolique de réserve, identique en ceci aux glycoprotéines de légumineuses²³.

Quelques repérages effectués à partir de fractions protéiques de graines de diverses espèces végétales, préparées par chromatographie sur HA-Ultrogel de la fraction soluble en tampon phosphate de ces graines, semblent indiquer non pas une répartition ubiquitaire des sialoglycoconjugués chez les plantes, mais néanmoins que cette identification dans les graines de sarrasin ne représente pas un cas isolé. En particulier, nous avons décelé selon la méthode de Codington *et al.*¹⁸, une teneur en acides sialiques supérieure ou du même ordre de grandeur que pour la fraction correspondante des graines de sarrasin, avec *Raphanus sativus*, *Lens culinaris* et

deux variétés de *Pisum sativum*. Il est à noter que ces dernières graines de légumineuses sont également riches en glycoprotéines affines de la concanavaline A.

L'isolement et la caractérisation d'une sialoglycoprotéine végétale proprement dite reste à réaliser. Néanmoins, l'ensemble de ces résultats semble constituer une forte présomption en faveur de la présence de dérivés de l'acide neuraminique, ou acides sialiques, en tant que partie intégrante de la chaîne oligosaccharidique de certaines glycoprotéines végétales.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits. — L'acide *N*-acétylneuraminique, la mucine, la neuraminidase et la *N*-acétylneuraminatase lyase de *Clostridium perfringens* (EC 4.1.3.3) sont des produits Sigma. La lactate deshydrogénase a été fournie par Boehringer (Biochemica Test Combination).

Méthodes analytiques. — La réaction à l'acide periodique-acide thiobarbiturique est effectuée selon le protocole de Codington *et al.*¹⁸, suivi d'une extraction du composé chromogène par le 1-butanol (2 mL) renfermant 5% (v/v) HCl. La différence d'intensité de fluorescence (excitation 550 nm/émission 570 nm) entre l'essai ayant subi la réduction par le borohydrure de sodium et le témoin, est rapportée à une gamme étalon de 0,1 à 0,25 µg en acide *N*-acétylneuraminique traitée dans les mêmes conditions.

Le dosage enzymatique des acides sialiques libérés par la neuraminidase s'effectue dans les conditions décrites par Schauer *et al.*¹⁹; la variation de fluorescence du milieu réactionnel (excitation 340 nm/émission 460 nm), correspondant à la quantité de NADH oxydé au cours de la réaction, est proportionnelle à la concentration initiale en acide *N*-acétylneuraminique (1–10 µg) ou en mucine (40–400 µg) traitée par la neuraminidase.

La composition en sucres des fractions glycoprotéiques a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse avec un chromatographe Intersmat modèle 120 FL équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. En présence de *myo*-inositol à titre d'étalon interne, les échantillons de glycoprotéines (2–12 mg) et de sucres de référence (20–100 µg) subissent une méthanolyse (méthanol chlorhydrique 0,5M, 20 h, 80°); les méthyl-glycosides obtenus sont transformés en dérivés trifluoracétylés selon la méthode de Zanetta *et al.*²⁰. L'analyse des dérivés trifluoracétylés est réalisée à l'aide d'une colonne de verre (3,0 m × 3 mm) imprégnée d'OV 210 à 3% sur Chromosorb WHP (80–100 mesh), avec une programmation de 2°/min de 75 à 220°.

Le spectre de masse de 70 eV de l'ester méthylrique du méthyl-glycoside de l'acide *N*-trifluoracétylneuraminique pertrifluoracétylé ainsi que des dérivés sialiques des glycoprotéines a été obtenu avec un spectromètre Ribermag R 10-10 (température de la chambre d'ionisation 190°; courant d'ionisation 200 µA), combiné à un chromatographe muni d'une colonne capillaire de 25 m imprégnée de CP-Sil 5 (programmation de 5°/min de 150 à 200°).

Préparation des fractions glycoprotéiques. — Les glycoprotéines hydrosolubles affines de la concanavaline A des graines de sarrasin ont été préparées selon le protocole déjà décrit¹⁰; des impératifs de solubilité nécessitent quelques modifications pour la préparation des glycoprotéines non hydrosolubles.

Les graines de sarrasin sont broyées dans un tampon phosphate 0,1M (pH 7)–NaCl 0,2M. Après centrifugation du broyat, le surnageant est dialysé contre de l'eau distillée pendant 3 jours. La fraction insoluble après dialyse est remise en suspension dans de l'eau, solubilisée par addition de NaOH M, et adsorbée sur une colonne d'hydroxylapatite (HA-Ultrogel, Pharmindustrial-France) équilibrée avec un tampon phosphate mM, pH 6. Les protéines non hydrosolubles ("globulines") précipitent sur le sommet de la colonne, sont désorbées par un tampon phosphate 0,5M (pH 7)–NaCl 0,2M, puis de nouveau précipitées par dialyse.

La chromatographie sur Con A–Sephadex (Pharmacia) de cette fraction protéique est effectuée suivant les précautions décrites¹⁰, et les glycoprotéines éluées par une solution de méthyl- α -D-mannoside 0,5M–NaCl 0,2M. Les glycoprotéines sont précipitées par dialyse, solubilisées par une solution de NaCl 0,2M ajustée à pH 9, et chromatographiées sur une colonne de Sephadex G-25 équilibrée avec la même solution. Les glycoprotéines sont éluées dans le pic correspondant au volume d'exclusion du Sephadex G-25 et lyophilisées.

Marquage radioactif des sialoglycoprotéines. — La méthode générale pour le marquage radioactif des glycoprotéines renfermant de l'acide sialique a été réalisée dans les conditions décrites par Van Lenten et Ashwell²² à partir d'un échantillon de 10 mg de glycoprotéines. Après hydrolyse sulfurique des glycoprotéines tritiées (H_2SO_4 50mM, 1 h, 80°), l'hydrolysate est soumis à une chromatographie sur papier pendant une nuit dans le système solvant acétate de butyle–acide acétique–eau (3:2:1 v/v), et ceci parallèlement à un mélange témoin d'analogues en C-7 et C-8 d'acides N-acétylneuraminiques tritiés. Les résidus tritiés sont localisés par comptage après découpe des bandes de papier en fractions de 1 cm.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre reconnaissance au Professeur R. Schauer (Biochemisches Institut, Kiel) pour ses conseils et l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Nous remercions Mr. J. Hoffelt (Laboratoire de Spectrométrie de masse, Hôpital Fernand Widai, Paris) pour les caractérisations en chromatographie phase gazeuse–spectrométrie de masse et le laboratoire du Professeur J. Agneray (Faculté de Pharmacie, Université Paris XI) pour les expériences de marquage des sialoglycoprotéines.

RÉFÉRENCES

- 1 S.-S. NG ET J. A. DAIN, dans A. ROSENBERG ET L.-L. SCHENGRUND (Eds.), *Biological Roles of Sialic Acid*, Plenum Press, New York, 1976, pp. 59–102.
- 2 F. C. MAYER, R. DAM ET J. H. PAZUR, *Arch. Biochem. Biophys.*, 108 (1964) 356–357.
- 3 K. ONODERA, S. HIRANO ET H. HAYASHI, *Agric. Biol. Chem.*, 30 (1966) 1170–1172.

- 4 J. A. CABEZAS ET F. FEO, *Rev. Esp. Fisiol.*, 25 (1969) 153-156.
- 5 H. HAYASHI, Y. NIKAIIDO ET S. HIRANO, *Agric. Biol. Chem.*, 41 (1977) 215-216.
- 6 A. C. JENNINGS, *J. Sci. Food. Agric.*, 29 (1978) 930-934.
- 7 N. SHARON ET H. LIS, *Biochem. Soc. Trans.*, 7 (1979) 783-794.
- 8 R. BOURBOUZE, F. PERCHERON ET J. E. COURTOIS, *Eur. J. Biochem.*, 63 (1976) 331-337.
- 9 R. BOURBOUZE, M. T. BONDIU ET F. PERCHERON, *Biochimie*, 59 (1977) 247-255.
- 10 C. AKIKI, R. BOURBOUZE, C. LUPORSI ET F. PERCHERON, *J. Chromatogr.*, 188 (1980) 435-438.
- 11 G. T. BARRY, *Nature (London)*, 183 (1959) 117-118.
- 12 G. T. BARRY, V. ABBOT ET T. TSAI, *J. Gen. Microbiol.*, 29 (1962) 335-352.
- 13 A. A. J. LUGIER, J. P. ZANETTA ET G. DIRHEIMER, *Toxicol. Eur. Res.*, 2 (1978) 103-108.
- 14 H. S. HAMMOND ET D. S. PAPERMASTER, *Anal. Biochem.*, 74 (1976) 292-297.
- 15 L. WARREN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1971-1975.
- 16 R. SCHAUER, *Methods Enzymol.*, 50 (1978) 64-89.
- 17 S. S. KUWAHARA, *Anal. Biochem.*, 101 (1980) 54-60.
- 18 J. F. CODINGTON, B. H. SANFORD ET R. W. JEANLOZ, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 45 (1970) 637-647.
- 19 R. SCHAUER, M. WEMBER, F. WIRTH-PEITZ ET C. FERREIRA DO AMARAL, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 352 (1971) 1073-1780.
- 20 J. P. ZANETTA, W. C. BRECKENRIDGE ET G. VINCENDON, *J. Chromatogr.*, 69 (1972) 291-304.
- 21 N. K. KOCHETKOV, O. S. CHIZHOV, V. I. KADENTSEN, G. P. SMIRNOVA ET I. G. ZHUKOVA, *Carbohydr. Res.*, 27 (1973) 5-10.
- 22 L. VAN LENTEN ET G. ASHWELL, *J. Biol. Chem.*, 246 (1971) 1889-1894.
- 23 A. MILLERD, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 26 (1975) 53-72.