

## Détermination du rapport molaire galactose/mannose dans les glycoprotéines à l'aide de la chromatographie sur couche mince de cellulose

L'évaluation du rapport molaire galactose/mannose dans les glycoprotéines est un problème encore mal résolu. On a proposé diverses méthodes qui, pour une même glycoprotéine, aboutissent à des résultats variables. Ces divergences proviennent d'une part des conditions d'hydrolyse pour libérer les oses—conditions variables d'une méthode à l'autre—et, d'autre part, des procédés de dosage des oses ainsi libérés.

Le dosage direct par spectrophotométrie, effectué sur le mélange de galactose et de mannose chauffé en présence d'orcinol sulfurique, n'aboutit pas à une valeur très sûre. Certains auteurs lisent les absorptions à 425 et 520  $m\mu$ <sup>1</sup>, d'autres à 475 et 516  $m\mu$ <sup>2</sup>. Mais selon la valeur du rapport galactose/mannose, les courbes d'étalonnages sont différentes. Et de plus, les intensités varient avec la durée et la température de l'hydrolyse. Seules les méthodes qui séparent le galactose et le mannose par chromatographie avant leur dosage donnent des résultats satisfaisants, à condition d'effectuer les hydrolyses de manière à libérer entièrement les oses sans les détruire.

Pour séparer les oses, on utilise essentiellement la chromatographie, soit sur papier<sup>3,4</sup> soit sur couche mince<sup>5</sup>, beaucoup plus rapide. On a récemment décrit une méthode de séparation sur résines qui nécessite un Autoanalyseur et un appareillage assez compliqué<sup>6</sup>.

Nous avons mis au point une technique simple et rapide et qui utilise la chromatographie sur couche mince de cellulose. Nous en donnerons la description et la précision qu'on peut en attendre. Nous l'avons appliquée à la détermination du rapport molaire galactose/mannose dans les haptoglobines d'Homme Hp 1-1 et de Lapin. Nous comparerons nos résultats à ceux des autres auteurs qui ont abordé ce problème.

### Matériels et méthodes

*Haptoglobines.* Les haptoglobines humaine Hp 1-1 et de Lapin ont été préparées dans notre laboratoire selon des méthodes déjà décrites<sup>7,8</sup>. Après électrophorèse en gel d'amidon, une seule bande est révétable par l'Amidoschwarz. Leur teneur en hexoses, déterminée par la méthode à l'orcinol selon WINZLER<sup>9</sup>, est respectivement de 8 % et 7.2 %.

*Hydrolyse et purification.* L'hydrolyse est faite à 100° dans des tubes scellés, par HCl *N* et pendant des durées variées. Après dilution jusqu'à une teneur en HCl égale à 0.1 *N* puis filtration, on élimine les acides aminés, l'acide chlorhydrique et la glucosamine par passages successifs sur des colonnes de Dowex 50 X 8 (50-100 mesh) sous forme H<sup>+</sup> et d'Amberlite IRA 401 (20-50 mesh) sous forme formiate.

Pour déterminer le taux de récupération des oses après passage à travers ces deux colonnes de résines, nous avons traité dans les mêmes conditions une solution de concentration connue en galactose et en mannose. Nous avons récupéré 95 % des oses, d'après leur dosage par la méthode de NELSON-SOMOGYI<sup>10,11</sup>.

*Chromatographie et élution des oses.* La chromatographie est effectuée sur couche mince de Cellulose 300 MN sans liant selon VOMHOF *et al.*<sup>12</sup>. La pâte est déposée sur les plaques au moyen d'un étaleur Desaga puis séchée horizontalement à la température ordinaire.

En des points séparés de 2 cm, on dépose de 40 à 70  $\mu$ g d'hexoses. On effectue

d'abord deux chromatographies successives de 2 h chacune dans le mélange de solvants préconisé par VOMHOF contenant: acide formique-butanol tertiaire-méthyl-éthylcétone-eau (15:40:30:15), puis une troisième chromatographie de 1 h 30 min avec le mélange acétate d'éthyle-pyridine-eau (30:15:10).

La révélation des bandes "témoins" est faite à froid par pulvérisation d'une solution de nitrate d'argent et de potasse alcoolique<sup>13</sup>.

L'élution de chaque sucre, à partir de 2 cm<sup>2</sup> environ de cellulose, est faite par 1 ml d'eau distillée. Elle semble ainsi plus rapide que par le mélange acétone-eau indiqué par VOMHOF.

La cellulose est ensuite filtrée sur verre fritté (porosité No. 4) et soigneusement lavée deux fois par 0.5 ml d'eau distillée. Les solutions sont ensuite concentrées sous vide dans un desiccateur contenant de l'acide sulfurique pur, à la température ambiante.

*Dosage des hexoses.* Il est effectué selon la méthode de NELSON-SOMOGYI<sup>10,11</sup> avec un temps de 15 min pour le galactose et de 30 min pour le mannose, dans un bain-marie porté à l'ébullition.

### Résultats

Le Tableau I rassemble les résultats obtenus sur l'haptoglobine humaine Hp 1-1 et sur l'haptoglobine de Lapin. Pour Hp 1-1, nous avons essayé 3 durées d'hydrolyse différentes. Au bout de 4 h, une partie du galactose n'est pas encore entièrement détachée; le rapport galactose/mannose est faible, mais il n'y a pas encore eu destruction des hexoses. Au bout de 6 h, le rendement en hexoses est bon, mais les oses doivent commencer à se détruire. Par contre, au bout de 8 h, cette destruction est déjà forte pour les deux hexoses.

Le rapport molaire galactose/mannose de 1.03 obtenu au bout de 6 h d'hydrolyse est donc le plus probable. Dans les mêmes conditions, il est de 0.94 chez le Lapin.

TABLEAU I

VARIATIONS DU TAUX DE RÉCUPÉRATION DES OSES ET DU RAPPORT GALACTOSE/MANNOSE EN FONCTION DE LA DURÉE DE L'HYDROLYSE

<i>Haptoglobine</i>	<i>Durée de l'hydrolyse (h)</i>	<i>Oses récupérés (%)</i>	<i>Rapport gal/man</i>
Hp 1-1	4	84	0.87 ± 0.07
	6	87	1.03 ± 0.07
	8	73	1.08 ± 0.06
Hp Lapin	6	86	0.94 ± 0.06

### Discussion

La chromatographie sur couche mince de cellulose, plus rapide que la chromatographie sur papier, donne une excellente séparation des oses. Pour savoir si la récupération des oses à partir de la plaque de cellulose était totale, nous avons effectué des dosages de solutions de galactose et de mannose (1:1) de concentrations croissantes, avant et après chromatographie. Pour des quantités déposées inférieures à 20 µg d'ose,

la récupération est mauvaise, de l'ordre de 70 %. Pour des valeurs supérieures à 30  $\mu\text{g}$ , elle est de 98 % en moyenne. On retrouve les mêmes valeurs limites que pour la chromatographie sur papier, dues dans les deux cas probablement à la sensibilité de la méthode de dosage de SOMOGYI (Fig. 1).

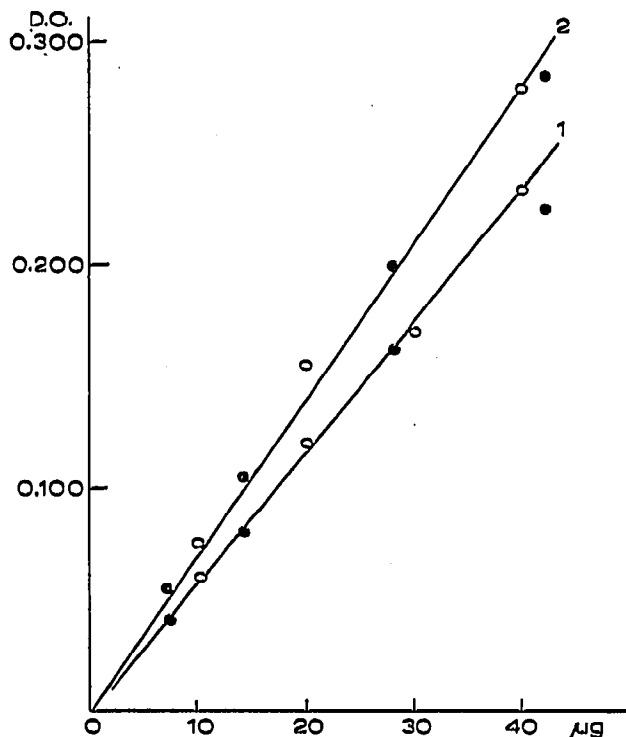


Fig. 1. Dosage spectrophotométrique du galactose (1) et du mannose (2) sans chromatographie (—○—○—) et après chromatographie (—●—●—). Dosage selon SOMOGYI<sup>11</sup>. Les points se situant sur les mêmes droites, le rendement de l'élution est voisin de 100 %.

Pour hydrolyser les glycoprotéines, nous avons préféré l'acide chlorhydrique, plus facile à éliminer que l'acide sulfurique. De plus, HCl, même à chaud, ne détruit pas les oses comme le fait  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Pour chaque cas particulier, il est nécessaire de déterminer la durée optimale de l'hydrolyse, c'est-à-dire celle qui permet la récupération la plus élevée des oses libérés. Une hydrolyse de 6 h à 100° par HCl N nous a permis dans le cas des Hp, de retrouver 87 % des oses initiaux.

En ce qui concerne le rapport galactose/mannose dans les Hp, diverses valeurs ont déjà été publiées. Pour Hp humaine, quel que soit le phénotype, CLOAREC<sup>14</sup> trouve une valeur de 2 par la méthode de MIHALYI ET GODFREY<sup>2</sup> (dosage par l'orcinol, lectures à 475 et 516  $m\mu$ ). Par la même méthode, pour les Hp de Lapin et de Rat, LOMBART *et al.*<sup>15</sup> trouvent un rapport galactose/mannose égal à 0.5. Résultat identique après hydrolyse par HCl et chromatographie sur papier, élution et dosage par l'orcinol. Pour Hp 2-1 et Hp 2-2, RAFELSON *et al.*<sup>3</sup> trouvent un rapport qui varie selon la durée de l'hydrolyse sulfurique. Ils séparent les sucres par chromatographie sur papier, les révèlent par le phosphate d'aniline, les éluent par l'acide acétique glacial et les dosent par absorption à 400  $m\mu$ . Ils trouvent les valeurs données dans le Tableau II.

Cette technique est évidemment supérieure à celle de MIHALYI et donne une

TABLEAU II

VARIATION DU RAPPORT GALACTOSE/MANNOSE EN FONCTION DE LA DURÉE DE L'HYDROLYSE

Durée de l'hydrolyse (h)	Hp 2-1	Hp 2-2
1	1.2	1.1
2	0.8	1.0
3	0.8	0.9
4	0.8	0.8
5	1.0	1.0

valeur voisine de 1 au lieu de 2. Nous trouvons de notre côté une valeur très voisine de 1 pour Hp 1-1 humaine. Pour Hp de Lapin, nous trouvons  $0.94 \pm 0.06$ .

Si l'on adopte pour Hp 1-1 un poids moléculaire de  $100.000^{10}$  et pour Hp de Lapin un poids de  $70.000^{15}$ , on calcule aisément que Hp 1-1 contient 44 résidus d'hexoses et que Hp de Lapin en contient 28. Dans le premier cas, les rapports  $23/21 = 1.09$  et  $24/20 = 1.20$  s'écartent trop de la valeur 1.03 que nous avons trouvée. Dans le second cas, de même, le rapport  $13/15 = 0.87$  est trop faible puisque nous avons trouvé 0.94. On peut donc conclure que, dans les deux cas, la valeur exacte du rapport molaire galactose/mannose est égale à l'unité.

Faculté de Médecine, Laboratoire de Biochimie,  
45 Rue des Saint-Pères, Paris 6° (France)

CLAUDE NICOT  
ROSE-IRÈNE CHEFTEL  
JEAN MORETTI

- 1 H. E. SCHULTZE, R. SCHMIDTBERGER ET H. HAUPT, *Biochem. Z.*, 329 (1958) 490.
- 2 E. MIHALYI ET J. E. GODFREY, *Biochim. Biophys. Acta*, 67 (1963) 73.
- 3 C. M. GERBECK, A. BEZKOROVAINY ET M. E. RAFELSON, *Biochemistry*, 6 (1967) 403.
- 4 H. E. WEIMER ET J. R. MOSHIN, *Am. Rev. Tuberc.*, 68 (1952) 594.
- 5 U. FREIMUTH, J. SCHMIEDER ET M. BUCHNER, *Acta Biol. Med. Ger.*, 16 (1966) 586.
- 6 P. JONSSON ET O. SAMUELSON, *J. Chromatog.*, 26 (1967) 194.
- 7 L. CLOAREC ET J. MORETTI, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 21.
- 8 C. LOMBART, J. MORETTI ET M. F. JAYLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 97 (1965) 262.
- 9 R. J. WINZLER, *Methods Biochem. Anal.*, 2 (1955) 279.
- 10 N. NELSON, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 375.
- 11 M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 19.
- 12 O. W. VOMHOF, J. TRUITT ET T. C. TUCKER, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 335.
- 13 W. E. TREVELYAN, D. P. PROETER ET J. S. HARRISON, *Nature*, 166 (1950) 444.
- 14 L. CLOAREC, *Thèse Doct. Sci. Phys.*, Imp. Foulon, Paris, 1964.
- 15 C. LOMBART, M. DAUTREVAUX ET J. MORETTI, *Biochim. Biophys. Acta*, 97 (1965) 270.
- 16 R. I. CHEFTEL ET J. MORETTI, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D.*, 262 (1966) 1982.

Reçu le 28 juillet 1967

*J. Chromatog.*, 31 (1967) 565-568