

50376
1979
146

50376
1979
146

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
MEMOIRE

présenté à l'Université de Lille I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

Spécialité Biochimie

par

Christine BRUVIER

**ÉTUDE D'UNE GLYCOPROTÉINE POSSEDANT
UNE ACTIVITÉ ANTI-BACTÉRIENNE
EXTRAITE D'UN LYSAT DE
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE***



Soutenu le 23 novembre 1979 devant la Commission d'Examen

| | | |
|------------|------|--------------------------|
| Président | M. | J. MONTREUIL |
| Rapporteur | M. | B. FOURNET |
| Examineurs | MM. | J. AGNERAY J.P. BURET |
| | Mlle | G. SPIK |
| | M. | G. STRECKER |

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Laboratoire Associé au CNRS n° 217 " Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués ") du Professeur Jean MONTREUIL , sous la direction de Monsieur Bernard FOURNET (Maître de Conférences) .

Ce travail a fait l'objet d'un contrat de Recherche privé
avec l'entreprise CASSENNE à laquelle nous adressons nos
vifs remerciements .

TABLE DES MATIERES
-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

| | |
|--|-------|
| <u>INTRODUCTION</u> | p. 1 |
| <u>GENERALITES</u> | p. 7 |
| <u>I - CLASSIFICATION GENERALE DES BACTERIES</u> | p. 8 |
| <u>II - STRUCTURE DE LA CELLULE BACTERIENNE</u> | p. 10 |
| <u>III - LA PAROI BACTERIENNE</u> | p. 15 |
| 1 - Constitution chimique | p. 15 |
| - le peptidoglycane | p. 17 |
| - les lipopolysaccharides | p. 26 |
| 2 - Fonction de la paroi | p. 33 |
| <u>IV - DIFFERENTS ANTIGENES</u> | p. 34 |
| 1 - Différents types d'antigènes | p. 34 |
| - les antigènes somatiques | p. 34 |
| - les antigènes flagellaires | p. 34 |

| | |
|--|-------|
| - les antigènes capsulaires | p. 35 |
| V - <u>LES ANTIGENES CAPSULAIRES DE <u>Klebsiella</u></u> | p. 37 |
| VI - <u>IMMUNOLOGIE</u> | p. 39 |
| 1 - La spécificité antigénique | p. 48 |
| a - déterminants saccharidiques | p. 48 |
| b - déterminants non saccharidiques | p. 49 |
| c - réactions croisées entre polysaccharides bactériens | p. 49 |
| 2 - Immunogénicité | p. 52 |
| | |
| <u>TRAVAUX PERSONNELS</u> | p. 53 |
| | |
| I - <u>PREPARATION DU PRINCIPE ACTIF</u> | p. 53 |
| | |
| II - <u>COMPOSITION DU PRINCIPE ACTIF</u> | p. 54 |
| | |
| 1 - <u>Etude de la copule protéique</u> | p. 54 |
| a - matériels et méthodes | p. 54 |
| b - résultats | p. 55 |
| | |
| 2 - <u>Etude de la copule glucidique</u> | p. 55 |

| | |
|--|-------|
| a - matériels et méthodes | p. 55 |
| . composition centésimale | p. 55 |
| . dosage des oses neutres | |
| . dosage des acides uroniques | |
| . dosage des acides sialiques | |
| . dosage des osamines | |
| . nature des monosaccharides et composition molaire | p. 57 |
| b - résultats | p. 59 |
| 3 - <u>Etude des éléments minéraux</u> | p. 62 |
| a - matériels et méthodes | p. 62 |
| . humidité | p. 62 |
| . dosage de sulfates | p. 62 |
| . dosage de phosphore | p. 63 |
| b - résultats | p. 63 |
| 4 - <u>Hétérogénéité du principe actif</u> | p. 63 |
| a - matériels et méthodes | p. 63 |
| b - résultats | p. 64 |

| | |
|---|-------|
| 5 - <u>Mise en évidence de l'acide</u> <u>diaminopimélique</u> | p. 64 |
| a - matériels et méthodes | p. 64 |
| b - résultats | p. 65 |
| 6 - <u>Mise en évidence de groupements</u> <u>pyruvyls</u> | p. 65 |
| a - matériels et méthodes | p. 65 |
| b - résultats | p. 65 |
| 7 - <u>Conclusions</u> | p. 69 |
| III - <u>ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE</u> | p. 70 |
| IV - <u>FRACTIONNEMENT DU PRINCIPE ACTIF</u> | p. 71 |
| 1 - <u>Matériels et méthodes</u> | p. 71 |
| 2 - <u>Résultats</u> | p. 72 |
| a - rendements | p. 72 |
| b - analyse en ultracentrifugation | p. 72 |
| c - activité anti-bactérienne | p. 74 |
| d - composition des copules protéique et glucidique | p. 74 |
| 3 - <u>Conclusion</u> | p. 74 |

| | |
|---|-------|
| V - <u>ETUDE DU PRECIPITE</u> | p. 78 |
| 1 - <u>Etude de la copule glucidique</u> | p. 78 |
| a - <u>matériels et méthodes</u> | p. 78 |
| - composition centésimale et molaire | p. 78 |
| - nature des points d'attache des liaisons glycosidiques : par perméthylation | p. 78 |
| - étude du positionnement des acides uroniques | p. 80 |
| . réduction | p. 80 |
| . dégradation uronique | p. 81 |
| . perméthylation | p. 82 |
| - oxydation periodique | p. 82 |
| - oxydation chromique | p. 83 |
| b - <u>résultats et discussion</u> | p. 83 |
| - composition centésimale et molaire | p. 83 |
| - nature des points d'attache des liaisons glycosidiques | p. 88 |

| | |
|---|--------|
| — étude du positionnement des acides uroniques | p. 90 |
| . réduction | p. 90 |
| . dégradation uronique | p. 93 |
| . perméthylation | p. 98 |
| — oxydation periodique | p. 102 |
| — oxydation chromique | p. 104 |
| 2 - <u>Etude de la nature glycoprotéinique</u> | p. 111 |
| a - <u>identification du point d'attache glycanne - protide</u> | p. 111 |
| α -matériels et méthodes | p. 111 |
| — recherche des liaisons O-glycosidiques | p. 111 |
| — recherche des liaisons N-glycosidiques | p. 112 |
| 1°) approche du point d'attache | p. 112 |
| . hydrolyse pronasique | p. 112 |
| . hydrolyse par l'acide fluorhydrique | p. 113 |

| | |
|---|--------|
| 2°) rupture de la liaison | |
| N-glycosidique | p. 114 |
| . hydrazinolyse | p. 114 |
| . rupture sodique en | |
| milieu réducteur | p. 116 |
| β -résultats et discussion | p. 117 |
| — recherche des liaisons O-glycosidiques | p. 117 |
| — recherche des liaisons N-glycosidiques | p. 117 |
| 1°) approche du point d'attache | p. 117 |
| . hydrolyse pronasique | p. 117 |
| . hydrolyse par l'acide | |
| fluorhydrique | p. 117 |
| 2°) rupture de la liaison | |
| N-glycosidique | p. 118 |
| . hydrazinolyse | p. 118 |
| . rupture sodique en milieu | |
| réducteur | p. 119 |
| γ - conclusion | p. 119 |
| b - <u>étude de la fraction protéique</u> | p. 122 |
| α -matériels et méthodes | p. 122 |
| . dosage des acides aminés | p. 122 |

| | |
|--|--------|
| . dosage des protéines | p. 122 |
| . identification de l'acide aminé N-terminal | p. 122 |
| . identification de l'acide aminé C-terminal | p. 123 |
| β- résultats et discussion | p. 123 |
| . dosage des acides aminés | p. 123 |
| . dosage des protéines | p. 123 |
| . identification de l'acide aminé N-terminal | p. 123 |
| . identification de l'acide aminé C-terminal | p. 123 |
| 3 - <u>Structure de la fraction précipitante</u> | p. 124 |
| VI.- <u>RELATION STRUCTURE - ACTIVITE</u> | p. 125 |
| a - matériels et méthodes | p. 125 |
| b - résultats | p. 127 |
| <u>CONCLUSIONS GENERALES</u> | p. 131 |

INTRODUCTION
-:-:-:-:-:-:-

LE MONDE MICROBIEN

C'est au cours du XVII^e siècle qu'Anthony VAN LEEUWENHOECK (1632 - 1723) révèle au monde scientifique la prodigieuse diversité des microorganismes et la richesse des milieux naturels , comme l'eau , en protozoaires , algues , levures , bactéries . Il faut attendre le XIX^e siècle et les expériences de PASTEUR pour que ce monde microbien soit exploré . Avant la découverte des microorganismes , tous les êtres vivants étaient classés à l'intérieur du monde animal et végétal . Comment classer ces microorganismes ? Les organismes animaux accumulent des substances de réserve sous forme de graisses ou de glycogène , sont animés de mouvements actifs . Au contraire , les végétaux sont photosynthétiques , utilisant la lumière comme source d'énergie , synthétisent de l'amidon , comme réserves nutritives , sont dépourvus de mouvements . Il est donc difficile de classer ces nouvelles formes

vivantes microscopiques dans le règne animal ou végétal .

En 1866 , le zoologiste allemand HAECKEL créa un troisième règne , celui des Protistes , qui rassemble les algues , les protozoaires, les champignons et les bactéries . Ils sont caractérisés par une organisation biologique rudimentaire et présentent toujours le même type de cellules indifférenciées . Les protistes sont classés en plusieurs classes :

1 - Les protistes supérieurs :

- algues
- protozoaires
- champignons

2 - Les protistes inférieurs :

- algues bleu - verts (ou cyanophycées ou schizophycées)
- bactéries (ou schizomycètes)

La place des bactéries dans le monde vivant fut longtemps discutée , les formes observées ayant conduit à les placer au voisinage des champignons (schizomycètes) puis des algues cyanophycées (schizophytes) L'absence de véritable noyau en fit ensuite de simples protistes procaryotes (CHATTON et LWOFF 1926) .

PREVOT A.R. classait les bactéries en un embranchement autonome , représentant le monde bactérien (voir Tableau I p. 4). Elles constituent l'embranchement des schizomycètes (NÄGELI) qui comporte quatre sous embranchements dans lesquels se rangent les bactéries d'affinités diverses .

- 1 - Les EUBACTERIA (sporulées ou non) : sans affinité avec les microorganismes animaux ou végétaux .

- 2 - Les MYCOBACTERIA : affines aux champignons .
- 3 - Les ALGOBACTERIA : affines aux algues .
- 4 - Les PROTOZOOBACTERIA : affines aux protozoaires .

Les protistes supérieurs sont dits " eucaryotes " , car ils possèdent un " vrai " noyau avec une membrane , de nombreux chromosomes et une structure cellulaire analogue à celle des animaux et des plantes.

Les protistes inférieurs sont dits " procaryotes " , car ce sont de petites cellules dans lesquelles le " noyau " est un unique chromosome , dépourvu de membrane .

Tous les microbes ne sont pas des Protistes . C'est le cas des particules virales infectieuses . Ces virus ne se multiplient qu'à l'intérieur d'une cellule vivante . Ils peuvent infecter les cellules animales , végétales et bactériennes (bactériophages) . Ce sont des parasites intra-cellulaires .

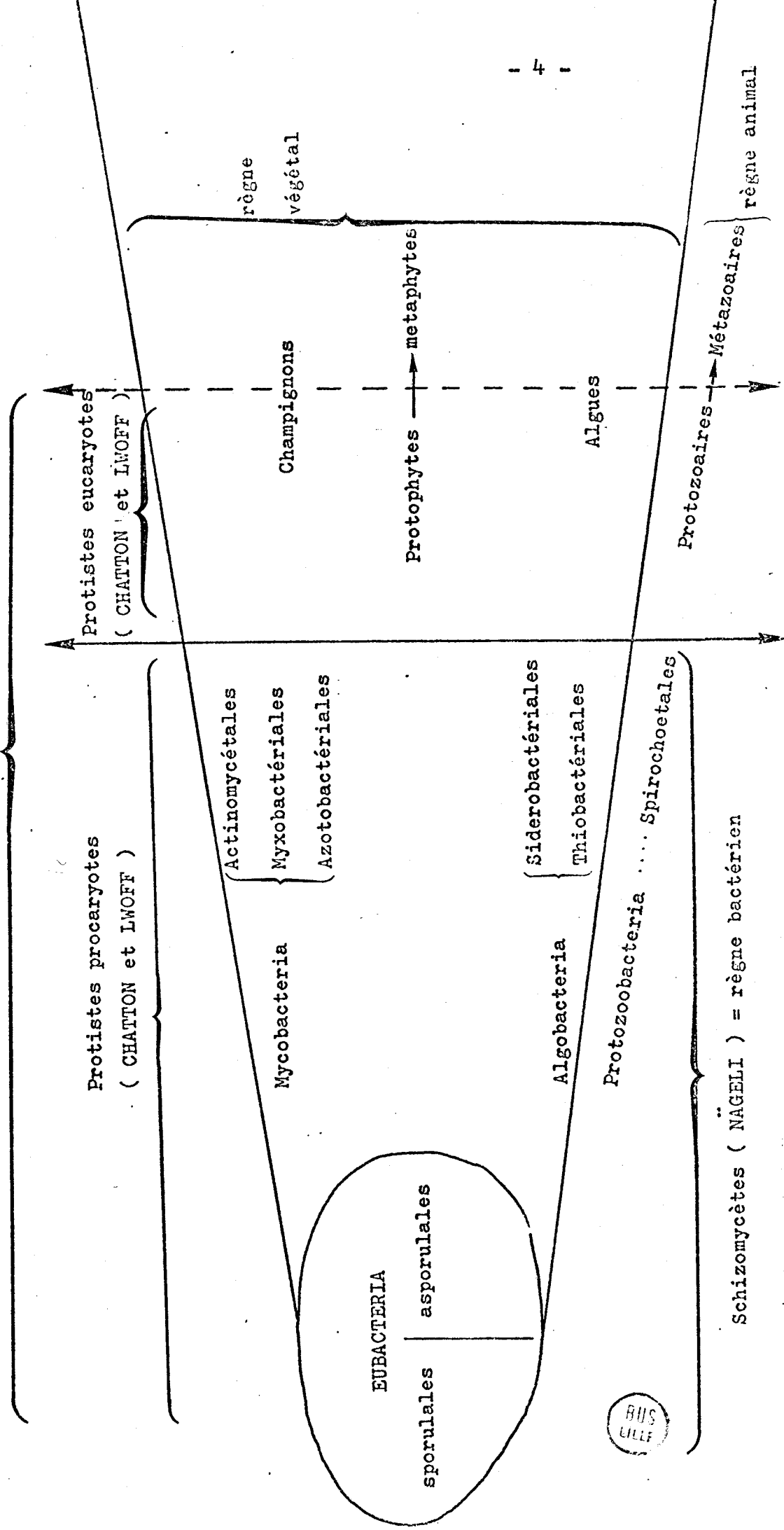
Dans la nature , certaines bactéries jouent un rôle biologique essentiel , par exemple , elles assurent la transformation de matières organiques animales ou végétales par des processus de putréfaction et de fermentation .

Chez l'Homme , la flore bactérienne de la peau , des muqueuses , et du gros intestin joue également un rôle biologique important . Elle exerce une action protectrice pour l'Homme . Mais aussi , l'Homme bénéficie d'inter-actions entre les microbes : certaines bactéries , hôtes normaux de l'intestin, telle Escherichia coli, secrètent des substances , les colicines , capables d'inhiber la multiplication excessive et dangereuse d'autres espèces bactériennes .

Les bactéries interviennent dans un grand nombre de problèmes économiques et industriels . Les activités chimiques des bactéries sont exploitées industriellement pour la fabrication de médicaments , l'enrichissement des aliments du bétail , la préparation de boissons

TABEAU I

Place des bactéries dans le monde vivant (d'après A.R. PREVOT)
 PROTISTES (HAECKEL) = règne intermédiaire



alcoolisées .

Les bactéries se sont révélées être de très remarquables modèles pour les recherches de biologie moléculaire . Elles sont capables de vivre et de se multiplier très rapidement dans des conditions simples et bien définies . De ce fait , les grands problèmes de croissance et de reproduction cellulaire ont été étudiés à l'aide de bactéries . JACOB et MONOD ont établi à l'aide d'Escherichia coli le schéma de la régulation de la biosynthèse des protéines .

La plupart des bactéries sont unicellulaires , peuvent être sphériques (cocci) , cylindriques (bacilles) ou spiralées . Leur taille est généralement comprise entre 1 et 10 microns . Ces cellules sont délimitées par une membrane , laquelle est entourée d'une paroi . Celle-ci protège la bactérie et sa structure est différente s'il s'agit d'une bactérie à Gram positive ou Gram négative . Ces deux types de bactéries sont identifiés après une coloration de Gram , qui fait intervenir la différence de perméabilité de la paroi . En microscopie électronique , la paroi de bactérie à Gram positive , apparaît comme une couche unique , d'opacité homogène , de 15 à 30 μ d'épaisseur . Par contre , chez les bactéries à Gram négative , elle apparaît comme une structure à trois feuillets , un feuillet clair entre deux feuillets opaques , l'ensemble étant séparé de la membrane cytoplasmique sous-jacente par un espace intermédiaire , siège du glycopeptide (ou muréine) . La paroi est le support des antigènes somatiques (Ag O) .

Beaucoup de bactéries sont capables de produire des polysaccharides , se situant hors de la paroi . Ces substances sont très abondantes mais diffuses et noyent les bactéries dans une sorte de mucus . Celui-ci est détecté au microscope électronique ou par coloration au rouge de ruthénium . Ce matériel extracellulaire n'est apparemment pas attaché à la surface bactérienne , il présente ainsi une masse sombre qui est éliminée par

centrifugation .

Chez certaines bactéries , la paroi est entourée d'une capsule dont le rôle n'est pas négligeable . La présence de cette capsule , chez les bactéries pathogènes capsulées , conditionne la virulence et rend la bactérie moins sensible à la phagocytose . Cette capsule renferme des polysaccharides de nature antigénique . Plus de 80 structures d'antigènes capsulaires de Klebsiella sont maintenant connues .

Dans le cadre des recherches sur la structure des glycoprotéines , nous nous sommes vus confier , par les Laboratoires CASSENNE , l'étude d'un lysat bactérien de Klebsiella pneumoniae doué d'activité anti-bactérienne dans le but de purifier cet extrait , de déterminer la structure de la molécule active et d'établir enfin une relation structure - activité. Nous avons conduit cette étude en trois temps :

- dans une première partie , nous avons analysé le principe actif dans son ensemble .

- dans une seconde partie , nous avons essayé de le fractionner pour sortir de l'extrait bactérien la molécule responsable de l'activité anti-bactérienne

- et dans une troisième partie , nous avons étudié la structure de cette molécule qui a été déterminée comme étant de nature glycoprotéinique . Dans chacun des cas , nous avons eu recours au test biologique de recherche d'activité anti-bactérienne . Cette recherche a été réalisée dans les Laboratoires CASSENNE .

Nous ferons procéder l'exposé de nos travaux par une revue générale sur la paroi bactérienne .

Ce travail a été présenté en communication orale au Forum des Jeunes , ORLEANS LA SOURCE , 12-14 Septembre 1979 .

C. BRUVIER , B. FOURNET , J. MONTREUIL et R. ZALISZ : Etude d'une glycoprotéine possédant une activité anti-bactérienne isolée d'un lysat de Klebsiella pneumoniae

GENERALITES
-:-:-:-:-

I - CLASSIFICATION GENERALE DES BACTERIES

Ce sont des microorganismes unicellulaires constitués par un cytoplasme sans mitochondries et d'un appareil nucléaire . La paroi cellulaire est constituée par des mucopolysaccharides différents de ceux des plantes et des animaux . Certains sont mobiles au moyen de flagelles . Certains sont sporulés , beaucoup sont pigmentés . Certains renferment une granule de soufre colloïdal , d'autres des inclusions d'hydroxyde de fer .

Suivant leur morphologie générale , leur physiologie générale , leur écologie et leurs affinités , l'embranchement des Schizomycètes peut être subdivisé en quatre sous embranchements présentés dans le tableau II p. 9

- EUBACTERIA
- MYCOBACTERIA
- ALGOBACTERIA
- PROTOZOOBACTERIA

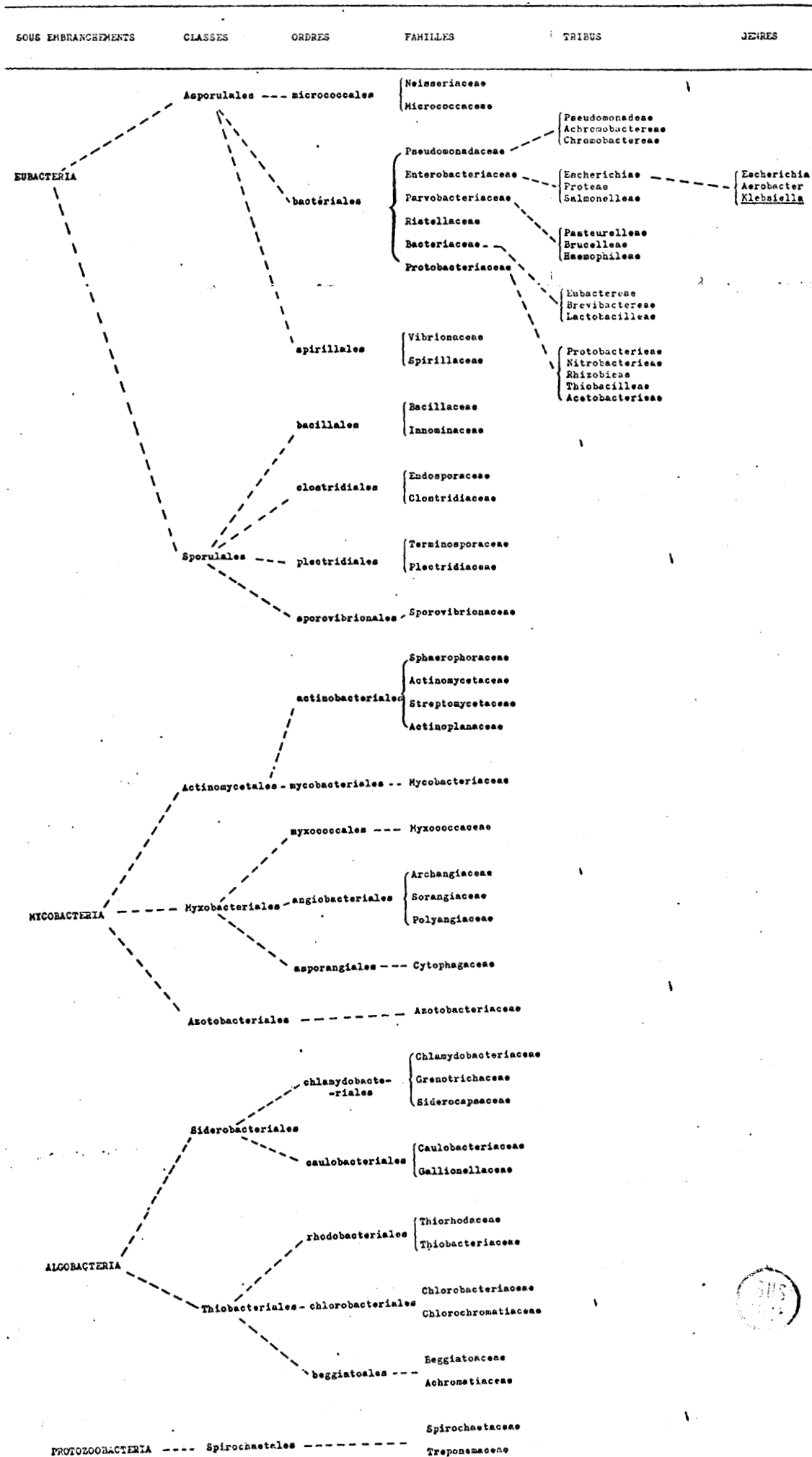
En ce qui nous concerne , nous nous intéressons plus particulièrement aux bactéries du genre Klebsiella appartenant à la famille Enterobacteriaceae (Eubactéria).

Le groupe des Klebsiella comprend des germes divers dont certains sont pathogènes (Klebsiella pneumoniae). Chez l'Homme , ils sont présents à l'état saprophyte dans les voies respiratoires et le tube digestif .

Klebsiella pneumoniae :

- synonymes : Bacille de Friedlander
- Hyalococcus pneumoniae
- Bacillus pneumoniae

EMBRANCHEMENT des Schizomycètes



- morphologie : bâtonnet de 4 à 5 μ sur 0,3 à 0,5 μ
à extrémités arrondies , isolés ou en paires.
Encapsulé , immobile , ne possède pas de
cils , ne forme pas de spores .
Bactérie gram négative .
- caractères généraux : elles donnent sur milieu solide ,
quand elles sont encore capsulées des colonies
bombées , très muqueuses et coulantes .
Klebsiella pneumoniae inoculé à une souris
blanche entraîne la mort rapide par septicémie
- structure antigénique : possède des antigènes O et des
antigènes capsulaires K .

II - STRUCTURE DE LA CELLULE BACTERIENNE

Une bactérie (âgée de quelques heures) appartenant aux
bactéries vraies (EUBACTERIA) comporte schématiquement (voir
figure 1 p. 11 :

- des éléments constants constitués par des enveloppes
cellulaires (paroi cellulaire et membrane cytoplasmique)
un cytoplasme contenant des inclusions diverses et un
appareil nucléaire .
- chez certaines bactéries , il peut exister des éléments
inconstants (capsule , cils ou flagelles , spores) .

Le cytoplasme abrite de la substance nucléaire non délimitée par une
membrane nucléaire ainsi que diverses inclusions . Il est entouré
d'une membrane cytoplasmique , très mince , riche en protéines (40%)
et en lipides (20%) associés en complexes lipoprotéiques . Cette

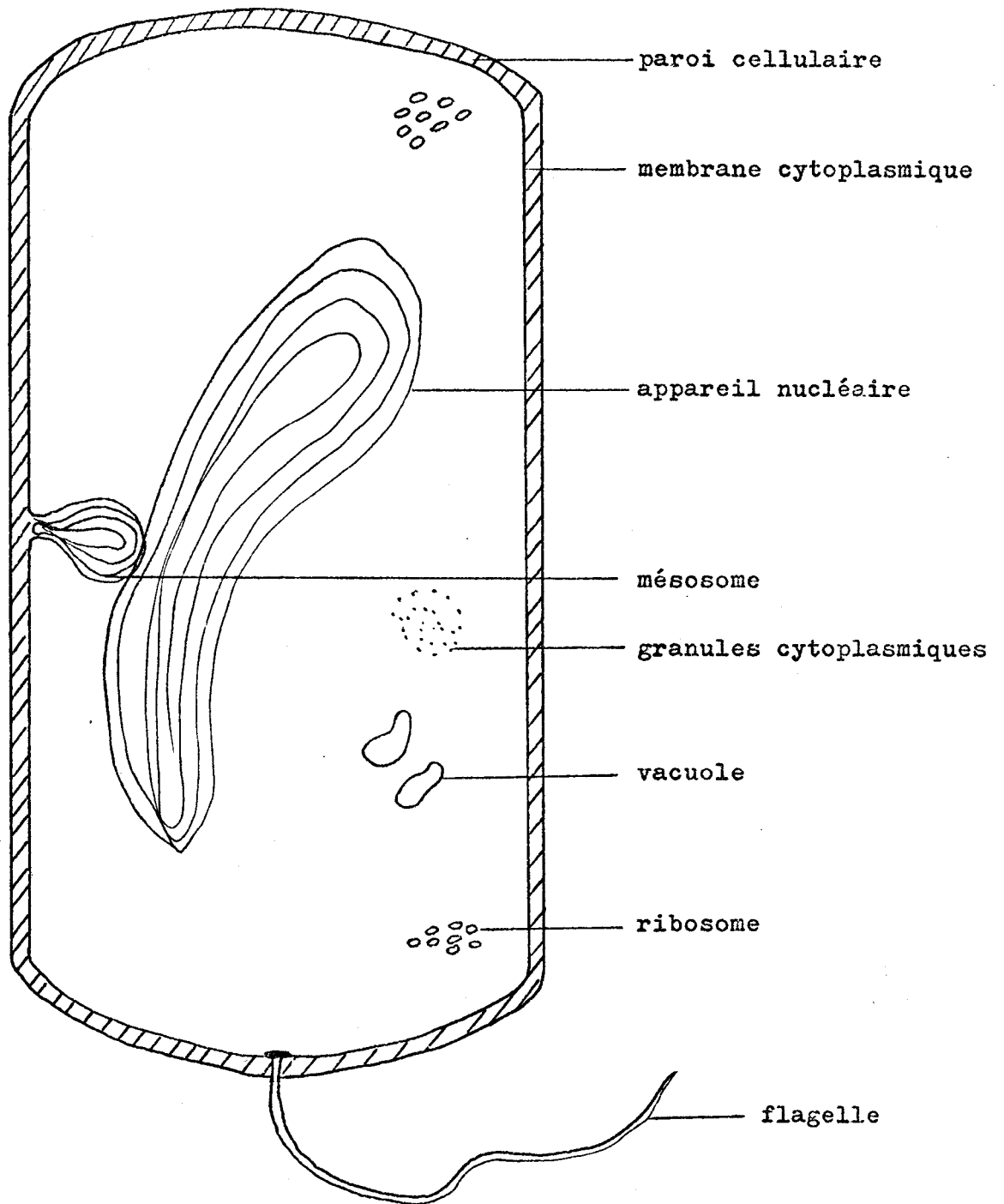


Figure 1

Structure schématique de la cellule bactérienne



membrane est considérée comme étant formée de trois couches: une couche centrale , claire , constituée de molécules de phospholipides orientées , située entre deux couches denses de protéines . Les structures intracytoplasmiques , appelées aussi mésosomes , ainsi que tout un réseau de membranes internes se situent à la périphérie du cytoplasme . Ces mésosomes sont de simples structures lamellaires , possédant une membrane à trois couches en continuité avec la membrane cytoplasmique . Cette dernière est recouverte d'une paroi , laquelle a été isolée par différents procédés physiques , chimiques et enzymatiques . Des études de structure ont été effectuées à partir de ces parois isolées . (Ceci fera l'objet d'un paragraphe ultérieur .)

Une capsule peut entourer certaines bactéries dites " encapsulées " et présenter différents aspects . Elle peut entourer une cellule bactérienne isolée ou quelques cellules associées bout à bout et se présente ainsi comme une sorte de halo clair . La présence d'une capsule est mise en évidence par différents systèmes de coloration ou par des réactions spécifiques antigène - anticorps (réaction de gonflement de la capsule de NEUFELD) . Certains auteurs comme PATE et ORDAL (1) utilisaient le rouge de ruthenium afin d'augmenter la densité du matériel bactérien . La figure 2 p.14 montre un exemple de cellule bactérienne colorée au rouge de ruthenium . Le cytoplasme est coloré et surtout le mucus , matériel qui entoure la bactérie sans y être fixé et qui peut être séparé de la bactérie par centrifugation . Par contre , la capsule se présente comme un halo clair . Une technique de coloration négative de BURRI à l'encre de chine , fait apparaître la capsule comme une zone incolore entourant un corps bactérien grisâtre sur le fond noir de

la préparation , ceci apporte des renseignements sur la forme et les dimensions de la capsule . Une technique de reconnaissance de la capsule est la réaction de NEUFELD qui favorise la réaction entre les constituants capsulaires et les anticorps homologues anticapsulaires qui se manifeste par une précipitation des complexes Ag - Ac à la surface de la capsule . La nature des constituants capsulaires est fréquemment polyholosidiques , quelquefois polypeptidiques . La capsule de pneumocoque virulent est constituée également de polysaccharides complexes dits " mixtes " . Ces polysaccharides sont formés d'un mélange d'oses , d'acides uroniques et de sucres aminés . Certains auteurs comme AVERY et HEIDELBERGER ont démontré que la spécificité sérologique de différents types de pneumocoques connus reposait sur des différences de structures de ces polysaccharides capsulaires .

Certaines bactéries sont pourvues de cils ou de flagelles ce qui permet la mobilité de ces microorganismes . Ceux ci ont été isolés par agitation mécanique , cela suffit à séparer les cils des corps bactériens puis une étude en microscopie électronique permet de déterminer leurs structures . De nature protéique , ces cils bactériens traversent la paroi bactérienne et sont insérés au niveau de la membrane cytoplasmique . Ils présentent un intérêt immunologique important en raison de leurs propriétés antigéniques . La protéine constitue l'antigène flagellaire (antigène H) . La spécificité sérologique d'une bactérie , au sein d'une espèce donnée peut être ainsi déterminée .

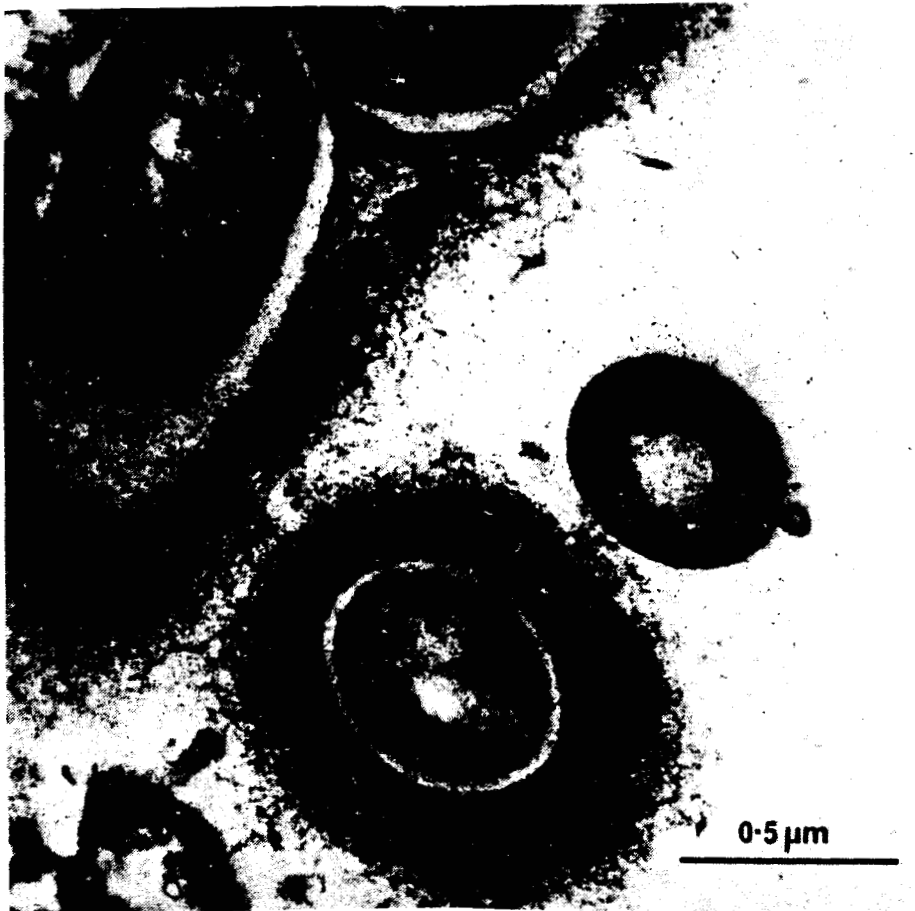


Figure 2

Cellule bactérienne colorée au rouge de ruthénium .

III - LA PAROI BACTERIENNE

L'étude moderne des parois bactériennes commence quand SALTON et al. (2) en 1951 réussirent à isoler et purifier des parois intactes de différentes bactéries .

1 - constitution chimique :

Elle constitue l'enveloppe externe de la cellule bactérienne et recouvre la membrane cellulaire . Par différents procédés (physiques , chimiques , enzymatiques) , il est possible d'obtenir les parois bactériennes dont les structures varient selon que la bactérie est gram positive ou gram négative . Cette différence de structure des parois explique la différence de perméabilité et de comportement à l'égard des colorants et de l'alcool après fixation . Ceci est vérifié lors de la coloration de Gram . Les bactéries peuvent être ainsi classées en deux catégories : gram négative et gram positive . Ceci est fondé sur la différence de structure de la paroi . Le tableau III p. 18 fait apparaître ces différences . La paroi de bactérie gram négative possède une structure et une constitution chimique plus complexes que celles des bactéries gram positives .

FLECK et al. (3) ont étudié au microscope électronique l'enveloppe cellulaire de Protéus vulgaris (bactérie gram négative) après différents traitements . La figure 3 p. 19 montre des sections de cellules chauffées (5 min. à 80°C) de Protéus vulgaris , ceci permet de visualiser plusieurs couches au niveau de la paroi de bactéries gram négatives, en particulier " l'outer membrane " constituée de L₁ , L₂ , L₃ , la région intermédiaire formée de G₁ , G₂ et M et finalement la membrane cytoplasmique . Lorsque les cellules bactériennes sont traitées par la trypsine et chauffées (5 min. à 80°C) , le matériel cytoplasmique est décollé partiellement .

-ment de la paroi , ainsi la membrane entourant le cytoplasme est bien visible (figure 4 p. 20), cela permet de caractériser deux parties bien distinctes : la paroi et la membrane cytoplasmique . Les figures 5 et 6 p. 21, 22 présentent des sections de cellules bactériennes traitées par une préparation enzymatique de Bacillus subtilis . Ce traitement a dégradé le matériel cytoplasmique , libère ainsi la paroi (60 - 70 Å) formée de deux couches denses aux électrons mesurant chacune 15 à 20 Å d'épaisseur séparées par une zone claire qui constitue " l'outer membrane " . La terminologie utilisée est celle de DE PETRIS (4) , lequel a décrit l'enveloppe cellulaire d'Escherichia coli. La paroi de ces bactéries gram négatives a une structure asymétrique et formée de plusieurs couches (5) . Elle apparaît être composée d'une partie externe appelée " membrane L " , d'une partie intermédiaire nommée " G " et d'une partie interne " M " transparente aux électrons et adjacente à la membrane cytoplasmique (C.M) (6) . DE PETRIS a ainsi identifié les différentes couches de la paroi bactérienne d'un point de vue chimique (lipoprotéines , lipopolysaccharide , mucopeptide et les protéines globulaires) . La figure 7 p. 23 illustre les résultats de DE PETRIS . Ce schéma représente la structure des parois bactériennes dites " smooth " et " rough " . Les protéines (Pr) et les polysaccharides (Ps) constituent une mosaïque sur la surface des parois (L₁) . Les lipides sont situés au niveau de la membrane L (L_p' et L_p'' indiquent schématiquement l'existence de différentes classes de lipides associés soit aux polysaccharides soit aux protéines .) Des protéines globulaires sont présentes au niveau de la partie " G " et peuvent être liées au mucopeptide (M) par des liaisons covalentes .

L'existence possible d'autres matériels (protéines ?) dans l'espace " M " entre G_2 et la membrane cytoplasmique est également indiquée. WEIDEL et al. (7 , 8) ont partagé cette structure en deux parties , l'une appelée " soft " et l'autre " rigid " . Les analyses chimiques et sérologiques du matériel cellulaire obtenu après centrifugation et traité soit par la trypsine soit par une préparation enzymatique de Bacillus subtilis ont permis à FLECK et al.(9) de montrer la présence de peptidoglycane et de lipopolysaccharide .

- le peptidoglycane :

La partie rigide de la paroi bactérienne est un peptidoglycane , appelé également glycopeptide ou mucopeptide ou glycosaminopeptide ou muréine . En général , ce peptidoglycane est constitué de deux N - acétylhexosamines : N - acétylglucosamine et acide N - acétylmuramique [3 - O - D - lactyl - D - glucosamine ou 3 - O - carboxy - éthyl - glucosamine] et de quelques acides aminés différents : alanine , acide glutamique , lysine , acide diaminopimélique (D.A.P.) . L'acide N - acétyl - muramique , trouvé seulement chez les bactéries , a été découvert par STRANGE et POWELL (10) en 1954 et sa structure a été élucidée par synthèse en 1954 par STRANGE et KENT (11) . L'acide aminé dicarboxylique (D.A.P.) est un second composé trouvé uniquement chez les bactéries . Il a été découvert , isolé et caractérisé par WORK (1949 - 1951) (12 , 13) . Un second acide aminé " non naturel " présent dans ces structures tel que D - alanine , a été découvert en 1955 par SNELL et al. (14 , 15) . La séquence des acides aminés attachée au groupe carboxylique de l'acide

TABLEAU III

Différences de constitution de la paroi de bactéries gram positives et gram négatives .

| bactéries gram <u>positives</u> | bactéries gram <u>négatives</u> |
|--|--|
| Trame discontinue de mucopeptide | Structure à 3 couches : - lipoprotéines (ext) - lipopolysaccharides - mucopeptide (int) |
| Absence de protéines (en général) | Présence d'unités protéiques |
| Peptides formés de 4 ou 5 acides aminés , absence d'arginine , proline , histidine , acides aminés soufrés , aromatiques . | Présence de tous les acides aminés connus (sauf l'histidine |
| Présence fréquente d'acides téchoïques | Absence d'acides téchoïques . |
| Fortes proportions de sucres aminés : 8 à 22 % . | Plus faibles proportions de sucres aminés : 2 à 3 % . |
| 30 à 50 % de polysaccharides . | 12 à 46 % de polysaccharides oses particuliers spécifiques de types : 3-6-desoxyribose , D-man-nose , galactose et glucose . |
| Faibles quantités de lipides éthéro-solubles 1 à 2 % . | Lipides plus abondants (complexe 11 à 22 % dont 8 % éthéro-solubles . |





Figure 3

Section de cellule de Protéus vulgaris .





Figure 4

Section de cellule de Protéus vulgaris traitée par la trypsine .



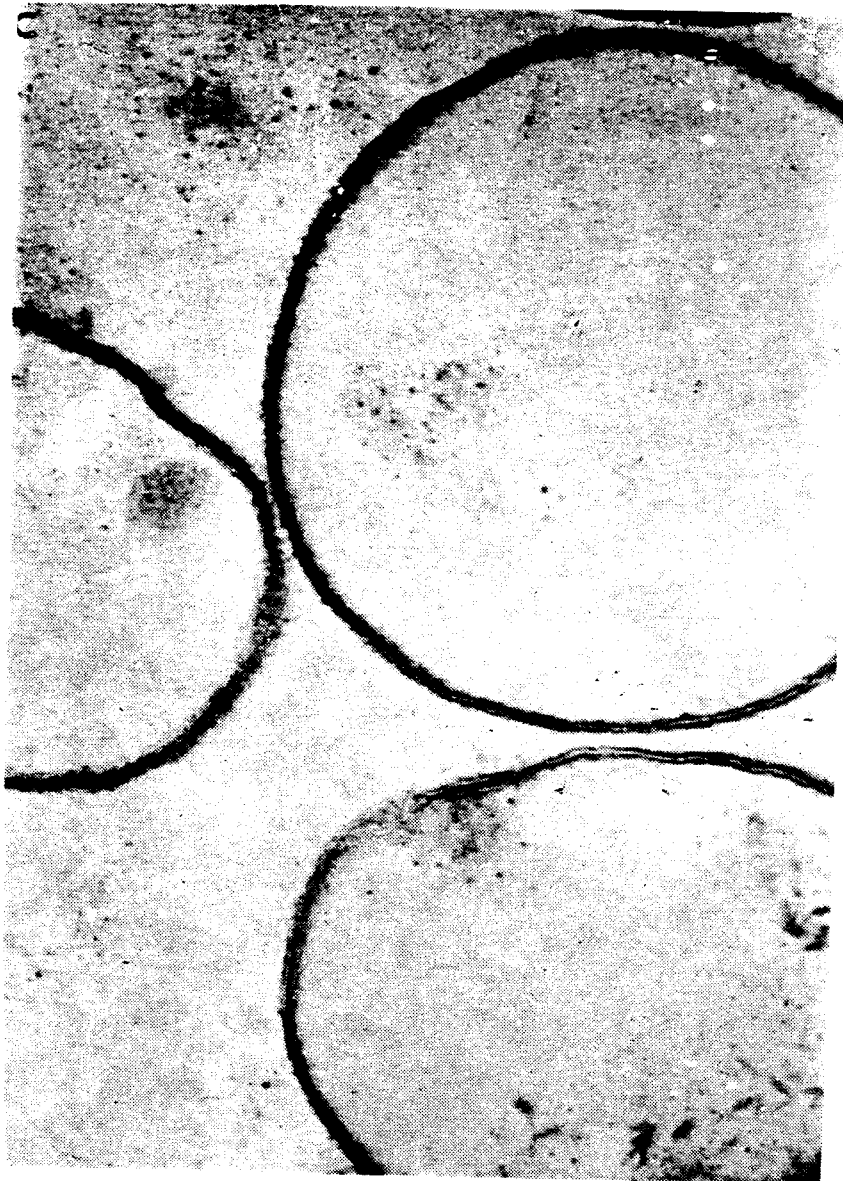


Figure 5

Sections de cellules de Protéus vulgaris traitées par une
préparation enzymatique de Bacillus subtilis . (dégradation
maximale)



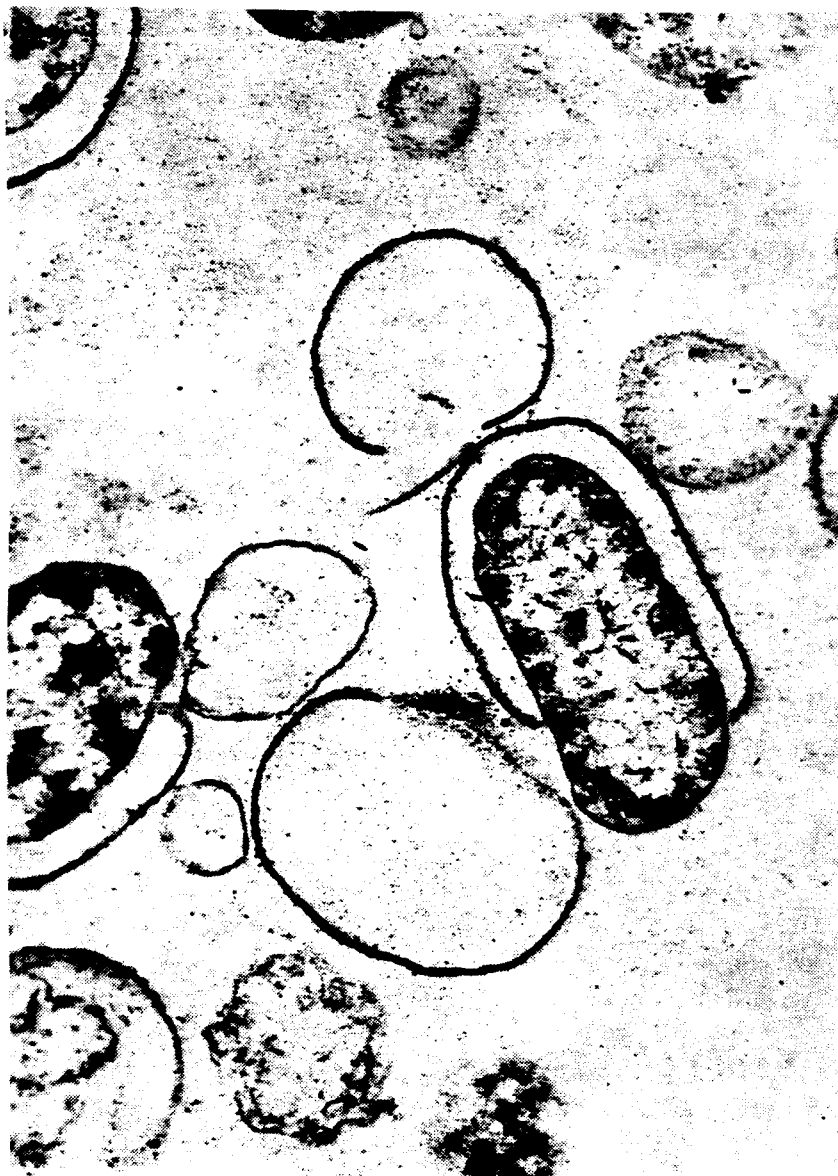
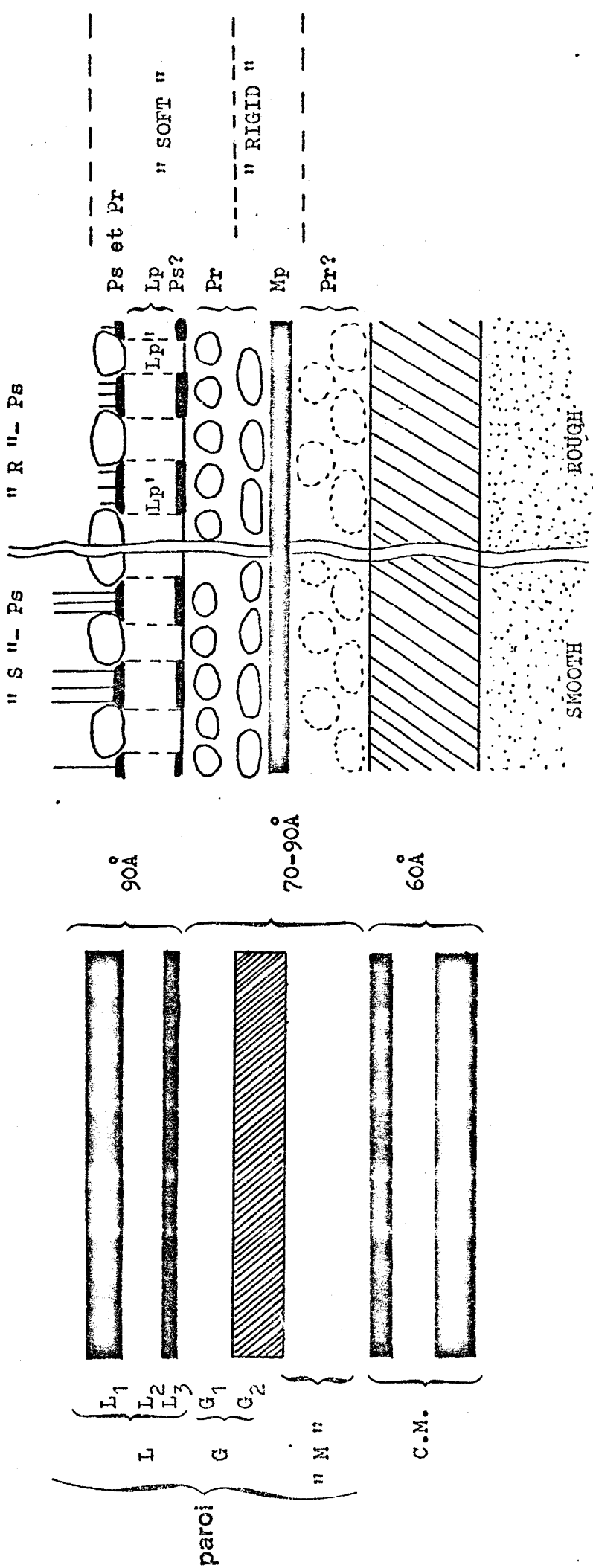


Figure 6

Sections de cellules de Protéus vulgaris traitées partiellement par une préparation enzymatique de Bacillus subtilis .





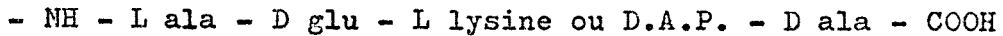
"outer membrane" : L₁, L₂, L₃ ; G : couche intermédiaire; C.M.: membrane cytoplasmique
 Pr : protéines ; Ps : polysaccharides ; Lp' , Lp" : lipides ; Mp : mucopeptide

Figure 7

Modèle schématique de la paroi de bactérie gram négative



N - acétylmuramique est la suivante :



ce qui a été démontré par l'action de peptidase spécifique . Un pont interpeptidique relie les peptides entre eux de manière différente soit, par des liaisons directes (- CO - NH -) entre acides aminés de peptides voisins ou plus exactement entre le D - alanine terminal et le L - lysine du peptide voisin (voir figure 8 p. 25) , soit par l'intermédiaire d'acides aminés supplémentaires .

Ce peptidoglycane , de nature bidimensionnelle , confère à la paroi sa résistance et maintient la forme caractéristique de la bactérie . La rigidité est apportée par la polymérisation de l'unité disaccharide - protéine . Les résidus d'acide N - acétylmuramique sont substitués par des tétrapeptides lesquels sont associés par des ponts interpeptidiques . Ces différentes liaisons (peptidiques et osidiques) donnent à la paroi sa résistance mécanique . L'hydrolyse d'une de ces liaisons provoque la solubilisation de ce complexe macromoléculaire .

Dans la plupart des bactéries gram négatives , les composés constituant la partie " non peptidoglycane " représentent environ 90% du poids des parois et sont des complexes protéines - polysaccharides - lipides (PPL) . Lorsque ces parois bactériennes isolées sont décapées à l'aide de détergent et de phénol, une partie insoluble résiste (environ 10% du poids de la paroi) ayant la forme caractéristique et la rigidité de la structure

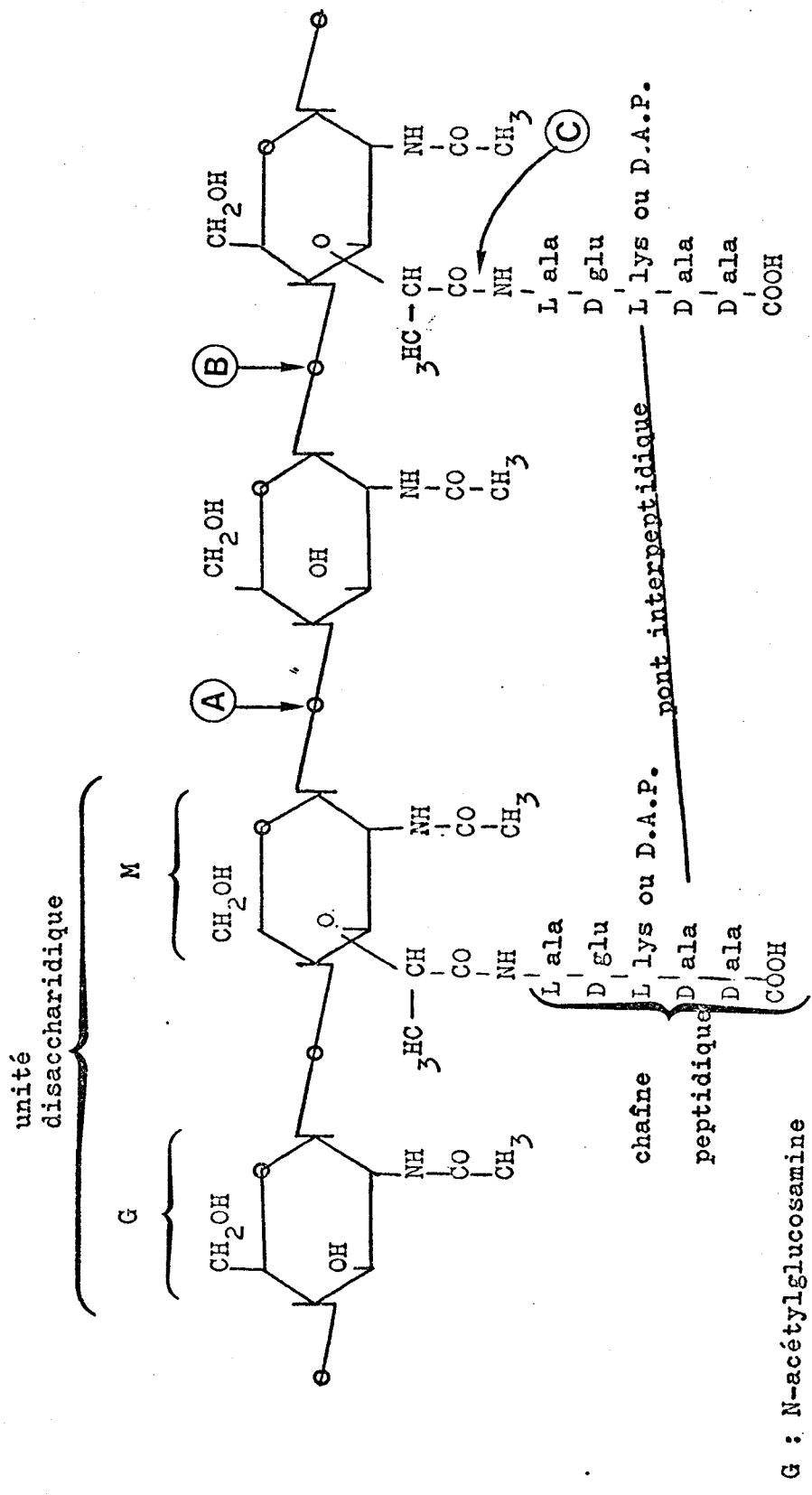


Figure 8

Structure générale du peptidoglycane



originale (16) . Par contre , chez les bactéries gram positives , la partie " non peptidoglycane " représente 10 à 50% du poids des parois , ce peut être des protéines , des acides teichoïques , des acides teichuroniques (polymères de N - acétylgalactosamine et d'acide glucuronique) et des polymères de L - rhamnose et de N - acétyl - D - glucosamine . Ces polymères sont liés de manière covalente au peptidoglycane . Cet ensemble " non peptidoglycane " des parois bactériennes localisé à la surface des cellules , constitue un site d'activité biologique important . Par exemple , ce sont des antigènes lesquels contiennent des déterminants chimiques responsables de la spécificité antigénique de la bactérie . Ils contiennent des récepteurs de phages . Ce sont aussi des endotoxines qui sont impliquées dans la virulence des bactéries (17) .

- les lipopolysaccharides (L.P.S.) :

En 1935 , BOIVIN et al. (18) , en 1937 MORGAN (19) , en 1945 GOEBEL et al. (20) ont introduit des méthodes classiques d'extraction de substances antigéniques de cellules bactériennes représentées par un complexe lipide - protéine - lipopolysaccharide (21) . L'activité antigénique ainsi que son activité endotoxique sont portées par le lipopolysaccharide . Ce dernier est un antigène " faible " lequel se convertit en antigène " fort " lorsqu'il est complexé à une protéine . Ce complexe antigénique a pu être dissocié en différents composés grâce à des agents dissociants tels que le phénol , l'acide acétique , la formamide sous des conditions bien définies . Suivant le mode d'extraction , l'antigène complet (L.P.S. - protéine) peut être isolé ou le lipopolysaccharide détaché du lipide B et de la protéine . Le tableau IV p. 28 résume

la composition de ce complexe . Cette fraction antigénique est composée de lipide A et B différenciés par la stabilité de leurs liaisons et d'une partie protéine - polysaccharide . La fraction polysaccharidique comprend d'une part le polysaccharide portant l'activité antigénique et d'autre part " le core " .

Situés au niveau le plus externe de la paroi bactérienne , les L.P.S. constituent les groupes déterminants spécifiques des antigènes polysaccharidiques bactériens (appelés Antigène O) . Ils sont connus aussi comme endotoxines car injectés aux lapins à une dose de 0,001 µg/Kg , ils provoquent une fièvre (effet pyrogénique) , et injectés à une dose de 5 mg/Kg à une souris provoquent la mort (effet toxique) (22) .

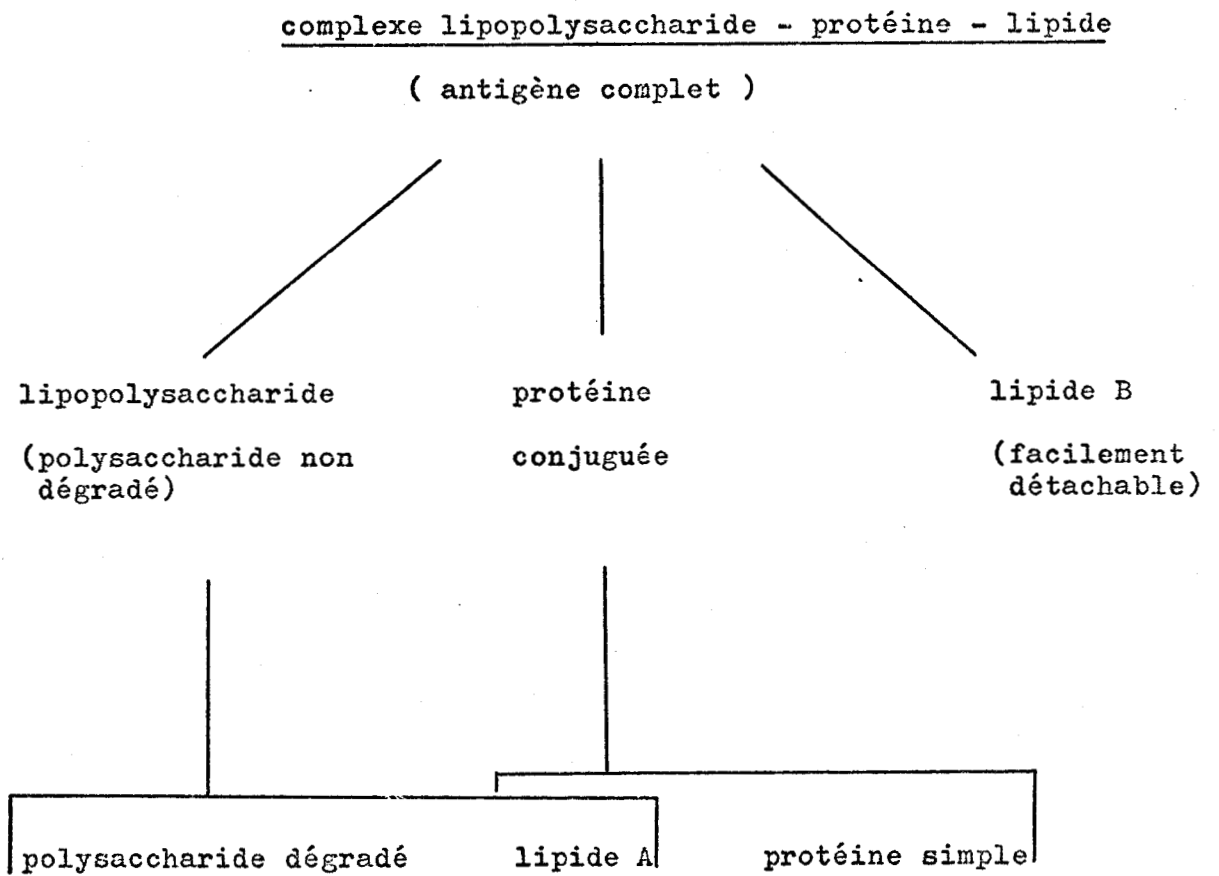
La structure de ces L.P.S. a été étudiée en détail chez Salmonella typhimurium (23) laquelle est exposée figure 9 p. 30 . Nous prenons comme référence ce schéma , qui sera quelque peu modifié lorsqu'il sera placé dans le genre " Klebsiella " . En règle générale , ces L.P.S. possèdent trois parties distinctes (figure 10 p. 30) :

- . une chaîne O
- . une chaîne polysaccharidique centrale appelée " core "
- . une partie lipidique : lipide A

La chaîne O est constituée d'unités de répétition d'un tétrasaccharide chez Salmonella typhimurium (ou de pentasaccharide) . Elle renferme des sucres particuliers , par exemple le 6 - deoxyhexose ou le 3,6 - dideoxyhexose . Des parties variées de l'unité de répétition servent comme groupes déterminants dans les interactions

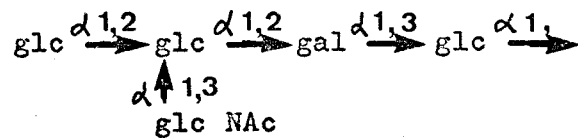
TABLEAU IV

Composants du complexe lipopolysaccharide - protéine - lipide
d'après WESTPHAL et LÜDERITZ (24)

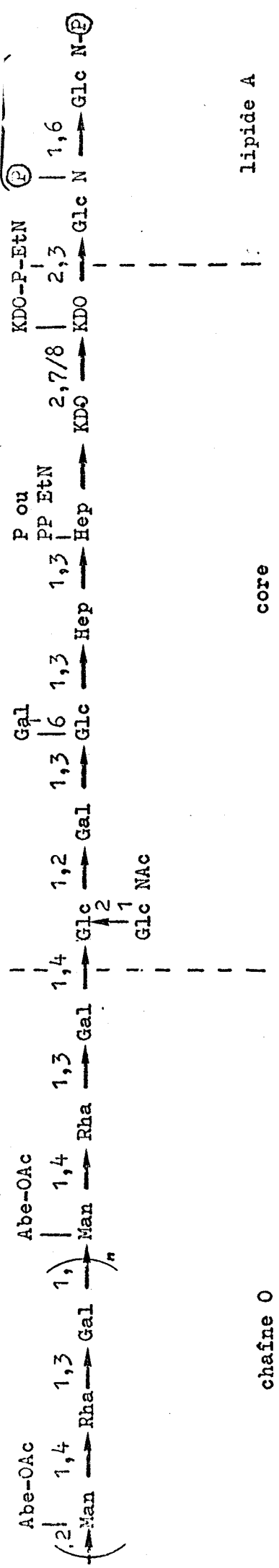


L.P.S. avec les anticorps correspondants (Ac O) . Cette chaîne O différencie les L.P.S. des différentes espèces et porte la spécificité sérologique .

A ces chaînes latérales se greffe la partie centrale polysaccharidique nommée " core " qui est très semblable dans sa structure grossière chez les Entérobactéries . JANSSEN et al. (25) ont étudié la région polysaccharidique du " core " d'entérobactériaceae nommé " type R₃ " . Ce core , commun à Shigella flexneri , et à quelques Echerichia coli a la structure suivante :



Ces L.P.S. sont des composés de " l'outer membrane " de l'enveloppe cellulaire de bactérie gram négative . La figure 11 p. 31 montre d'une part toute une cellule bactérienne gram négative (A) et d'autre part une paroi isolée (B) , la partie intermédiaire étant une représentation schématique de la paroi . Les traits pleins représentent " l'outer membrane " et les pointillés la " R - layer " contenant le peptidoglycane . Un modèle basé sur le concept d'une " mosaïque fluide " a été suggéré (26) où les molécules de L.P.S. sont intercalées dans la partie externe de " l'outer membrane " (figure 12 p. 32) .



Abe : Abequose

EtN : éthanolamine

KDO : acide 3-O-deoxy-D-manno-octulosonique

Figure 9

Exemple de structure de L.P.S. (*Salmonella typhimurium*)

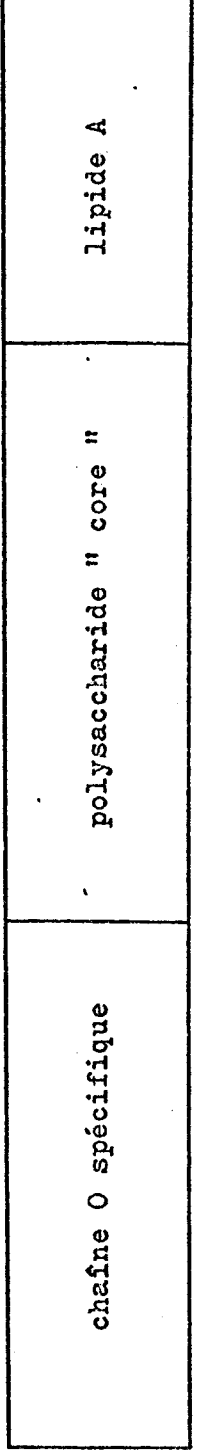


Figure 10

Représentation schématique des trois éléments constituant les lipopolysaccharides



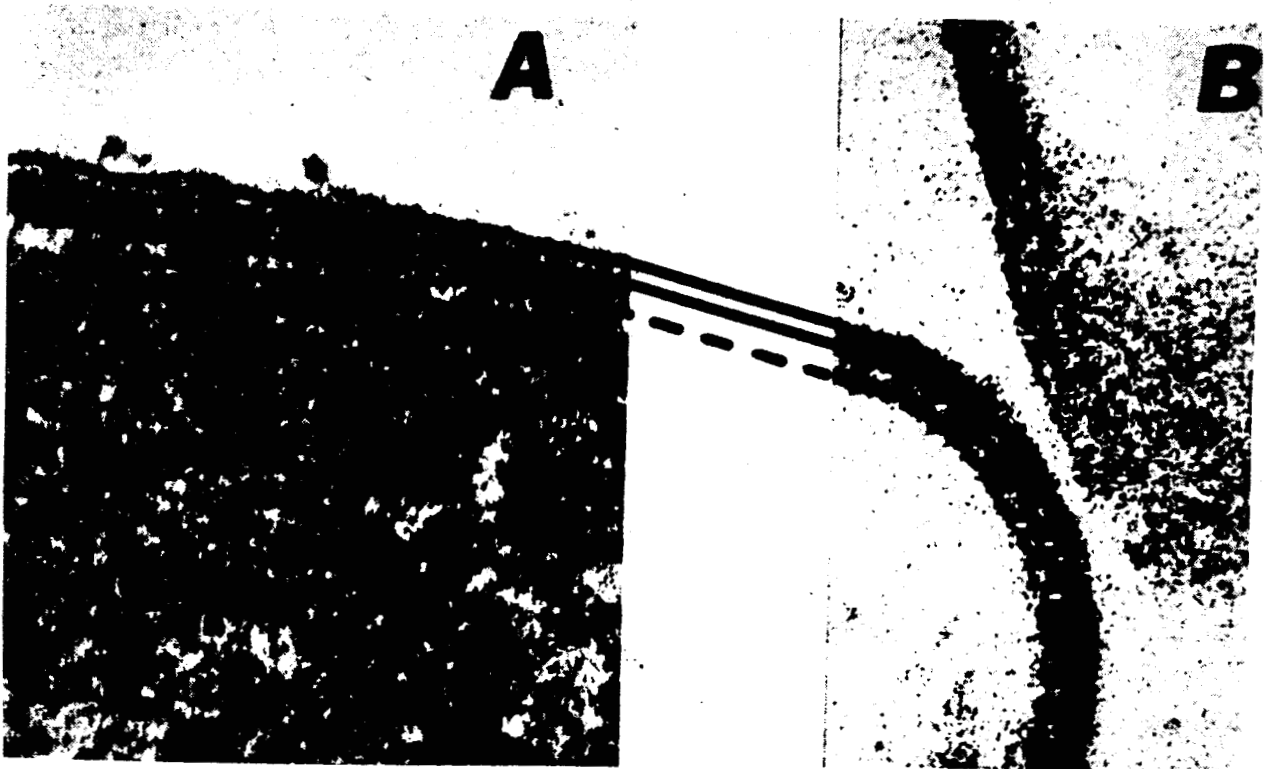


Figure 11

Sections de cellule d'Escherichia coli : A- toute la cellule ;
B- paroi isolée . La partie intermédiaire représente un schéma
de la paroi : les traits pleins représentent " l'outer membrane"
et les pointillés la " R-layer " contenant le peptidoglycane .

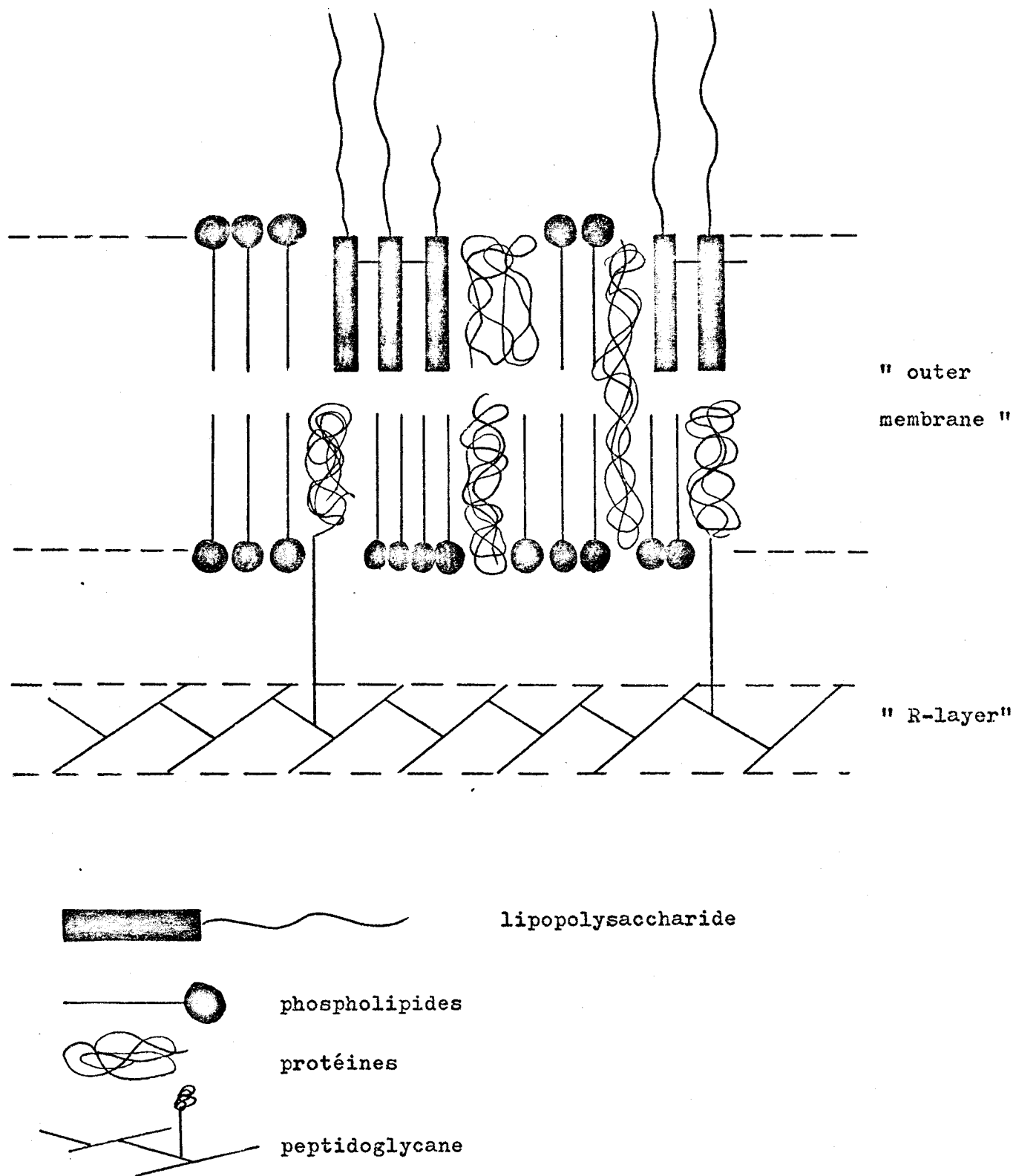


Figure 12

Modèle général de paroi de bactérie gram négative



2 - fonction de la paroi :

. rôle mécanique : la présence de la paroi autour de la bactérie lui confère un rôle mécanique de protection à l'égard du protoplasme bactérien . Par sa rigidité , elle en maintient la forme , en son absence , toutes les bactéries prennent une forme sphérique et se lysent rapidement sous l'effet d'un choc osmotique . Par son élasticité , elle permet à la bactérie de retrouver sa forme initiale après des traitements divers .

. rôle de la paroi dans la coloration de Gram : tous les protoplasmes (privés de la paroi) sont gram négatifs , même ceux provenant de bactéries gram positives . La différence de structure des parois de bactéries gram positives ou gram négatives suffit à expliquer leur différence de perméabilité et de comportement à l'égard des colorants .

. rôle pathogène : certains de ses constituants sont toxiques , tels que les endotoxines des bactéries gram négatives . La fraction lipidique (lipide A) du lipopolysaccharide serait le support de la toxicité . A l'état isolé , il ne paraît pas conserver cette propriété . L'importance de ce constituant a été suggéré par WESTPHAL et LÜDERITZ dès 1954 .

. rôle immunologique : la plupart des constituants antigéniques spécifiques (antigènes somatiques) d'une bactérie sont localisés au niveau de la paroi . Ce sont eux qui permettent l'identification sérologique de l'espèce , du groupe ou du type sérologique d'une bactérie . Au point de vue immunologie , le rôle des constituants antigéniques pariétaux est important . Les complexes lipopolysaccharidiques représentent les antigènes O des bactéries et stimulent dans l'organisme la production d'anticorps O - spécifiques . Ces lipopolysaccharides peuvent faire fonction de

récepteurs pour un certain nombre de phages , la présence ou l'absence d'un seul sucre décide de l'absorption ou de l'inactivation du phage .

IV - DIFFERENTS ANTIGENES

1 - différents types d'antigènes :

Parmi les différentes espèces bactériennes , différents types d'antigènes ont été mis en évidence . L'existence de deux classes distinctes d'antigènes bactériens de surface a été reconnue par JOOS (27) mais aussi par SMITH et REAGH (28) . Ce sont d'une part les antigènes somatiques appelés également " antigène O " et d'autre part les antigènes flagellaires " antigène H " . Un troisième type d'antigène (antigène K) provenant de la capsule a été mis en évidence en particulier par la réaction de NEUFELD .

- Les antigènes somatiques (Ag O) :

L'origine de O provient de l'allemand ohne hauch (sans flagelle) . Ces antigènes O sont constitués d'une partie lipidique (lipide A) liée covalentielllement au polysaccharide nommé " core " lequel est attaché à une unité de répétition spécifique " O " sérologiquement différente . L'activité antigénique est portée particulièrement au niveau de cette unité de répétition . La figure 10 p.30 présente la structure générale de l'antigène O .

- Les antigènes flagellaires (Ag H) :

provenant de l'allemand hauch = buée . Ces antigènes présents au niveau des flagelles sont de nature protéique et spécifiques du type sérologique d'une bactérie au sein d'une espèce donnée . En 1937, GARD (29) et en 1939, GARD et ERIKSON (30) ont remarqué que ces antigènes flagellaires en présence de leurs anticorps

correspondants produisent une immobilisation de la bactérie .

- Les antigènes capsulaires (Ag K) :

provenant de l'allemand Kapsel . Ces antigènes K correspondent à la présence d'une capsule . La définition d'une capsule est plutôt arbitraire . Bien développée , elle est visible au microscope . Parfois elle est peut-être présente mais n'est pas observable au microscope . Cependant , elle est parfaitement détectable par d'autres méthodes (réaction de NEUFELD et la réaction colorée à " l'India Ink ") . Beaucoup de bactéries gram négatives produisent des quantités importantes de matériel extracellulaire non fixé à la surface cellulaire qui diffuse librement dans le milieu de culture , ainsi se forme un mucus qui peut être séparé de la bactérie par centrifugation . D'après WILKINSON , les polysaccharides de ce mucus possèdent des propriétés sérologiques et une composition chimique similaires aux polysaccharides de l'antigène K .

* nature chimique :

Beaucoup d'antigènes capsulaires de bactéries gram négatives sont de nature polysaccharidique et une grande majorité porte des charges négatives apportées par des groupements phosphates et pyruvates , des acides hexuroniques , ou des acides aminohexuroniques . Les antigènes de bactéries gram négatives sont rarement de nature protéique . Cependant Pasteurella pestis produit un antigène capsulaire protéique et Pasteurella multocida possède un antigène capsulaire de nature glycoprotéinique .

* condition de culture pour la formation d'antigènes capsulaires :

Les capsules ne sont pas une partie intégrante et essentielle de la paroi bactérienne . La production d'antigènes capsulaires dépend des conditions de culture . DUGUID et WILKINSON , par des études systématiques ont montré que la production de polysaccharides capsulaires était fonction de la température de culture . Un meilleur développement est favorisé par des températures comprises entre 15°C et 20°C .

* propriétés sérologiques des antigènes capsulaires :

Chez les bactéries gram négatives encapsulées , les antigènes capsulaires interfèrent lors de la réaction de l'antigène O avec son anticorps correspondant . L'effet inhibiteur des antigènes capsulaires sur la réaction sérologique des antigènes O à la surface bactérienne est aboli en chauffant la bactérie avant la réaction sérologique dans l'antisérum O . La classification sérologique de "Klebsiella" est basée sur les réactions de l'antigène capsulaire , lequel est une substance spécifique .

* rôle biologique des antigènes capsulaires :

Certaines bactéries gram négatives (Klebsiella) présentent une capsule très importante lors de l'isolement de leur milieu biologique et peuvent la perdre lors de cultures prolongées .

Cela permet de conclure que la capsule joue un rôle dans le maintien et la croissance de la bactérie dans son environnement naturel .

Une des fonctions des antigènes capsulaires est de rendre la bactérie moins vulnérable à la phagocytose . JANN et al. (31) ont étudié le comportement d'Escherichia coli encapsulé (K 42) et de son mutant non capsulé (K ⁻) face à la phagocytose . La bactérie non capsulée est réellement phagocytée par des macrophages , par contre , K 42 ne l'était pas . L'incubation avec un sérum anti-K42 rend la bactérie capsulée susceptible d'être phagocytée . BURROWS et BACON (32) ont montré que Pasteurella pestis encapsulé développait la résistance à la phagocytose . Beaucoup d'antigènes capsulaires sont chargés négativement , cela favoriserait cette résistance à la phagocytose .

Les antigènes capsulaires protègent la bactérie gram négative contre l'action des phages " O " , leurs récepteurs étant l'antigène O . KAUFFMANN (33) a montré une corrélation entre l'épaisseur de la capsule et sa capacité de protection contre l'action de ces phages " O " (34) .

V - LES ANTIGENES CAPSULAIRES DE Klebsiella (Ag K)

La nomenclature des bactéries gram négatives est confuse depuis que les termes Klebsiella et Aerobacter sont fréquemment utilisés comme synonymes . Selon KAUFFMANN (35) , le terme d'Aerobacter n'est plus utilisé . Les différentes espèces sont différenciées en types sérologiques sur la base des propriétés de leurs antigènes capsulaires . Les nomenclatures les plus anciennes

utilisaient des lettres capitales A , B , C ... , maintenant elles sont remplacées par des chiffres K_1 , K_2 , K_3

Les polysaccharides capsulaires ont été étudiés par NIMMICH (36) qui a caractérisé 81 antigènes capsulaires différents . Leurs importances sont montrées par le fait qu'ils sont beaucoup plus nombreux que les antigènes somatiques " O " .

HEIDELBERGER et al. (37) ont établi la corrélation directe entre la structure des polysaccharides et la spécificité antigénique . Les antigènes sérotypiquement identiques ont un monosaccharide ou un oligosaccharide immunodominant identique plutôt qu'une structure totalement identique .

En général , la structure de ces antigènes capsulaires est constituée d'une unité de répétition , laquelle peut être mise en évidence par les méthodes suivantes : méthylation , RMN , hydrolyse partielle , oxydation periodique et réduction du groupement carboxylique des acides uroniques . Les différents monosaccharides présents dans ces structures sont :

- . les oses neutres : D-galactose , D-mannose , D-glucose ,
L-rhamnose , L-fucose
- . les acides uroniques : acide D-glucuronique ,
acide D-galacturonique
- . les acides pyruviques et des acides cétoniques dont les structures n'ont pu être encore déterminées .

HEIDELBERGER et NIMMICH (38) en 1976 ont classé les différents antigènes capsulaires de Klebsiella selon la nature de leurs sucres présents ou chénotypes (voir tableau V p. 40) . Par exemple , K_2 et K_{24} ont les mêmes constituants (glucose , mannose , acide

glucuronique) mais leurs rapports molaires sont différents ainsi que leurs types de liaison . Les structures de ces différents antigènes capsulaires sont exposées dans le tableau VI p. 41 . D'après ces données structurales LAPEYRE (39) a établi un classement des antigènes K selon des caractéristiques générales : avec ou sans acide uronique , structure linéaire ou ramifiée , position de l'acide par rapport à la ramification (voir tableau VII p.45) .

VI - IMMUNOLOGIE

L'enveloppe cellulaire d'une même bactérie qui comprend la capsule et la membrane dite " outer membrane " contient les antigènes capsulaires et somatiques qui, injectés aux animaux , induisent la formation d'anticorps et réagissent sérologiquement avec ces derniers . D'une part , les anticorps anti-K réagissent avec la capsule , provoquant une agglutination , d'autre part , les anticorps anti-O sont "masqués" par la capsule , laquelle peut être éliminée en chauffant ou en lavant la bactérie . Cela permet ainsi l'action des anticorps anti-O .

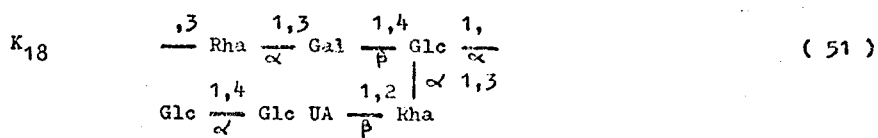
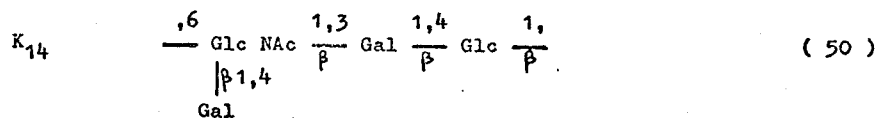
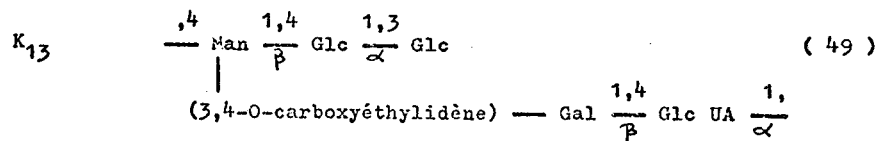
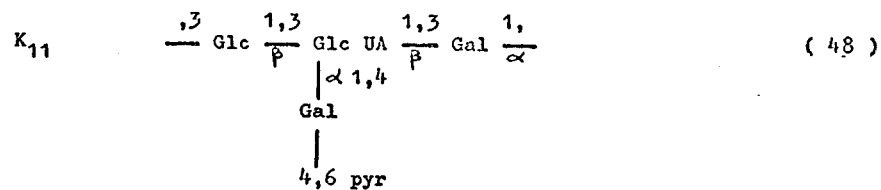
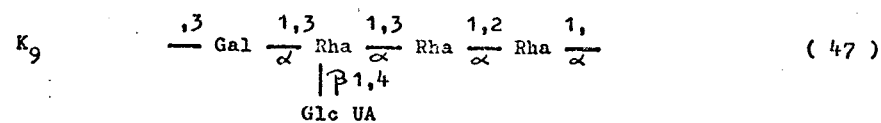
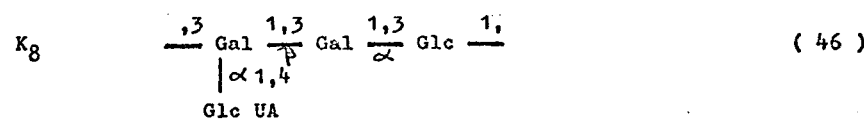
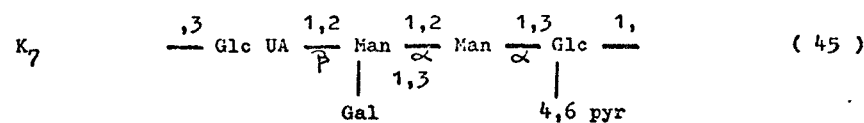
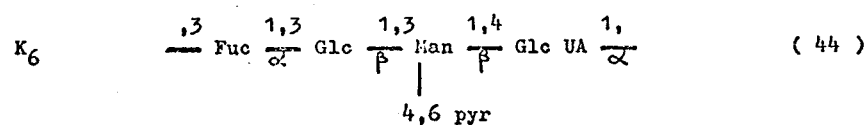
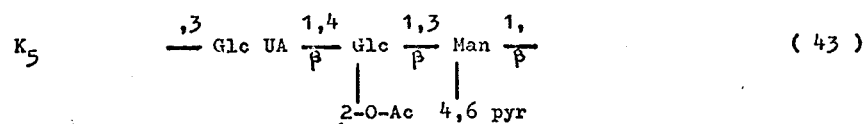
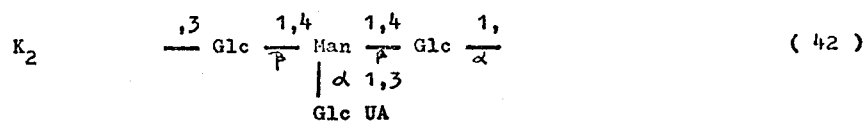
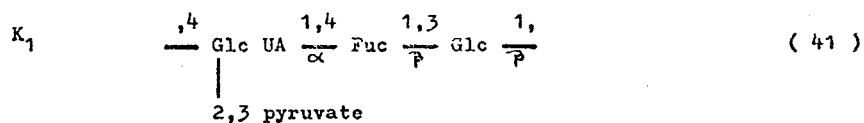
Le phénomène immunologique est la reconnaissance de structures partielles d'antigènes polysaccharidiques par des anticorps ou des récepteurs de cellules immunes . Ces structures partielles appelées groupes déterminants ou déterminants antigéniques peuvent être constituées d'oligosaccharides ou de monosaccharides . Deux aspects sont à considérer lorsque ces polysaccharides bactériens agissent comme antigènes . Il s'agit d'une part de la spécificité antigénique qui est la réactivité avec les anticorps et d'autre part de l'immunogénicité qui constitue la capacité d'induire la formation d'anticorps .

TABLEAU V

Constituants des polysaccharides capsulaires (Ag K) de *Klebsiella*,
classés selon leurs chémotypes (d'après HEIDELBERGER et NIMMICH (40))

| CONSTITUANTS | TYPE SEROLOGIQUE K |
|---|---|
| acide glucuronique , galactose , glucose | 15,25,51,78,8 ^P ,27 ^P |
| acide glucuronique , galactose , mannose | 20,43,66,76,21 ^P ,29 ^P ,42 ^P , 74 ^P |
| acide glucuronique , galactose , rhamnose | 9,47,52,81 |
| acide glucuronique , glucose , mannose | 2,24 |
| acide glucuronique , glucose , rhamnose | 17,44 |
| acide glucuronique , glucose , fucose | 1,54 ^P |
| acide glucuronique , galactose , glucose , mannose | 4,10,28,39,50,59,61,62, 77,5 ^P ,7 ^P ,11 ^P ,13 ^P ,26 ^P ,30 ^P 31 ^P ,33 ^P ,35 ^P ,46 ^P ,69 ^P |
| acide glucuronique , galactose , glucose , fucose | 16,58 ^P |
| acide glucuronique , galactose , glucose , rhamnose | 18,19,23,41,79,12 ^P ,36 ^P , 45 ^P ,55 ^P ,70 ^P , |
| acide glucuronique , galactose , mannose , rhamnose | 40,53,80 ^P |
| acide glucuronique , glucose , mannose , fucose | 60,6 ^P |
| acide glucuronique , glucose , mannose , rhamnose | 71,64 ^P ,65 ^P |
| acide glucuronique , galactose , glucose , mannose , fucose | 68 ^P |
| acide glucuronique , galactose , glucose , mannose , rhamnose | 67,14 ^P |
| acide galacturonique , galactose , mannose | 49,75,3 ^P ,57 ^P |
| acide galacturonique , glucose , rhamnose | 34,48 |
| acide galacturonique , galactose , fucose , rhamnose | 63 |
| acide pyruvique , galactose , rhamnose | 32 |
| acide pyruvique , galactose , glucose , rhamnose | 56,72 |
| acide 3-desoxy-L-glycero-pentulosonique , galactose , glucose | 38 |
| acide 4-O(1 carboxyéthyl)D-glucuronique , galactose , glucose | 37 |
| acide cétonique inconnu , galactose , glucose | 22 |

P : substituant pyruvate

Structures des différents polysaccharides capsulaires de *Klebsiella*.

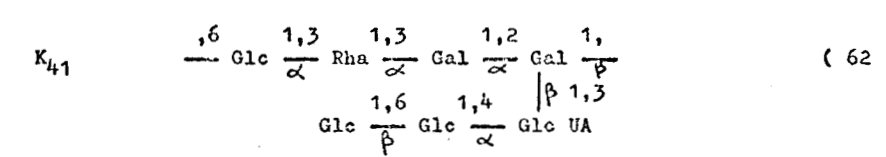
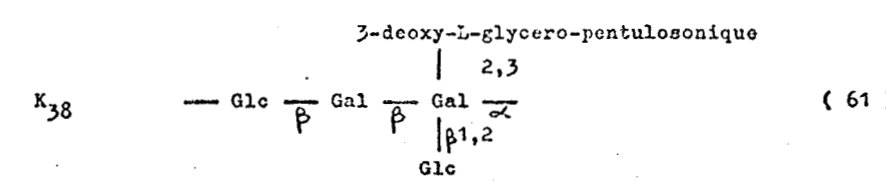
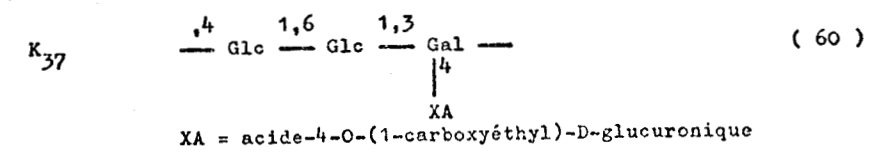
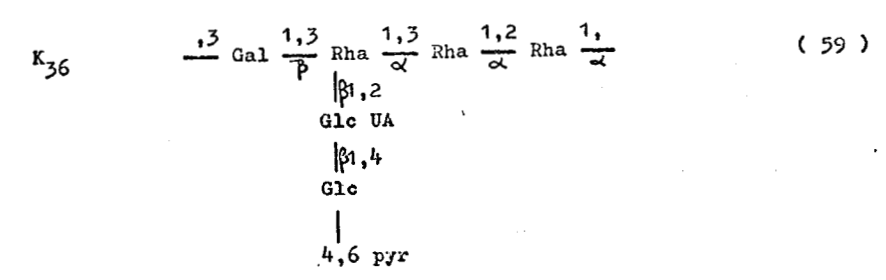
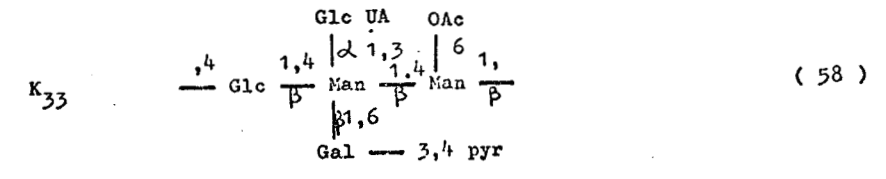
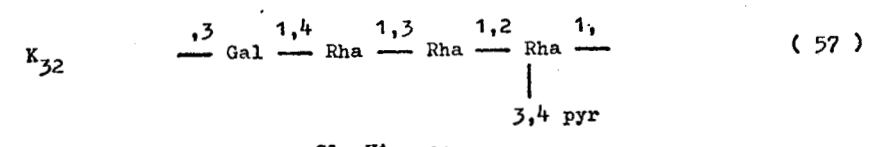
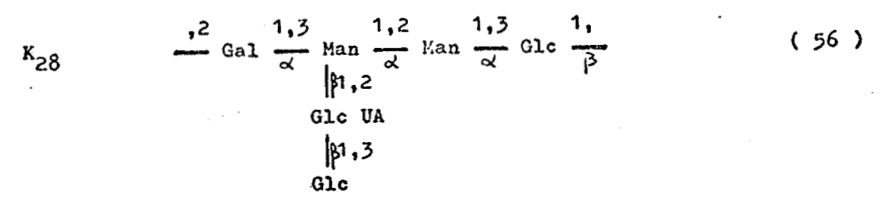
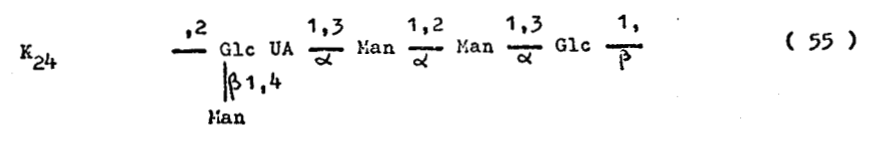
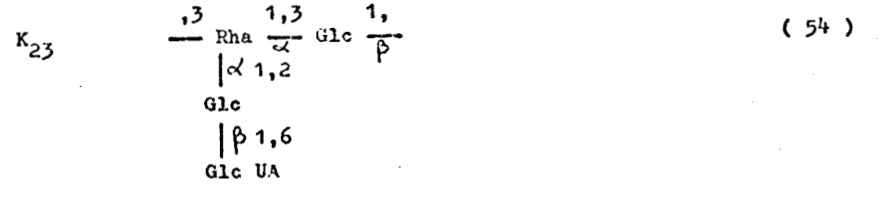
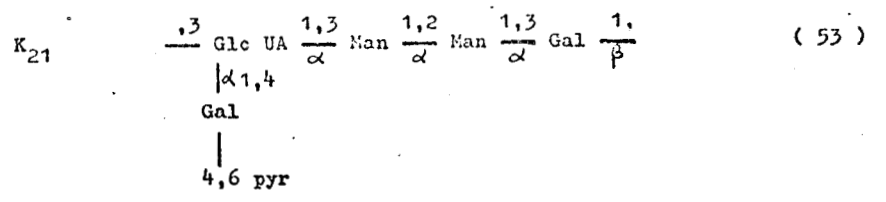
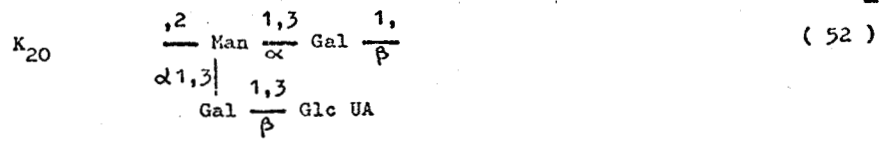


TABLEAU VII

Classement des polysaccharides capsulaires de Klebsiella (76)

O = ose neutre

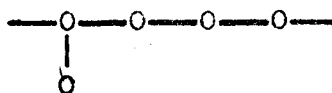
X = acide uronique

Les acétates et pyruvates n'ont pas été indiqués .

A - Souches sans acide uronique



K₃₂, K₇₂



K₅₆

B - Acide uronique dans la chaîne principale

a) polysaccharide linéaire

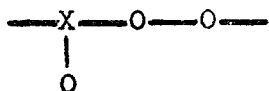


K₅, K₁

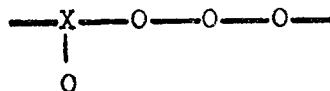


K₇₀, K₈₁

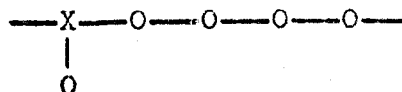
b) branchement sur l'acide uronique



K₁₁, K₅₇

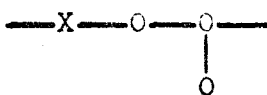


K₂₁, K₂₄

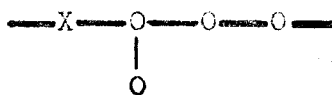


K₁₈

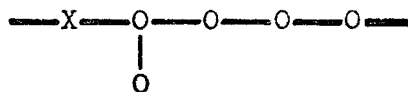
c) non branché sur l'acide uronique



K₅₄



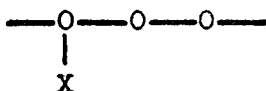
K₇, K₆₂



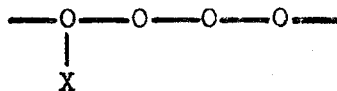
K₅₂

C - Acide uronique dans la chaîne latérale

a) chaîne latérale à une seule unité



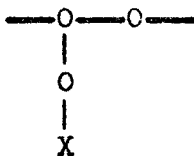
K₂, K₈



K₉, K₅₉

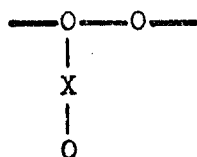
b) chaîne latérale à deux unités

1 - acide uronique terminal

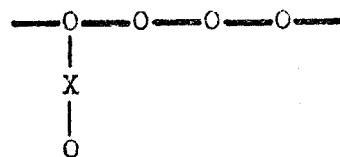


K₂₀, K₅₅, K₈₃

2 - acide uronique en position non terminale



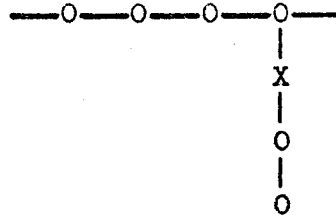
K₄₇



K₂₈ , K₃₆

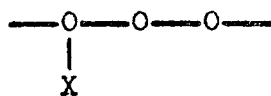
c) chaîne latérale à 3 unités

acide uronique en position non terminale

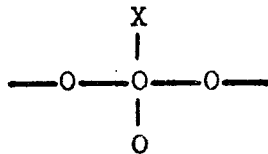


K₄₁

D - Souches contenant des analogues d'acide uronique : acides cétoniques particuliers



X : acide 4-O(1 carboxyéthyl) D-glucuronique



X : acide 3-deoxy-L-glycéropentulosonique

1 - La spécificité antigénique :

En général , les polysaccharides bactériens sont formés d'unités de répétition d'oligosaccharides . Ces complexes antigéniques sont soit neutres soit chargés négativement . Les polysaccharides neutres proviennent des lipopolysaccharides (Ag O) et les acides des antigènes capsulaires . Ces charges négatives sont apportées soit par des acides uroniques , des acides cétoniques soit par des groupements acides tels que l'acide pyruvique , le glycérol phosphate , l'acide succinique , le phosphate .

Ces structures neutres ou acides , formées d'unités de répétition peuvent être assemblées en une chaîne unique ou en structure branchée. Ces chaînes latérales sont très souvent impliquées dans la spécificité antigénique . Il faut donc établir une relation structure - activité . Les sites immunologiquement importants sont soit de nature monosaccharidique soit des composés non saccharidiques . (77)

a - déterminants saccharidiques :

La spécificité antigénique de ces polysaccharides est due à quelques monosaccharides appelés " sucres immunodominants " (78) qui sont soit en position terminale soit à l'intérieur de la chaîne , c'est le cas du polysaccharide de Salmonella newington dont la structure est exposée figure 13 p. 50. La nature de ces monosaccharides est importante mais également l'anomérisation et la position de la liaison .

Les déterminants antigéniques , de polysaccharides linéaires , sont trouvés en position terminale non réductrice mais aussi au milieu de la chaîne . Beaucoup de polysaccharides sont branchés et les chaînes latérales sont habituellement les déterminants antigéniques dominants. Au niveau des polysaccharides acides , comme les polysaccharides

capsulaires , les constituants chargés sont généralement les monosaccharides immunodominants ou à la rigueur une partie des déterminants antigéniques . (79)

b - déterminants non saccharidiques :

La charge négative peut être apportée soit par des monosaccharides acides soit par des groupements tels que phosphate , glycérol phosphate , O-acétyl , acide succinique , acide pyruvique . Ils confèrent à la molécule une charge négative et peuvent jouer le rôle de déterminants antigéniques . JANN et al. (80) ont étudié un antigène " O " d'Echerichia coli et en ont déduit que le groupe déterminant est le glycérol phosphate .

c - réactions croisées entre polysaccharides bactériens

Ces réactions croisées sont réalisées en complexant un anticorps A spécifique d'un antigène A avec un antigène B différent de A , s'il existe des analogies de structure entre A et B . En connaissant la structure de l'un des antigènes , la structure du déterminant antigénique est ainsi déduite .

La classification des polysaccharides S II et S V de Pneumococcus de type II et V a été difficile , cela est dû au déterminant commun : l'acide glucuronique . Dans le polysaccharide S II , l'acide glucuronique occupe une position terminale non réductrice alors que dans le polysaccharide S V il se trouve à l'intérieur de la chaîne glucidique substitué sur son carbone 2 . Les anticorps dirigés contre l'acide glucuronique terminal peuvent aussi reconnaître un acide glucuronique interne substitué en 2 . La figure 14 p. 51 montre les comparaisons stériques du monosaccharide terminal et substitué en 2 dans une réaction avec l'anticorps . Le monosaccharide substitué en 2 est exposé de la

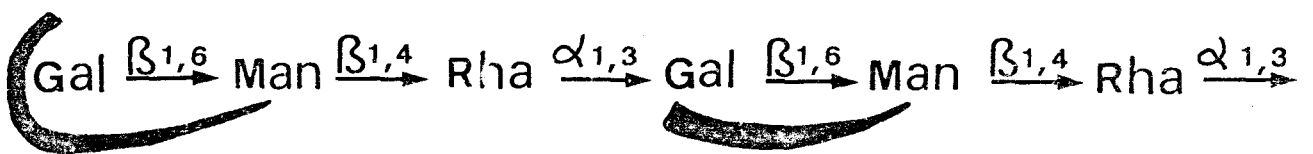


Figure 13

Sucres immunodominants du polysaccharide de Salmonella newington
(ROBBINS et al. (81) ; HELLERQVIST et al. (82)) en position
terminale et interne de la chaîne polysaccharidique .



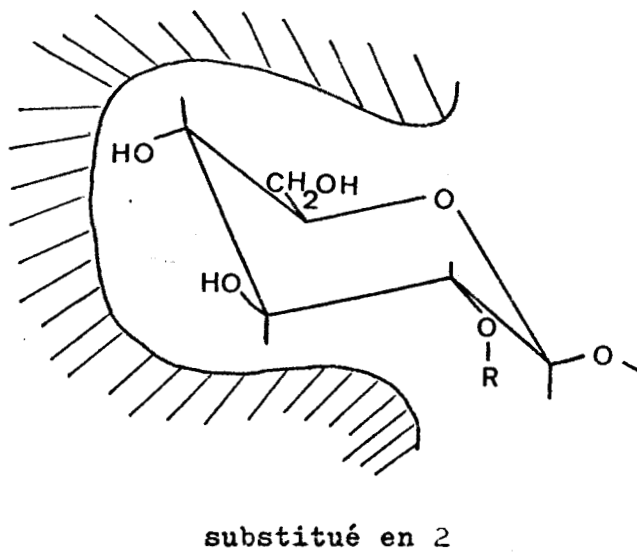
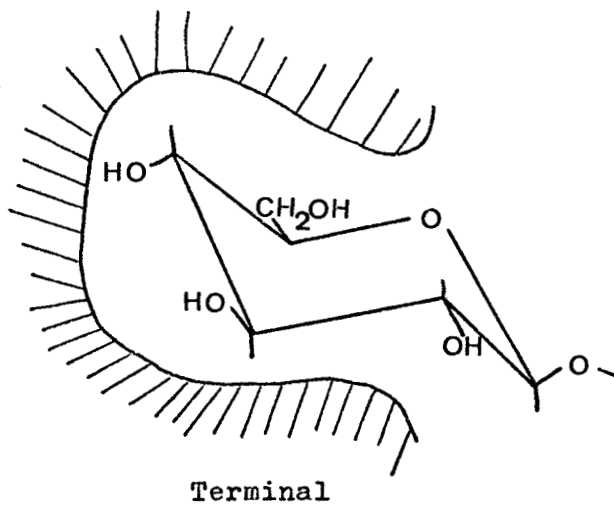
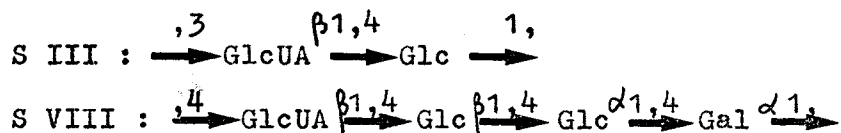


Figure 14

Comparaison stérique des résidus de glucose terminal et substitué en 2 d'un polysaccharide dans leur réaction avec leur anticorps . (83)
(La partie hachurée représente l'anticorps combiné au site .)



même manière que le monosaccharide terminal . Cela permet de dire que le composé substitué en 2 est immunologiquement équivalent au même composé en position terminale . Les réactions croisées sont basées sur l'identité des structures partielles . C'est le cas également des polysaccharides S III et S VIII de pneumococcus dont les structures sont les suivantes :



Dans cet exemple , la réactivité est due à la présence d'acide cellobiuronique qui est l'unité de répétition de SIII et S VIII .

2 - Immunogénicité :

Ceci est un phénomène très complexe . En général , l'immunogénicité des polysaccharides dépend de leurs poids moléculaires . C'est le cas , par exemple , de dextrans de Leuconostoc , s'ils ont un poids moléculaire de 90 000 ou plus , ils sont très bons immunogènes pour l'Homme et s'ils ont un poids moléculaire de 50 000 ou en dessous , ils ne sont pas immunogéniques .

Lorsque l'agent immunisant est injecté à dose trop élevée , l'organisme de l'animal ne répond pas (> 500 µg) , au contraire , injecté à faible dose (0,5 à 1 µg) , il se produit une réponse . Dans le premier cas , il s'agit d'une paralysie immunologique , ceci semble être un caractère typique d'antigènes polysaccharidiques bactériens .

TRAVAUX PERSONNELS
-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

I - PREPARATION DU PRINCIPE ACTIF

Le principe actif est préparé par les Laboratoires CASSENNE dans les conditions expérimentales suivantes :

Après revivification du germe , la culture est réalisée en fermenteur , et la pousse bloquée peu avant la fin de la phase exponentielle de croissance du micro-organisme .

La préparation est alors sensibilisée par chauffage à 56°C. et la lyse parfaite par voie enzymatique . Cette opération terminée , la préparation est lyophilisée puis extraite successivement par l'acétone et le méthanol , de manière à solubiliser la totalité des lipides , phospholipides et pigments .

Les produits non solubilisés par ces solvants sont remis en suspension dans de l'eau puis centrifugés une première fois à faible vitesse (20 000 t/mn.) pour éliminer les débris cellulaires , substances insolubles ou rendues insolubles par le traitement précédent (protéines dénaturées) .

La solution ainsi clarifiée est alors centrifugée en continu sous de

fortes accélérations (60 000 g) .

La fraction hydrosoluble surnageante est alors diafiltrée sur membranes microporeuses calibrées (seuil de rétention 300 000) .

Après lavage par quarante volumes d'eau , la fraction retenue dans ces conditions est centrifugée , lyophilisée et constitue le principe actif .

II - COMPOSITION DU PRINCIPE ACTIF

1 - Etude de la copule protéique :

a - matériels et méthodes :

L'analyse de la composition de la copule protéique a été faite par dosage des protéines totales (technique de LOWRY (84)) et des acides aminés .

Le dosage des protéines est le suivant :

solution_A_: Na_2CO_3 2% dans NaOH 0,1N

solution_B_: sulfate de cuivre , $5\text{H}_2\text{O}$, 0,5% dans le tartrate de Na , K 1%

solution_C_: 50 ml de la solution A + 1 ml de la solution B .

A 1ml d'une solution de protéines sont ajoutés 5ml de la solution C , le mélange est agité puis laissé au repos pendant 10 min. Puis 0,5ml du réactif de Folin-ciocalteu , préalablement dilué au $\frac{1}{2}$, est additionné . La solution ainsi formée est laissée 30 min. à l'obscurité . Ce dosage se fait également sur des solutions témoins de sérum albumine à différentes concentrations . Ainsi les protéines se révèlent en bleu et la lecture se fait à 750 nm.

Les acides aminés sont analysés à l'autoanalyseur*. Le principe actif est hydrolysé par de l'acide chlorhydrique 5,6N redistillé , sous vide , à 105°C pendant 24 h.

Les hydrolysats , évaporés à siccité en exsiccateur en présence de soude , sont dosés à l'autoanalyseur Beckman-Multichrom suivant le principe de SPACKMAN et al. (85) adapté par CHARET et al. (86) à l'analyse des glycoprotéines . Il faut noter que cette technique permet également d'identifier et de doser les hexosamines .

b - résultats :

La méthode de LOWRY (87) nous a permis d'identifier 26,28% de protéines , par contre le dosage à l'autoanalyseur Beckman-Multichrom ne nous fournit que 11,88% d'acides aminés (Tableau VIII p. 56) . Le principe actif renferme d'une part tous les acides aminés , à l'exception de la cystéine et d'autre part 0,98% de glucosamine . Ce dernier résultat a été vérifié par la méthode modifiée d'ELSON et MORGAN (88) (1,23% d'osamines libres) .

2 - Etude de la copule glucidique :

a - matériels et méthodes :

. composition centésimale :

Dosage des oses neutres

Les oses neutres sont dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (89) modifié par RIMINGTON (90) . L'orcinol donne avec les oses , en milieu sulfurique et à chaud , une coloration brune orangée .

Dosage des acides uroniques

Les acides uroniques sont dosés par la méthode au carbazol

*Nous remercions très vivement M^{me} BENAÏSSA d'avoir effectué les analyses à l'autoanalyseur.

TABLEAU VIII

Composition en acides aminés du principe actif , calculée par rapport à 1 résidu d'alanine .

| | | | |
|-----|------|------|------|
| Asp | 1,16 | Met | 0,15 |
| Thr | 0,34 | Ileu | 0,16 |
| Ser | 0,62 | Leu | 0,70 |
| Glu | 0,77 | Tyr | 0,24 |
| Pro | 0,30 | Phe | 0,22 |
| Gly | 0,69 | Lys | 0,40 |
| Ala | 1 | Hist | 0,13 |
| Val | 0,36 | Arg | 0,37 |



sulfurique de DISCHE (91) . Le carbazol donne avec les acides uroniques en milieu sulfurique et à chaud une coloration violacée spécifique .

Dosage des acides sialiques

Les acides sialiques totaux sont dosés par la méthode à la diphenylamine de NIAZI et STATE (92) modifiée par WERNER et ODIN (93). Les acides sialiques , sous l'action des acides présents dans le réactif à la diphenylamine sont rapidement désacétylés et décarboxylés en 2-desoxy-4-amino-octose qui subit ensuite une dégradation plus poussée et donne un chromogène qui , se condensant avec la diphenylamine fournit une coloration bleu-violacée qui présente un maximum d'absorption à 530 nm.

Dosage des osamines

Les osamines , libérées par hydrolyse chlorhydrique (HCl 4N, 4 h. , 105°C) sont dosées par la méthode modifiée d' ELSON et MORGAN (94) selon laquelle la glucosamine libre en milieu alcalin donne avec l'acétylacétone un chromogène qui réagit avec le réactif d'Ehrlich pour donner une coloration rouge-violacée .

. nature des monosaccharides et composition molaire:

La composition molaire en monosaccharides du principe actif a été effectuée après méthanolyse par chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides trifluoroacétylés . Les conditions expérimentales sont les suivantes : 500 µg de principe actif sont méthanolysés en présence de 50 µg de méso-inositol par 1 ml de mélange méthanol chlorhydrique 0,5N à 80°C pendant 24 h. Après séchage sous azote , le résidu est trifluoroacétylé par 400 µl du mélange CH₂Cl₂ / ATFA (volume / volume) à 150°C pendant 5 min. . Après refroidissement ,

le trifluoroacétyle est réchauffé 5 minutes à 150°C (ZANETTA et al. (95) .

Les méthylglycosides trifluoroacétylés sont ensuite analysés en chromatographie en phase gazeuse sur colonne de silicone OV210 à 5% sur Varaport 30 , température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C par minute , sous un débit de gaz vecteur (azote) de 10 ml / min. L'identification des monosaccharides a également été réalisée par chromatographie sur papier après une hydrolyse par l'acide trifluoroacétique 4N , 8h. , 100°C .

L'hydrolyse sulfurique selon SEAMAN (96) (10 mg de principe actif dissous dans H₂SO₄ 72% en poids , 5 min. à température ambiante puis amenée à normalité , portée à 100°C pendant 6h.) a permis d'obtenir une fraction acide . L'hydrolysate sulfurique est neutralisé par du carbonate de baryum , centrifugé et le précipité de sulfate de baryum ainsi formé est abondamment lavé par de l'eau distillée. Le surnageant et les eaux de rinçage sont purifiés sur résines échangeuses de cations (Dowex 50 x 8, "mesh" 25-50 , forme H⁺ , 20 x 2 cm) et d'anions (Duolite A 102 D "mesh" 25-50 , forme HCOO⁻ , 20 x 2 cm) , et ont fourni une fraction neutre qui est chromatographiée sur papier Whatman n° 3 dans le système solvant : acétate d'éthyle / pyridine / eau 8 / 2 / 1 . L'élution de la résine échangeuse d'anions par l'acide formique 10% fournit une fraction acide qui est chromatographiée sur papier Whatman n° 3 dans le système solvant : acétate d'éthyle / acide acétique / acide formique / eau : 18 / 3 / 1 / 4 . Les oligosaccharides contenus dans la fraction acide ont été chromatographiés sur colonne de Sephadex G 10 dans les conditions expérimentales suivantes : élution de la colonne de 96 x 2 cm par de l'eau sous un débit de 6 ml / heure , repérage des fractions par le réactif au phénol sulfurique de DUBOIS et al. (97) et par le réactif au carbazol de DISCHE (98) . Les fractions phénol et carbazol positives ont été

chromatographiée sur papier Whatman n°3 dans le système solvant :
acétate d'éthyle / acide acétique / acide formique / eau: 18 / 3 / 1 / 4
pendant 24 heures . L'oligosaccharide majeur est ainsi purifié par
chromatographie préparative dans le même système solvant pendant 48 h.

b - résultats :

Nous avons rassemblé dans le tableau IX p. 66
les résultats de la composition centésimale et molaire en monosaccharides
du principe actif .

Afin d'éliminer d'une part l'interférence des
hexoses des acides uroniques par la méthode au carbazol sulfurique de
DISCHE (99) et d'autre part l'interférence des acides uroniques lors
du dosage des oses neutres par la méthode à l'orcinol sulfurique de
TILLMANS et PHILIPPI (100) , les résultats obtenus ont été corrigés
suivant le protocole préconisé par MONTREUIL et SPIK (101) .

Le dosage à la diphénylamine permet de doser les
acides sialiques mais également les acides nucléiques car tous deux
présentent un maximum d'absorption à 530 nm , la différence qui existe
est la coloration . Les acides sialiques présentent une coloration
mauve et les acides nucléiques une coloration bleue . Pour cela , nous
avons dosé des solutions témoins d'acides sialiques et d'acides nucléiques
et du desoxyribose . Dosé dans ces conditions, le principe actif
présente une coloration bleue , ce qui signifie que ce dernier renferme
en faible quantité , des acides nucléiques et qu'il est totalement
dépourvu d'acide sialique .

La chromatographie en phase gazeuse des
monosaccharides libérés par méthanolyse nous a permis d'identifier sans
ambiguïté trois constituants monosaccharidiques : le galactose , le
mannose et le glucose ainsi qu'un constituant ayant un temps de
rétention supérieur à l'acide N-acétylneuraminique (figure 15 (C₁)
p. 61) qui a pu être isolé et caractérisé comme étant un disaccharide:

acide glucuronique lié au mannose . Un tel disaccharide se nomme acide aldobionique .

La chromatographie sur papier de l'hydrolysate acide trifluoroacétique a permis également d'identifier le galactose , le mannose , le glucose et l'acide glucuronique .

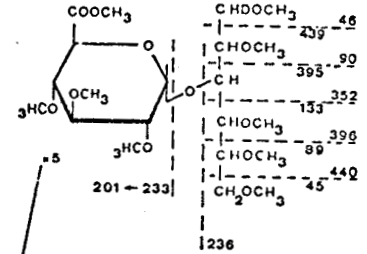
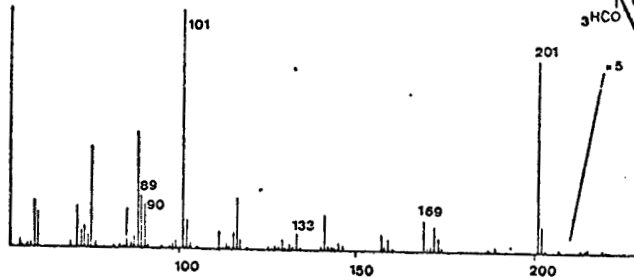
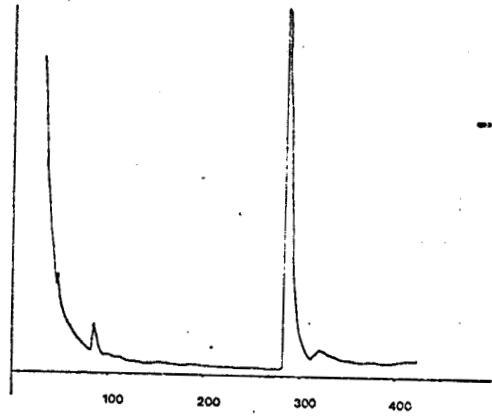
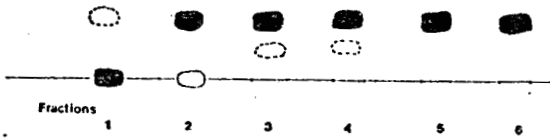
La chromatographie sur Sephadex G 10 de l'éluate acide a fourni 6 fractions (voir figure 15 p. 61) qui ont été chromatographiées sur papier . La chromatographie préparative sur papier a permis d'isoler à l'état pur un oligosaccharide majeur identifié , après réduction au borodéutériure de sodium , perméthylation et analyse par gaz chromatographie spectrométrie de masse (GC-MS)^{*} , à un disaccharide acide aldobionique (HexUA ~~1,3~~ hexose^{itol}) (fragments aA₁ de m/e : 233 , 201 , spécifique d'un acide uronique en position terminale non réductrice et le fragment aldA₁ de m/e 236 spécifique d'un hexose^{itol} en position terminale réductrice , la liaison en 3 de l'hexitol est donnée par les pics de masse m/e 396 et m/e. 133) (voir figure 15 p. 61) .

La méthanolyse de ce disaccharide suivie de la trifluoroacétylation (voir figure 15 p. 61) et de la chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier le mannose comme hexose constituant ce disaccharide et de positionner l'acide aldobionique sur notre chromatogramme , en effet , la liaison acide glucuronique - mannose est très faiblement coupée par méthanolyse . Il est à noter , par conséquent , que le mannose , libéré par méthanolyse du principe actif est dosé par défaut . Ce monosaccharide pourra être estimé avec précision par méthanolyse du principe actif réduit (transformation de l'acide uronique en son hexose correspondant) (voir page 80) .

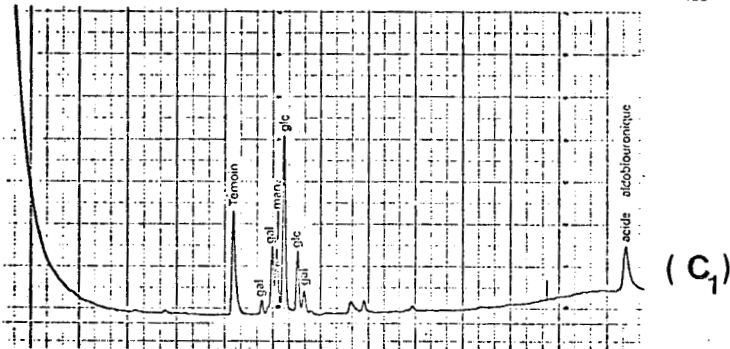
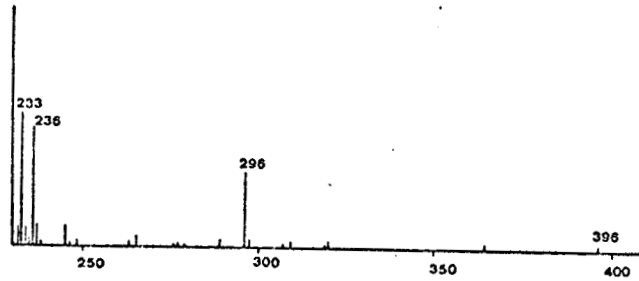
* Nous remercions M^r YVES LEROY d'avoir effectué ces analyses GC-MS

(A)

(B₁)



(B₂)



(C₁)



(C₂)

Figure 15



Chromatographie sur papier (A) des fractions obtenues par gel filtration sur Sephadex G 10 de l'éluat acide de la Duolite A 102 D, Gaz liquide chromatographie B₁ sur colonne de silicone SE30 et spectrométrie de masse B₂ du dissaccharide réduit et perméthylé. Chromatographie en phase gazeuse des méthyl glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse du principe actif total (C₁) et du dissaccharide acide aldobiouronique (C₂) obtenu à partir de la fraction acide de l'hydrolysats sulfurique.

3 - Etude des éléments minéraux :

a - matériels et méthodes :

. humidité :

100 mg de principe actif sont pesés , mis dans une étuve sous vide à 50°C pendant 24 heures . Après avoir pris quelques précautions (deshydratation de la balance pendant une nuit) le principe actif est de nouveau pesé . La différence de poids nous permet ainsi de connaître le taux d'humidité .

. dosage de sulfates :

La méthode utilisée est celle de TERHO et al. (102) . La vaisselle est préalablement lavée à l'acide nitrique et rincée à l'eau distillée . Le mode opératoire est le suivant :

solution tampon BaCl₂ :

| | | | |
|--------------------|-----------|-------|----------------------------------|
| acide acétique | : 2 M | 10 ml | |
| BaCl ₂ | : 0,005 M | 2 ml | |
| NaHCO ₃ | : 0,02 M | 8 ml | → qsp 100 ml avec de l'éthanol . |

solution de rhodizionate de sodium : 5 mg de rhodizionate de sodium sont dissous dans 20 ml d'eau distillée . 100 mg d'acide ascorbique sont ajoutés . Le mélange formé est complété à 100 ml avec de l'éthanol .

solutions standards de sulfate : solutions de 2 à 12 µg pour 0,5 ml d'eau . Les échantillons sont préalablement hydrolysés par de l'acide chlorhydrique 0,5 N à 100°C pendant 1 à 2 heures . Les hydrolysats sont séchés puis dissous dans de l'eau . 0,5 ml de solution , 2 ml d'éthanol sont introduits dans les tubes . S'il y a précipitation , une centrifugation est nécessaire afin d'obtenir une solution claire . 1 ml de solution de

BaCl₂ et 1,5 ml de solution de rhodizonate de sodium sont additionnés puis agités . Les tubes sont laissés 10 minutes à l'obscurité . La coloration reste stable pendant 30 minutes . La lecture au spectrophotomètre se fait à 520 nm.

. dosage de phosphore :

La libération du phosphore se fait grâce à un mélange destructeur . Ce phosphore libéré se condense au molybdate d'ammonium pour former du phosphomolybdate d'ammonium qui est réduit par de l'amidol en bleu de molybdène . Le protocole expérimental est le suivant : 1 ml de solution à doser (1%) est ajouté à 1 ml de mélange destructeur (HClO₄ 2V , H₂SO₄ 3V) , la solution est laissée pendant 1 heure dans un bain à 100°C (rampe à destruction) . 8 ml d'eau distillée , 1 ml de molybdate d'ammonium (8,3% dans l'eau) sont ajoutés à la solution puis agités . 1 ml d'amidol (à 1% dans le sulfite de sodium anhydre à 20%) est additionné . Cette solution d'amidol est à préparer extemporanément et à filtrer après ½ heure de contact à l'obscurité . Le mélange est complété à 15 ml par de l'eau , puis laissé à l'obscurité pendant 30 minutes . La lecture au spectrophotomètre se fait à 725 nm . Des solutions standards sont dosées en même temps que les échantillons et permettent de tracer la droite de la densité optique en fonction de la concentration en phosphore.

b - résultats :

Le taux d'humidité est de 10% et les teneurs en sulfate et en phosphore sont très faibles (voir Tableau IX p. 66)

4 - Hétérogénéité du principe actif :

a - matériels et méthodes :

L'hétérogénéité du principe actif a pu être déterminée par une étude en ultracentrifugation* .

Le principe actif , dissous dans un tampon Tris HCl 0,1M

* Nous remercions Myriam CONIEZ d'avoir effectué ce travail .

à PH 7,2 à une concentration de 10 mg/ml , est soumis à une ultracentrifugation . Cette technique nous a permis de connaître d'une part le coefficient de sédimentation mesuré selon SVEDBERG (103) et d'autre part la masse moléculaire déterminée selon la technique de YPHANTIS (104) modifiée par CHEVENKA (105) .

b - résultats :

La constante de sédimentation est de 1,6 S et la masse moléculaire de 165 000 . Nous constatons , sur la plaque photographique la présence de 3 composés indiquant l'hétérogénéité du principe actif .

5 - Mise en évidence de l'acide diaminopimélique :

a - matériels et méthodes :

L'acide diaminopimélique est un élément de la paroi bactérienne . Sa présence indiquerait donc une contamination du principe actif par des éléments de cette paroi . Il peut être analysé après hydrolyse à l'autoanalyseur Beckman-Multichrom . Après une hydrolyse chlorhydrique 5,6 N redistillé , l'acide diaminopimélique possède le même temps de rétention que la méthionine . Afin d'éliminer cette interférence , une oxydation performique selon le procédé de HIRS (106) a été effectuée sur une solution d'acide diaminopimélique , de méthionine et de principe actif .

L'acide performique est préparé en ajoutant à 9,5 ml d'acide formique pur 0,5 ml d'eau oxygénée à 110 volumes et en abandonnant le mélange 2 heures à la température du laboratoire .

D'autre part , 20 mg de protéines ou de glycopeptides sont dissous dans 1 ml d'acide formique pur additionné de 0,3 ml de méthanol pour éviter la congélation .

Ces solutions sont refroidies séparément et mélangées

volume à volume . Après 25 heures de réaction à - 20°C , la solution est diluée avec 10 volumes d'eau distillée puis lyophilisée .

b - résultats :

Nous constatons sur les chromatogrammes que l'acide diaminopimélique " témoin " n'a subi aucune modification par contre la méthionine " témoin " transformée en méthionine sulfone voit son temps de rétention diminuer(voir figure 16 p. 67) .

La solution de principe actif , ayant subi une oxydation performique présente toujours un pic ayant le même temps de rétention que la méthionine . Cela signifie donc que le principe actif renferme de l'acide diaminopimélique , en très faible quantité .

6 - Mise en évidence de groupements pyruvyls :

Ces groupements pyruvyls sont présents dans beaucoup de polysaccharides bactériens , conjugués par liaisons acétaliques aux monosaccharides .

a - matériels et méthodes :

La méthode employée est celle de LEW et al. (107) . Le principe actif est chauffé pendant 30 mn. à 80°C en présence d'acide sulfurique 5 mM , puis dialysé . Le principe actif ainsi obtenu est méthylé selon HAKOMORI (108) , méthanolysé en présence de MeOH/HCl pendant 24 h. à 80°C puis étudié en chromatographie en phase gazeuse .

b - résultats :

L'étude en chromatographie en phase gazeuse ne révèle aucun éther méthylique nouveau , ce qui signifie que le principe actif ne renferme pas de groupements pyruvyls (voir figure 17 p. 68)

TABLEAU IX

Nature des sucres et composition molaire en monosaccharides* . Composition centésimale en monosaccharides , phosphate , sulfate et taux d'humidité du principe actif .

| Gal | Man | Glc | acide aldobiouronique HexUA $\xrightarrow{1,3}$ Man | oses neutres | acides uroniques | osamines | acides nucléiques | P | S (SO ₄ --) | taux d'humidité |
|------|-----|------|--|--------------|------------------|----------|-------------------|-------|---------------------------|-----------------|
| 1,84 | 1 | 3,49 | présence | 50,15% | 8,76% | 1,23% | 1,60% | 0,43% | 0,30% | 10% |

* sur la base de 1 résidu de mannose



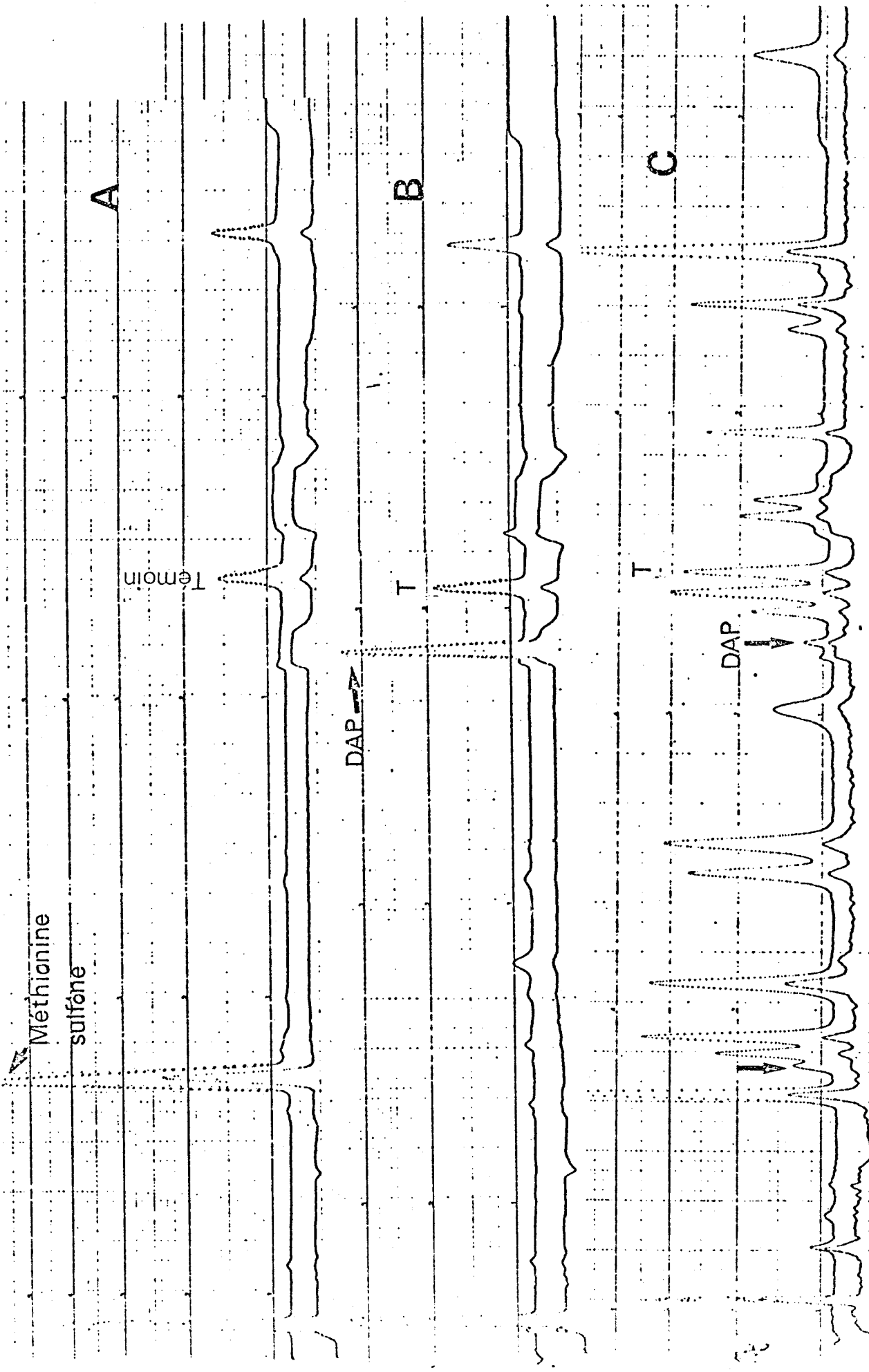


Figure 16

Analysé à l'autoanalyseur Beckman des produits de l'oxydation performique de la méthionine (A), de l'acide diaminopimélique (B) et du principe actif oxydé par l'acide performique (C)



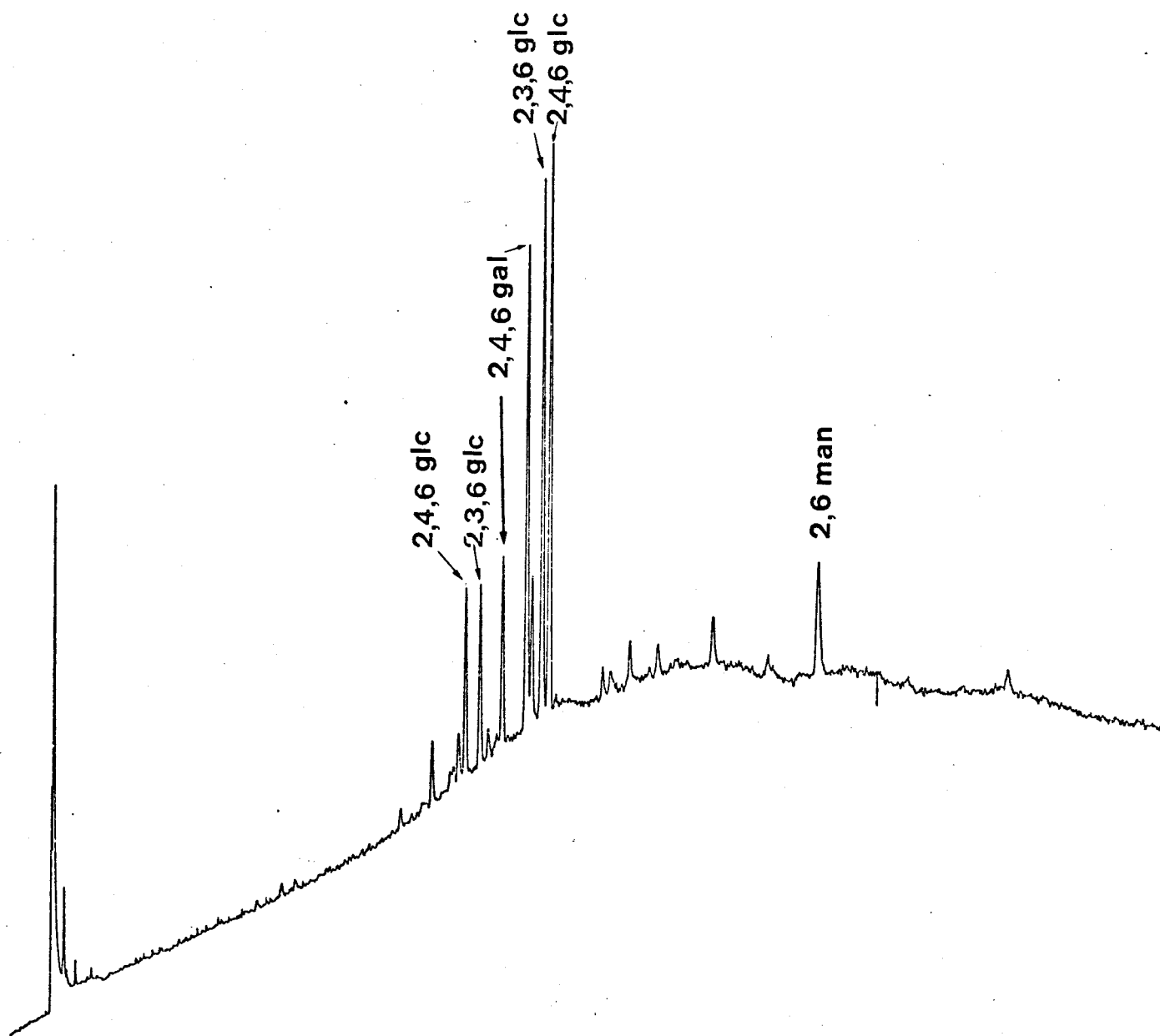


Figure 17

Chromatographie en phase gazeuse du principe actif dépyruvylé perméthylé et méthanolysé (sur colonne de verre (60 m x 0,4 mm) de Carbowax 20 M (capillaire) ; température programmée de 150°C à 225°C à raison de 2°C/mz gaz vecteur (azote) : 0,4 bar .



7 - Conclusions :

Après cette étude , nous constatons que le principe actif , hétérogène , de masse moléculaire moyenne de 165 000 , est constitué d'une copule protéique (12%) riche en acides aminés dicarboxyliques , d'une copule glucidique (60%) constituée de 4 sucres : 3 hexoses neutres (le galactose , le mannose et le glucose) et d'un acide uronique : l'acide glucuronique . Ce dernier forme avec le mannose un disaccharide appelé acide aldobiouronique (Glc UA ^{1,3}Man) résistant à l'hydrolyse sulfurique , à la méthanolyse et qui a pu être isolé et caractérisé par chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse . Enfin , le principe actif renferme très peu d'acides nucléiques et pratiquement pas de groupements sulfates et phosphates ainsi que des restes pyruvyls .

Du fait de son hétérogénéité , ce principe actif doit être fractionné afin de connaître le constituant responsable de son activité anti-bactérienne .

III - ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE

L'ensemble des études pharmacologiques réalisées par les Laboratoires CASSENNE sur la fraction isolée de Klebsiella pneumoniae a la propriété de stimuler intensément les mécanismes immunologiques chez l'animal et chez l'homme .

Cette stimulation se traduit par les effets suivants :

1°) Activation du système réticulo endothélial

en augmentant , chez la souris , le pouvoir phagocytaire des macrophages (clearance sanguine du carbone , ou de bactéries vivantes) .

2°) Activation des lymphocytes

comme le montre l'augmentation du nombre de cellules formant rosette (RFC) ou la prolifération lymphoblastique in vitro des cellules spléniques de souris (B et T) .

3°) Effet mitogénique

sur les lymphocytes humains circulants , ainsi qu'une potentialisation de mitogènes non spécifiques (pHA , ConA , PWM) .

4°) Effet mitogénique

chez la souris , comme le montre l'augmentation du poids des ganglions poplités après injection intraplantaire .

5°) Augmentation des réponses immunes à médiation cellulaire

(hypersensibilité retardée) et des réponses humorales démontrée par l'augmentation du nombre de cellules formant plages en réponse à une immunisation par des antigènes tels que les globules rouges de mouton .

Ce produit présente également une activité anti-inflammatoire vis-à-vis de l'œdème plantaire provoqué par la carraghénine chez le rat , ainsi qu'un effet activateur de la vitesse de cicatrisation cutanée des plaies provoquées chez le rat par brûlures thermiques .

En outre , il antagonise l'effet létal provoqué par l'administration de certains germes . Cette activité anti-bactérienne in vivo est mise en évidence , chez la souris , par la réduction de la mortalité due à l'administration du Kp .

Le protocole expérimental est le suivant :

. Le produit est administré sous 0,5 ml , par voie intrapéritonéale , à des lots de 10 souris Swiss de 18 - 20 g , 6 jours et quarante huit heures avant l'infection .

. Les animaux reçoivent alors une suspension de germes correspondant à un certain nombre de doses létales cinquante pour cent de Klebsiella pneumoniae sérotype capsulaire 2 , par voie intrapéritonéale . Une DL_{50} représente 50 germes par animal .

. L'effet protecteur est défini par le pourcentage d'animaux survivants au 6^e jour après l'infection .

. La septicémie étant rapide , la courbe de mortalité restant stable au delà du 6^e jour après l'infection , ainsi une observation pendant 6 jours seulement a été choisie .

IV - FRACTIONNEMENT DU PRINCIPE ACTIF

L'hétérogénéité du principe actif constatée par ultracentrifugation nous a conduit à le fractionner . Plusieurs techniques de purification ont été utilisées en tenant compte du caractère acide du principe actif .

La chromatographie sur résine échangeuse d'anions Dowex 1 x 2 (200 - 400 mesh , forme Cl^-) nous a fourni un seul pic de composition et d'activité similaire au produit de départ .

Le fractionnement sur colonne de DEAE Sephadex du principe actif dans un tampon phosphate avec élution par un gradient de chlorure de sodium de molarité croissante de 0 à 2M n'a pas donné de résultats reproductibles malgré un début de séparation en trois constituants .

La présence dans le principe actif d'une concentration importante d'acide glucuronique (8,7%) nous a conduit à essayer de précipiter sélectivement le polymère acide présent dans le principe actif à l'aide d'ions ammonium quaternaire tels que le " Cetavlon " (bromure de cétyle-triméthyle-ammonium) . Cette technique nous a fourni effectivement un complexe polyanionique du cetavlon qui précipite et une fraction surnageante . Les résultats encourageants de la composition et des activités biologiques nous ont amené à utiliser ce dernier mode de fractionnement .

1 - Matériels et méthodes

Le principe actif est fractionné selon la méthode au cetavlon de SCOTT (109) .

333 mg de bromure de cétyle-triméthyle-ammonium ont été ajoutés progressivement à 11 ml d'eau en chauffant légèrement vers 30°C pour former une solution de cetavlon à 3% . Ce mélange a été ajouté lentement à la solution de principe actif (100 mg dans 12,5 ml) sous

agitation magnétique douce puis laissé une nuit à $+4^{\circ}\text{C}$. Le précipité formé , recueilli par centrifugation , est redissous dans une solution de NaCl $0,2\text{ M}$ (6 ml) . Dans ces conditions , seul le complexe polyanionique du cetavlon doit se dissoudre . La solution de sel de sodium du polyanion obtenue est reprécipitée dans 6 volumes d'éthanol. Après une nuit à $+4^{\circ}\text{C}$, le précipité formé est recueilli par centrifugation , redissous dans l'eau , dialysé 24 heures contre de l'eau distillée et enfin lyophilisé . Le produit obtenu prend le nom de précipité P_1 . La fraction non précipitante au cetavlon (surnageant) est précipitée par 6 volumes d'éthanol . Après une nuit à $+4^{\circ}\text{C}$, le précipité est recueilli par centrifugation , redissous dans l'eau , dialysé et lyophilisé . La fraction ainsi obtenue prend le nom de surnageant S_1 . Nous avons résumé dans la figure 18 p. 73 le schéma de fractionnement .

L'homogénéité des deux fractions a été étudiée ainsi que leur activité anti-bactérienne . Nous avons enfin déterminé les compositions centésimales et molaires des copules glucidiques et protéiques (voir techniques p. 55) .

2 - Résultats

a - rendements :

Les poids en fractions S_1 et P_1 sont rassemblés dans le tableau X p. 75 . Le rendement moyen des fractionnements au cetavlon est de 70% .

b - analyse en ultracentrifugation :

Le surnageant S_1 et le précipité P_1 ont été soumis à une ultracentrifugation (dans les conditions décrites plus haut p. 63).

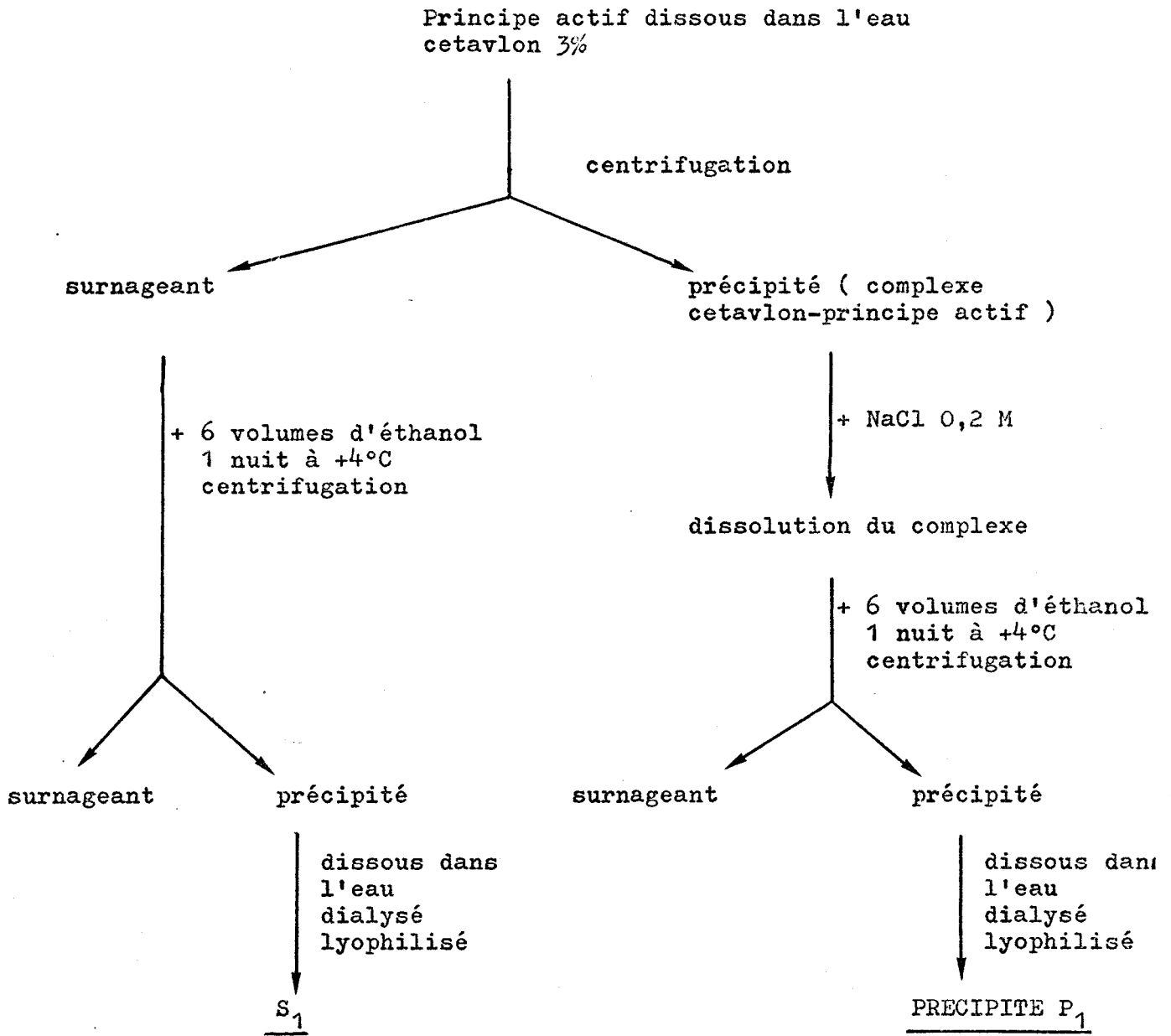


Figure 18

Schéma de fractionnement du principe actif selon la méthode de SCOTT
(110) au cetavlon (bromure de cétyl-triméthyl-ammonium) .



Nous constatons que S_1 est hétérogène (présente 3 pics) et que P_1 est homogène (1 seul pic symétrique) ayant une constante de sédimentation de $1,20 \cdot 10^{-13} \pm 5\%$ S . La masse moléculaire de ce constituant calculée selon la technique de YPHANTIS (111) modifiée par CHEVENKA (112) est de 95 500 .

c - activité anti-bactérienne :

Les activités anti-bactériennes effectuées aux laboratoires CASSENNE selon la technique décrite précédemment (p. 70) montrent que toute l'activité est concentrée dans la fraction précipitante au cetavlon . Toutefois , cette activité n'est pas augmentée par rapport à celle du principe actif (voir tableau XI p. 76) .

d - composition des copules protéique et glucidique :

Nous avons rassemblé dans le tableau X p. 75 les résultats de la composition centésimale et molaire en glucides ainsi que le pourcentage de protéines de la fraction précipitante par le cetavlon (P_1) et de la fraction surnageante .

Nous constatons que la précipitation au cetavlon a réalisé un fractionnement très net des constituants glucidiques du principe actif de départ . La fraction précipitante active au test anti-bactérien est très riche en acide uronique (18,2 %), en glucose et possède la quasi totalité du mannose qui est condensé à l'acide uronique sous forme d'acide aldobiouronique alors que le galactose se retrouve presque quantitativement dans la fraction surnageante (figure 19 p. 77) . Les deux fractions possèdent très peu de N-acétylglucosamine et 15 à 25% de protéines .

3 - Conclusion

Le fractionnement du principe actif par le bromure de cétyle-triméthyle-ammonium (cetavlon) fournit rapidement et avec un très

TABLEAU X

Composition centésimale et molaire* des trois fractions suivantes : le principe actif, la fraction surnageante S₁ et la fraction précipitante P₁ obtenues lors du fractionnement au cetavlon.

| | Composition centésimale | | | | | Composition molaire* | | | | Rendement (70%) |
|----------------|-------------------------|------------------|----------|---------------|-----------|----------------------|---------|-----------------------|---------|----------------------|
| | Oses neutres | acides uroniques | osamines | acides aminés | Galactose | Glucose | Mannose | Acide aldobiouronique | | |
| Principe actif | 50,18% | 8,76% | 1,17% | 11% | 1,06 | 2 | 0,57 | ++ | 60 mg | |
| S ₁ | 57,8 | 6,8 | 1,75 | 25 | 4,1 | 2 | 1,2 | + | 22 mg | |
| P ₁ | 69,24 | 18,2 | 0,76 | 15 | 0,36 | 2 | 0,43 | +++ | 19,5 mg | |

* sur la base de 2 résidus de glucose

TABLEAU XI

Tests anti-bactériens .

| Dose infectante | 5000 DL 50 | | | |
|---------------------------|------------|-----|-----|-----|
| Dose de produit g / Kg | 0,5 | 1 | 10 | 100 |
| principe actif | 40% | 60% | 80% | 60% |
| fraction surnageante | | 0% | 20% | 30% |
| fraction précipitante | | 40% | 80% | 60% |

* Les résultats représentent le taux de protection .



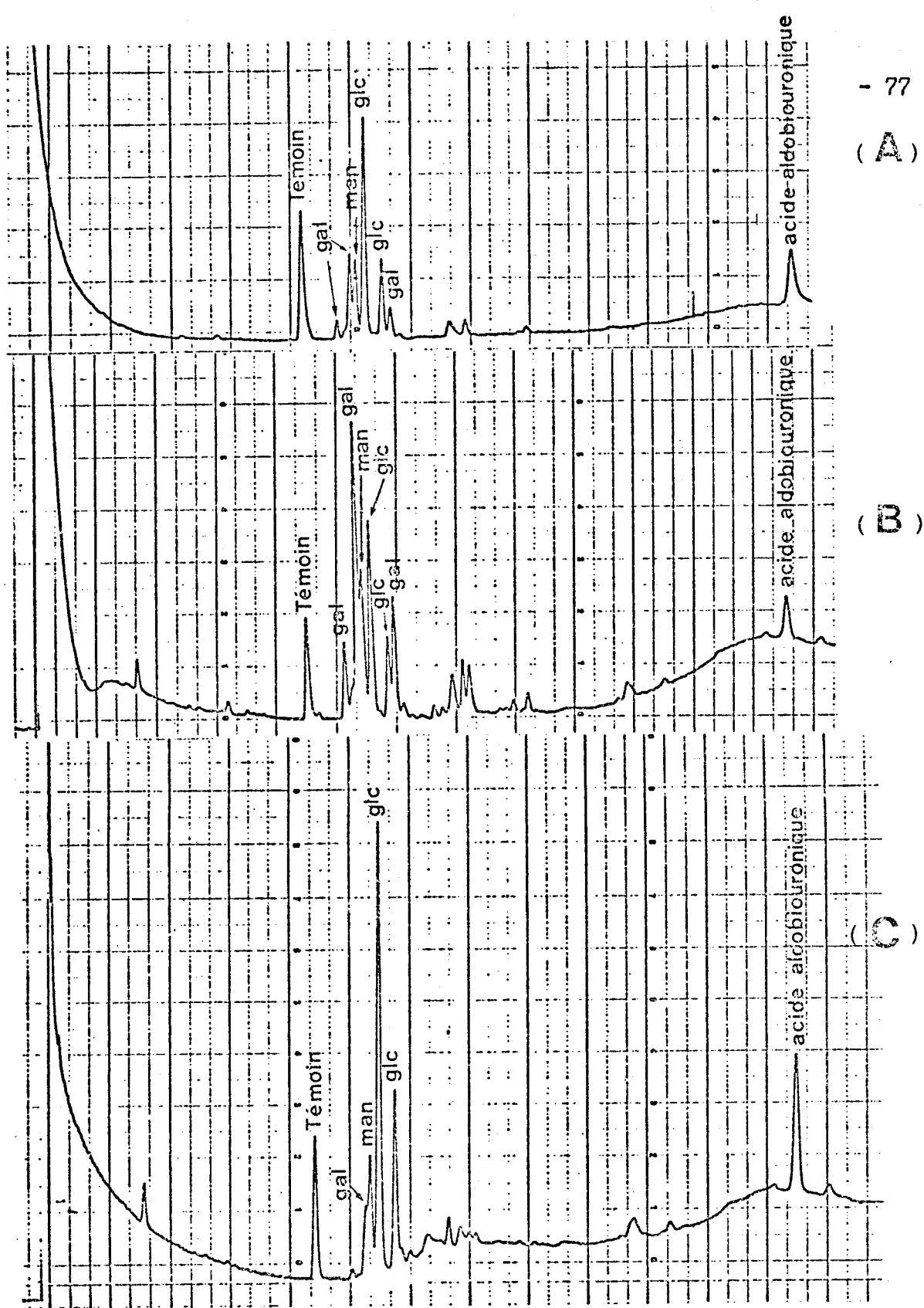


Figure 19



Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du principe actif (A) , de la fraction surnageante S₁ (B) et de la fraction précipitante P₁ (C) (Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5% sur varaport 30 " mesh " 80 - 100 ; température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C par minute ; sous un débit de gaz vecteur (azote): 10 ml/mn.

bon rendement (70%) une fraction précipitante , homogène , qui possède toute l'activité anti-bactérienne . C'est par conséquent sur cette fraction que nous effectuerons les analyses structurales afin de connaître la relation entre structure de la molécule et activité anti-bactérienne .

V - ETUDE DU PRECIPITE

1 - Etude de la copule glucidique

a - matériels et méthodes :

α -Composition centésimale et molaire :

Les compositions centésimales et molaires ont été réalisées selon les techniques décrites p. 55 .

β -Nature des points d'attache des liaisons glycosidiques : par perméthylation .

Le principe actif de départ et le précipité P₁ du fractionnement au cetavlon ont été perméthylés par la méthode d'HAKOMORI (113) modifiée par SANFORD et CONRAD (114) au diméthylsulfinyle carbanion , iodure de méthyle .

Nous verrons successivement la préparation de la base méthylsulfinyle carbanion , la perméthylation proprement dite et l'analyse des produits méthylés obtenus par méthanolyse des perméthyl-glycoprotéines.

- préparation de la base : méthylsulfinyle carbanion

Dans un flacon à pénicilline de 100 ml sont introduits 3 g d'hydrure de sodium (mélangé à 55 % avec de l'huile minérale) . L'hydrure de sodium est lavé par trois fois sous agitation avec 30 ml de pentane ou d'hexane . Après le troisième lavage , le flacon est scellé . Le solvant est éliminé à l'aide d'une aiguille hypodermique et l'hydrure de sodium est séché par un lent courant d'azote . 30 ml de diméthylsulfoxyde sont introduits

dans le flacon . La solution est alors portée dans un bain ultrasonique . Lorsque la production d'hydrogène est arrêtée , le flacon est retiré du bain ultrasonique et placé sous azote . Le méthylsulfinyle carbanion est conservé à l'obscurité à +4°C .

- perméthylation du précipité cetavlon :

3 mg de la fraction précipitante sont introduits dans un flacon à pénicilline , puis repris par 1 ml de diméthylsulfoxyde . Le flacon est scellé et placé dans un bain ultrasonique . 0,5 ml de base est additionnée à l'aide d'une aiguille hypodermique . Le flacon est ensuite placé dans un bain ultrasonique pendant 30 minutes après avoir saturé le flacon par de l'azote . Le flacon est alors congelé . 1 ml d'iodure de méthyle est ajouté sur le produit congelé et le flacon est placé 30 minutes au bain ultrasonique . La solution contenant le précipité perméthylé est versée dans 10 ml d'eau distillée . Le sucre méthylé est extrait par trois fois 5 ml de chloroforme . Les phases organiques rassemblées sont lavées par trois fois 5 ml d'eau distillée . La phase organique est séchée par du sulfate de sodium anhydre , filtrée et évaporée à l'évaporateur rotatif .

Le produit ainsi méthylé est purifié sur une colonne (2 x 50 cm) de Sephadex LH 20 dans le système solvant chloroforme / éthanol (1:1) . Le repérage du produit méthylé se fait par la méthode au phénol sulfurique de DUBOIS et al. (115) (à 200 µl de solution , on additionne 200 µl de phénol 5% et 1 ml d'acide sulfurique concentré) . Les fractions sont rassemblées puis séchées pendant 24 heures sur P₂O₅ .

- analyse des éthers méthyliques :

Les éthers méthyliques libérés par méthanolyse (MeOH / HCl 0,5 N , 80°C , 24 h.) sont analysés avant et après peracétylation (200 µl de pyridine , 200 µl d'anhydride acétique , une nuit à température ordinaire) par chromatographie en phase gazeuse d'une part sur colonne de verre

(capillaire) de Carbowax 20M (60 m x 0,4 mm) ; température programmée de 150°C à 225°C à raison de 2°C/min. ; gaz vecteur (azote) : 0,4 bar et d'autre part sur colonne (0,3 x 200 cm) de 1% Dexil 300 sur supelcoport "mesh" 100-200 , à la température programmée de 100°C à 200°C à raison de 2°C/min. sous un débit de gaz vecteur (azote) de 20 ml/min. couplée au spectromètre de masse Riber Mag 10-10 (énergie d'ionisation 70 eV) .

χ - Etude du positionnement des résidus d'acide uronique dans la chaîne glucidique :

★ réduction des acides uroniques :

Les liaisons uronosidyles sont parmi les plus difficiles à rompre par les moyens classiques d'hydrolyse . C'est pour cela qu'une réduction de la fonction carboxylique des acides uroniques permet d'obtenir des glycoprotéines modifiées devenant sensibles à l'action des agents d'hydrolyse . D'autre part , le sucre neutre apparu permet de connaître sans ambiguïté la nature de l'acide uronique de départ .

Nous avons rassemblé dans la figure 20 p. 84 le mécanisme de la réduction selon la technique de TAYLOR et CONRAD (116). 10 mg de la fraction précipitante ont été mis à dissoudre la nuit dans 3 ml d'eau pour obtenir une solution bien homogène . 9 mg de N-cyclohexyl-N'-(β-(N-méthyl-morpholino)-éthyl)-carbodiimide-p-toluène sulfonate ont ensuite été ajoutés par petites quantités . Nous obtenons ainsi le dérivé (A) provenant de la condensation de la fonction carboxylique avec le carbodiimide . Le pH est maintenu à 4,75 par addition d'acide chlorhydrique 0,1N . La solution est laissée 1 heure sous agitation à température ambiante à pH 4,75 . En présence d'acide chlorhydrique , le

dérivé (A) se transforme en un chlorure d'acide (B) qui se réarrange en lactone (C) ou ester intramoléculaire qui est ensuite réduit en un sucre neutre (D) par addition d'une solution de borohydrure de potassium 2M (5 ml) , le pH étant maintenu à 7,0 à l'aide d'une solution d'HCl 4N . Quelques gouttes d'octanol sont ajoutées à la solution . Après une heure sous agitation , à température ambiante , à pH 7,0 le mélange a été mis à dialyser deux jours contre l'eau distillée et lyophilisé . Puis nous avons déterminé la composition molaire , la composition centésimale de ce principe actif modifié . Une méthylation a ensuite été effectuée afin de déterminer la position des acides uroniques .

★ dégradation uronique :

Nous avons représenté dans la figure 21 (A) p. 85 le mécanisme de cette dégradation . La fraction précipitante au Cetavlon (25,5 mg) peracétylée (formamide : 5 ml , mélange pyridine - anhydride acétique (1:1) 3,2 ml , 15 h. à température ambiante , dialyse et lyophilisation) est dissoute dans l'anhydride acétique (10 ml) et portée au bain ultrasonique pendant 30 min. La β élimination est effectuée en ajoutant de la triéthylamine (8,6 ml) , la solution étant maintenue au bain marie bouillant pendant 2,5 h. puis concentrée. Ceci conduit au produit (B) . L'acide uronique modifié est éliminé sélectivement par hydrolyse (acide acétique 90% : 6,4 ml , 2 h. , 100°C) . Après dialyse et lyophilisation, le mélange réactionnel (C) est désacétylé par la soude 0,4M (2,5 ml) dans le diméthyl-sulfoxyde (7,2 ml) une nuit à température ambiante . Après dialyse , lyophilisation et purification sur biogel P₂ (2,5 cm x 55 cm , solvant : eau) nous recueillons une fraction sur laquelle nous effectuons la composition centésimale et molaire en monosaccharides ainsi que la perméthylation .

La figure 21 (B) donne une application de la dégradation uronique (selon LINDBERG et al. (117) sur un polysaccharide Klebsiella K28 (118) .

★ perméthylation :

Les fractions précipitantes réduites et dégradées ont été méthylées selon HAKOMORI (119) modifié par SANFORD et CONRAD (120) afin de mettre en évidence la présence d'un nouvel éther méthyl-ique libéré soit par la transformation de l'acide glucuronique en glucose soit par l'élimination de l'acide glucuronique .

§ - Oxydation periodique :

Nous avons utilisé la méthode de GOLDSTEIN et al. (121) et nous avons rassemblé dans la figure 22 p. 86 les étapes des réactions de dégradation .

Une solution de 50 mg de la fraction précipitante (A) dans 12,5 ml d'eau est additionnée de 25,5 ml de métaperiodate de sodium 0,05M . Le mélange est maintenu à +4°C et à l'obscurité pendant 8 jours . La réaction est ensuite arrêtée par de l'éthylène glycol puis dialysée . Les polyaldéhydes (B) formés lors de l'oxydation sont réduits par du borohydrure de potassium (500 mg) pendant une nuit . La solution , neutralisée par de l'acide acétique , évaporée à siccité est débarrassée de l'acide borique par trois codistillations en présence de méthanol . Le résidu (C) est repris par 10 ml d'eau et la solution est amenée à pH 1 par de l'acide sulfurique 2N , l'hydrolyse est poursuivie pendant 18 heures à température ambiante . La solution est alors neutralisée par de l'hydroxyde de baryum et le précipité de sulfate de baryum est abondamment lavé par de l'eau distillée . Le surnageant et les eaux de lavage sont lyophilisés . L'oligosaccharide résistant à l'oxydation periodique (D) est isolé par chromatographie sur biogel P₂ . L'oligosaccharide ainsi purifié est étudié d'une part en chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse (voir technique page 57) et d'autre part en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse après méthylation selon HAKOMORI (122) (voir technique page 78) .

ξ - Oxydation chromique :

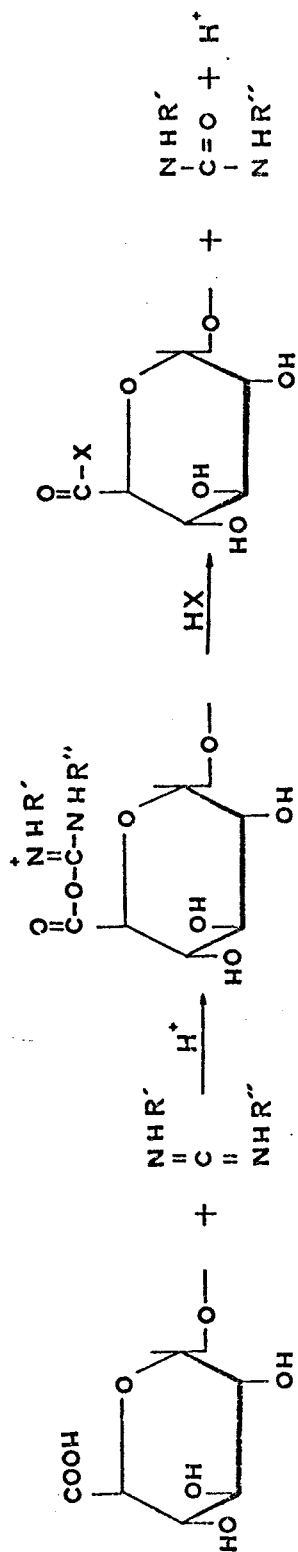
Le trioxyde de chrome en milieu acétique oxyde les monosaccharides liés par une liaison glycosidique β tout en laissant les liaisons α intactes .

La glycoprotéine précipitante(6 mg) au Cetavlon, réduite par le carbodiimide et peracétylée (produit B : figure 23 p. 87) selon le procédé décrit page 79 , est traitée avec du trioxyde de chrome (50 mg) dans l'acide acétique (1 ml) à 50°C pendant 2 heures au bain ultrasonique (HOFFMAN et al. (123) . Après addition d'eau dans le mélange , le polysaccharide peracétylé et modifié est extrait par le chloroforme (3 x 5 ml) . Les phases chloroformiques , séchées par du sulfate de sodium anhydre sont évaporées à l'évaporateur rotatif .L'oxyde de chrome a pour effet d'ouvrir le cycle pyranique du monosaccharide en liaison β , d'oxyder la fonction alcool sur le carbone 5 et de transformer la fonction hémi-acétalique du carbone 1 en une fonction ester (figure 23 : produit C) Cette fonction ester peut être rompue par action du méthylsulfinyle carbanion ($\text{CH}_3 - \underset{\text{O}}{\text{S}} - \text{CH}_2^- \text{Na}^+$) dans le DMSO ; le polysaccharide ainsi modifié peut ensuite être méthylé selon le protocole expérimental décrit plus haut (page 78) (produit D : figure 23) . Le polysaccharide oxydé peut encore être analysé directement après méthanolyse par chromatographie en phase gazeuse (voie 1) .

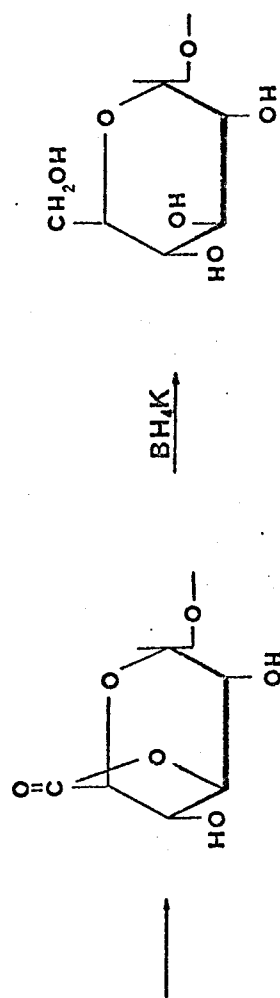
b - résultats et discussion :

α - Compositions centésimale et molaire en sucres de la glycoprotéine précipitante :

Nous avons rassemblé dans le tableau XII p. 89 les résultats de la composition centésimale et molaire de la fraction précipitante au Cetavlon . Les résultats exprimés sont des moyennes calculées



(B)



(D)

Figure 20

Mécanisme de la réduction au carbodiimide selon TAYLOR et CONRAD (124) .



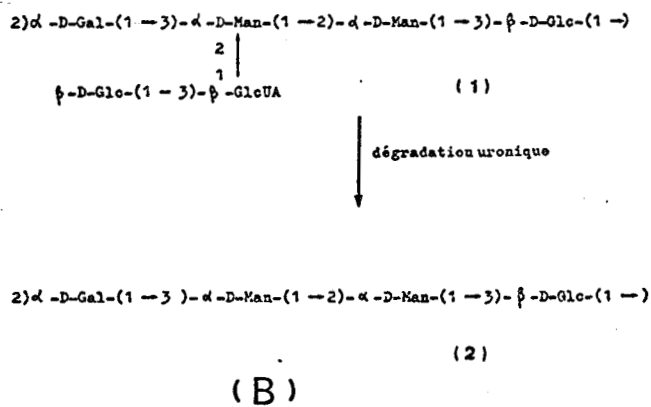
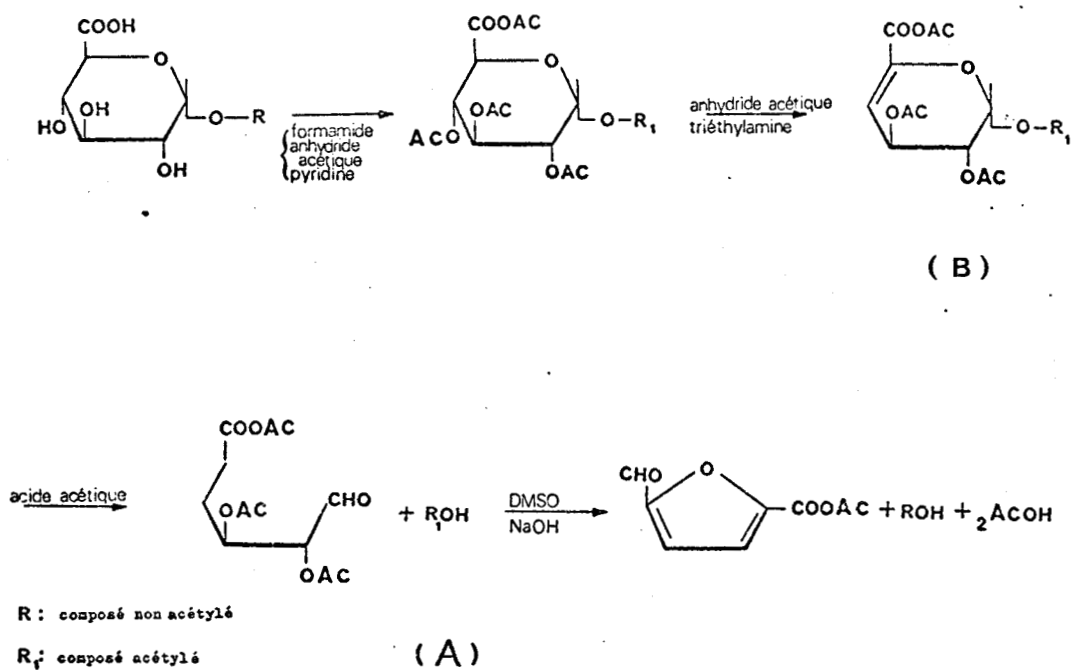


Figure 21

Mécanisme d'action (A) de la dégradation uronique et application (B) sur un polysaccharide capsulaire de *Klebsiella K_28*. (125)

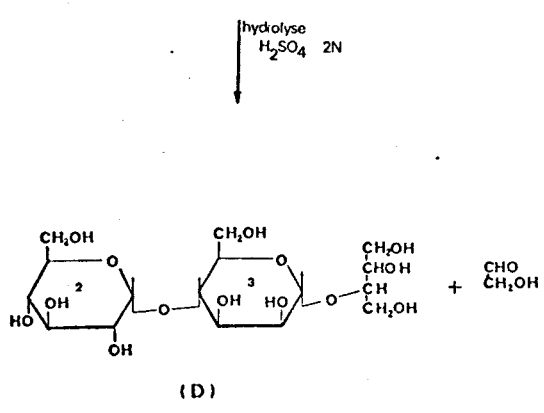
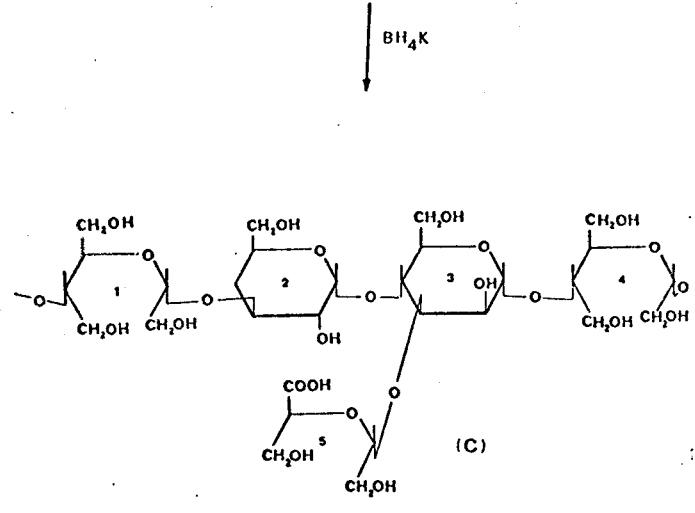
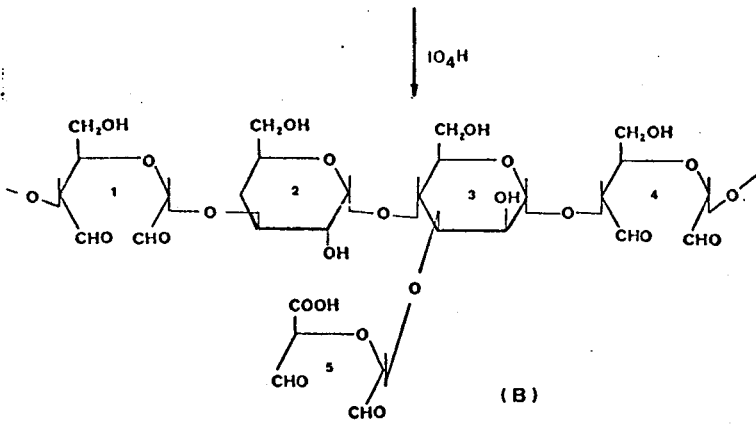
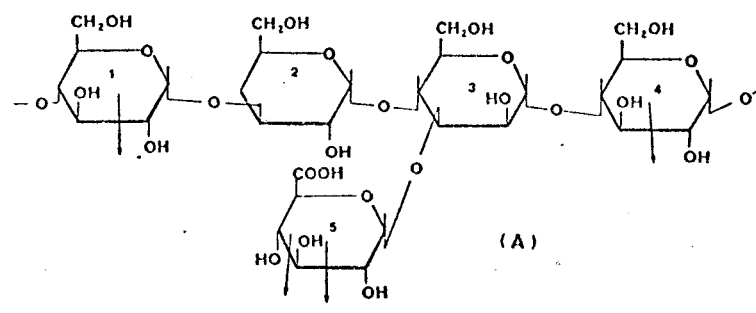
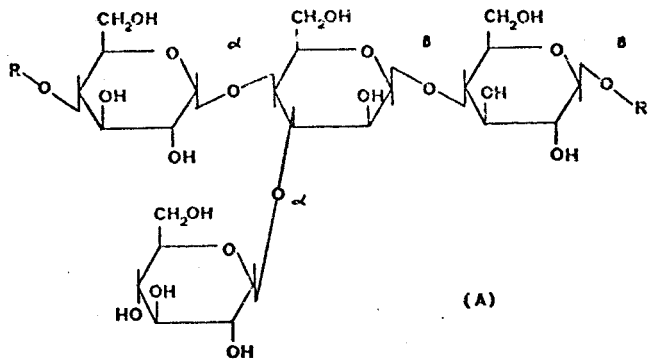


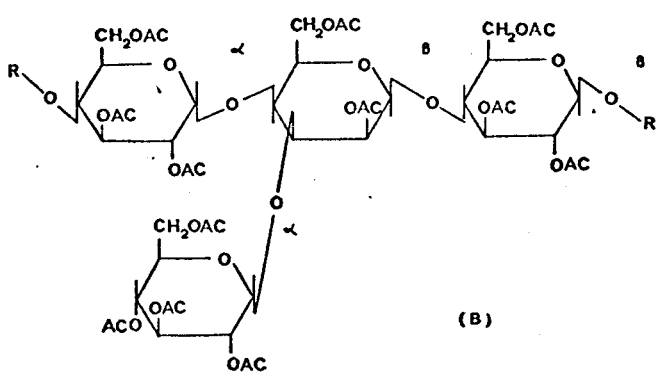
Figure 22

Mécanisme de l'oxydation periodique , appliquée à la fraction précipitante .

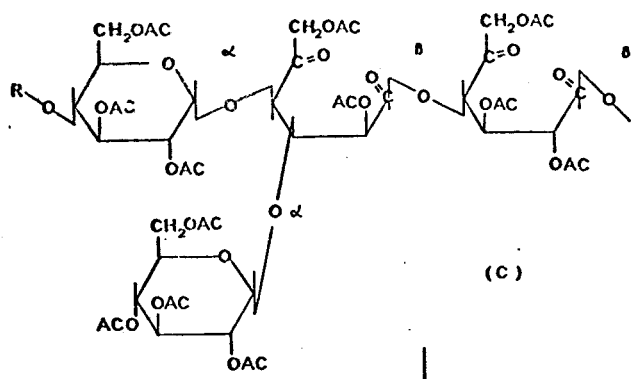




acétylation



oxydation chromique



vole 1 → méthanolyse
vole 2 → méthylation

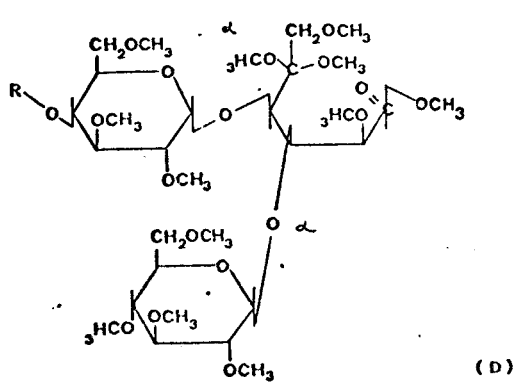


Figure 23

Mécanisme d'action de l'oxydation chromique (126) appliquée au précipité Cetavlon réduit par le carbodiimide .

à partir des dosages effectués sur plusieurs précipitations au Cetavlon .

A la lecture de ces résultats , nous constatons que par rapport au produit de départ , la fraction précipitante au Cetavlon s'est enrichie en acide uronique ce qui est logique puisque les sels de cétyl-triméthyl-ammonium précipitent sélectivement les polyanions . Cette concentration importante en acide uronique peut également se mettre en évidence sur les diagrammes de chromatographie en phase gazeuse par l'augmentation du pic d'acide aldobiouronique (rapport des hauteurs du pic d'acide aldobiouronique sur le pic de mésoinositol : 0,98 pour le précipité , 0,43 pour le produit de départ) (voir figure 19 p. 77) . La présence de ces résidus d'acide aldobiouronique que nous avons déjà identifiés à de l'acide glucuronique lié sur du mannose (voir page 60) , a pour conséquence de donner des valeurs par défaut sur le nombre de résidus de mannose obtenus par méthanolyse de la glycoprotéine . Ces valeurs seront corrigées lors de l'étude de la composition du polysaccharide réduit par le carbodiimide .

β - Nature des points d'attache des liaisons glycosidiques :

Les éthers méthyliques obtenus par perméthylation et méthanolyse de la fraction précipitante ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse à l'aide de deux types de colonnes :

a) avant acétylation :

Par chromatographie sur colonne capillaire de Carbowax 20M (figure 24 p. 91) , nous avons pu identifier le 2,3,6-tri-O-méthyl-glucose , le 2,4,6-tri-O-méthyl-glucose , le 2,4,6-tri-O-méthyl-galactose et le 2,6-di-O-méthyl-mannose dans les rapports molaires : 0,9 / 1 / 0,13 / 0,23 . Le diméthylmannose est dosé par défaut pour les mêmes raisons que celles discutées plus haut (page 60) . En effet , ce

Tableau XII

Composition centésimale et molaire du principe actif et de la fraction précipitante .

| | composition centésimale en % | | | | composition molaire | | | |
|-----------------------|------------------------------|------------------|----------|------------|---------------------|----------|------------------------|--|
| | Oses neutres | Acides uroniques | osamines | Galactose★ | Mannose★ | Glucose★ | Acide aldobionurique★★ | |
| principe actif | 50,18 | 8,76 | 1,17 | 1,06 | 0,57 | 2 | 0,43 | |
| fraction précipitante | 69,2 | 18,2 | 0,76 | 0,36 | 0,43 | 2 | 0,98 | |



★ calculé sur la base de 2 résidus de glucose

★★ rapport de la hauteur du pic d'acide aldobionurique sur la hauteur du pic du témoin interne (mésoinositol)

monosaccharide est conjugué à de l'acide glucuronique sous la forme d'un acide aldobiouronique . De même la présence d'un résidu de diméthylmannose indique une structure branchée .

b) après acétylation :

Par chromatographie sur colonne de Dexil à 1% , qui permet de séparer des oligosaccharides de masses moléculaires plus élevées , nous avons pu caractériser et identifier au spectromètre de masse le disaccharide acide aldobiouronique (figure 25 p. 92) . L'analyse des fragments m/e 233 et m/e 247 indique la présence d'un acide uronique perméthylé en position terminale non réductrice et d'un hexose méthylé et acétylé en position terminale réductrice respectivement. On peut remarquer également sur le diagramme le fragment de masse m/e 307 (247 + 60) qui constitue l'ion baJ_1 . L'analyse du spectre de masse de ce disaccharide ne nous permet pas de trancher entre les deux isomères $GlcUA \xrightarrow{1,3} Man$ ou $GlcUA \xrightarrow{1,4} Man$. Cette ambiguïté est cependant levée par l'étude de structure du disaccharide isolé à partir du principe actif total , que nous avons réalisée dans le premier chapitre (voir page 58) .

✓ - Etude du positionnement des résidus d'acide uronique dans la chaîne glucidique :

★ réduction des acides uroniques :

Les résultats de la réduction du précipité Cetavlon sont illustrés dans le tableau XIII p. 94 et la figure 26 p. 95 . On constate qu'il est nécessaire d'effectuer deux cycles de réduction par le carbodiimide pour faire disparaître totalement l'acide aldobiouronique . On constate également l'augmentation importante du glucose indiquant que l'acide uronique est de l'acide glucuronique enfin ,

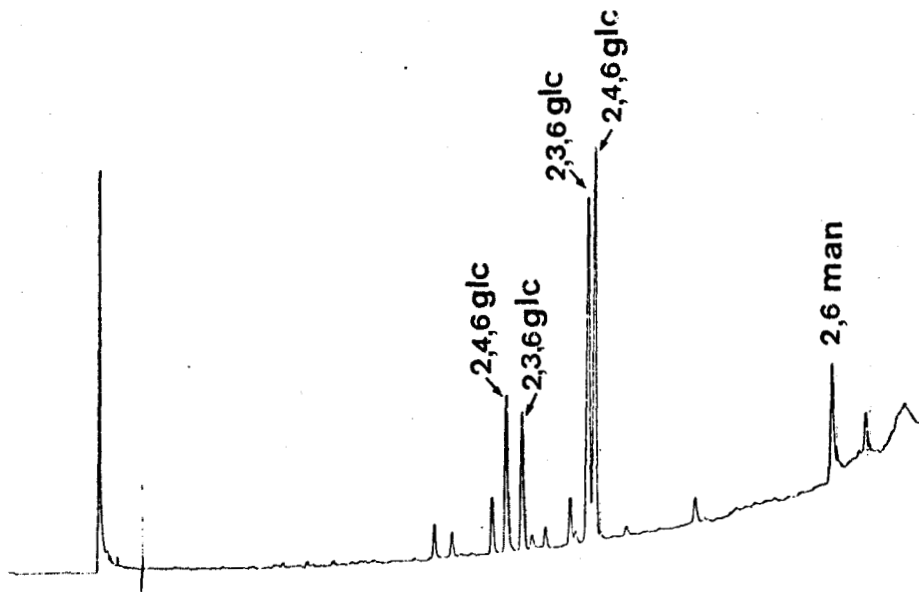


Figure 24

Analyse en chromatographie en phase gazeuse de la fraction précipitante perméthylée et méthanolysée sur colonne de verre (capillaire) de Carbowax 20M (60 m x 0,4 mm); température programmée de 150°C à 225°C à raison de 2°C/min. ; gaz vecteur (azote):0,4 bar .

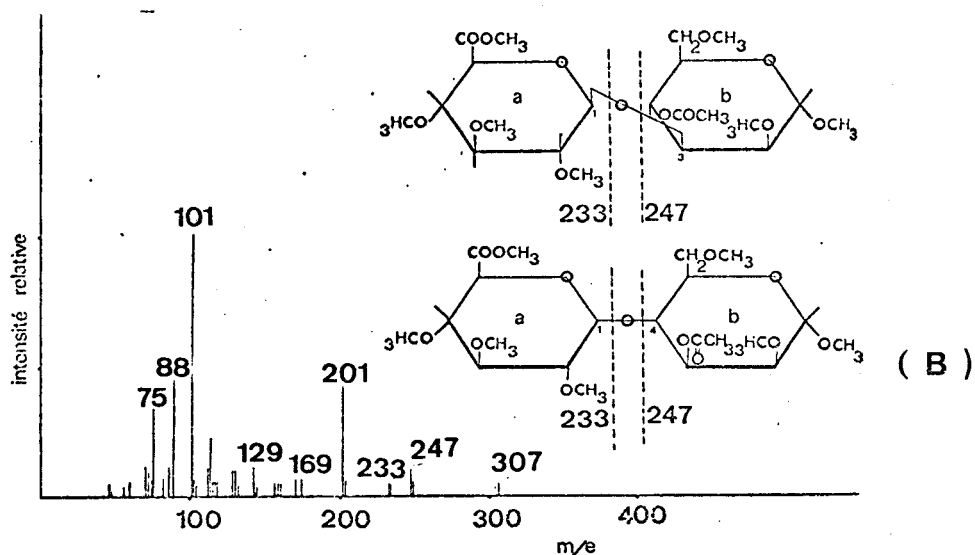
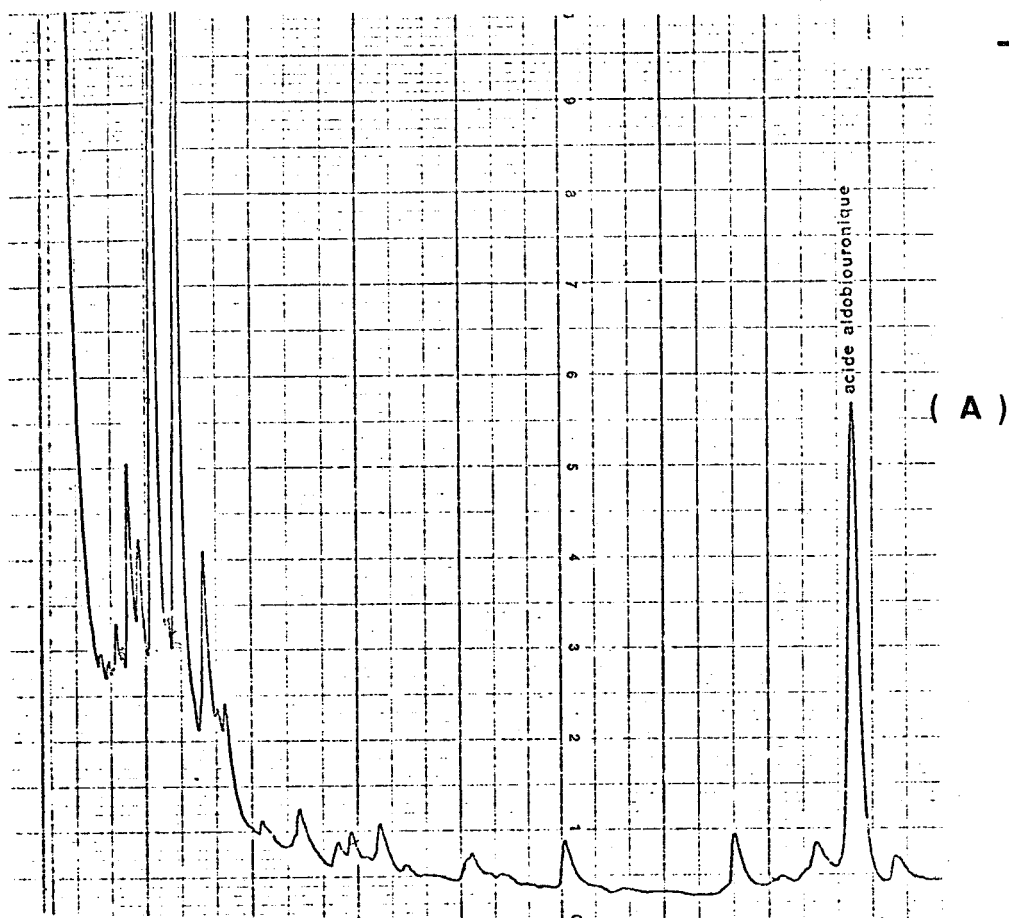


Figure 25

Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques du principe actif libérés par méthanolyse et analysés après acétylation sur colonne de Dexil 300 à 1% sur supelcoport "mesh" 100-120, à la température programmée de 100 à 200°C à raison de 2°C/min. sous un débit de gaz vecteur (azote) de 20 ml/min. (A) , couplée au spectromètre de masse Riber Mag 10-10 (énergie d'ionisation 70 eV) (B)



l'augmentation plus légère du mannose permet de conclure à une conjugaison acide uronique → mannose .

Ces expériences de réduction nous permettent de déterminer les rapports molaires des monosaccharides neutres et acides présents dans le précipité Cetavlon . En effet , la présence d'acides uroniques interdit la libération quantitative des liaisons glucosidiques de l'acide uronique ce qui n'est plus le cas dans les fractions réduites où l'acide uronique est transformé en son hexose correspondant . Pour un résidu de mannose , la réduction a fait apparaître un résidu de glucose supplémentaire provenant de l'acide glucuronique . Sur la base des déterminations centésimales et molaires des sucres ainsi que de la détermination de la masse moléculaire de 95 500 déterminé par ultracentrifugation , nous avons calculé le nombre total de résidus de monosaccharides présents dans la glycoprotéine native .

★ dégradation uronique :

Nous avons rassemblé dans le tableau XIV p. 96 et la figure 27 p. 97 les résultats de la dégradation uronique de la fraction précipitante . Nous constatons la disparition totale du pic d'acide aldobiouronique ainsi que l'absence d'acide uronique par dosage au carbazol sur la glycoprotéine ayant subi une dégradation uronique . D'autre part , les résultats des rapports molaires en sucres concordent tout à fait avec ceux de la glycoprotéine réduite à savoir un résidu de mannose , pour deux résidus de glucose . A la suite de ces études , nous pouvons indiquer que la fraction glucidique de la glycoprotéine précipitante est constituée d'unités de répétition contenant deux résidus de glucose , un résidu de mannose et un résidu d'acide glucuronique .

TABLEAU XIII

Calcul du nombre de résidus réels de chacun des monosaccharides présents dans la fraction précipitante P₁ du fractionnement Cetavlon

| | P ₁ natif | | | | P ₁ réduit (après 2 cycles de réduction) | | | | | |
|---|----------------------|----------------------------|-------------------------|---------|--|--------------|------|-----|-----------|-------|
| | Oses neutres | Acides uroniques (GlcUA) | Nombre de résidus réels | | | Oses neutres | Gal | Man | Glc natif | Glc ↓ |
| | | | Galactose | Mannose | Glucose | | | | | |
| Composition centésimale | 69,1 % | 18,2 % | | | | | | | | |
| Rapports molaires ★ | | | 0,35 | 0,43 | 2 | 0,23 | 1,01 | 2 | 1 | |
| Nombre de résidus calculés sur la base d'une MM de 95 500 | | | 26 | 115 | 246 | | | | | 90 |

★ calculés sur la base de 2 résidus de glucose



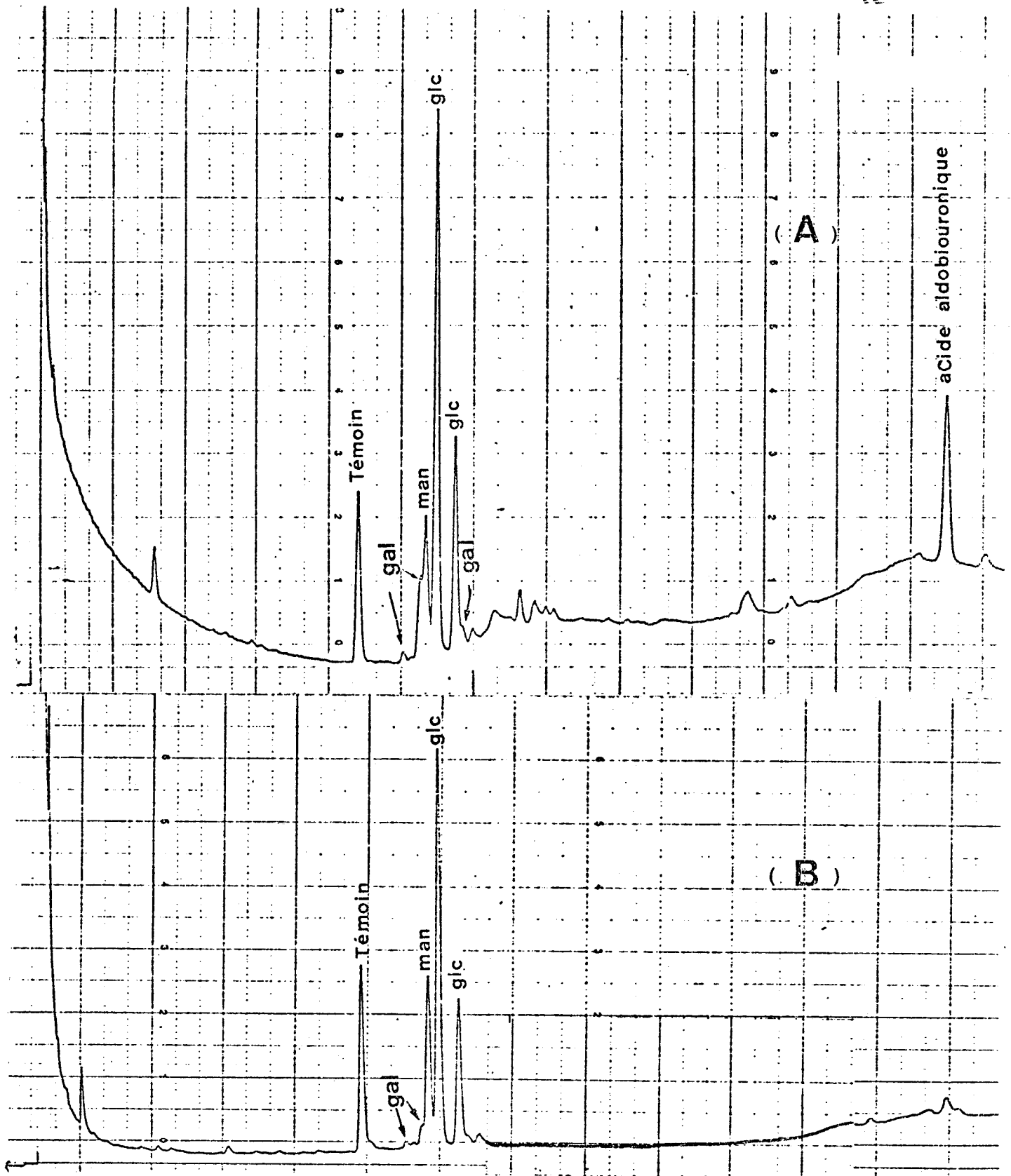


Figure 26

BHS
LILLE

Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du précipité P₁ natif (A) et du précipité P₁ réduit (B) . (Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5% sur varaport 30 "mesh" 80-100 ; température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C/min. sous un débit de gaz vecteur (azote) : 10 ml/min.

TABLEAU XIV

Composition molaire★ de la fraction précipitante avant et après dégradation uronique .

| | Galactose | Mannose | Glucose | Acide aldobiouronique★★ |
|-------------------|-----------|---------|---------|-------------------------|
| précipité natif | 0,26 | 0,50 | 2 | 0,95 |
| précipité dégradé | 0,22 | 1,04 | 2 | — |

★calculée sur la base de 2 résidus de glucose

★★ rapport de la hauteur du pic d'acide aldobiouronique sur la hauteur du pic du témoin interne (mésoinositol)



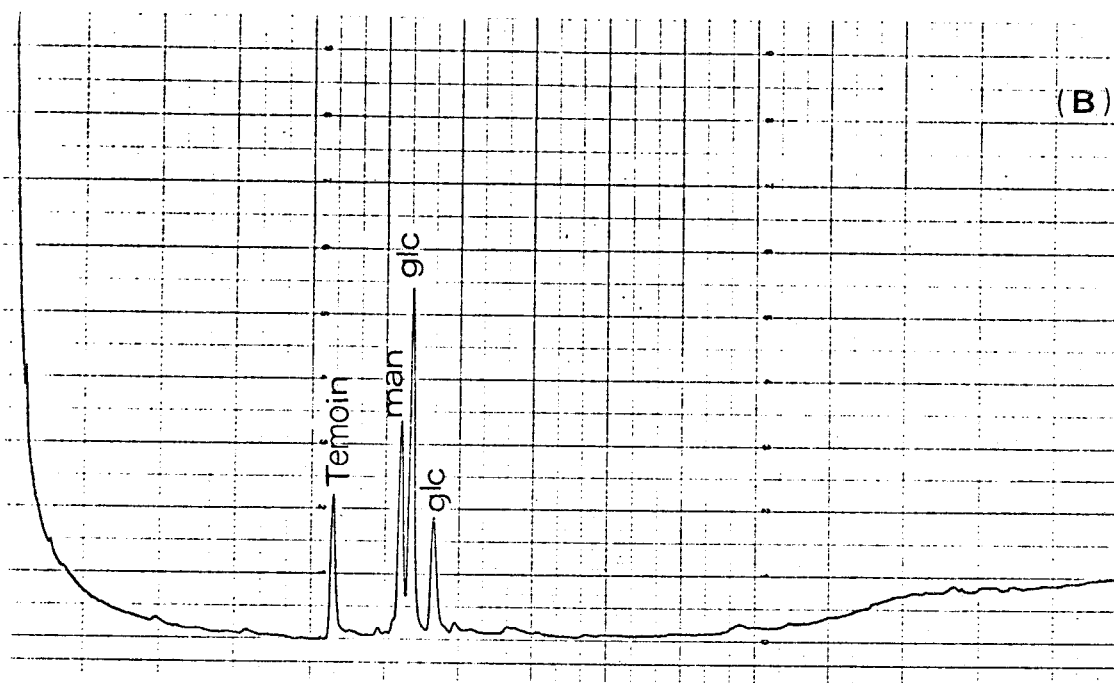
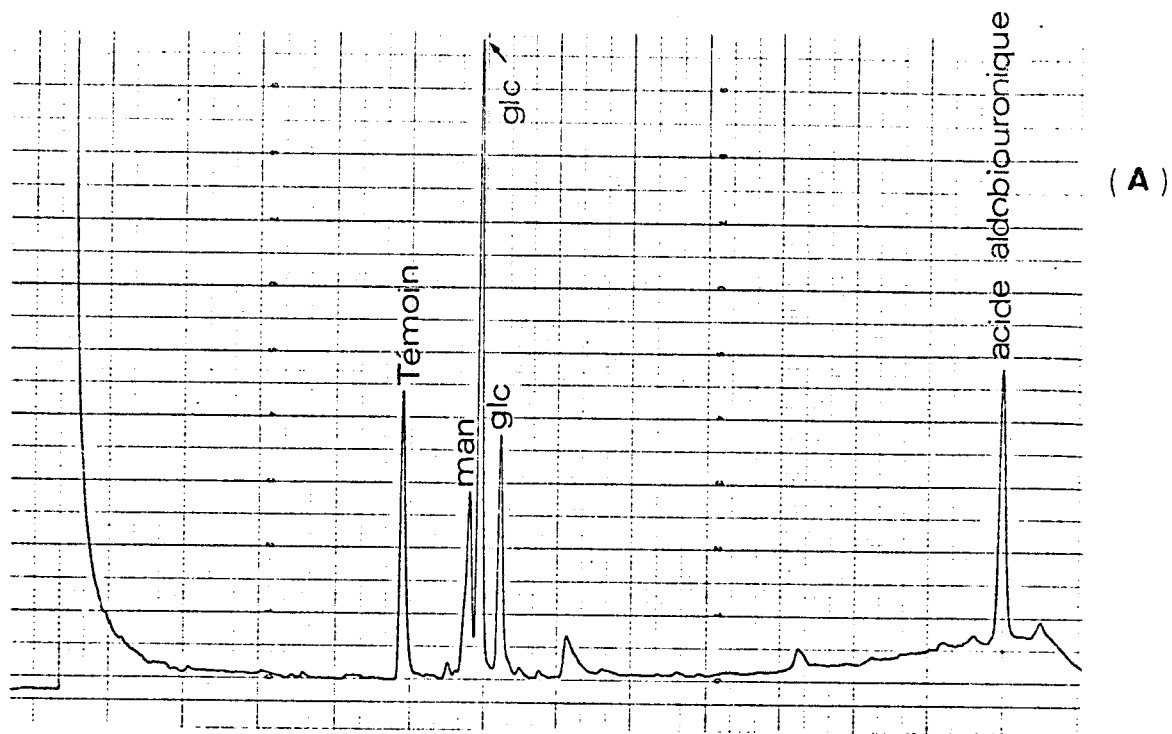


Figure 27

Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du précipité P₁ natif (A) et du précipité P₁ ayant subi une dégradation uronique (B) .

(Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5% sur varaport 30 "mesh" 80-100 ; température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C/ min. sous un débit de gaz vecteur(azote) : 10 ml/min.

BUS LILLE

★ étude par perméthylation des fractions P₁ réduite par le carbodiimide et P₁ ayant subi une dégradation uronique :

Nous avons rassemblé dans les figures 28 et 29 p. 99, 100 et le tableau XV p. 101 les résultats des analyses par chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse des deux fractions perméthylées. Nous constatons que les résultats des rapports molaires des éthers méthyliques obtenus par perméthylation et méthanolyse du précipité Cetavlon réduit et du précipité Cetavlon ayant subi une dégradation uronique confirment les rapports molaires déterminés dans le paragraphe précédent à savoir : pour 2 résidus de glucose , 1 résidu de mannose et 1 résidu d'acide glucuronique (voir page 94) . En effet , la fraction réduite fournit 1 résidu de di-O-méthyl-mannose , 2 résidus de tri-O-méthyl-glucose et 0,32 résidu de perméthyl-glucose , cette faible valeur est due à une réduction non quantitative de l'acide glucuronique en glucose .

D'autre part , sur la glycoprotéine débarrassée de ses résidus d'acide glucuronique , nous identifions 2 résidus d'éthers triméthyliques du glucose pour 0,52 résidu de tri-O-méthyl-mannose ; cette faible valeur est due à une élimination non quantitative de l'acide glucuronique ce qui est démontré par la présence de 0,2 résidu de 2,6-di-O-méthyl-mannose . Enfin , l'identification du 2,3,6-tri-O-méthyl-mannose sur la fraction dépourvue d'acide glucuronique indique que ce dernier est lié sur la position 3 du résidu de mannose dans la molécule native .

Les résultats de la composition molaire de la glycoprotéine avant et après réduction par le carbodiimide , de la perméthylation de la glycoprotéine avant et après réduction ou dégradation de l'acide glucuronique nous permettent de formuler l'hypothèse de structure pour

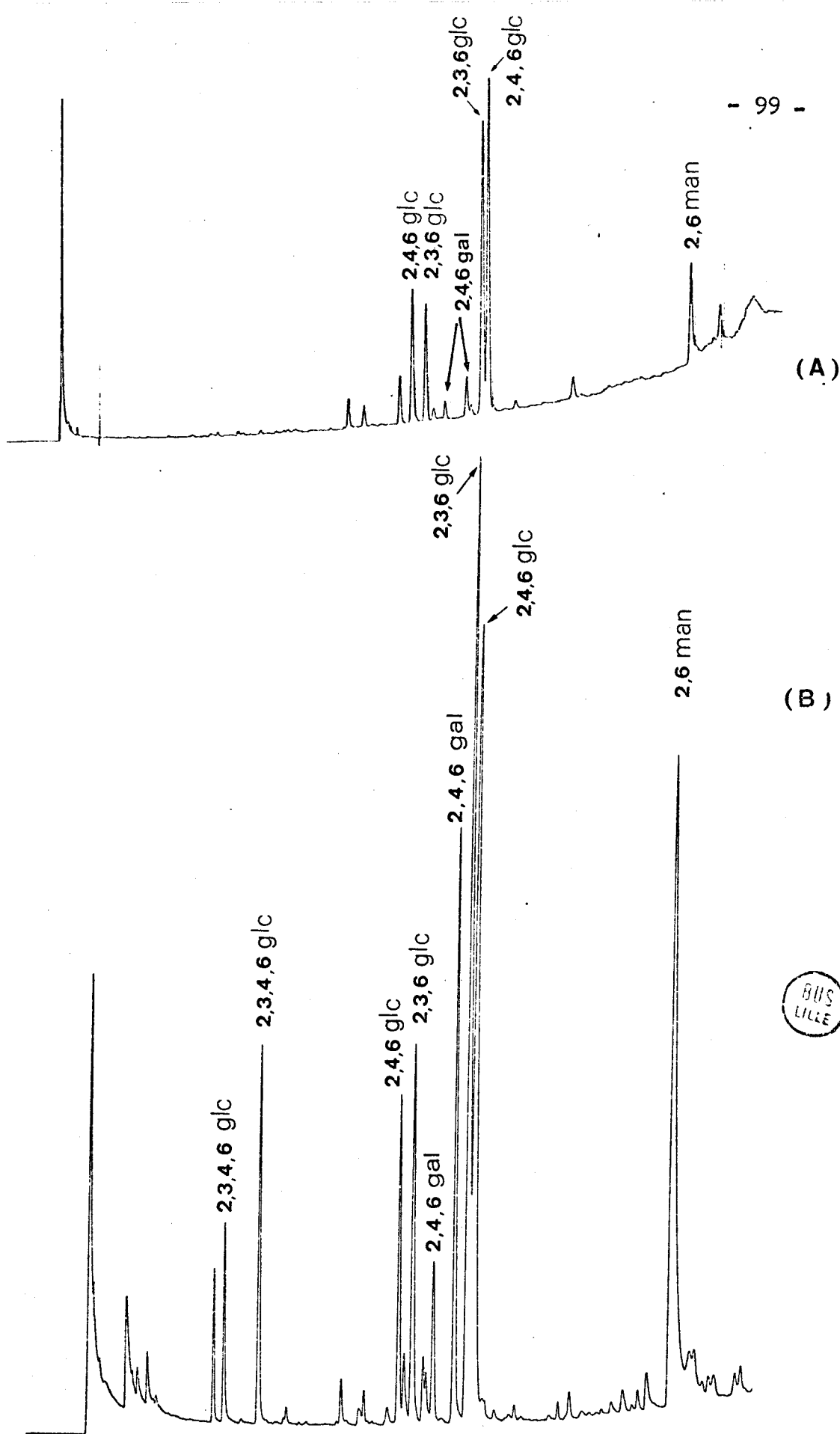


Figure 28

Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques du précipité P₁ natif et perméthylé (A) et du P₁ réduit et perméthylé (B) obtenus par méthanolyse . (Colonne de verre (capillaire) de Carbowax 20M (60 m x 0,4 mm) ; température programmée de 150°C à 225°C à raison de 2°C/min. . gaz vecteur (azote) : 0,4 bar .

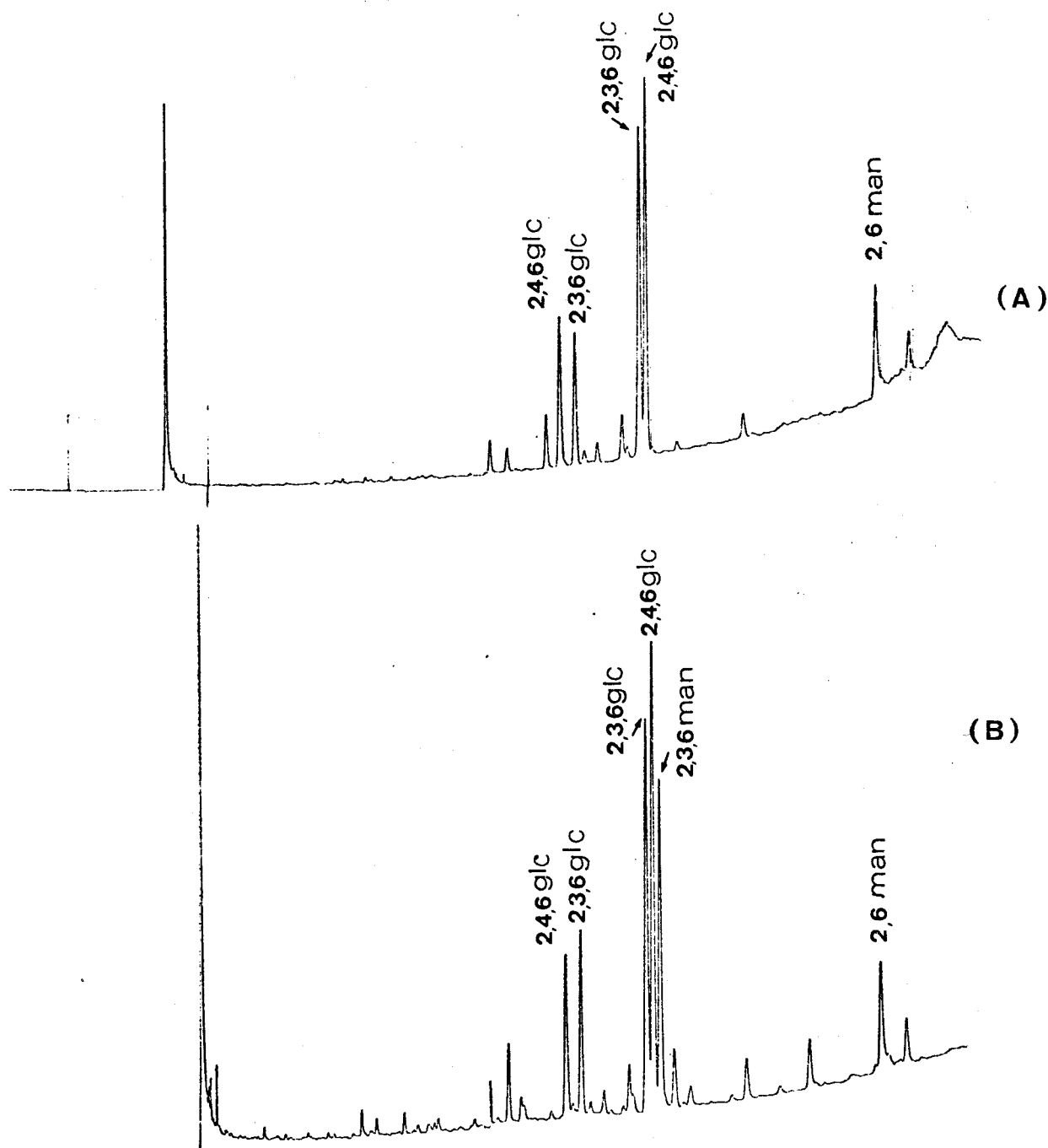


Figure 29

Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques du précipité P₁ natif (A) et du p₁ modifié après dégradation uronique (B) obtenus par méthanolyse de ces deux fractions perméthylées . (Colonne de verre (capillaire) de Carbowax 20M (60 m x 0,4 mm) ; température programmée de 150°C à 225°C à raison de 2°C/min. ; gaz vecteur (azote) : 0,4 bar .



TABLEAU XV

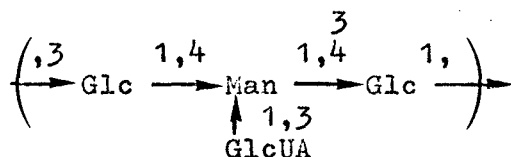
Rapports molaires * des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse des fractions perméthylées P₁, P₁ réduit et P₁ ayant subi une dégradation uronique .

| | Ethers méthyliques | | | | | 2,6-di-0-méthyl-Mannose |
|---|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| | 2,3,4,6-tétra-0-méthyl-Glucose | 2,3,6-tri-0-méthyl-Glucose | 2,4,6-tri-0-méthyl-Glucose | 2,4,6-tri-0-méthyl-Galactose | 2,3,6-tri-0-méthyl-Mannose | |
| Fraction P ₁ | | 0,9 | 1 | 0,13 | | 0,23 |
| Fraction P ₁ réduite | 0,32 (1) | 1,03 (1) | 1 | 0,49 | | 0,78 (1) |
| Fraction P ₁ ayant subi une dégradation uronique | | 0,94 (1) | 1 | 0,11 | 0,52 (1) | 0,2 |

* calculés sur la base de 1 résidu de 2,4,6-tri-0-méthyl-Glucose



l'unité de répétition :



Cette hypothèse de structure sera confirmée par oxydation periodique de la glycoprotéine totale et par les anoméries de liaisons déterminées par une oxydation chromique .

§ - Oxydation periodique :

L'oxydation periodique suivie de la réduction et de l'hydrolyse partielle par l'acide sulfurique nous a fourni sur biogel P₂ une fraction sucrée dont nous avons étudié la composition molaire en sucres et la structure après méthylation .

- composition molaire :

La figure 30 p. 106 et le tableau XVI p. 107 résument les résultats de la composition en sucres du précipité P₁ ayant subi une oxydation periodique . Cette fraction oligosaccharidique renferme pour 1 résidu de mannose , 1 résidu de glucose . Nous constatons sur le diagramme de chromatographie en phase gazeuse un pic correspondant à l'erythritol et un composé X que nous n'avons pu identifier sous la forme méthyl glycoside trifluoroacétylé . Enfin , nous remarquons la disparition totale de l'acide aldobiouronique .

- étude de structure de la fraction oligosaccharidique :

Après perméthylation , cette fraction oligosaccharidique fournit par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de Dexil à 1% deux pics qui ont pu être analysés par couplage GC-MS (figure 31 p. 108)

— Le composé I a été identifié à : $\text{Glc} \xrightarrow{1,4} \text{Man} \xrightarrow{1,3} \text{Erythritol}$
sur la base des résultats suivants :

. La séquence Hexose \rightarrow Hexose \rightarrow Erythritol est déterminée par les pics de masse m/e 219 , 187 , 155 (série aA) , m/e 351 , 319 , 287 (série bc) , les ions de masse m/e 147 , 115 correspondant au résidu d'erythritol en position terminale et aux ions de la série J : l'ion cbaJ₁ de masse m/e 411 et l'ion cbJ₁ de masse m/e 207 indiquant que le carbone 3 des deux résidus d'hexose sont libres (les ions J₁ se formant à l'aide du groupement méthyl du carbone 3)

. La séquence Glucose \rightarrow Mannose \rightarrow Erythritol ainsi que les points d'attache sont déterminés après méthanolyse de l'oligosaccharide perméthylé et identification du perméthyl glucose et du 2,3,6 - tri-O-méthyl-mannose .

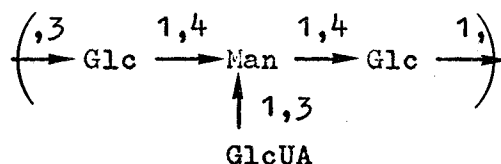
— Le composé II a été identifié à : $\text{Glc} \xrightarrow{1,4} \text{Man} \xrightarrow{1,4} 3,6 \text{ dideoxyhexose}$
sur la base des résultats suivants :

. La séquence Hexose \rightarrow Hexose \rightarrow 3,6 dideoxyhexose est déterminée par les pics de masse m/e 219 , 187 , 155 (série aA) , m/e 379 , 347 , 315 (série bc) , l'ion de masse m/e 175 correspondant au résidu de 3,6 dideoxyhexose en position terminale et aux ions de la série J : ion cbaJ₁ de masse m/e 439 et l'ion cbJ₁ de masse m/e 235 .

. La séquence Glc \rightarrow Man \rightarrow 3,6 dideoxyhexose ainsi que les points d'attache sont déterminés par analyse des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse de la fraction oligosaccharidique perméthylée : 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-glucose et 2,3,6-tri-O-méthyl-mannose .
Il nous a été malheureusement impossible d'identifier le dérivé méthylé de l'erythritol et du 3,6 dideoxyhexose .

L'oxydation periodique nous a fourni une fraction oligosaccharidique hétérogène (2 constituants) .Le premier oligosaccharide, élué de la colonne de chromatographie en phase gazeuse de structure

(Glc $\xrightarrow{1,4}$ Man $\xrightarrow{1,3}$ Erythritol) est le produit logique de l'oxydation periodique de l'unité de répétition :



Par contre , nous n'expliquons pas encore actuellement la présence du trisaccharide terminé par le deoxysucre (Pic II)

ε - Oxydation chromique :

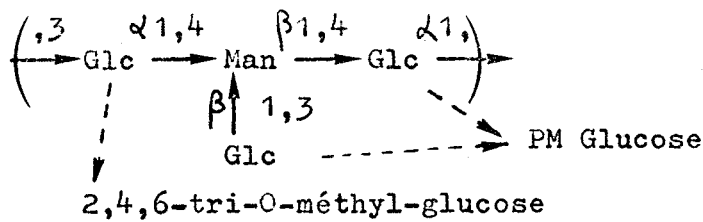
Nous n'avons jamais pu obtenir de résultats exploitables par oxydation chromique de la glycoprotéine native . C'est pour cette raison que nous avons travaillé sur le produit réduit par le carbodiimide .

Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

1°) Par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse (figure 23 p. 87 : Voie 1) nous observons une disparition presque quantitative du mannose alors qu'une partie du glucose est conservée . Les rapports molaires calculés par rapport au galactose , qui n'a pas subi de modification , indiquent qu'il reste 2 résidus de glucose . (figure 32 p. 109 et tableau XVII p. 110) . Nous pouvons donc conclure après ce premier résultat que tout le mannose est lié par liaison β glycosidique et que 2 résidus de glucose sur les 3 sont conjugués par des liaisons α glycosidiques .

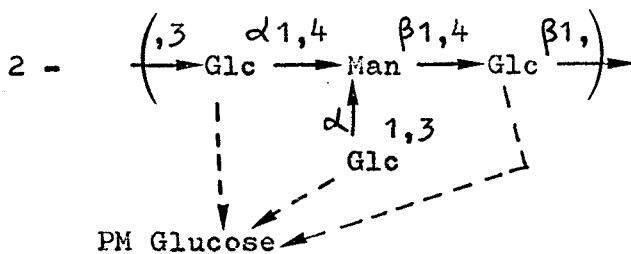
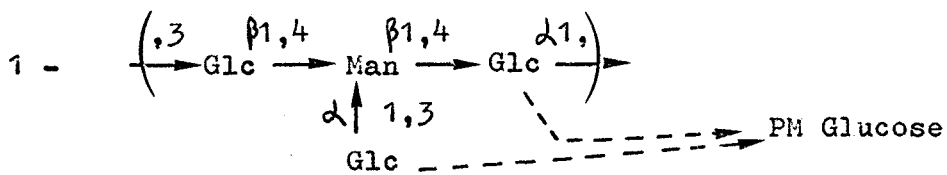
2°) Après perméthylation (figure 23 p. 87 :Voie 2) et méthanolyse de la glycoprotéine réduite et oxydée par l'oxyde de chrome , nous identifions uniquement du perméthyl glucose .

Les résultats obtenus par les voies 1 et 2 . permettent d'exclure la structure suivante :



qui donnerait après perméthylation du perméthyl glucose et du 2,4,6-tri-O-méthyl-glucose, ce qui n'est pas le cas.

Par contre, nous ne pouvons trancher entre les deux structures suivantes :



qui toutes deux donnent après oxydation chromique une disparition totale du mannose et la conservation de 2 résidus de glucose et la présence unique de perméthyl glucose.

Cette ambiguïté sera levée par Résonance Magnétique Nucléaire de la glycoprotéine native.

Quant aux résidus de galactose que nous retrouvons dans notre fraction, il appartient à la fraction surnageante du fractionnement au Cetavlon qui souille nos préparations.

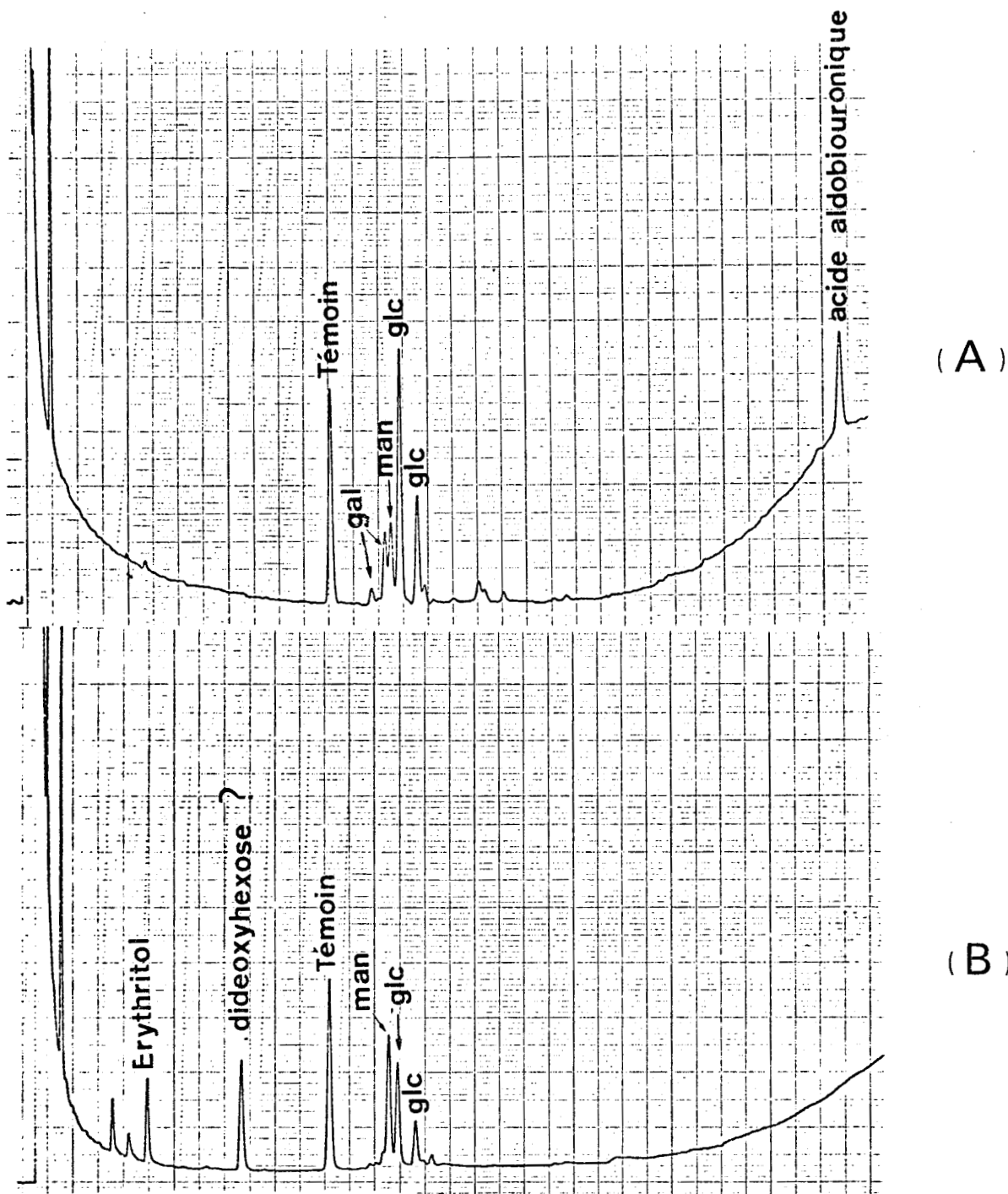


Figure 30

Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoro-acétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du précipité P_1 natif (A) et du précipité P_1 ayant subi une oxydation periodique (B) . (Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5% sur varoport 30 "mesh" 80-100 ; température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C/min. sous un débit de gaz vecteur (azote) ; 10ml/min.

BNS
LILLE

TABLEAU XVI

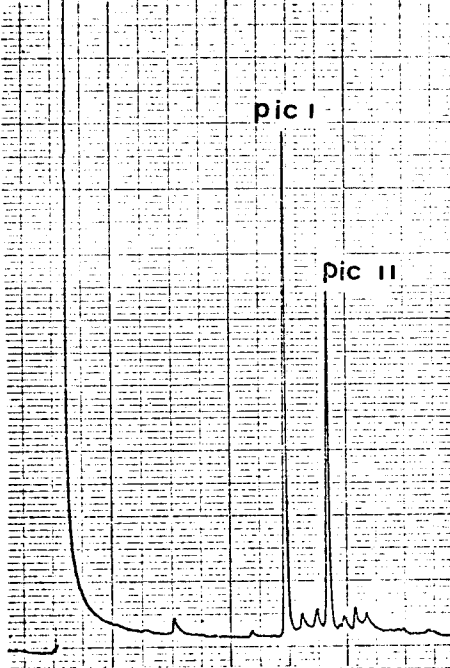
Composition molaire*de la fraction précipitante native et de la fraction précipitante ayant subi une oxydation periodique .

| | Galactose | Mannose | Glucose | Acide aldobiouronique** |
|-----------------|-----------|---------|---------|-------------------------|
| fraction native | 1,5 | 1 | 4,2 | 0,9 |
| fraction oxydée | 0,2 | 1 | 1 | — |

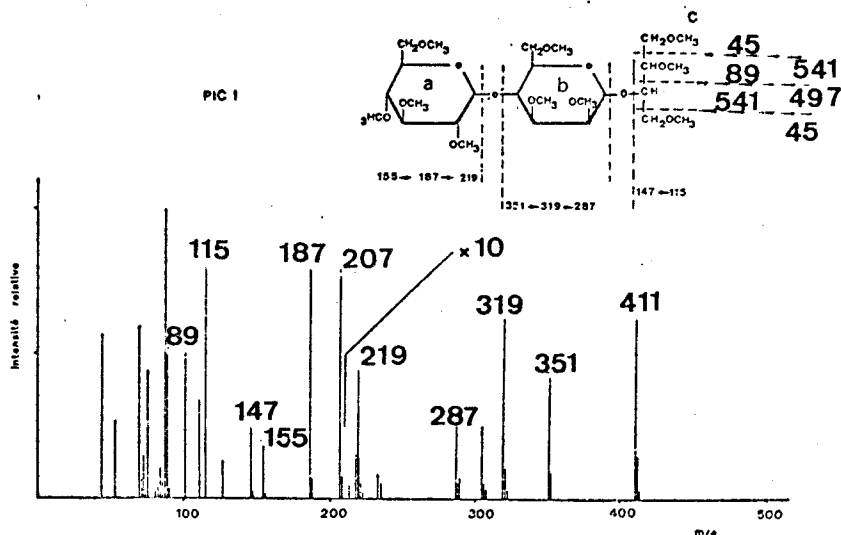
*calculée sur la base de 1 résidu de mannose

** rapport de la hauteur du pic d'acide aldobiouronique sur la hauteur du pic du témoin interne (mésoinositol)

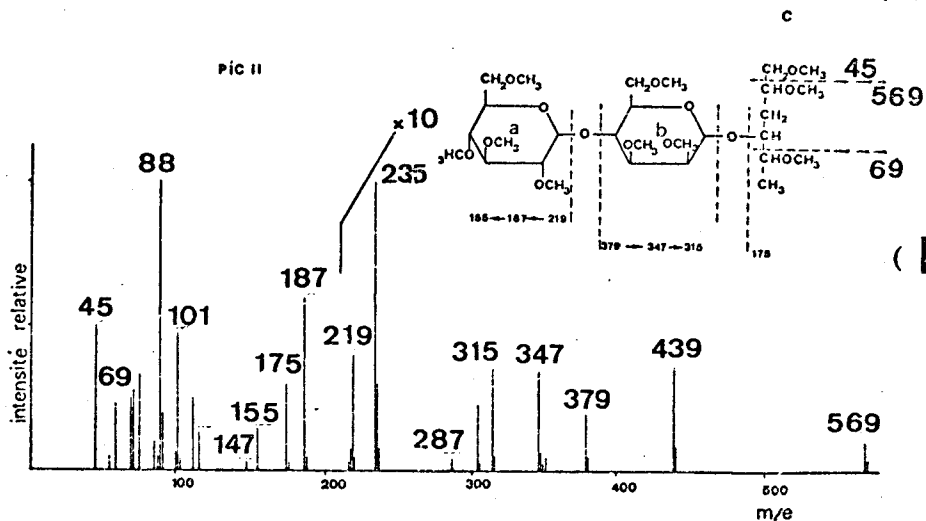




(A)



(B₁)



(B₂)

Figure 31

Chromatographie en phase gazeuse de la fraction précipitante oxydée et perméthylée (A) (sur colonne (0,3 x 200 cm) de 1% Dexil 300 sur supelcoport "mesh" 100-200 , à la température programmée de 150°C à 300°C , 6°C/min. , sous un débit de gaz vecteur (Azote) de 20 ml/min. Analyse par couplage GC-MS du pic I (B₁) et du pic II (B₂)



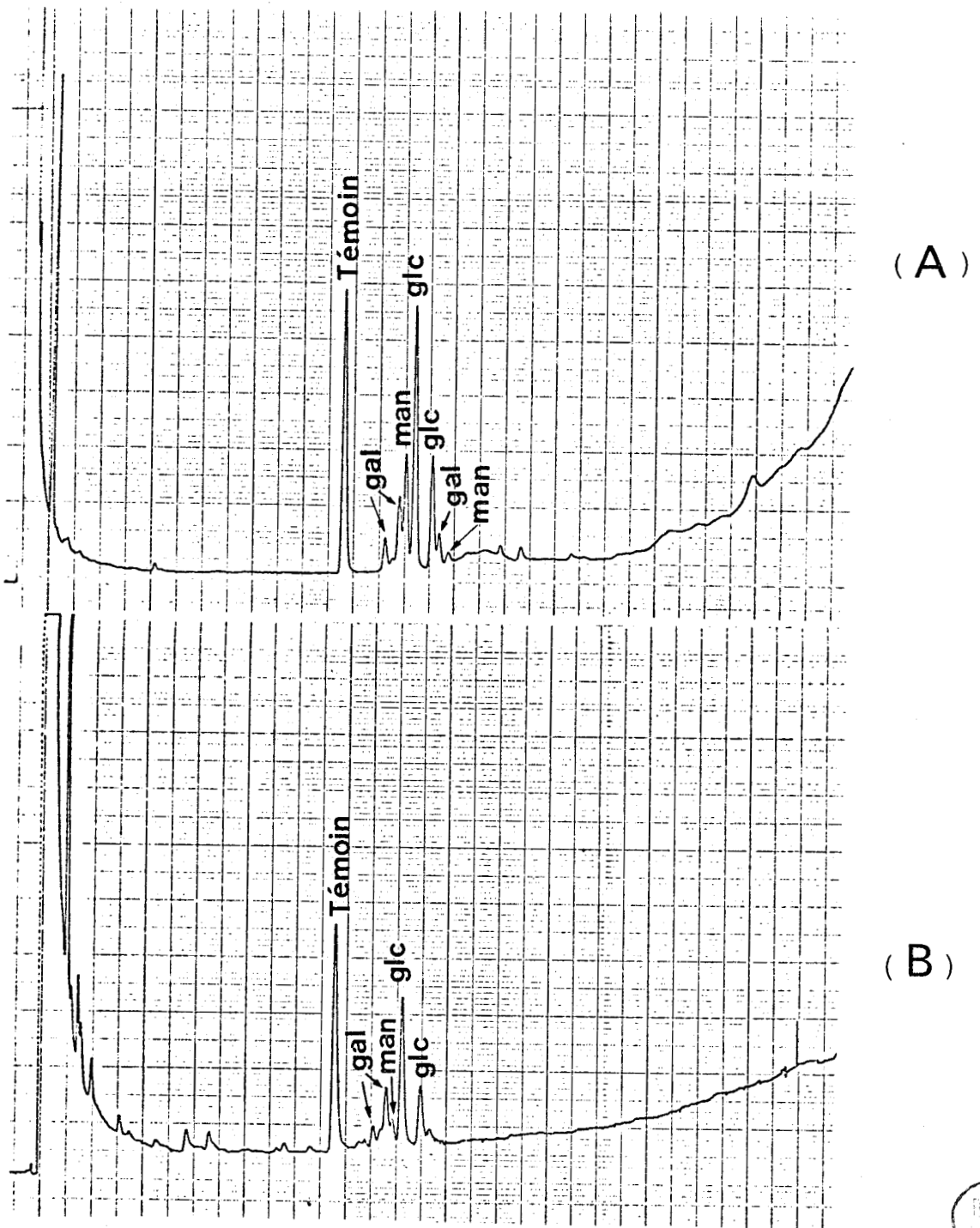


Figure 32

Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du précipité P_1 réduit (A) et du précipité P_1 ayant subi une oxydation chromique (B). (Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5% sur varoport 30 "mesh" 80-100 ; température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C / min. sous un débit de gaz vecteur (azote) : 10 ml/min.



TABLEAU XVII

Composition molaire* de la fraction précipitante réduite et de la fraction précipitante réduite ayant subi une oxydation chromique .

| | Galactose | Mannose | Glucose | Acide aldobiouronique |
|------------------------------|-----------|---------|---------|-----------------------|
| Précipité réduit | 1 | 0,81 | 2,25 | — |
| Précipité réduit et oxydé | 1 | 0,25 | 1,75 | — |

* calculée sur la base de 1 résidu de galactose



2 - Etude de la nature glycoprotéinique du précipité Cetavlon

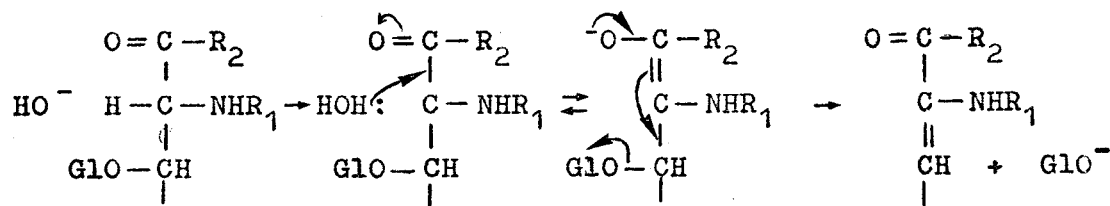
a - identification du point d'attache glycanne - protide :

La présence dans la fraction précipitante au Cetavlon d'une copule protéique (15%) nous a incité à rechercher si cette protéine était bien liée à la fraction glucidique dont nous venons de décrire la structure . Cette recherche est d'autant plus importante que jusqu'à ce jour les auteurs travaillant sur ces structures parlent de polysaccharides capsulaires et non de glycoprotéines capsulaires . Nous avons donc recherché la présence de liaisons O-glycosidique et N-glycosidique dans ce précipité Cetavlon .

α - matériels et méthodes :

★ recherche des liaisons O-glycosidiques :

Les glycannes liés O-glycosidiquement sur une chaîne protéique peuvent être séparés de cette dernière par un mécanisme de β élimination en milieu alcalin (NaOH 0,1N) qui transforme l'acide aminé du point d'attache (hydroxyamino-acide , sérine ou thréonine) en un déhydroamino-acide (déhydroalanine ou acide 2 amino-2-buténoïque) qui reste conjugué à la chaîne peptidique . Cette réaction s'accompagne d'une augmentation de l'absorbance de la solution à 240 nm . Le mécanisme de la β élimination est le suivant :



(GLO correspond à la partie glucidique)

Nous avons utilisé la technique de TANAKA et al. (127) : incubation de 1 mg de précipité Cetavlon dans 3 ml de NaOH 0,1 N . La cinétique de réaction est suivie par la lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 240 nm .

★ recherche des liaisons N-glycosidiques :

La présence dans le précipité Cetavlon de N-acétyl-glucosamine (0,76 %) nous a incité à rechercher le chaînon asparaginy-glucosamine qui constitue le point d'attache de nombreuses glycoprotéines .

Pour ce faire , nous avons utilisé :

1°) des techniques permettant d'approcher le point d'attache : -- hydrolyse protéinasique conduisant à l'obtention du glycopeptide

-- hydrolyse par l'acide fluorhydrique qui fournit la protéine sur laquelle reste fixé le monosaccharide constituant le point d'attache , toutes les liaisons O-glycosidiques étant rompues par ce réactif .

2°) des procédés chimiques de rupture de la liaison N-glycosidique : -- l'hydrazinolyse qui fournit le polysaccharide débarrassé de sa protéine (rupture des liaisons peptidiques et de la liaison asparaginy-glucosamine)

-- la rupture sodique en milieu réducteur qui fournit le polysaccharide avec le sucre du point d'attache réduit .

1°) Approche du point d'attache :

- hydrolyse protéinasique :

Nous avons effectué cette hydrolyse pronasique sur le précipité Cetavlon réduit par le carbodiimide . Une telle hydrolyse faite sur le précipité natif révèle un taux d'acides aminés encore trop élevé .

Il semblerait que la présence de résidus d'acides uroniques empêche l'enzyme d'agir . C'est pour cela que nous avons réalisé cette hydrolyse pronasique sur le précipité réduit par le carbodiimide .

La technique employée est celle de YAMASHINA et al. (128) . A une solution de 1 g de précipité réduit dans 100 ml d'acétate de calcium 0,01 M , on ajoute 20 mg de pronase (Calbiochem) . L'hydrolyse est effectuée à pH8 et à 40°C , sous agitation , pendant 48 heures en présence de toluène . Le pH est maintenu constant par l'addition de soude 0,1 N contrôlée par un titrateur automatique et la consommation de soude est régulièrement déterminée . L'hydrolysate est ensuite ajusté à pH 4,5 avec de l'acide acétique glacial , puis concentré à 20 ml environ et traité par 10 volumes d'éthanol absolu . Le mélange est maintenu pendant deux heures à la température du laboratoire , puis à +4°C pendant 18 heures . Le précipité qui s'est formé est recueilli par centrifugation, dissous dans 100 ml d'acétate de calcium 0,01 M et soumis à une nouvelle hydrolyse pronasique dans les conditions décrites ci-dessus . Ce protocole expérimental est répété deux fois .

Ce glycopeptide pronasique est ensuite analysé à l'autoanalyseur Beckman après une hydrolyse chlorhydrique (HCl 5,6N , 100°C , 24 heures) (voir technique page 55) .

— hydrolyse par l'acide fluorhydrique * :

MORT et LAMPORT (129) ont utilisé cette méthode de déglycosylation sur un simple polysaccharide (arabinogalactane) et sur des glycoprotéines possédant différents types de liaisons : liaison O-glycosidique (mucine submaxillaire de porc) , liaison N-glycosidique et liaison O-glycosidique (fœtus) .

Cette hydrolyse demande un appareillage spécial (voir schéma page 115) et l'utilisation de récipients Kel-F .

*Nous remercions M^r PERINI d'avoir si aimablement réalisé cette hydrolyse

Ce système clos renferme un cylindre d'acide fluorhydrique (A) , un réservoir (B) contenant du trifluorure de cobalt , une chambre à réaction (C) possédant la glycoprotéine dissoute dans l'anisol , deux trappes (D,E) avec de la potasse . Cet appareillage est relié à un manomètre à mercure (F) .

20 ml d'acide fluorhydrique sont introduits très lentement dans le réservoir (B) , refroidi grâce à l'azote liquide et contenant du trifluorure de cobalt (agent desséchant) . L'acide fluorhydrique est ensuite distillé dans la chambre à réaction (C) renfermant la glycoprotéine . La solution est laissée 3 heures sous agitation à 23°C . Quand la réaction est terminée , l'acide fluorhydrique est détruit en présence de potasse (disparition de fumée blanchâtre) . Nous recueillons ainsi une glycoprotéine déglycosylée . Cette dernière en solution dans l'anisol est extraite par 2 x 2 ml d'eau . Les deux phases inférieures non colorées sont rassemblées et chromatographiées immédiatement sur colonne de Sephadex G 50 (46 x 2,2 cm) , éluee par de l'eau à raison de 12 ml/heure . La fraction glycanique est repérée au phénol sulfurique (130) et la chaîne peptidique par absorbance à 280 nm.

2°) rupture de la liaison N-glycosidique :

— hydrazinolyse :

Nous avons employé la technique de BAYARD et al. (131) . La fraction précipitante native (50 mg) est traitée par de l'hydrazine (5 ml) pendant 30 heures à 100°C . L'hydrazinolysat est séché sous azote puis en exsiccateur en présence d'acide sulfurique . Séché et dissous dans 3 ml d'eau , le précipité hydrazinolysé est purifié sur colonne de Sephadex G 50 éluee par de l'eau à raison de 8 ml/heure . Un premier repérage est effectué au phénol sulfurique (132) (200 μ l de la solution , 200 μ l de phénol 5% , 1 ml d'acide sulfurique concentré)

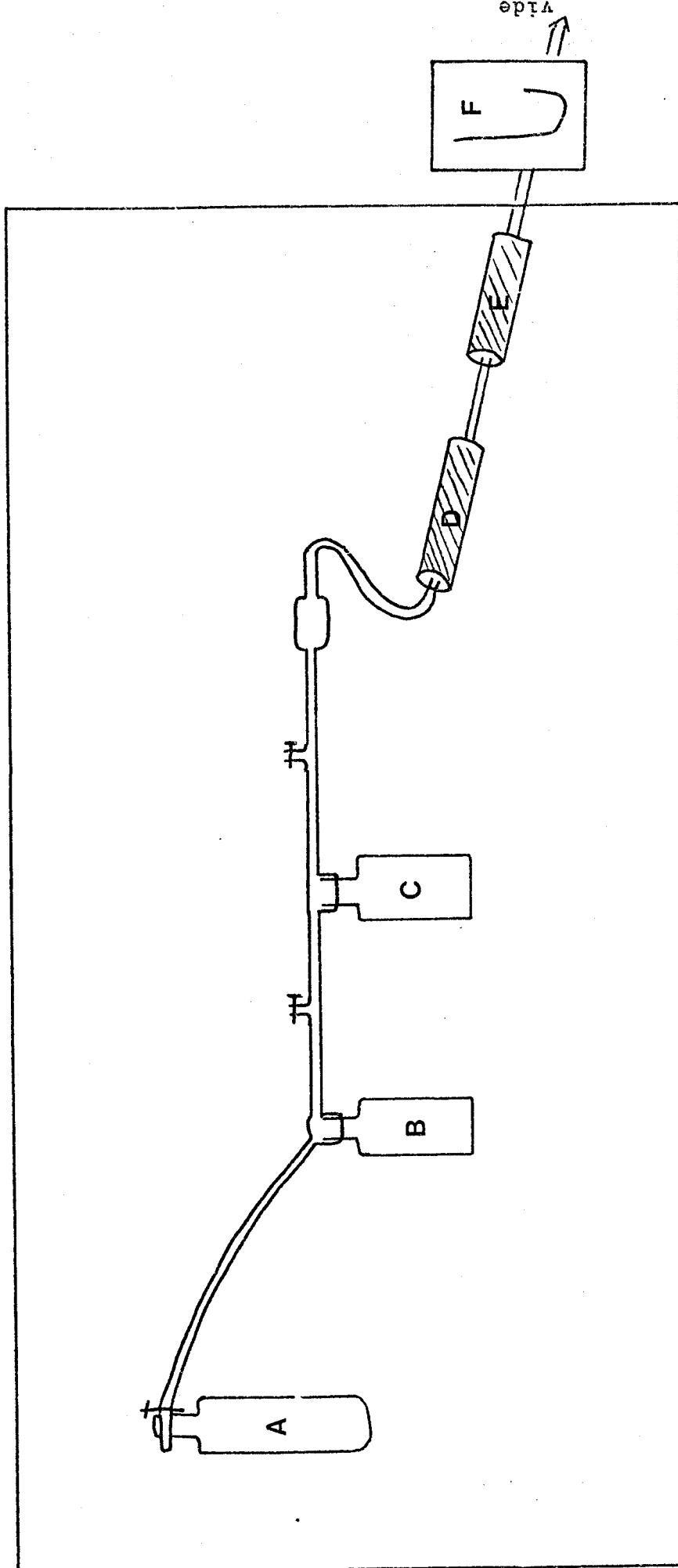


Figure 33

Schéma représentant l'appareillage spécial utilisé lors de l'hydrolyse fluorhydrique .



afin d'identifier la fraction glucidique désacétylée puis un second repérage à la ninhydrine identifiant les acides aminés sous forme d'hydrazides . La fraction glucidique désacétylée est N-réacétylée suivant la méthode de SPIRO (133) . Les oligosaccharides sont dissous dans une solution d'acétate de sodium 4,5 M à raison de 3 μ M/ml . L'anhydride acétique est ajouté 25 fois en excès par rapport aux fonctions amines et alcools libres , à température ambiante , en 5 aliquotes égales en une heure . La réaction est terminée en diluant l'échantillon avec 20 volumes d'eau et en chauffant 10 min. au bain marie à 100°C . La solution est chromatographiée sur colonne de Dowex 50 x 8 (4 fois en excès) afin d'éliminer le sodium . L'éluat et les eaux de rinçage sont concentrées puis chromatographiées sur colonne de Sephadex G 50 . La fraction glucidique N-réacétylée est analysée à l'autoanalyseur après une hydrolyse chlorhydrique (HCl 5,6N, 100°C , 24h. , en tube scellé et sous vide)(voir technique page 55) Nous recueillons ainsi la fraction précipitante dépourvue de sa chaîne protéique .

- rupture sodique en milieu réducteur :

La technique de MARSHALL et NEUBERGER (134) a été utilisée sur la fraction précipitante ayant subi une hydrolyse pronasique . Une solution de glycopeptide (3 mg dans 1 ml de NaOH 0,2M contenant BH_4K M) est chauffée dans un bain marie à 100°C pendant 10 heures en ajoutant à intervalles réguliers (toutes les heures) 200 μ l de la solution NaOH- BH_4K . La solution est refroidie puis hydrolysée par HCl 5,6N en présence d'un témoin interne (Norleucine 100 nM) 24h., 100°C . L'hydrolysate est ensuite séché dans un exsiccateur en présence de soude puis analysé à l'autoanalyseur afin de mettre en évidence la présence de glucosaminitol provenant de la glucosamine liée à l'asparagine .

β - résultats et discussion :

★ recherche des liaisons O-glycosidiques :

La cinétique de la réaction est suivie par lecture au spectrophotomètre à 240 nm. L'augmentation d'absorbance du milieu réactionnel à cette longueur d'onde est due à la formation de dehydroamino-acides formés au cours de la β élimination . Nous n'avons pu mettre en évidence de variation de densité optique lors de l'hydrolyse alcaline de la glycoprotéine précipitante . De ces expériences , nous pouvons conclure à l'absence de liaisons O-glycosidiques dans le précipité Cetavlon .

★ recherche des liaisons N-glycosidiques :

1°) Approche du point d'attache :

— hydrolyse protéinasique :

L'hydrolyse pronasique effectuée sur le précipité Cetavlon réduit par le carbodiimide présente encore 2% d'acides aminés dosés à l'autoanalyseur .Ce résultat n'a pu être obtenu que sur la glycoprotéine réduite , en effet , des essais réalisés sur la glycoprotéine native ont été négatifs , les résidus d'acide glucuronique empêchant l'enzyme de s'approcher de son substrat . C'est sur cette fraction pronasique que nous avons effectué l'hydrolyse de la liaison polysaccharide - protide en milieu alcalin et à chaud .

— hydrolyse par l'acide fluorhydrique :

L'hydrolyse par l'acide fluorhydrique libère les liaisons O-glycosidiques et protège les liaisons peptidiques ainsi que la liaison N-glycosidique de la glucosamine sur

l'asparagine . Appliquée à notre glycoprotéine , dans le cas d'une liaison di-N-acétylchitobiose , nous devrions obtenir une quantité d'osamine diminuée de moitié .

La chromatographie sur Sephadex G 50 de l'hydrolysât fluorhydrique fournit deux fractions . La première , éluee au volume d'exclusion de la colonne , renferme la fraction précipitante dépourvue de sa chaîne glucidique et la seconde représente l'ansol . La protéine ainsi recueillie (5 mg) absorbe faiblement à 280 nm. , et est totalement dépourvue en sucres (réaction négative au phénol sulfurique , recherche des sucres en chromatographie gazeuse après méthanolyse négative) . Le dosage de glucosamine réalisé à l'autoanalyseur nous fournit 0,8 résidu dans la molécule déglycosylée alors que la molécule native possède 3,4 résidus . Ce résultat n'est pas en faveur de la présence d'unité di-N-acétylchitobiose au point d'attache mais plutôt d'une unité constituée de 3 résidus de N-acétylglucosamine .

2°) rupture de la liaison N-glycosidique :

— hydrazinolyse :

L'hydrazine coupe les liaisons peptidiques d'une protéine en libérant les acides aminés sous forme d'hydrazides ainsi que la liaison asparaginyl-glucosamine .

La figure 34 p. 120 illustre le résultat obtenu sur la fraction précipitante hydrazinolysée . En comparant avec la fraction précipitante native , nous pouvons constater l'absence d'acides aminés , seule la glucosamine persiste . Ce résultat constitue une deuxième preuve à l'existence d'une liaison de type asparaginyl-glucosamine dans notre glycoprotéine précipitante .

— rupture sodique en milieu réducteur :

La soude en milieu réducteur et à chaud coupe la liaison asparaginy-glucosamine et réduit ainsi l'osamine du point d'attache en glucosaminitol. Appliquée à la fraction précipitante pronasique, nous avons effectivement identifié, après hydrolyse chlorhydrique, de la glucosamine ainsi que du glucosaminitol (voir figure 35 p. 121). Les résultats obtenus ne nous ont toutefois pas permis de calculer le nombre exact de résidus d'osamine restantes car il semble que la réaction ne soit pas quantitative. Cette expérience apporte une preuve supplémentaire à l'existence de liaison de type N-glycosidique dans la glycoprotéine précipitante au Cetavlon .

∞ - conclusion :

Le faible taux d'osamines dans notre glycoprotéine native ne nous a pas permis d'isoler à partir de l'hydrolysate pronasique, et par hydrolyse partielle le chaînon asparaginy-glucosamine. Toutefois, nous avons maintenant la preuve qu'il s'agit bien d'une glycoprotéine et non pas d'un polysaccharide. En effet,

1°) l'hydrolyse par l'acide fluorhydrique fournit une protéine déglycosylée possédant encore de la glucosamine.

2°) l'hydrazinolyse libère un polysaccharide contenant de la N-acétylglucosamine.

3°) l'hydrolyse alcaline en milieu réducteur et à chaud libère un polysaccharide possédant de la glucosamine et glucosaminitol.

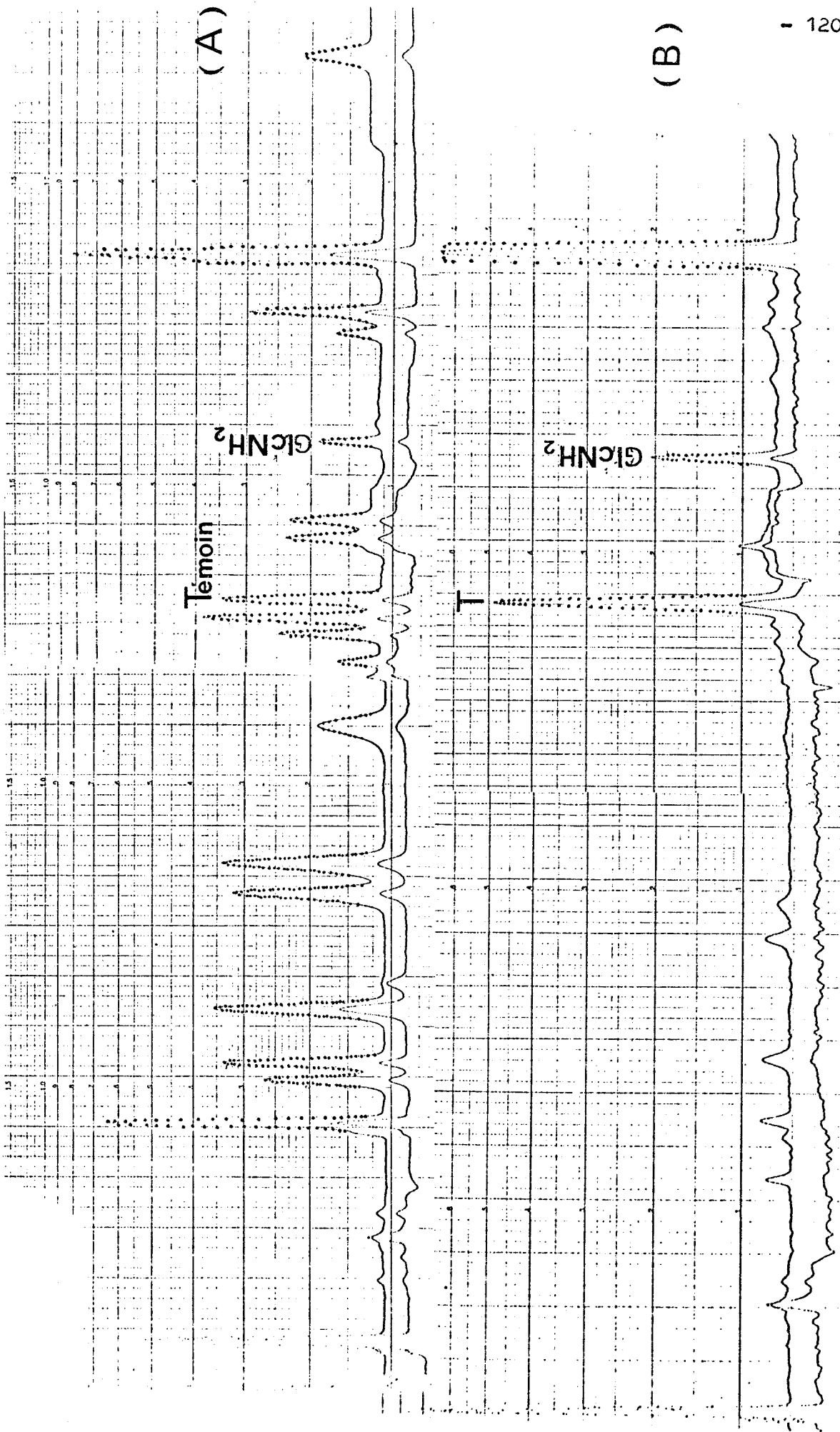


Figure 34

Analyse à l'autoanalyseur Beckman de la fraction précipitante native (A) et de la fraction précipitante hydrazinolyisée (B)



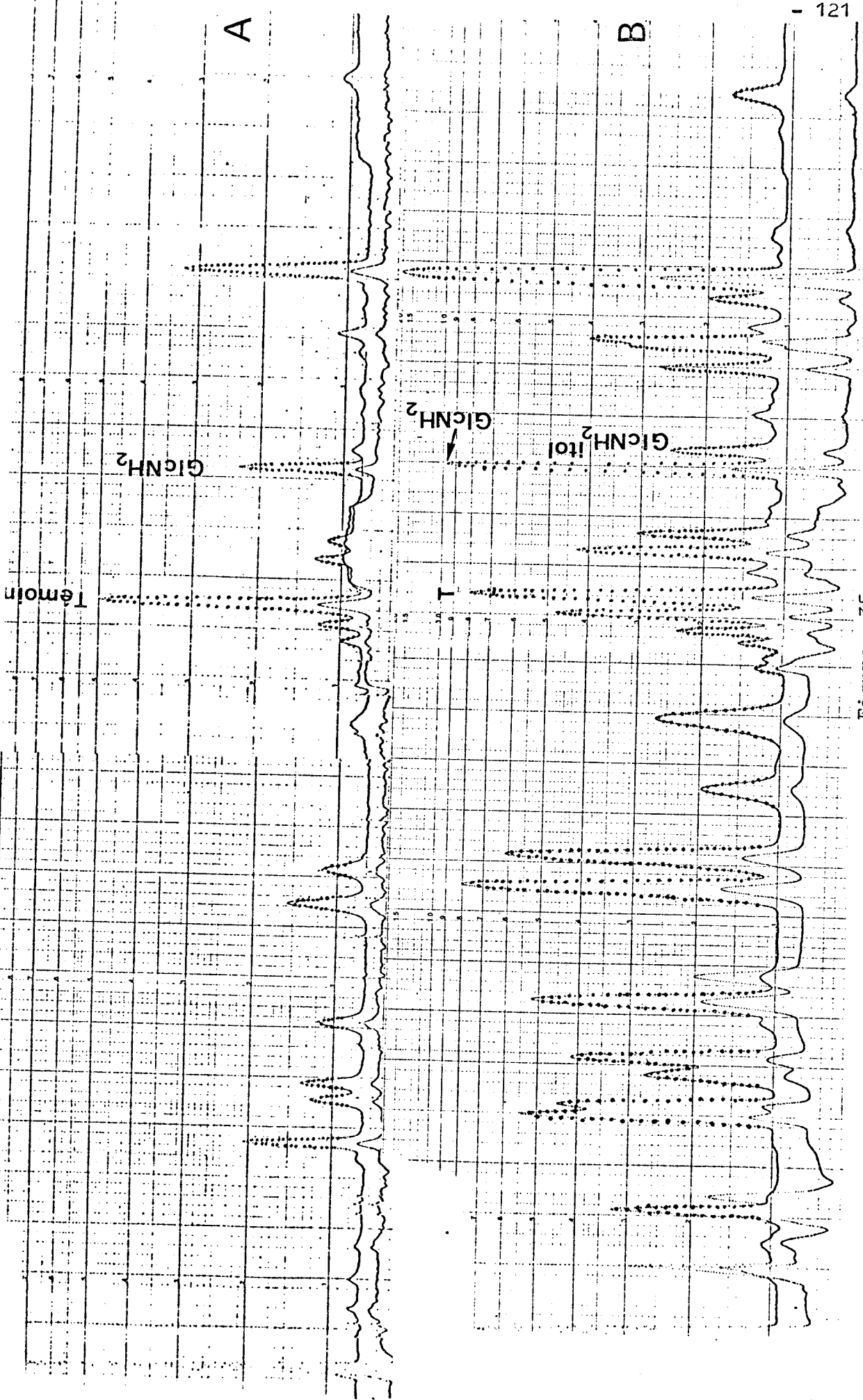


Figure 35

Analyse à l'autoanalyseur Beckman de la fraction précipitante pronasique (A) et de la fraction ayant subi une rupture sodique en milieu réducteur (B)



b - étude de la fraction protéique :

α - matériels et méthodes :

▲ dosage des acides aminés :

. à l'autoanalyseur : la méthode employée a été décrite plus haut (voir page 55) .

▲ dosage des protéines : selon la technique de LOWRY (135) (voir page 54) .

▲ identification de l'acide aminé N-terminal :

Nous avons utilisé la technique de dansylation de GROS et al. (136) modifiée par PERCY et al. (137) .

Une quantité de 5 nM de peptides est dissoute dans 500 µl d'urée 8M , la solution est tamponnée par 150 µl de bicarbonate de sodium 0,2M pH 9,2 , puis 200 µl de diméthylformamide et 5 mg de chlorure de dansyl dissous dans 100 µl d'acétonitrile sont ajoutés . La réaction se poursuit pendant 1 heure à 37°C . La protéine dansylée est ensuite précipitée par l' ATCA à 10% à 4°C , puis lavée par de l'acétone pour éliminer l'excès de chlorure de dansyl . Le précipité est enfin hydrolysé par de l'acide chlorhydrique 5,6 N pendant 8 à 18 heures à 105°C . L'hydrolysat est séché sous vide contre de la soude et chromatographié sur des plaques de micropolyamide suivant le procédé de WOODS et al. (138) . Les acides aminés dansylés sont extraits par de l'acétate d'éthyl saturé en eau , à l'exception de DNS Arg , α DNS Lys , ε DNS Lys , DNS Hist , qui sont repris dans un mélange acide acétique - acétone dans les rapports 3 : 2 .

▲ identification de l'acide aminé C-terminal :

L'acide aminé C-terminal a été identifié après hydrolyse par la carboxypeptidase B (from Hog Pancreas , SIGMA chemical company E.C. n° 3.4.2.2) .

100 nM de protéines sont dissoutes dans 1 ml de bicarbonate de potassium 0,1M . 50 nM de Norleucine sont ajoutés au mélange .

L'hydrolyse enzymatique est effectuée à 37°C par 3 µl d'une solution d'enzyme à 370 unités / ml pendant des temps différents : 3^H , 5 min. , 1 min. et étudiée à l'autoanalyseur .

β - résultats et discussion :

▲ dosage des acides aminés :

. à l'autoanalyseur : La fraction précipitante renferme 15% d'acides aminés (riche en acides aminés acides : acide aspartique , acide glutamique) . Elle est complètement dépourvue en cystéine .

▲ dosage des protéines :

. le dosage de LOWRY a révélé la présence de 19% de protéines .

▲ identification de l'acide aminé N-terminal :

La technique de dansylation a fourni comme acide aminé N-terminal : l'acide aspartique .

▲ identification de l'acide aminé C-terminal :

L'analyse à l'autoanalyseur révèle la présence de 3 acides aminés (lysine , arginine , tyrosine) . Une hydrolyse enzymatique de 1 min. à 37°C est suffisante pour libérer ces 3 acides aminés . Cette hydrolyse est récurrente , ce qui signifie

que ces acides aminés sont libérés successivement . Compte tenu de l'hydrolyse extrêmement rapide de la partie C-terminale de la protéine, nous n'avons pu préciser la nature exacte de l'acide aminé C-terminal. Sur la base des résultats de la composition en acides aminés (pas de résidus de cystéine) et de l'étude de la partie N-terminale de la protéine (un seul résidu d'acide aminé : l'acide aspartique) , nous pouvons penser que la chaîne protéique est monocaténaire .

3 - Structure de la fraction précipitante

Les résultats des rapports molaires en sucres du précipité P₁ du fractionnement au Cetavlon , corrigés après réduction des acides uroniques par le réactif au carbodiimide , ainsi que les résultats de la perméthylation du composé natif , réduit , ayant subi une dégradation uronique , de l'oxydation périodique et de l'oxydation chromique nous conduisent aux conclusions suivantes :

-- Le précipité Cetavlon , de masse moléculaire 95 500 est constitué de 120 unités de répétition renfermant 4 résidus monosaccharidiques (2 résidus de glucose , 1 résidu de mannose , 1 résidu d'acide glucuronique) . Ce chaînon répétitif dont nous donnons la structure détaillée dans la figure 36 p. 126 est en tout point identique à celui isolé du polysaccharide capsulaire de Klebsiella sérotype 2 déterminé par GAHAN et al. (139) .

-- Cette fraction précipitante est une glycoprotéine :

. présence de N-acétylglucosamine dans la fraction précipitante native et dans la fraction précipitante dégradée par l'acide fluorhydrique .

. présence de N-acétylglucosamine dans la fraction polysaccharidique détachée par hydrazinolyse .

. identification de glucosaminitol sur la fraction polysaccharidique détachée par rupture alcaline en milieu réducteur .

Le faible taux de N-acétylglucosamine ne nous a cependant pas permis d'isoler le chaînon asparaginy-glucosamine .

Nous ne savons pas actuellement si ces 120 unités tétrasaccharidiques se répartissent sur une ou plusieurs chaînes glucidiques , de même que nous ne pouvons indiquer le nombre de N-acétylglucosamine se situant au point d'attache polysaccharide - protéine , le nombre de résidus d'osamine étant compris entre 2 et 4 . Il est possible que la glycoprotéine renferme 2 chaînes polysaccharidiques attachées par deux résidus de di-N-acétylchitobiose . Cette hypothèse sera vérifiée en attaquant la glycoprotéine par des protéases et en essayant de séparer les glycopeptides ainsi obtenus .

VI - RELATION STRUCTURE - ACTIVITE

a - matériels et méthodes :

La recherche de l'activité anti-bactérienne (protocole expérimental décrit page 70) a été effectuée sur la glycoprotéine native et , afin de cerner une éventuelle structure minimum active , sur la glycoprotéine modifiée : -- glycoprotéine réduite au niveau des acides uroniques par le réactif au carbodiimide (voir page 80)

-- glycoprotéine dépourvue d'acide uronique (dégradation uronique : voir page 81)

-- polysaccharide obtenu par hydrazinolyse de la glycoprotéine native (voir page 114)

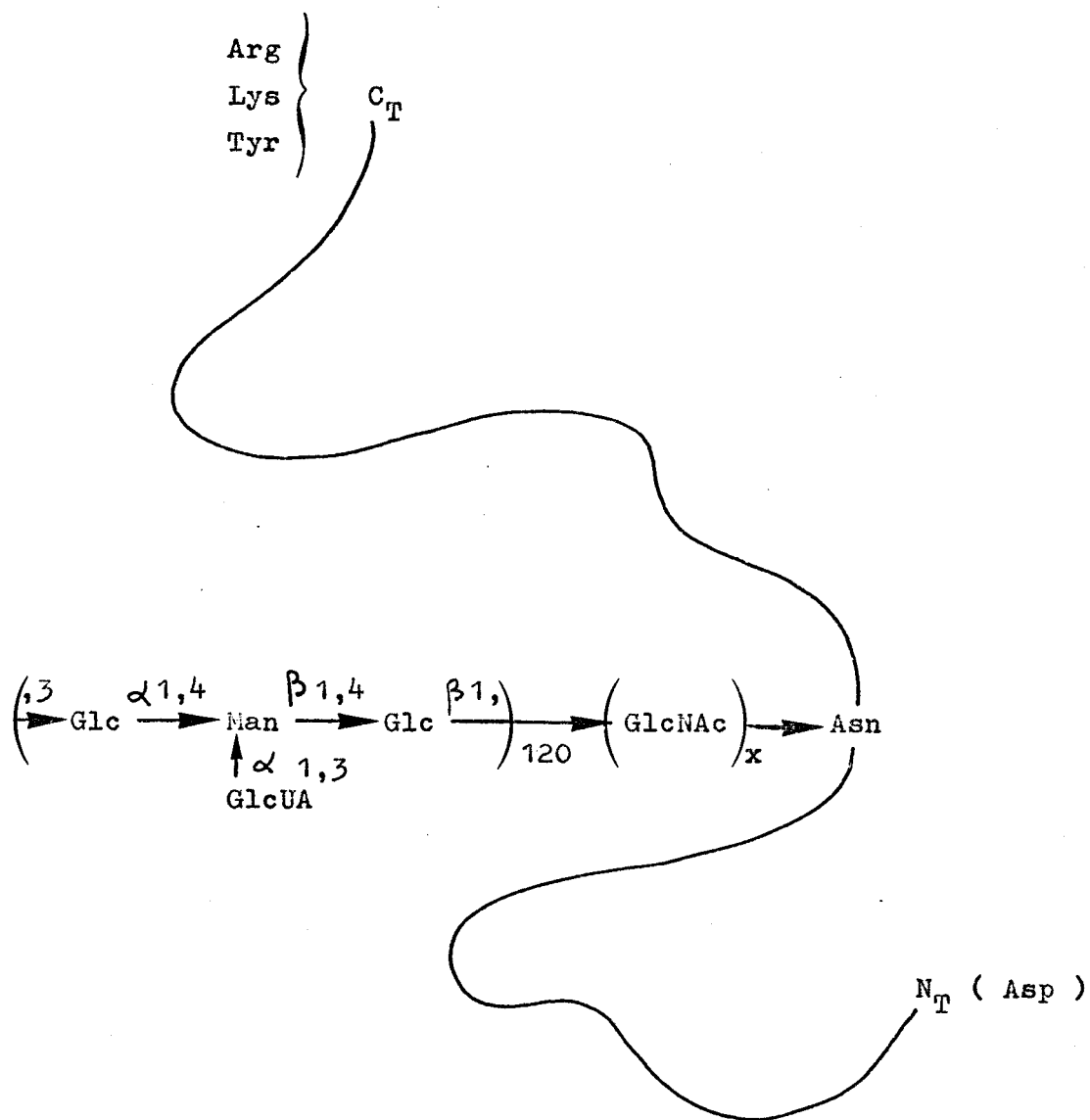


Figure 36

Structure de la fraction précipitante au Cetavlon .

b - résultats :

Nous avons rassemblé dans les tableaux et les figures suivants les résultats obtenus dans le test anti-bactérien in vivo chez la souris infectée par 250 000 germes (soit 5000 DL 50). Nous avons utilisé le Klebsiella pneumoniae sérotype 2 .

Dans le tableau XVIII p. 128 figurent les résultats obtenus pour l'ensemble des expériences effectuées sur les différents lots préparés (nombre total de souris mortes , survivantes et pourcentage de protection) . Ces résultats sont illustrés dans la figure 37 p. 129 par les cinétiques de mortalité des souris témoins ou traitées par des doses de 1 , 10 , 100 γ / Kg de principe actif brut , de la fraction glycoprotéinique précipitante au cetavlon (P) ou de la fraction surnageante (S) . Il apparaît un gain d'activité significatif (voir tableau XVIII) pour la fraction glycoprotéinique P par rapport au principe actif brut , pour toutes les doses étudiées. Par contre , la fraction surnageante présente peu d'activité , en particulier pour les doses inférieures ou égales à 10 γ / Kg .

Nous avons voulu si nous pouvions préparer une structure minimum active (figure 38 p. 129 bis) . Les tests anti-bactériens effectués sur la glycoprotéine modifiée au niveau des résidus d'acide uronique (réduction et élimination) sont négatifs , indiquant l'importance de ces résidus monosaccharidiques dans l'activité de la molécule . Le fait que ces acides uroniques soient conjugués à la chaîne oligosaccharidique par une liaison de type α explique la durée de protection des animaux aux germes . Le principe total ainsi que le précipité cetavlon sont encore actifs 6 jours après l'injection . En effet , in vivo , l'élimination des

P R O T E C T I O N D E S D I F F E R E N T E S F R A C T I O N S

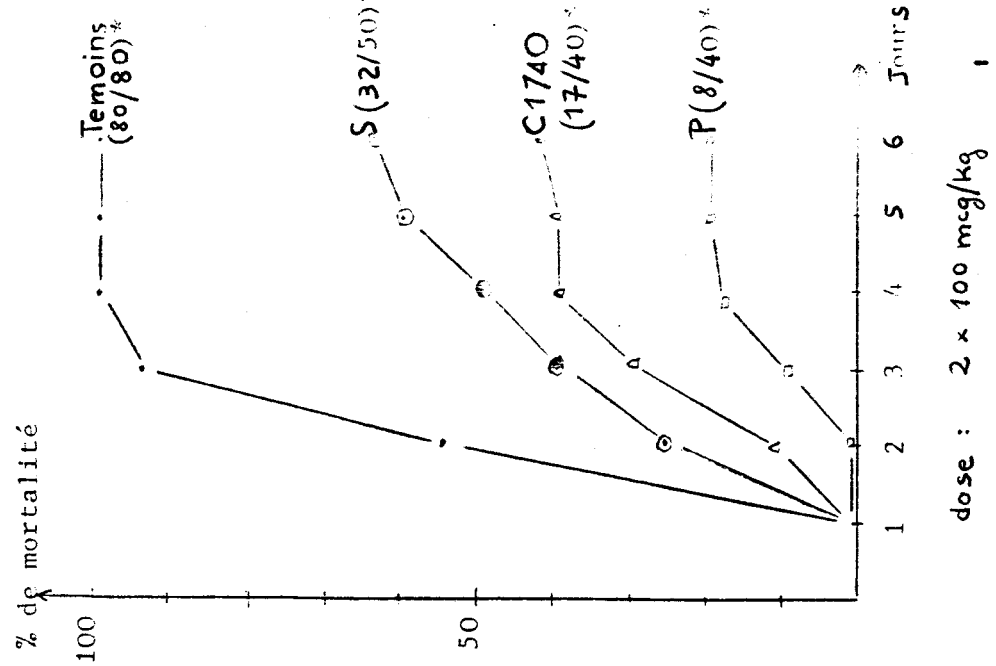
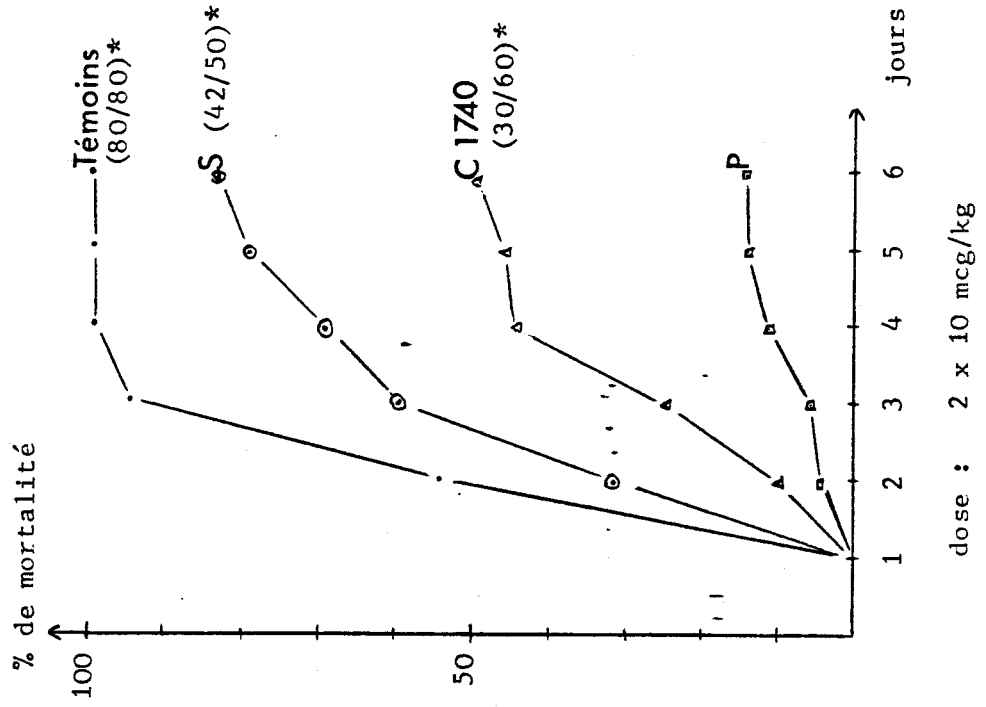
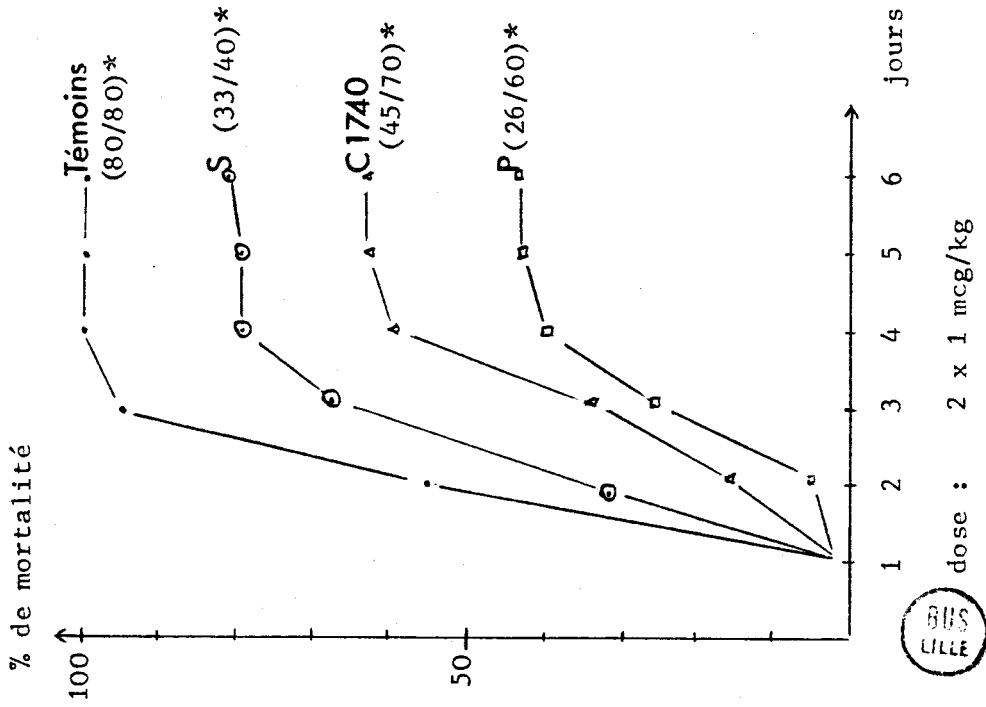
| Résultats | Souris non traitées | Souris traitées par le C 1740 | | | | Souris traitées par le surnageant | | | | Souris traitées par le précipité | | | |
|------------------------------|---------------------|-------------------------------|-----------|------------|--|-----------------------------------|-----------|------------|--|----------------------------------|-----------|------------|--|
| | | 1 mcg/kg | 10 mcg/kg | 100 mcg/kg | | 1 mcg/kg | 10 mcg/kg | 100 mcg/kg | | 1 mcg/kg | 10 mcg/kg | 100 mcg/kg | |
| Nombre de souris mortes | 80 | 45 | 30 | 17 | | 33 | 42 | 32 | | 26 | 7 | 8 | |
| Nombre de souris survivantes | 0 | 25 | 30 | 23 | | 7 | 8 | 18 | | 34 | 43 | 32 | |
| Total | 80 | 70 | 60 | 40 | | 40 | 50 | 50 | | 60 | 50 | 40 | |
| moyenne du % de protection | 0 | 36 (1) | 50 (1) | 58 (1) | | 18 (2) | 20 (2) | 36 (1) | | 56 (1) | 86 (1) | 80 (1) | |

(1) $p \leq 0,001$ comparaison avec les témoins (test du χ^2)

(2) $p \leq 0,002$ comparaison avec les témoins (calcul de probabilité exacte)



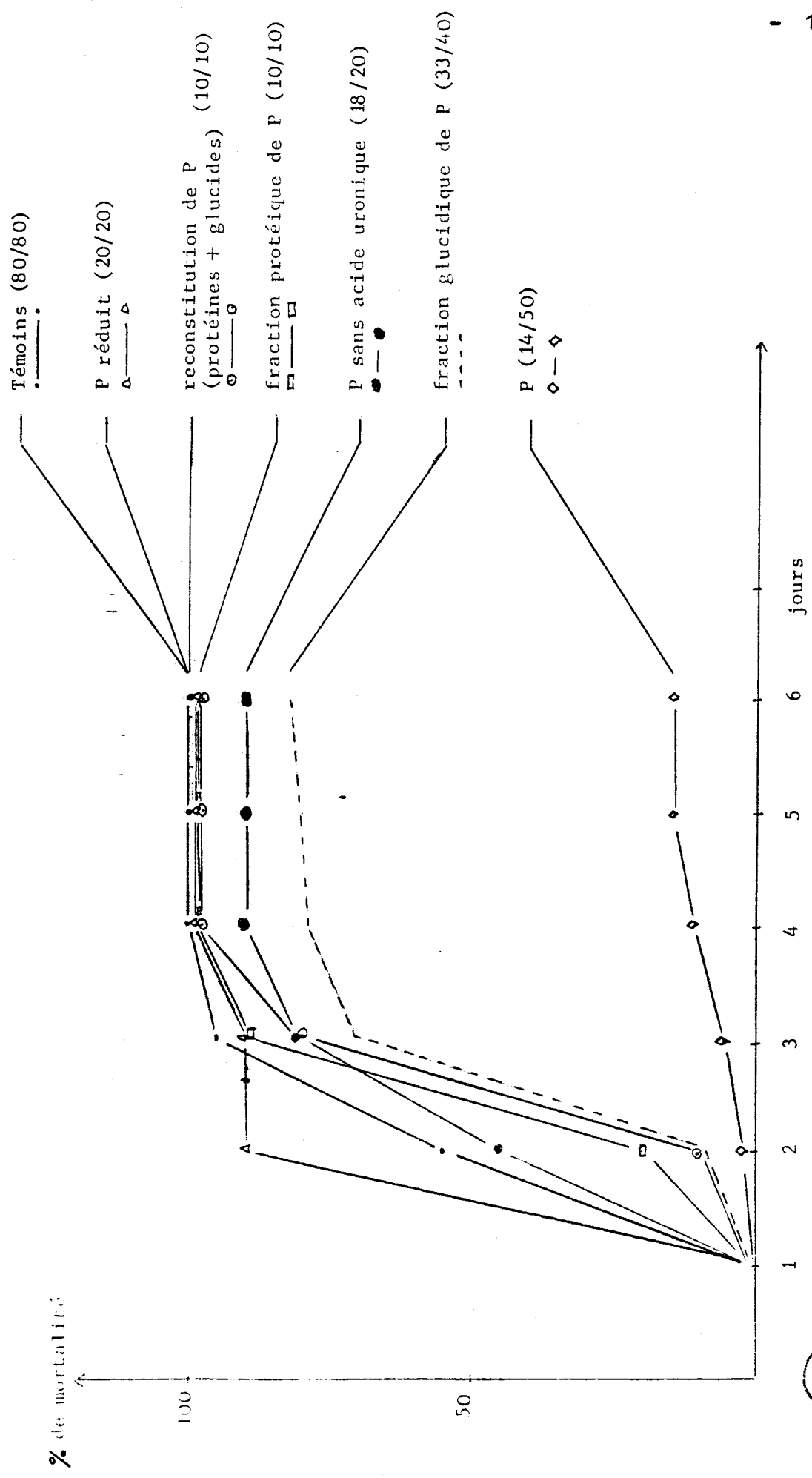
Courbe de mortalité des souris infectées par 250.000 germes (Klebsiella pneumoniae sérotype 2)



* nombre de souris mortes/nombre total de souris.
C 1740 : principe actif



Dose : 10 mg/kg



acides glucuroniques se fait principalement par une β
glucuronosidase .

Nous avons voulu savoir si la chaîne protéique est nécessaire à l'activité . L'hydrazinolyse permet de préparer une fraction glucidique débarrassée de protéine . Le polysaccharide ainsi obtenu s'est révélé inactif . Il en est de même pour la fraction protéique obtenue par hydrolyse fluorhydrique de la glycoprotéine .

Enfin , nous avons analysé la fraction glycoprotéinique reconstituée simplement en mélangeant , dans le rapport 85 / 15 , la fraction sucre et la fraction protéique . Nous avons montré qu'elle ne protège pas les souris ainsi traitées .

Il semble donc évident que l'intégrité de la glycoprotéine soit indispensable à l'expression de l'activité anti-bactérienne in vivo chez la souris infectée par le Klebsiella pneumoniae (sérotype 2) .

CONCLUSIONS GENERALES

--::--::--::--::--::--::--::--::--::--

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'étude du lysat bactérien doué de propriété anti-bactérienne de Klebsiella pneumoniae sont les suivantes :

1 - Nous avons dans un premier temps étudié la composition du principe actif dans son ensemble . Il est constitué de 26% de protéines (déterminé par la méthode de LOWRY) , 50% de monosaccharides neutres , 8,76% d'acide uronique et 1,23% de N-acétylglucosamine . Cette fraction est contaminée par des acides nucléiques (1,6%) . Elle est dépourvue de groupements pyruvyls . Elle est très hétérogène . Nous avons pu identifier trois constituants par ultracentrifugation .

2 - Après plusieurs tentatives de purification du lysat par des méthodes chromatographiques , nous avons mis à profit la

présence d'une concentration importante d'acide glucuronique (8,7%) pour essayer de précipiter sélectivement le polymère acide présent dans le principe actif à l'aide d'ions ammonium quaternaire tels que le " Cetavlon " (bromure de cétyle-triméthylammonium) . Cette technique nous a conduit à l'obtention de deux fractions ; une fraction surnageante et une fraction précipitante , homogène , douée de l'activité anti-bactérienne .

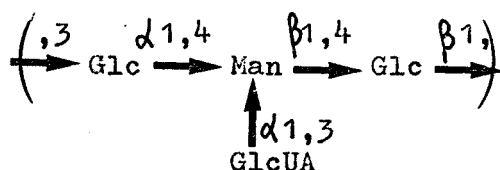
3 - Nous avons été amenés à faire une étude complète de cette fraction précipitante qui possède l'activité anti-bactérienne .

a - Elle est constituée de 19% de protéines (caractérisée par une richesse en acides glutamique et aspartique et par un manque total de cystéine) , 69% de monosaccharides neutres 18% d'acide glucuronique et 0,76% de N-acétylglucosamine . Cette fraction est homogène et possède une masse moléculaire déterminée par ultracentrifugation , de 95 500 .

b - Nous avons étudié en détail la structure chimique de cette fraction précipitante . Les rapports molaires en monosaccharides déterminés sur la base de 2 résidus de glucose sont de 0,43 résidu de mannose , 0,36 résidu de galactose . D'autre part, les analyses chromatographiques révèlent la présence d'un disaccharide ou acide aldobiouronique dont nous avons effectué la structure (GlcUA^{1,3}Man) . La présence dans les méthanolysats de ce composé indique la grande stabilité de la liaison glucuronosidyle et empêche de déterminer avec précision les rapports molaires en monosaccharides .

La réduction des acides uroniques en hexoses correspondants par la méthode au carbodiimide de TAYLOR et CONRAD lève cette difficulté et permet en même temps de déterminer sans ambiguïté la nature de l'acide uronique (acide glucuronique) . Les rapports molaires obtenus après réduction et déterminés sur la base de 2 résidus de glucose sont de 1 résidu de mannose , 0,23 résidu de galactose et 1 résidu de glucose provenant de l'acide glucuronique.

c - L'application des techniques d'étude de la structure des polysaccharides : perméthylation et spectrométrie de masse , dégradation uronique , oxydation periodique et chromique nous a permis d'identifier un tétrasaccharide de répétition :



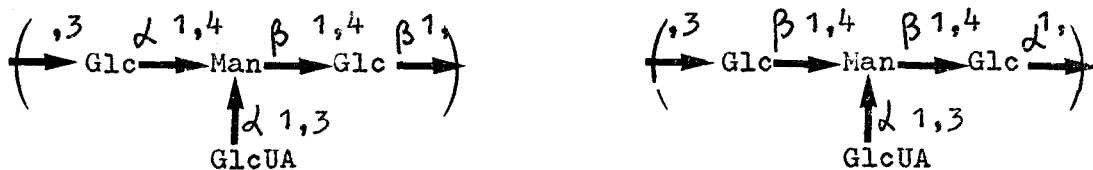
Compte tenu de la masse moléculaire , la copule polysaccharidique de la glycoprotéine posséderait 120 résidus de ce tétrasaccharide .

-- La perméthylation de la glycoprotéine native et réduite nous indique un branchement sur le résidu de mannose et la position externe de l'acide glucuronique (présence de perméthylglucose sur le polysaccharide réduit et perméthylé) .

-- La dégradation uronique confirme les résultats de la réduction par le carbodiimide (position externe de l'acide glucuronique) et permet de définir la liaison 1→3 de l'acide uronique sur le résidu de mannose .

-- L'oxydation periodique fournit l'enchaînement des monosaccharides neutres par l'identification en GC-MS de l'oligosaccharide $\text{Glc} \rightarrow \text{Man} \rightarrow \text{Erythritol}$. Cependant , nous n'avons pu expliquer la présence dans les produits de l'oxydation periodique de l'oligosaccharide $\text{Glc} \rightarrow \text{Man} \rightarrow \text{dideoxyhexose}$. Nous recherchons actuellement la présence , dans la molécule native , d'un dideoxysucre pouvant donner ce composé lors de l'oxydation periodique .

-- La transformation des β glycosides par l'oxyde de chrome permet de donner les anomeries de liaisons du tétrasaccharide de répétition sans toutefois lever l'ambiguité entre ces deux structures :



Une étude par résonance magnétique nucléaire devrait nous permettre de lever cette ambiguité .

d - Nous avons démontré que ce précipité Cetavlon est de nature glycoprotéinique :

-- L'action de l'acide fluorhydrique sur le précipité Cetavlon fournit la fraction protéique possédant encore des résidus de N-acétylglucosamine .

-- L'hydrazinolyse libère un polysaccharide contenant de la N-acétylglucosamine .

-- L'hydrolyse alcaline en milieu réducteur et à chaud des glycopeptides pronasiques conduit à l'identification de glucosamine et de glucosaminitol provenant de l'osamine du point d'attache .

Compte tenu de ces résultats et de l'absence de liaison O-glycosidique , nous pouvons dire que le polysaccharide est attaché sur la protéine par une liaison faisant intervenir la N-acétylglucosamine. Malheureusement , nous ne connaissons pas actuellement le nombre de résidus d'osamines au voisinage du point d'attache .

e - Nos préparations Cetavlon ont toujours contenu quelques résidus de galactose . Ce monosaccharide fait partie de la fraction surnageante qui souille notre glycoprotéine précipitante .

4 - La glycoprotéine précipitante native , réduite , dégradée (élimination de l'acide uronique) et le polysaccharide obtenu par hydrazinolyse ont été étudiés afin de connaître leur activité anti-bactérienne . Seule la glycoprotéine native est douée de cette activité ce qui signifie que la chaîne protéique ainsi que les résidus d'acide uronique sont indispensables à l'expression de l'activité anti-bactérienne .

5 - Nous ne pouvons conclure actuellement quant à l'origine de la glycoprotéine . Des auteurs (GAHAN et al. (140)) ont isolé de la capsule du même Klebsiella (sérotype 2) un polysaccharide de structure identique à la partie glucidique de la glycoprotéine précipitante . Ce polysaccharide capsulaire est constitué de 10 unités de répétition du tétrasaccharide .

Il est possible que la glycoprotéine précipitante soit le précurseur du polysaccharide antigène capsulaire qui est libéré dans le mucus entourant la capsule .

6 - L'activité anti-bactérienne de la fraction précipitante vis à vis de Kp serait due en grande partie à l'action d'anticorps spécifiques . En effet , GEYER et al. (141) dans un article récent ont montré que le tétrasaccharide , le octo et dodecasaccharide isolés de la même bactérie (Klebsiella sérotype 2) après hydrolyse à l'aide d'une glycanase , couplée à une protéine (edestine) étaient capables d'induire la formation d'anticorps chez le lapin . De même ZALISZ (communication personnelle) a pu mettre en évidence , 8 jours après l'injection à l'animal de 100 µg de la fraction précipitante , la présence d'arc de précipitation dans un test ouchterlony . Il semble donc que l'animal avant de recevoir la dose létale de germe Kp (6 jours après l'injection de la glycoprotéine précipitante) ait eu le temps de synthétiser des anticorps spécifiques . Des études sont réalisées actuellement pour déterminer le taux de protection du principe actif vis à vis d'autres germes . Les premiers résultats effectués sur le pneumocoque , indique que pour obtenir la même protection que celle obtenue contre le Kp il est nécessaire d'injecter une dose 10 000 fois supérieure de glycoprotéine précipitante .

BIBLIOGRAPHIE

--:--:--:--:--:--:--

- Ref. - (page)
- 1 - PATE J.L. et ORDAL J.E. , Journal of cell biology ,
1967 , 35 , 37 - 44 (12)
 - 2 - SALTON M.R.J. et HORNE R.W. , Biochim. Biophys. Acta ,
1951 , 7 , 177 (15)
 - 3 - FLECK J. , MOCK M. , MINCK R. , GHUYSEN J.M. , Biochim. Biophys.
Acta , 1971 , 233 , 489 - 503 (15)
 - 4 - DE PETRIS S. , J. Ultrastruct. Res. , 1967 , 19 , 45 - 83 (16)
 - 5 - DE PETRIS S. , J. Ultrastruct. Res. , 1965 , 12 , 247 (16)
 - 6 - DE PETRIS S . , J. Ultrastruct. Res. , 1965 , 12 , 247 (16)
 - 7 - WEIDEL W. , FRANK H. , MARTIN H.H. , J. Gen. Microbiol. ,
1960 , 22 , 158 (17)
 - 8 - WEIDEL W. , PELZER H. , Advan. , Enzymol. , 1964 , 26 , 193 (17)
 - 9 - FLECK J. , MOCK M. , MINCK R. , GHUYSEN J.M. , Biochim. Biophys.
Acta , 1971 , 233 , 489 - 503 (17)
 - 10 - STRANGE R.E. , POWELL J.F. , Biochem. J. , 1954 , 58 , 80 (17)

- 11 - STRANGE R.E. , KENT L.H. , Biochem. J. , 1959 , 71 , 333 (17)
- 12 - WORK E. , Biochim. Biophys. Acta , 1949 , 3 , 400 (17)
- 13 - WORK E. , Biochem.J. , 1951 , 45 , 17 (17)
- 14 - SNELL E.E. , RADIN N.J. , IKAWA M. , J. Biol. Chem. ,
1955 , 217 , 803 (17)
- 15 - IKAWA M. , SNELL E.E. , Biochim. Biophys. Acta ,
1956 , 19 , 576 (17)
- 16 , 17 - GHUYSEN J.M. , STROMINGER J.L. , TIPPER D.J. , Comprehen.
Biochem. , 1968 , 26 A , 53 - 99 (26)
- 18 - BOIVIN A. , MESROBEANU L. , Rev. Immunol. , 1935 , 1 , 553 (26)
- 19 - MORGAN W.T.J. , Biochem. J. , 1937 , 31 , 2003 (26)
- 20 - GOEBEL W.F. , BINKLEY F. , PERLMAN E. , J. Exptl. Med. ,
1945 , 81 , 315 (26)
- 21 - WESTPHAL O. , LÜDERITZ O. , Angew. Chem. ,1954 , 66 , 407 (26)
- 22 - LUDERITZ O. , JANN K. , WHEAT R. , Comprehen. Biochem. ,
1968 , 26 A , 105 - 212 (27)
- 23 - LÜDERITZ O. , WESTPHAL O. , STAUB A.M. , NIKAIDO H. , in micro-
-bial Toxins , 1971 , 4 , 145 - 233 , Academic
Press , New york . (27)
- 24 - WESTPHAL O. , LUDERITZ O. , Angew. Chem. , 1954 , 66 , 407 (28)

- 25 - JANSSON P.E. , LINDBERG B. , LINDBERG A.A. , WOLLIN R. ,
Carbohydr. Res. , 1979 , 68 , 385 - 389 (29)
- 26 - WILKINSON S.G. , 1977 , Surface Carbohydrates of the
Prokaryotic Cell , edited by I.W. SUTHERLAND ,
Academic Press , 97 - 175 (29)
- 27 - JOOS A. , Zentbl. Bakt. Parasitkde , Abt I Orig. 1903 ,
33 , 762 (34)
- 28 - SMITH T. , REAGH A.L. , 1903 , J. Med. Res. , 10 , 89-101
(34)
- 29 - GARD S. , Z. Hyg. Infekt. Krankh. , 1937 , 120 , 59 - 65
(34)
- 30 - GARD S. , ERIKSON E.J. , Z. Hyg. Infekt. Krankh. , 1939 ,
122 , 54 - 61 (34)
- 31 - JANN , MUNDER , résultats non publiés (37)
- 32 - BURROWS T.W. , BACON G.A. , Brit. J. Exptl. Pathol. ,
1956 , 37 , 481 (37)
- 33 - KAUFFMANN F. , The bacteriology of Enterobacteriaceae ,
Munksgaard , Copenhagen , 1966 (37)
- 34 - LÜDERITZ O. , JANN K. , WHEAT R. , Comprehen. Biochem. ,
1968 , 26 A , 105 - 228 (37)

- 35 - KAUFFMANN F. , The bacteriology of Enterobacteriaceae ,
Munksgaard , Copenhagen , 1966 (37)
- 36 - NIMMICH W. , Z. Med. Mikrobiol. Immunol. , 1968 ,
154 , 117 - 131 (38)
- 37 , 38 - HEIDELBERGER M. , NIMMICH W. , Immunochemistry ,
1976 , 13 , 1 , 67 - 80 (38)
- 39 - LAPEYRE M. , Thèse de troisième cycle , 1977 (39)
- 40 - HEIDELBERGER M. , NIMMICH W. , Immunochemistry ,
1976 , 13 , 1 , 67 - 80 (40)
- 41 - ERBING C. , KENNE L. , LINDBERG B. , LÖNNGREN J. ,
SUTHERLAND I.W. , Carbohydr. Res. , 1976 , 50 , 115 - 120 ,
(41)
- 42 - GAHAN L.C. , SANDFORD P.A. , CONRAD H.E. , Biochemistry,
1967 , 6 , 9 , 2755 - 2766 (41)
- 43 - DUTTON G.G.S. , YANG M.T. , Can. J. Chem. , 1973 , 51 ,
1826 - 1832 (41)
- 44 - ELSASSER - BEILE U. , FRIEBOLIN H. , STIRM S. , Carbohydr. Res.
1978 , 65 , 245 - 249 (41)
- 45 - DUTTON G.G.S. , STEPHEN A.M. , CHURMS S.C. , Carbohydr. Res. ,
1974 , 38 , 225 - 237 (41)

- 46 - SUTHERLAND I.W., *Biochemistry*, 1970 , 9 , 10 , 2180 - 2185
(41)
- 47 - LINDBERG B. , LÖNNGREN J. , THOMPSON J.L. , NIMMICH W. ,
Carbohyd. Res. , 1972 , 25 , 49 - 57 (41)
- 48 - THUROW H. , CHOY Y.M. , FRANK N. , NIEMANN H. , STIRM S. ,
Carbohyd. Res. , 1975 , 41 , 241 - 255 (41)
- 49 - NIEMANN H. , FRANK N. , STIRM S. , *Carbohyd. Res.* , 1977 ,
59 , 165 - 177 (41)
- 50 - LINDBERG B. , LÖNNGREN J. , POWELL D.A. , *Carbohyd. Res.* ,
1977 , 58 , 177 - 186 (41)
- 51 - DUTTON G.G.S. , MACKIE K.L. , YANG M.T. , *Carbohyd. Res.* ,
1978 , 65 , 251 - 263 (41)
- 52 - CHOY Y.M. , DUTTON G.G.S. , *Can.J.Chem.* , 1973 , 51 ,
3015 - 3020 (42)
- 53 - CHOY Y.M. , DUTTON G.G.S. , *Can.J.Chem.* , 1973 , 51 ,
198 - 207 (42)
- 54 - DUTTON G.G.S. , MACKIE K.L. , SAVAGE A.V. , STEPHENSON M.D. ,
Carbohyd. Res. , 1978 , 66 , 125 - 131 (42)
- 55 - CHOY Y.M. , DUTTON G.G.S. , ZANLUNGO A.M. , *Can.J.Chem.* ,
1973 , 51 , 1819 -1825 (42)

- 56 - CURVALL M. , LINDBERG B. , LÖNNGREN J. , NIMMICH W. ,
Carbohyd. Res. , 1975 , 42 , 95 - 105 (42)
- 57 - BEBAULT G.M. , DUTTON G.G.S. , FUNNELL N. , MACKIE K.L. ,
Carbohyd. Res. , 1978 , 63 , 183 - 192
(42)
- 58 - LINDBERG B. , LINDH F. , LÖNNGREN J. , NIMMICH W. ,
Carbohyd.Res. , 1979 , 70 , 135 - 144 (42)
- 59 - DUTTON G.G.S. , MACKIE K.L. , Carbohyd. Res. , 1977 , 55 ,
49 - 63 (42)
- 60 - HEIDELBERGER M. , NIMMICH W. , Immunochemistry , 1976 ,
13 , 67 - 80 (42)
- 61 - LINDBERG B. , SAMUELSON K. , NIMMICH W. , Carbohyd. Res. ,
1973 , 30 , 63 - 70 (42)
- 62 - JOSELEAU J.P. , LAPEYRE M. , VIGNON M. , DUTTON G.G.S. ,
Carbohyd. Res. , 1978 , 67 , 197 - 212 (42)
- 63 - BJÖRNDAL H. , LINDBERG B. , LÖNNGREN J. , ROSELL K.G. ,
NIMMICH W. , Carbohyd. Res. , 1973 , 27 , 373 - 378
(43)
- 64 - BJÖRNDAL M. , LINDBERG B. , LÖNNGREN J. , MIOMIR M. ,
NIMMICH W. , Carbohyd. Res. , 1973 , 31 , 93 - 100
(43)

- 65 - TAYLOR R.L. , CONRAD H.E., *Biochemistry*, 1972 , 11 , 1383
(43)
- 66 - BEBAULT G.M. , DUTTON G.G.S. , *Carbohydr. Res.* , 1978 ,
64 , 199 - 213 (43)
- 67 - CHOY Y.M. , DUTTON G.G.S. , *Can.J.Chem.* , 1973 , 51 ,
3021 - 3026 (43)
- 68 - KAMERLING J.P. , LINDBERG B. , LÖNNGREN J. , NIMMICH W. ,
Acta Chem. Scand. , 1975 , 29 , 593 - 598
(43)
- 69 - LINDBERG B. , LÖNNGREN J. , RUDEN U. , NIMMICH W. ,
Carbohydr. Res. , 1975 , 42 , 83 - 93 (43)
- 70 - RAO A.S. , ROY N. , *Carbohydr. Res.* , 1978 , 67 , 2 , 449
(43)
- 71 - DUTTON G.G.S. , YANG M.T. , *Carbohydr. Res.* , 1977 , 59 ,
1 , 179 - 192 (43)
- 72 - DUTTON G.G.S. , MACKIE K.L. , *Carbohydr. Res.* , 1978 ,
62 , 321 - 325 (43)
- 73 - CHOY Y.M. , DUTTON G.G.S. , *Can.J.Chem.* , 1974 , 52 ,
684 - 687 (43)
- 74 - CURVALL M. , LINDBERG B. , LÖNNGREN J. , NIMMICH W. ,
Carbohydr. Res. , 1975 , 42 , 73 - 82 (44)

- 75 - LINDBERG B. , NIMMICH W. , Carbohydr. Res. , 1976 , 48 ,
81 - 84 (44)
- 76 - LAPEYRE M. , Thèse de troisième cycle , 1977 , (45)
- 77 - JANN K. , JANN B. , Surface Carbohydrates of the Prokaryotic
Cell , edited by Sutherland I.W. , Academic Press
1977 , (48)
- 78 - LÜDERITZ O. , STAUB A.M. , WESTPHAL O. , Bacteriological
Reviews , 1966 , 30 , 192 - 255 (48)
- 79 - JANN K. , WESTPHAL O. , " The Antigens " edited by SELA M. ,
Academic Press , 1975 , III , 1 - 125 (49)
- 80 - JANN B. , JANN K. , SCHIMDT G. , ORSKOV I. , ORSKOV F. ,
Eur. J. Biochem. , 1970 , 15 , 29 - 39 (49)
- 81 - ROBBINS P.W. , UCHIDA T. , Biochemistry , 1962 , 1 , 323 - 335
(50)
- 82 - HELLERQVIST C.G. , LINDBERG B. , LINDBERG J. , LINBERG A.A. ,
Acta Chem. Scand. , 1971 , 25 , 939 - 944 (50)
- 83 - JANN K. , WESTPHAL O. , " The Antigens " edited by SELA M. ,
Academic Press , 1975 , III , 1 - 125 (51)
- 84 - LOWRY O.H. , ROSEBROUGH N.J. , FARR A.L. , RANDALL R.J. ,
J. Biol. Chem. , 1951 , 193 , 265 - 273 (54)

- 85 - SPACKMAN D.H. , STEIN W.A. , MOORE S. , Anal. Chem. , 1958 ,
30 , 1190 (55)
- 86 - CHARET P. , TETAERT D. , HAN K.K. , MONTREUIL J. ,
C. R. Acad. Sci. , 1973 , 276 , 1629 (55)
- 87 - LOWRY O.H. , ROSEBROUGH N.J. , FARR A.L. , RANDALL R.J. ,
J. Biol. Chem. , 1951 , 193 , 265 - 273 (55)
- 88 - ELSON L.A. , MORGAN W.T.J. , Biochem. J. , 1933 , 27 , 1824
(55)
- 89 - TILLMANS J. , PHILIPPI K. , Biochem. Z. , 1929 , 215 , 36
(55)
- 90 - RIMINGTON C. , Biochem. J. , 1931 , 25 , 1062 (55)
- 91 - DISCHE Z. , J. Biol. Chem. , 1947 , 167 , 189 (57)
- 92 - NIAZI S. , STATE D. , Cancer Research , 1948 , 8 , 653 (57)
- 93 - WERNER I. , ODIN L. , Acta. Soc. Med. Upsaliensis , 1952 ,
57 , 230 (57)
- 94 - ELSON L.A. , MORGAN W.T.J. , Biochem. J. , 1933 , 27 , 1824
(57)
- 95 - ZANETTA J.P. , BRECKENBRIDGE W.C. , VINCENDON G. ,
J. Chromato. , 1972 , 69 , 291 (58)

- 96 - SEAMAN J.S. , MOORE W.E. , MITCHELL R.L. , MILLER M.A. ,
Tappi , 1954 , 37 , 336 (58)
- 97 - DUBOIS M. , GILLES K.A. , HAMILTON J.K. , REBERS P.A. ,
SMITH F. , Nature , 1951 , 168 , 167
Anal. Chem. , 1956 , 28 , 350 (58)
- 98 , 99 - DISCHE Z. , J. Biol. Chem. , 1947 , 167 , 189 (58,59)
- 100 - TILLMANS J. , PHILIPPI K. , Biochem. Z. , 1929 , 215 , 36
(59)
- 101 - MONTREUIL J. , SPIK G. , Microdosage des glucides : méthodes
colorimétriques de dosage des glucides totaux ,
1963 , 1 , 31 et 67 (59)
- 102 - TERHO T.T. , HARTIALA K. , Anal. Biochem. , 1971 , 41 ,
471 - 476 (62)
- 103 - SVEDBERG T. , PEDERSON K.O. , die " ultrazentrifuge " ,
STEINKOPFF , the Dresden and Leipzig , 1940 , (64)
- 104 - YPHANTIS D.A. , Biochemistry , 1964 , 3 , 297 (64)
- 105 - CHERVENKA C.H. , Anal. Biochem. , 1970 , 34 , 24 - 29 (64)
- 106 - HIRS C.H.W. , J. Biol. Chem. , 1956 , 219 , 611 (64)

- 107 - LEW J.Y. , HEIDELBERGER M. , Carbohydr. Res. , 1976 ,
52 , 255 - 258 (65)
- 108 - HAKOMORI S.I. , J. Biochem. , (TOKYO) , 1964 , 55 ,
, 205 (65)
- 109 } - SCOTT J.E. , Methods in Carbohydr. Chem. , 1965 , V , 38
110 } - (71)
- 111 - YPHANTIS D.A., Biochemistry, 1964 , 3 , 297 (74)
- 112 - CHEVENKA C.H. , Anal. Biochem. , 1970 , 34 , 24 - 29
(74)
- 113 - HAKOMORI S.I. , J. Biochem. , (TOKYO) 1964 , 55 , 205
(78)
- 114 - SANDFORD P.A. , CONRAD H.E., Biochemistry, 1966 , 5 , 1508
(78)
- 115 - DUBOIS M. , GILLES K.A. , HAMILTON J.K. ; REBERS P.A. ,
SMITH F. , Nature , 1951 , 168 , 167
Anal. Chem. , 1956 , 28 , 350 (79)
- 116 - TAYLOR R.L. , CONRAD H.E., Biochemistry, 1972 , 11 , 1383
(80)
- 117 - LINDBERG B. , LINDH F. , LÖNNGREN J. , Carbohydr. Res. ,
1978 , 60 , 81 - 87 (80)

- 118 - CURVALL M. , LINDBERG B. , LÖNNGREN J. , NIMMICH W. ,
Carbohydr. Res. , 1975 , 42 , 95 - 105 (81)
- 119 - HAKOMORI S.I. , J. Biochem. , (TOKYO) , 1964 , 55 , 205
(82)
- 120 - SANDFORD P.A. , CONRAD H.E., Biochemistry, 1966 , 5 , 1508
(82)
- 121 - GOLDSTEIN I.J. , HAY G.W. , LEWIS B.A. , SMITH F. ,
Methods Carbohydr. Chem. , 1965 , 5 , 361-370 (82)
- 122 - HAKOMORI S.I. , J. Biochem. , (TOKYO) , 1964 , 55 , 205
(82)
- 123 - HOFFMAN J. , LINDBERG B. , SVENSSON S. , Acta. Chem. Scand.
1972 , 26 , 661 - 666 (83)
- 124 - TAYLOR R.L. , CONRAD H.E., Biochemistry, 1972 , 11 , 1383
(84)
- 125 - CURVALL M. , LINDBERG B. , LÖNNGREN J. , NIMMICH W. ,
Carbohydr. Res. , 1975 , 42 , 95 - 105 (85)
- 126 - HOFFMAN J. , LINDBERG B. , SVENSSON S. , Acta. Chem. Scand.
1972 , 26 , 661 - 666 (87)
- 127 - TANAKA K. , BERTOLINI M. , PIGMAN W. , Biochem. Biophys.
Res. Comm. , 1964 , 16 , 404 (112)

- 128 - YAMASHINA I. , MAKINO M. , J. Biochem. , 1962 , 51 , 359
(2113)
- 129 - MORT A.J. , LAMPORT D.T.A. , Anal. Biochem. , 1977 , 82 ,
289 - 309 (113)
- 130 - DUBOIS M. , GILLES K.A. , HAMILTON J.K. , REBERS P.A. ,
SMITH F. , Nature ; 1951 , 168 , 167
Anal. Chem. , 1956 , 28 , 350 (114)
- 131 - BAYARD B. , MONTREUIL J. , Actes du colloque international,
CNRS , n° 221 , ed. Paris , 1974 , 209 - 218
(114)
- 132 - DUBOIS M. , GILLES K.A. , HAMILTON J.K. , REBERS P.A. ,
SMITH F. , Nature , 1951 , 168 , 167
Anal. Chem. , 1956 , 28 , 350
(114)
- 133 - SPIRO R.G. , Meth. Enzymol. , 1972 , XXVIII , 3 (116)
- 134 - MARSHALL R.D. , NEUBERGER A. , Meth. in Carbohyd. Chem. ,
1976 , VII , 212 - 219 (116)
- 135 - LOWRY O.H. , ROSEBROUGH N.J. , FARR A.L. , RANDALL R.J. ,
J. Biol. Chem. , 1951 , 193 , 265 - 275 (122)

- 136 - GROS C. , LABOUESSE B. , Euro. J. Biochem. , 1969 ,
2 , 4 , 463 (122)
- 137 - PERCY M.E. , BUCHWALD B.M. , Anal. Biochem. ,
1972 , 45 , 6067 (122)
- 138 - WOODS K.S. , WANG K.T. , Biochim. Biophys. Acta , 1967 ,
133 , 369 - 370 (122)
- 139 } - GAHAN L.C. , SANDFORD P.A. , CONRAD H.E. ,
140 } ,Biochemistry, 1967 , 6 , 9 , 2755 - 2766
(124 ,135)
- 141 - GEYER H. , STIRM S. , HIMMELSPACH K. , Med. Microbiol.
Immunol. , 1979 , 165 , 271 - 288 (136)