

the water-soluble substances extracted by grinding with sand and water. The extract was centrifuged and the purple supernatant fluid removed and shaken vigorously with an equal volume of chloroform for 5 min.

Centrifugation of the mixture produced three layers, of which the clear purple upper one was retained. This was reduced in volume to about 10 ml and was placed on a 15 cm × 1.75 cm column of Sephadex 50, previously equilibrated with distilled water. Elution with water produced three fractions, in order of appearance: a cloudy one containing carbohydrate material (1), a slightly yellow fraction (2), and a third fraction (3) containing the purple pigment. Fractions 1 and 3 were discarded.

Fraction 2 gave an intense colour with the Elson and Morgan reaction. However, about 90% of this colour was produced without incubation with alkaline acetyl-acetone and had absorption spectrum peaks at 525 and 567. Under the same conditions, pure glucosamine gave a single peak at 528. The intensity of this interfering colour markedly increased on standing; that of glucosamine did not. Later work showed that the interfering colour resulted from the presence of two substances, substance A which was retained by the cation exchange resin Zeo-Karb 225 and substance B which was retained by De-Acidite FF (an anion-exchange resin). Substance A could be eluted from the Zeo-Karb 225 with 2N NaOH and recombined with substance B to give the interfering colour with the Elson and Morgan reagent. (It is, of course, well known that a mixture of certain amino acids with a neutral sugar produces a colour in the Elson and Morgan reaction<sup>6</sup>. However no neutral sugar appears to be present in either substance A or substance B.)

Fraction 2 was therefore always treated with Zeo-Karb 225 to remove this source of interference. The clear effluent was treated with De-Acidite FF, which retained the amino sugar compound. It was released from the De-acidite FF with 2N HCl. The HCl was removed under

vacuum over phosphorus pentoxide and solid NaOH and the residue dissolved in water.

Hydrolysis of this final solution with N HCl released amino sugar, maximum release being obtained after about 4–5 h at 98°C. No free acetyl-glucosamine was present and none could be liberated by mild conditions such as would release it from a nucleotide. The absorption spectrum of the colour produced with the Elson and Morgan reagent was identical with that given by pure glucosamine. Paper chromatography gave a single spot corresponding to glucosamine<sup>6</sup>.

The properties of the compound do not suggest its identity with any of the main forms in which amino sugars have hitherto been reported to occur in plants. Its behaviour on ion-exchange columns suggests an acidic substance; its behaviour with Sephadex 50 suggests a compound of intermediate molecular weight<sup>7</sup>.

*Résumé.* On a découvert que certaines plantes contiennent de petites quantités de sucres aminés, les feuilles épigées paraissant en contenir les plus grandes concentrations. Dans les feuilles épigées de la *Sinapis alba*, ce sucre se trouve sous la forme combinée d'une substance acide de poids moléculaire intermédiaire. On mentionne ici également la présence de substances interférentes qui sont aussi colorées par la réaction Elson et Morgan.

R. E. HUGHES

Welsh College of Advanced Technology, Cardiff (Wales, Great Britain), November 2, 1964.

<sup>5</sup> S. GARDELLI, in D. GLICK, *Methods of Biochemical Analysis* (Interscience Publications, New York 1958), vol. VI, p. 289.

<sup>6</sup> P. HEYWORTH, H. R. PERKINS, and P. G. WALKER, *Nature* 190, 261 (1961).

<sup>7</sup> Mr. P. ELLIS made the absorption spectrum determinations.

### Présence d'une $\alpha_2$ -globuline lente au cours de la polyarthrite immunologique déterminée par l'adjuvant de Freund

L'injection d'adjuvant de FREUND – qu'il s'agisse d'une émulsion de mycobactéries tuées, ou mieux de certaines fractions extraites des cires D – détermine chez le rat, une polyarthrite immunologique<sup>1</sup> qui s'accompagne de modifications quantitatives de l'albumine et des  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ -globulines sériques<sup>2</sup>.

On sait d'autre part que l'électrophorèse en gel d'amidon peut révéler, dans le sérum de cet animal, la présence d'une  $\alpha_2$ -globuline *lente* située immédiatement après l' $\alpha_1$ -globuline *lente*. Mais cette  $\alpha_2$  est très particulière puisqu'elle n'apparaît qu'au cours de certains états physiologiques: période néonatale, gestation<sup>3,4</sup>, ou dans diverses conditions expérimentales telles que: processus tumoraux<sup>5</sup>, exérèse chirurgicale<sup>6</sup>, injection d'endotoxine ou d'adjuvant de FREUND<sup>7</sup>.

Ces données nous ont incité à préciser par électrophorèse – sur papier, en gel de gélose et en gel d'amidon – l' $\alpha_2$ -dysprotéinémie de la polyarthrite immunologique.

*Matériel.* Nos recherches ont porté principalement sur deux séries de rats Long Evans de même portée, âgés de 9 semaines, ayant reçu dans le coussinet adipeux plantaire

d'une patte postérieure, 0,5 ml d'une émulsion contenant 1 mg/ml de fraction extraite de cire D obligatoirement fournie par E. LEDERER et P. JOLLES. Première série: 6 animaux injectés avec la fraction CANETTI Dp 35<sup>8</sup> et 4 animaux témoins. Deuxième série: 6 animaux injectés avec la fraction Atypique Dp 35<sup>9</sup> et 3 animaux témoins. Tous les animaux injectés ont présenté des polyarthrites: celles-ci sont apparues pour la première série entre le 12<sup>e</sup> et le 20<sup>e</sup> jour et pour la seconde entre le 8<sup>e</sup> et le 20<sup>e</sup> jour. Les prises de sang ont été effectuées avant l'injection

<sup>1</sup> C. M. PEARSON et F. D. WOOD, *J. exp. Med.* 120, 547 (1964).

<sup>2</sup> J. LACAPERE et Ph. GOULLET, *C.r. Acad. Sci., Paris* 258, 5771 (1964).

<sup>3</sup> G. H. BEATON, A. E. SELBY, M. J. VEEN et A. M. WRIGHT, *J. biol. Chem.* 236, 2005 (1961).

<sup>4</sup> W. G. HEIM, *Nature* 193, 491 (1962).

<sup>5</sup> G. A. BOFFA, J. M. FINE et F. SAJDELA, *C.r. Acad. Sci., Paris* 255, 802 (1962).

<sup>6</sup> W. G. HEIM, J. M. KERRIGAN et P. H. LANE, *Nature* 200, 688 (1963).

<sup>7</sup> W. G. HEIM et P. H. LANE, *Nature* 203, 1077 (1964).

<sup>8</sup> P. JOLLES, D. SAMOUR et E. LEDERER, *Arch. Biochem. Biophys.*, Suppl. I, 283 (1962).

<sup>9</sup> P. JOLLES, D. SAMOUR et E. LEDERER, *Biochim. biophys. Acta* 78, 342 (1963).

au 8<sup>e</sup> jour et au 20<sup>e</sup> jour après l'injection, puis à divers temps échelonnés.

**Résultats.** L'électrophorèse sur papier en tampon véronal (Michaelis pH 8,6) avec l'appareil à évaporation limitée de GROULADE<sup>10</sup>, sous une différence de potentiel de 4,25 V/cm pendant 16 h, révèle au 20<sup>e</sup> jour (phase de pleine évolution de l'arthrite) chez tous les animaux la présence d'un constituant particulier dont la mobilité est celle d'une  $\alpha_2$ -globuline lente ( $\alpha_2$ L) (Figure 1). Ce nouveau constituant correspond à une augmentation des  $\alpha_2$ -glycoprotéines, après coloration par l'acide périodique-réactif de SCHIFF; il disparaît entre 3 et 8 semaines après l'apparition de l'arthrite.

L'électrophorèse en gel de gélose (tampon véronal pH 8,6) pratiquée selon la méthode du dépôt direct<sup>11</sup> confirme ces

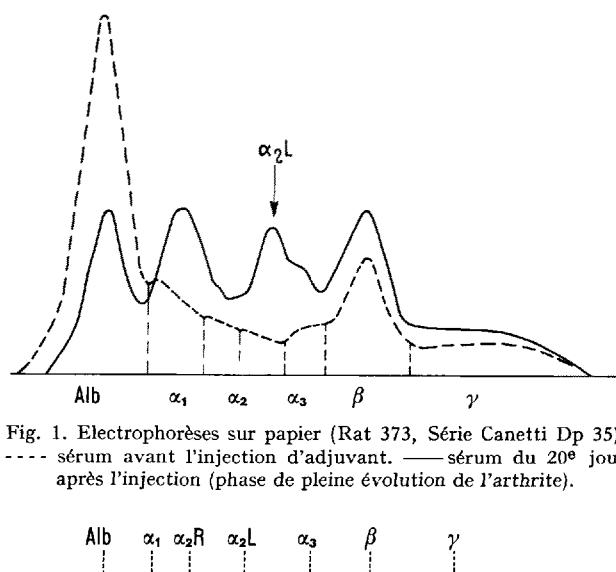


Fig. 1. Electrophorèses sur papier (Rat 373, Série Canetti Dp 35). --- sérum avant l'injection d'adjuvant. —— sérum du 20<sup>e</sup> jour après l'injection (phase de pleine évolution de l'arthrite).

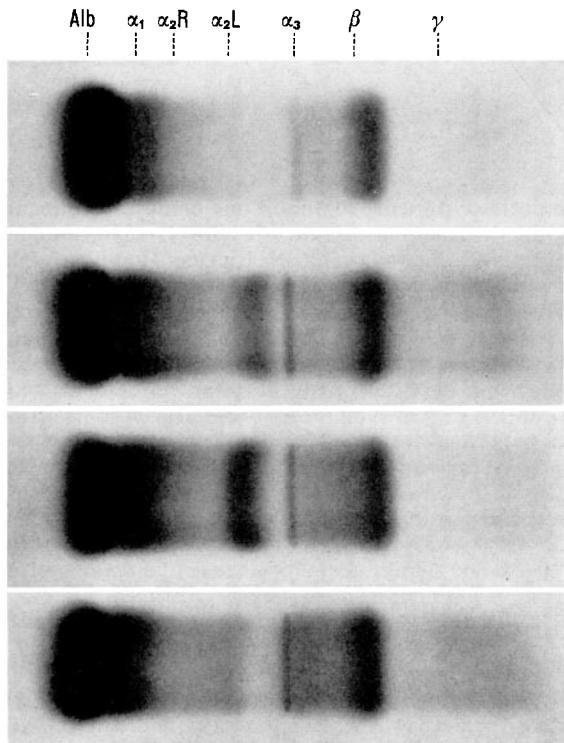


Fig. 2. Electrophorèses en gel de gélose (Rat 373). 1, sérum avant l'injection d'adjuvant. 2, sérum au 20<sup>e</sup> jours après l'injection (une semaine après l'apparition de l'arthrite: phase de pleine évolution). 3 et 4, sérum trois et six semaines après l'apparition de l'arthrite.

résultats. La Figure 2 permet de suivre chez le même animal l'évolution des protéines sériques: le constituant particulier de nature  $\alpha_2$ L est très important une semaine après l'apparition de l'arthrite; il diminue à la troisième semaine, mais reste encore décelable à la sixième semaine.

A l'électrophorèse en gel d'amidon (tampon borate)<sup>12</sup> cette  $\alpha_2$ L se situe immédiatement après l' $\alpha_1$  lente (Figure 3, A) comme dans le cas des  $\alpha_2$  lentes décrites dans d'autres conditions<sup>3-7</sup>.

**Discussion.** L' $\alpha_2$  que nous signalons correspond à l'arthrite immunologique et non aux phénomènes inflammatoires locaux déclenchés immédiatement après l'injection d'adjuvant. Celle-ci détermine en effet<sup>7</sup> – comme nous l'avons par ailleurs vérifié – l'apparition d'une  $\alpha_2$  lente. Mais cette  $\alpha_2$  lorsqu'elle est encore décelable le 8<sup>e</sup> jour après l'injection d'adjuvant ne l'a été qu'à l'état de traces. La comparaison des prises de sang effectuées chez un même animal au 8<sup>e</sup> jour (phase préarthritique) après l'injection et au 20<sup>e</sup> jour (phase de pleine évolution de l'arthrite) montre bien qu'il s'agit de deux phénomènes distincts (Figure 3, B): au 8<sup>e</sup> jour, persistance d'une simple trace d' $\alpha_2$  lente «initiale», et au 20<sup>e</sup> jour, fraction bien visible d' $\alpha_2$  lente «arthritique».

**Conclusion.** L'ensemble des faits exposés permet de conclure qu'en plus des diverses conditions d'apparition déjà signalées<sup>3-7</sup>, l' $\alpha_2$  globuline lente apparaît aussi au cours de l'arthrite déterminée par l'adjuvant de FREUND et qu'elle constitue un élément biologique important de cette maladie immunologique.

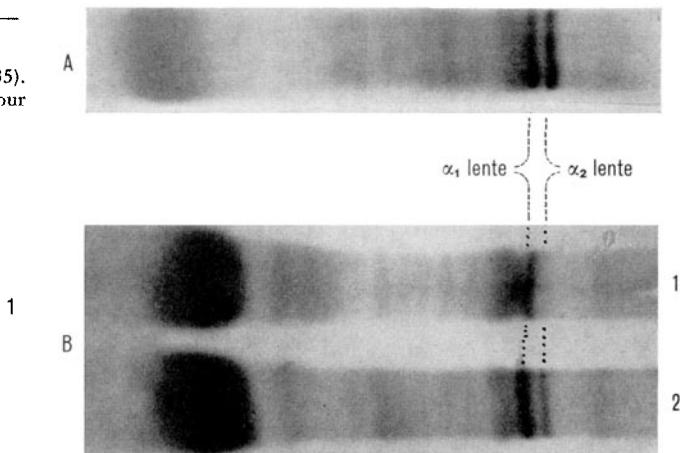


Fig. 3. Electrophorèses en gel d'amidon. A, Rat 373: sérum du 20<sup>e</sup> jour après l'injection (phase de pleine évolution de l'arthrite). B, Rat 410: (série Atypique Dp 35). 1, sérum du 8<sup>e</sup> jour après l'injection (phase préarthritique); 2, sérum du 20<sup>e</sup> jour après l'injection (phase de pleine évolution de l'arthrite).

**Summary.** Paper, agar-gel, and starch-gel electro-phoretic studies of rat serum show a slow  $\alpha_2$ -globulin in adjuvant induced arthritis.

PH. GOULLET,  
avec la collaboration technique de  
C. PAYET et B. ALTWEGG

Institut Prophylactique, 36 rue d'Assas, Paris (France),  
le 11 janvier 1965.

<sup>10</sup> J. GROULADE, *Electrophorèses sur papier* (Allier imp., Grenoble 1961).

<sup>11</sup> PH. GOULLET et H. KAUFMANN, *J. Chromatogr.* 14, 566 (1964).

<sup>12</sup> O. SMITHIES, *Biochim. J.* 61, 629 (1955).