

N° d'ordre : 936

50376
1981
201

50376
1981
201

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MEMOIRE

présenté à l'Université de LILLE I

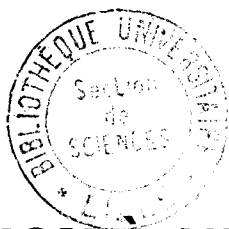
pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spécialité Biochimie

par

Jean-Marc LAMÉRAND



CONTRIBUTION À L'ÉTUDE D'UNE GLYCOPROTEINE POSSÉDANT UNE ACTIVITÉ ANTI-INFLAMMATOIRE EXTRAITE D'UN LYSAT D'ENTEROBACTER AGGLOMERANS

Soutenu le 9 décembre 1981 devant la Commission d'Examen

Président :	M. MONTREUIL
Rapporteur :	M. FOURNET
Examineurs :	M. AGNERAY
	M. SMETS

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I (laboratoire associé au C. N. R. S. n° 217) du Professeur Jean MONTREUIL sous la direction du Professeur Bernard FOURNET.

Je dédie cette thèse de 3ème Cycle à la mémoire de mes grands-parents, à mes parents pour m'avoir permis de continuer de longues études et à mon épouse.

Avec ce travail, je tiens à adresser mes plus vifs remerciements
à :

- Monsieur le Professeur MONTREUIL pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, confié un sujet si intéressant et montré l'exemple à suivre pour devenir un "chercheur".

- Monsieur le Professeur FOURNET. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir guidé pendant deux ans dans mes travaux et de m'avoir si souvent fait partager votre enthousiasme pour la recherche.

- Les Laboratoires CASSENNE pour nous avoir donné la possibilité d'étudier leur nouvel anti-inflammatoire. Nos réunions de travail ont toujours été très enrichissantes, tant sur le plan travail que sur le plan humain.

- Monsieur Yves LEROY pour ses conseils et son aide précieuse pour tout ce qui concerne la phase gazeuse et la spectrométrie de masse.

- Madame Myriam CONIEZ pour son aide dans l'étude de l'homogénéité des produits purifiés.

- Mademoiselle Christine BRUVIER et Madame Catherine ALONSO. Merci de m'avoir si bien accueilli au "107" et de m'avoir si souvent aidé et conseillé avec gentillesse et dans la bonne humeur.

- Madame Claude COSNUAU, pour avoir accepté si gentiment de bien vouloir dactylographier ma thèse avec beaucoup de patience.

INTRODUCTION: GENERALE

1

INTRODUCTION:

LA REACTION INFLAMMATOIRE

2

I. LES INITIATEURS DE LA REACTION INFLAMMATOIRE

4

1 - Le stimulus lui-même de l'inflammation

4

2 - La coagulation sanguine dans la zone lésée

4

3 - Le complexe antigène-anticorps

5

4 - Les produits de dégradation du collagène

8

II. LES MEDIATEURS DE L'INFLAMMATION

8

1 - Les substances vaso-actives

8

a) L'histamine

9

b) La 5 hydroxy-tryptamine ou sérotonine

9

c) Les kinines

10

d) Slow reacting substance of anaphylaxis (S.R.S.A.)

10

2 - Le complément

12

a) Première étape : C₁ estérase

14

b) Deuxième étape : C₃ convertase

14

c) Troisième étape : C₃ - activation

15

d) Quatrième étape : C₅ - C₇

16

e) Cinquième étape : C₇ - C₉

16

3 - Les prostaglandines

19

4 - Les facteurs de la coagulation sanguine

23

a) Facteurs de la coagulation sanguine

23

b) Relations entre les facteurs de la coagulation sanguine avec les kinines d'une part et le complément d'autre part

26

III. LES ELEMENTS CELLULAIRES DE L'INFLAMMATION

28

1 - La fonction phagocytaire

30

a) Les polynucléaires et les macrophages

30

b) La phagocytose

32

2 - <u>Les autres fonctions</u>	34
a) Les lymphocytes	34
b) Les plasmocytes	37
c) Les histiocytes et les fibroblastes	37
IV. <u>CONCLUSION SUR LE PHENOMENE INFLAMMATOIRE</u>	38
V. <u>LES ANTI-INFLAMMATOIRES</u>	42
1 - <u>Les anti-inflammatoires physiologiques</u>	42
a) Les cellules	42
b) Le rôle du foie	42
c) Les hormones	42
d) Les prostaglandines	43
2 - <u>Les médicaments anti-inflammatoires</u>	43
a) Les gluco-corticoïdes	43
b) Les non-stéroïdiens	46
a') Les hydroxy-benzoates : dérivés salicylés	46
b') Les dérivés pyrazoles	46
c') Les dérivés indoliques	47
d') Les dérivés anthraniliques	47
e') Les dérivés de l'acide isonicotinique	47
f') Les dérivés phénothiaziniques	48
g') Les dérivés arylalcanoïques	48
h') La colchicine	48
i') Les anti-malariques	49
j') Les sels d'or	49
c) Les enzymes et anti-enzymes	49
d) Les immunodépresseurs	49
<div style="border: 1px dashed black; padding: 10px; display: inline-block; margin: 20px 0;">TRAVAUX PERSONNELS</div>	51
I. <u>PREPARATION DU PRINCIPE ACTIF RC 1292</u>	52
II. <u>COMPOSITION DU PRINCIPE ACTIF RC 1292</u>	56

	Pages
1 - <u>Etude de la copule protéique</u>	56
a) <u>Matériels et méthodes</u>	56
b) <u>Résultats</u>	56
2 - <u>Etude de la copule glucidique</u>	58
a) <u>Matériels et méthodes</u>	58
- <u>Composition centésimale</u>	58
. <u>Dosage des oses neutres</u>	58
. <u>Dosage des acides uroniques</u>	58
. <u>Dosage des acides sialiques</u>	58
. <u>Dosage des osamines</u>	60
- <u>Identification et composition molaire des monosaccharides</u>	60
1) <u>Identification des monosaccharides après hydrolyse</u>	60
. Hydrolyse par l'acide trifluoroacétique (AFTA)	60
. Hydrolyse par l'acide sulfurique	60
2) <u>Identification et dosage des monosaccharides après méthanolyse</u>	61
- <u>Isolement et identification d'une hexosamine particulière</u>	61
1) <u>Isolement</u>	61
2) <u>Identification par GLC-MS de l'hexaminitol acétate</u>	62
3) <u>Identification de l'hexosamine par chromatographie sur couche mince sous forme phényl-osazone</u>	62
b) <u>Résultats</u>	63
- <u>Composition centésimale</u>	63
- <u>Identification et composition molaire en monosaccharides</u>	64
1) <u>Identification des monosaccharides après hydrolyse</u>	64
2) <u>Identification des monosaccharides après méthanolyse</u>	64
- <u>Isolement et identification d'une hexosamine particulière</u>	66
1) <u>Isolement</u>	66
2) <u>Identification de l'hexosamine par GLC-MS sous forme d'hexosaminitol</u>	66
3) <u>Identification de l'hexosamine par chromatographie sur couche mince sous forme phényl-osazone</u>	70
3 - <u>Etude des éléments minéraux</u>	70
a) <u>Matériels et méthodes</u>	70
- Humidité	70
- Dosage de sulfates	73
- Dosage de phosphore	73

	Pages
b) <u>Résultats</u>	74
4 - <u>Hétérogénéité du RC 1292</u>	74
a) <u>Matériels et méthodes</u>	74
b) <u>Résultats</u>	74
5 - <u>Conclusion</u>	76
 III. <u>ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE</u>	 76
 IV . <u>FRACTIONNEMENT DU PRINCIPE ACTIF RC 1292</u>	 77
1 - <u>Précipitation au sulfate d'ammonium</u>	77
a) <u>Matériels et méthodes</u>	77
b) <u>Résultats</u>	78
- <u>Biochimiques</u>	78
- <u>Pharmacologiques</u>	78
2 - <u>Purification du précipité P₇ par chromatographie de gel filtration et d'échange d'ions sur DEAE Séphadex</u>	84
A. <u>Fractionnement du P₇ sur AcA 34</u>	84
a) <u>Matériel et méthodes</u>	84
b) <u>Résultats</u>	84
B. <u>Fractionnement du P₇ sur D.E.A.E. Séphadex</u>	85
a) <u>Matériel et méthodes</u>	85
b) <u>Résultats</u>	85
C. <u>Conclusion</u>	85
3 - <u>Précipitation au Cetavlon</u>	88
a) <u>Matériels et méthodes</u>	88
b) <u>Résultats</u>	88
- <u>Biochimique</u>	88
- <u>Pharmacologique</u>	91
A) <u>Fractionnement du S₁ sur colonne Ultrogel AcA 34</u>	91
a) <u>Matériels et méthodes</u>	91
b) <u>Résultats</u>	91
c) <u>Conclusion</u>	94
B) <u>Chromatographie du S₁ sur gel d'hydroxy-apatite</u>	94
a) <u>Matériels et méthodes</u>	94
b) <u>Résultats</u>	94
c) <u>Conclusion</u>	94

V. <u>ETUDE D'UNE FRACTION ACTIVE FI S₁ HA obtenue par chromatographie sur</u> <u>colonne d'hydroxy-apatite du surnageant de la précipitation au Cetavlon</u>	98
1 - <u>Etude de la copule protéique</u>	98
a) <u>Matériels et méthodes</u>	98
b) <u>Résultats</u>	98
2 - <u>Etude de la copule glucidique</u>	100
a) <u>Matériels et méthodes</u>	100
- <u>Compositions centésimales et molaires</u>	100
- <u>Nature des points d'attache des liaisons glycosi-</u> <u>diques par perméthylation</u>	100
. Préparation de la base	100
. Perméthylation du FI S ₁ HA	100
. Analyse des éthers méthyliques	101
- <u>Oxydation périodique</u>	102
b) <u>Résultats et discussion</u>	102
- <u>Composition centésimale et molaire en monosaccha-</u> <u>rides de la glycoprotéine FI S₁ HA</u>	102
- <u>Nature des points d'attache des liaisons glycosi-</u> <u>diques</u>	104
- <u>Conclusion</u>	104
- <u>Oxydation périodique</u>	107
1° <u>Composition molaire</u>	107
2° <u>Etude de la structure de la fraction</u> <u>oligosaccharidique</u>	107
3° <u>Etude de la nature glycoprotéinique du FI S₁ HA</u>	111
α - <u>Matériels et méthodes</u>	111
. <u>Recherches des liaisons O-glycosidiques</u>	111
. <u>Recherches des liaisons N-glycosidiques</u>	112
. <u>Rupture de la liaison N-glycosidique</u>	113
1/ <u>Hydrazinolyse</u>	113
2/ <u>Rupture sodique en milieu réducteur</u>	114
- <u>Résultats</u>	114
. <u>Recherche des liaisons O-glycosidiques</u>	114
. <u>Recherche des liaisons N-glycosidiques</u>	114
1/ <u>Hydrazinolyse</u>	114
2/ <u>Rupture sodique en milieu réducteur</u>	119
3/ <u>Conclusion</u>	119

INTRODUCTION GENERALE

La mise en évidence, il y a quelques années, d'activités anti-inflammatoires dans différents lysats bactériens (1) a été la source de travaux sur les anti-inflammatoires. L'intérêt de trouver de nouveaux remèdes possédant une activité anti-inflammatoire est considérable. En effet, de nombreux médicaments, actuellement utilisés, sont des stéroïdiens qui présentent parfois des effets secondaires néfastes ; d'autre part, ces nouvelles molécules permettront peut-être de comprendre les mécanismes de la réaction anti-inflammatoire.

Les Laboratoires CASSENNE nous ont donné la possibilité de continuer des travaux afin de mieux connaître la structure et la relation structure-activité d'une substance issue d'un lysat bactérien d'Enterobacter Agglomerans possédant une activité anti-inflammatoire intéressante.

Notre travail a donc consisté, dans un premier temps, à purifier le lysat bactérien par différentes méthodes, puis, après avoir extrait la fraction portant l'essentiel de l'activité anti-inflammatoire, à en connaître la structure et de déterminer enfin la relation structure-activité.

Dans une première partie, nous avons repris quelques notions générales sur le phénomène anti-inflammatoire, pour ensuite dans la seconde partie exposer nos travaux sur la purification du lysat bactérien et sur la structure de la glycoprotéine portant l'activité anti-inflammatoire.

INTRODUCTION

La réaction inflammatoire :

La réaction inflammatoire peut être considérée comme la réponse opposée par les tissus vivants à une agression (2) et comme mécanisme de défense primaire de l'organisme. En effet, la réaction inflammatoire met en jeu tout l'organisme et en particulier les cellules du mésoderme. On a pu être tenté de différencier, lors de la réaction inflammatoire, les facteurs sériques et les facteurs cellulaires. En fait, tous ces facteurs sont liés étroitement : les facteurs sériques étant synthétisés par les cellules et les cellules agissant par le moyen des facteurs sériques. Cependant, le terme "facteurs sériques" peut être réservé aux profacteurs circulants pré-existants au phénomène inflammatoire (3).

CELSUS (42 ans av. J.C. - 38 ap. J.C. ; livre de De Re Medicina) avait décrit l'inflammation par ces quatre symptômes "Notae vero inflammationis sunt quatuor rubor et tumor cum calore et dolore".

Cependant, l'inflammation semble être beaucoup plus que rougeur, tumeur, chaleur et douleur, car elle peut conduire notamment à des maladies invalidantes telles que la polyarthrite articulaire ou la goutte.

La réaction inflammatoire est un phénomène complexe : le passage de la réaction inflammatoire aiguë à la réaction inflammatoire chronique est un phénomène essentiel à son étude. Le processus inflammatoire recouvre un ensemble de réactions concernant des modifications vasculaires, tissulaires et humorales déclenchées par un stimulus responsable de lésions tissulaires.

La réaction inflammatoire évolue de cette façon :

- d'abord l'inflammation aiguë : avec migration des polynucléaires sanguins, augmentation de la perméabilité cellulaire, formation d'un oedème.
- ensuite l'inflammation subaiguë avec migration des cellules mononuclées qui, en association avec les cellules conjonctives, conduisent à la guérison grâce à leur activité sécrétoire ou phagocytaire.
- parfois l'inflammation chronique : l'élément agressif est tel que l'irritation peut devenir chronique.

L'inflammation chronique se caractérise alors par des granulomes, formations qui se développent autour d'un agent infectieux ou d'un corps étranger. Les globules blancs, pour se débarrasser des corps étrangers, sécrètent des enzymes destructrices : enzymes lysosomiales (4), lorsque l'organisme ne peut se défaire d'un corps étranger : particules de silice, d'amiante, ou cristaux d'urate de sodium, les enzymes lysosomiales libérées agressent les tissus voisins sains et les endommagent ; ces tissus lésés deviennent des étrangers pour l'organisme et sont le siège d'une réaction immunitaire.

Nous allons donc, dans cette première partie, envisager successivement :

- les initiateurs de la réactions inflammatoire ;
- les médiateurs de l'inflammation ;
- les cellules impliquées au cours de l'inflammation ;
- les anti-inflammatoires.

I. LES INITIATEURS DE LA REACTION INFLAMMATOIRE

Ils peuvent être de nature très diverse tels que :

- le stimulus lui-même de l'inflammation ;
- la coagulation sanguine dans la zone lésée ;
- les complexes antigène-anticorps ;
- les produits de dégradation du collagène.

1 - Le stimulus lui-même de l'inflammation :

Le stimulus de l'inflammation peut être un germe microbien qui secrète des toxines, initiateur direct ou indirect de l'inflammation.

- Les toxines attirent les polynucléaires et les macrophages : c'est le chimiotactisme direct.
- Les germes microbiens secrètent des coagulases, hémolysines, collagénases qui sont phlogogènes : c'est le chimiotactisme indirect.
- D'autre part, le stimulus peut être, comme c'est le cas dans la goutte, un micro-cristal d'urate de sodium. Ce dernier active le facteur XII de HAGEMAN qui intervient dans le déclenchement du phénomène anti-inflammatoire.

2 - La coagulation sanguine dans la zone lésée :

Quand un vaisseau est lésé ou quand la perméabilité permet aux facteurs circulants de s'échapper, les activateurs de la coagulation interviennent. Certains de ces facteurs sont des initiateurs de l'inflammation tels que :

- les plaquettes : activées par le collagène, elles libèrent la sérotonine qui augmente la perméabilité vasculaire.

- le facteur HAGEMAN : ou facteur XII est sous sa forme active un activateur des Kallicréinogènes dans le système kininogène - kinine (voir figure¹ page 6).
- la fibrine, terme ultime de la coagulation, puissant facteur chimio-tactique, est un activateur de la fibrinolyse et en particulier du système plasmine ; la plasmine qui est une enzyme protéolytique de la coagulation est un activateur du système kinine et agit au niveau de la séquence du complément en clivant la 3^e fraction de ce dernier (C3) (voir figure¹ p. 6).

3 - Les complexes antigène-anticorps :

La réaction antigène-anticorps donne lieu à des réactions immunologiques d'hypersensibilité immédiate. Celles-ci sont de trois types :

- La première est l'anaphylaxie ; dans ce type de réaction, l'anticorps est fixé sur des cellules particulières : les mastocytes. Quand l'organisme est de nouveau en contact avec l'antigène correspondant, les mastocytes portant les anticorps spécifiques de l'antigène éclatent et libèrent notamment de l'histamine, la 5 hydroxytryptamine ou sérotonine et l'héparine.

Ces phénomènes peuvent être locaux, c'est ce qui se passe au cours du rhume des foins ou de la crise d'urticaire, ou généralisés : c'est le choc anaphylactique qui peut conduire à la mort.

- La seconde réaction est qualifiée de cytotoxique et fait intervenir le complément qui est un système enzymatique complexe fait de neuf composants (C1 à C9) et dont l'activation de cette chaîne de réactions donne lieu à la libération d'histamine, de polypeptides vaso-actifs comme la bradykinine, d'acides gras et de prostaglandines. L'activation du complément est due à l'existence d'une réaction entre les anticorps et

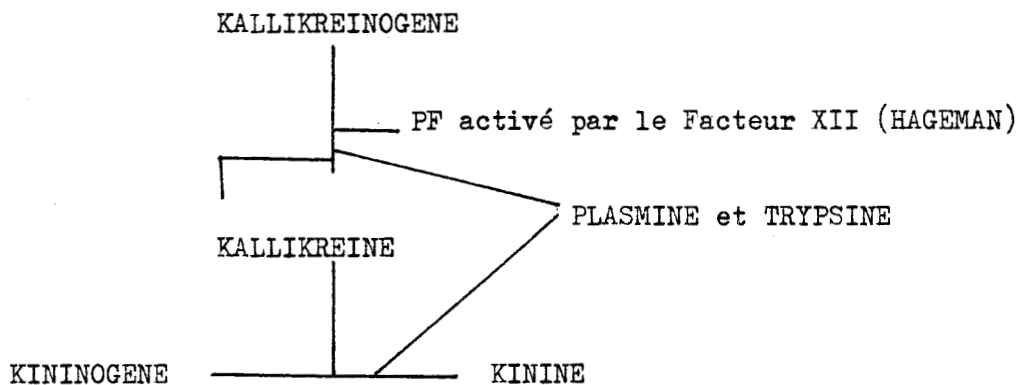


Figure 1

Formation des kinines. Réactions enzymatiques menant à la formation des kinines

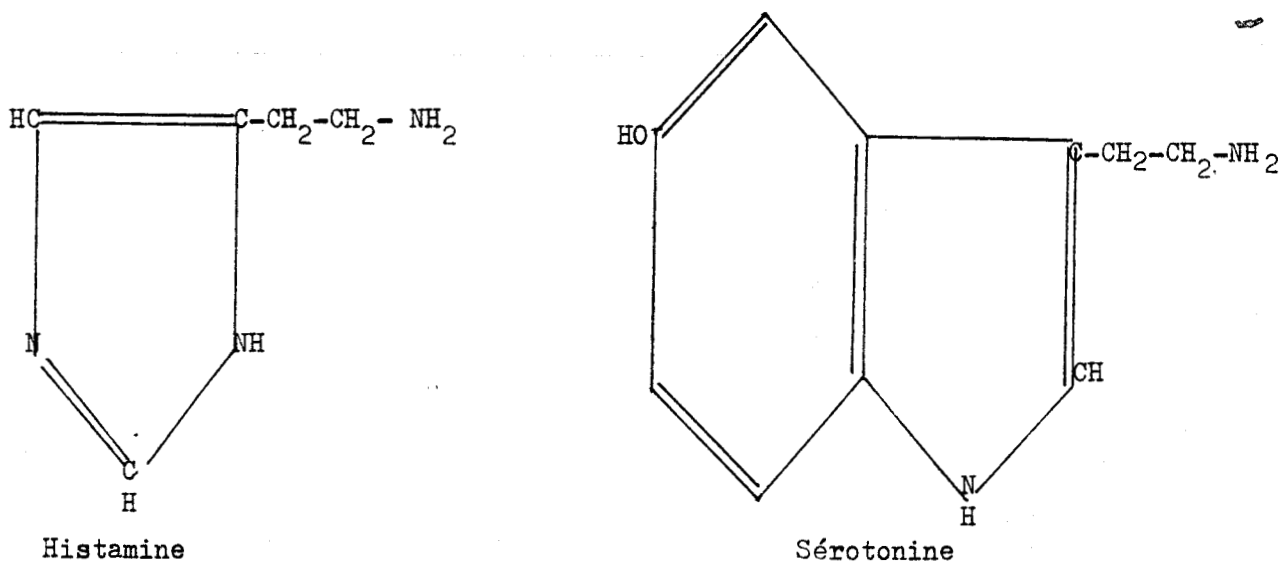


Figure 2

Formule de deux amines vaso-actives : l'histamine et la sérotonine



les antigènes spécifiques produits lors d'une première exposition de l'organisme à ces anticorps et qui se situent à la surface de cellules, elles-mêmes spécifiques : la fin de cette réaction est la mort de ces cellules.

- La troisième réaction est dite à complexes immuns, l'anticorps et l'antigène réagissent et forment un complexe immun qui déclenche l'activation du complément. Par rapport aux autres réactions d'hypersensibilité retardées, l'antigène est cette fois soluble. Les complexes immuns formés lors d'excès d'antigènes par rapport aux anticorps deviennent insolubles et sont alors responsables d'une maladie appelée : maladie sérique.

Ces complexes immuns peuvent se déposer également un peu partout dans l'organisme où ont lieu alors les réactions classiques de destructions cellulaires liées à l'activation du complément. Ce type de réactions avec dépôts de complexes immuns est en particulier à l'origine de certains cas de glomérulonéphrite.

Enfin, la réaction anticorps-antigène peut donner lieu à des réactions immunologiques dites "spécifiques", de type retardé, à médiation cellulaire. Dans ce genre de réaction, interviennent les lymphocytes. Ces cellules sensibilisées par un antigène spécifique libèrent à son contact des substances appelées lymphokines.

Dès 1963, WILLOUGHBY et al. (5) ont isolé à partir de lymphocytes le "Lymph Node Permeability Factor" (L.N.P.F.) et ont démontré l'activité de ce facteur sur la perméabilité vasculaire et la migration leucocytaire. Au contact de l'antigène spécifique, les lymphocytes se transforment en cellules dites "tueuses" et peuvent ainsi détruire un type de cellules déterminé, appelées "cellules cibles". C'est ce type de réaction que

l'on a notamment au cours de la polyarthrite rhumatoïde, au cours des rejets de greffe et lors d'incidents thérapeutiques.

4 - Les produits de dégradation du collagène :

Les collagénases des bactéries ou les enzymes lysosomiales libérées lors d'une lyse cellulaire hydrolysent le collagène en donnant des peptides de faible poids moléculaire (1 000 à 10 000) qui sont tous très chimiotactiques pour les polynucléaires (6).

II. LES MEDIATEURS DE L'INFLAMMATION

Nous examinerons successivement quatre types de médiateurs de l'inflammation : les substances vaso-actives, le système complément, les prostaglandines et les facteurs de coagulation sanguine.

1 - Les substances vaso-actives (7) :

La réaction inflammatoire est perçue en réalité par des troubles vasculaires. En effet, la cause des douleurs au niveau des tissus est due à la dilatation des capillaires et l'augmentation de leur perméabilité. Cette augmentation de la perméabilité vasculaire peut être étudiée au microscope électronique en suivant le passage de particules de carbone entre les cellules endothéliales des capillaires irriguant les tissus enflammés (8).

Quatre types de molécules sont mis en jeu dans ces phénomènes vasculaires, il s'agit de l'histamine, de la 5 hydroxy-tryptamine ou sérotonine, des kinines et de la "Slow Reacting Substance of Anaphylaxis" (S.R.S.A.).

a) L'histamine :

Cette amine provenant de la décarboxylation de l'histidine (figure²p. 6) se trouve dans les mastocytes, les polynucléaires basophiles, les péricytes capillaires et les plaquettes, associée à l'héparine sous forme de complexe inactif.

La libération de l'histamine de son complexe avec l'héparine peut être induite par des endotoxines bactériennes ou des complexes immuns ; des protéines basiques et des substances de haut poids moléculaire.

D'autre part, les mastocytes ou les polynucléaires, en fixant des facteurs du complément, libèrent leur histamine.

Dans le phénomène de l'inflammation, l'histamine dont l'action est précise mais peu durable, provoque une vaso-dilatation et une augmentation de la perméabilité capillaire. Elle serait en outre responsable de la fuite des protéines plasmatiques au niveau des veinules, à la faveur de la création d'espaces (gaps) entre les cellules endothéliales, la membrane basale restant intacte (COTRAN et MAJNO) (9).

b) La 5 hydroxy-tryptamine ou sérotonine :

La sérotonine ou 5 hydroxy-tryptamine est le produit de décarboxylation du 5 hydroxy-tryptophane (voir figure²p. 6). Elle se trouve en quantité importante dans les plaquettes, les cellules entéro-chromaffines de l'intestin et les mastocytes. Sa libération semble avoir les mêmes origines que celles décrites pour l'histamine.

Comme pour l'histamine, son injection par voie sous-cutanée entraîne une augmentation des phénomènes de perméabilité, en particulier elle provoquerait une disjonction des cellules endothéliales.

c) Les kinines :

Les kinines sont des polypeptides comportant neuf à onze acides aminés. Nous avons rassemblé dans la figure³ page 11 les structures de 3 kinines : la bradykinine, la kallidine et la met-kallidine.

Ces kinines proviennent de l'hydrolyse partielle d'une γ 2 - globuline ; le kininogène par la kallikréine. Cette hydrolyse enzymatique est régulée par un système complexe d'enzymes et de pro-enzymes. La première étape est l'activation du facteur XII de la coagulation (facteur de HAGEMAN) par des substances insolubles présentant des charges électro-négatives (Kaolin, membranes cellulaires, complexes antigènes-anticorps, bactéries). Ce facteur XII a d'une part une action directe sur le système kallikréinogène kallikréine (voir figure¹ p. 6), d'autre part une action indirecte par l'intermédiaire d'un facteur dit de perméabilité de dilution (PF/dil) et par l'intermédiaire du système plasminogène/plasmine qui induit l'activité protéolytique de la kallikréine.

Les kinines comme les deux amines étudiées précédemment augmentent la perméabilité capillaire. Elles sont également responsables de phénomènes chimiotactiques et de la douleur.

Les polypeptides ont une durée de vie très courte, en effet ils sont rapidement hydrolysés par les carboxypeptidases plasmatiques et les kininases érythrocytaires ou granulocytaires.

d) Slow reacting substance of anaphylaxis (S.R.S.A.) :

La nature chimique des SRS-A est mal connue. Les cellules productrices de ces substances sont les leucocytes neutrophiles et basophiles. Certains types d'immunoglobulines sont capables de provoquer, au contact de leur antigène, la libération du SRS-A. La sécrétion des Slow reacting substance of anaphylaxis provoque, comme pour les 3 autres médiateurs

1)

a) Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg

b) Lys - Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg

c) Met - Lys - Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg

Kinines

2)

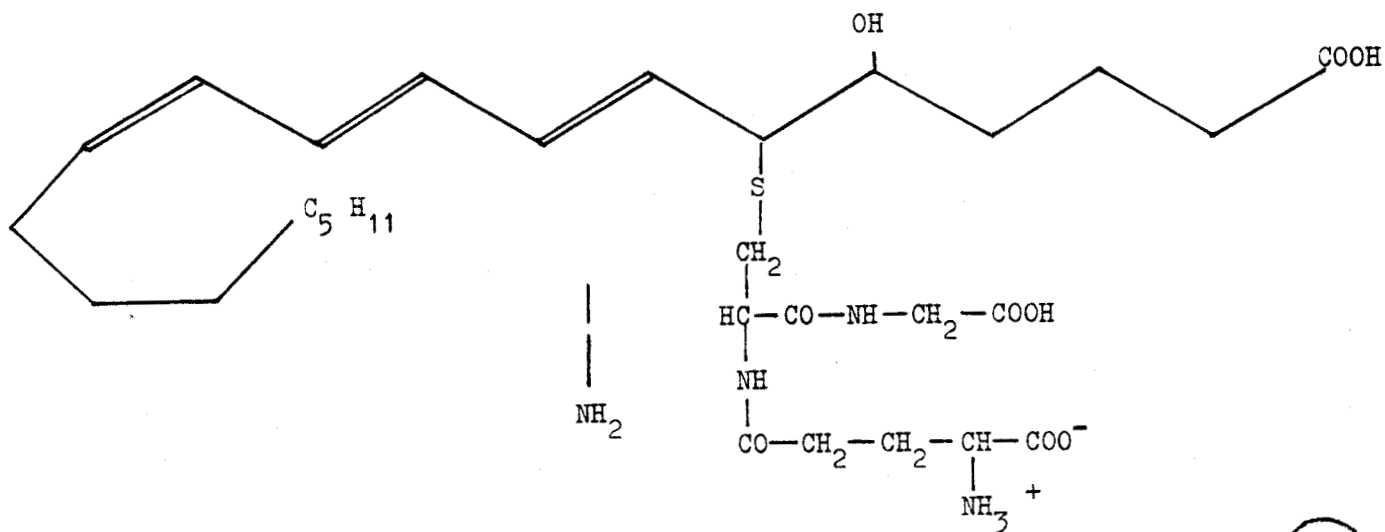


Figure 3



1) Les kinines : bradykinine, kallidine, Met kallidine

2) Structures proposées pour le SRS-A (ou SRS) Slow reacting Substance of Anaphylaxis

-- leucotriène D

— leucotriène C

vaso-actifs, une augmentation de la perméabilité vasculaire.

Récemment, SAMUELSSON (10) propose que le SRS-A ou SRS soit un dérivé de l'acide arachidonique identique au leucotriène C, mais le groupe de PIPER (11) montre que la structure chimique du SRS est identique à celle du leucotriène D. Ces molécules de leucotriène sont des dérivés de l'acide arachidonique obtenus par action des phospholipases sur les phospholipides membranaires. Les deux structures sont indiquées sur la figure³p. 11 .

2 - Le complément :

Le système complément est formé de neuf globulines représentant quantitativement 10 % des globulines sériques. Ces neuf composants interviennent dans une réaction en cascades selon le schéma classique : C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9 pour provoquer l'hémolyse des globules rouges sensibilisés en présence d'antigène.

D'autre part, il existe une voie différente d'activation du complément, appelée voie alternée.

L'activation du complément lui confère toute une série de propriétés biologiques qui expliquent son importance dans les réactions inflammatoires à point de départ immunologique. L'augmentation de la perméabilité vasculaire est provoquée par le composant C1⁺ protéase et des anaphylatoxines. Ces dernières induisent la contraction des fibres musculaires lisses. Le pouvoir phagocytaire est dû à la fraction C3 ; l'action chimiotactique par les fractions C3 C5 et C5 C6 C7 ; l'immuno-adhérence est sous le contrôle de la fraction C3, enfin le pouvoir cytolitique qui termine l'intervention du complément est le fait des fractions C8 et C9.

Les différentes étapes de l'activation du complément, dans la séquence classique, sont les suivantes : figure⁴p. 13 .

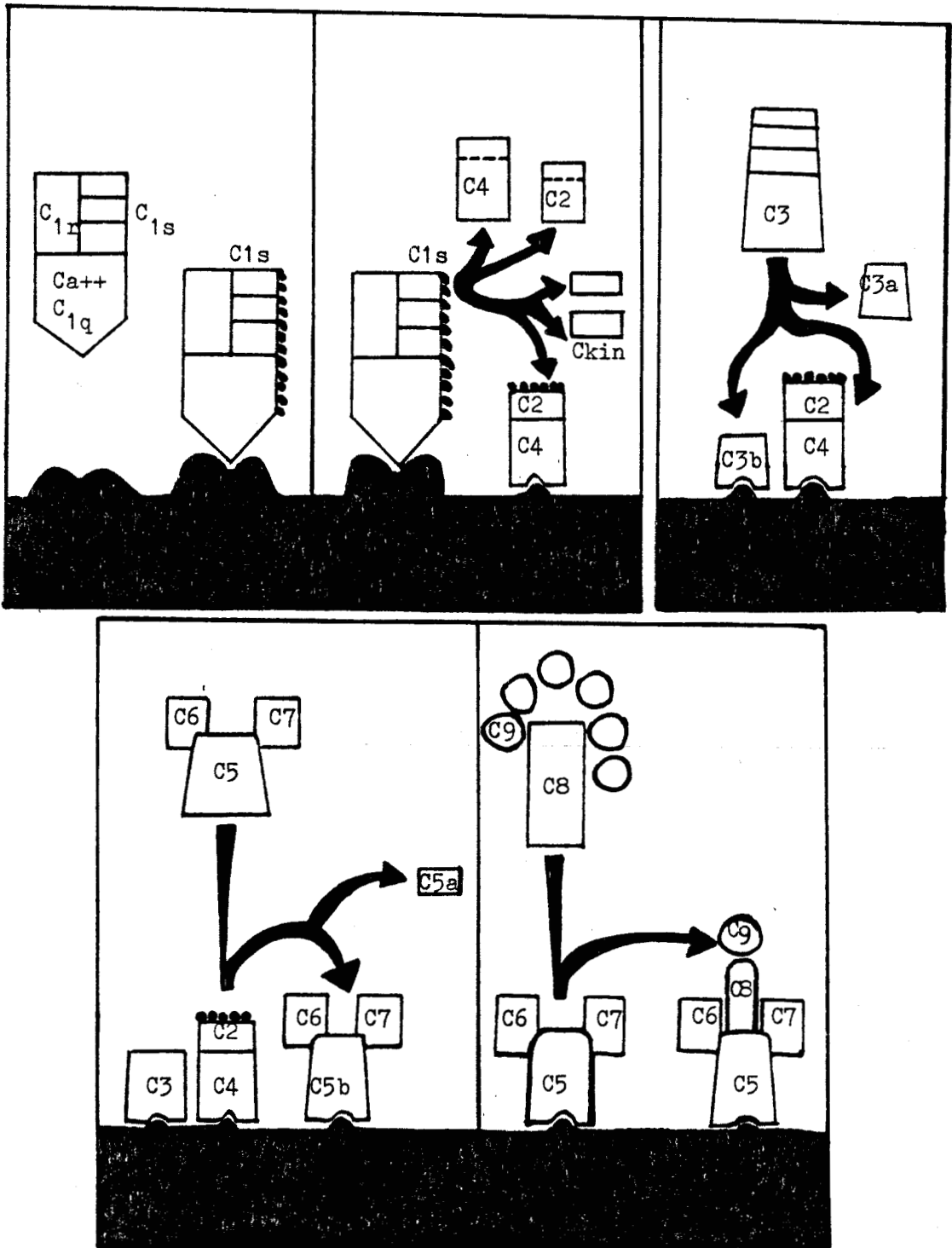


Figure 4

Séquence classique de l'activation du complément dans l'immuno-hémolyse (d'après H. GEWURZ)



Le complément, comme nous allons le voir, est un élément essentiel de la réaction inflammatoire.

Nous décrivons maintenant les différentes étapes de l'activation du complément dans la séquence classique.

a) Première étape :

Le C1, premier composant, est une molécule faite de trois sous-unités C1q, C1r, C1s unies entre elles par des ions calcium Ca^{++} .

Si la sous-unité C1q vient à rencontrer des complexes anticorps-antigène contenant de l'Ig G ou de l'Ig M, elle active la sous-unité C1r qui élimine un fragment de C1s, transformant cette sous-unité en un agent protéolytique puissant, la C1 protéase (MULLER-EBERHARD) (1969) (12).

L'activation se fait uniquement si C1 rentre en contact avec un fragment Fc d'un anticorps (Ig G. ou Ig M) fixé lui-même sur le site antigénique (membrane cellulaire, bactéries, virus, etc.).

L'anticorps libre est par conséquent incapable d'activer la sous-unité C1.

D'autres facteurs peuvent cependant induire la formation de la C1 protéase, notamment la plasmine, qui peut jouer le rôle de C1r et enlever à C1s le fragment qui l'empêche d'agir comme protéase (RATNOFF) (13) ou encore le facteur XII d'HAGEMAN qui peut induire la formation de la C1 protéase (DONALDSON) (14) certainement par l'intermédiaire de la kallicroïne et de la plasmine.

b) Deuxième étape :

La C1 protéase agit à la fois sur deux protéines sériques C4 et C2 en détachant à chacune un polypeptide de faible poids moléculaire. Cette hydrolyse fournit donc une protéine C4b. Sur la protéine C4, la C1 protéase libère le peptide C4a, de masse moléculaire 15.000 et fournit la protéine C4b. Sur la protéine C2, la C1 protéase libère le peptide C2b,

de masse moléculaire 39.000 et fournit la protéine C2a. L'association de ces deux dernières protéines C4b et C2a forme une nouvelle enzyme protéolytique : la C3 convertase.

c) Troisième étape :

La troisième phase fait intervenir la protéine C3 encore appelée β 1-C globuline : cette globuline (MM : 185.000) qui se trouve à un taux élevé dans le sang (12 mg par ml de sérum) va perdre un peptide (C3a) qui, selon les auteurs, aurait une masse moléculaire de 8.000 (MASSON) (15), de 7.200 (FONTAGNE et GIROUD) (16) ou de 2.700 (PELTIER) (17).

Ce peptide possède des propriétés anaphylactiques et leucotoxiques. Quant au fragment principal appelé C3b, il va intervenir dans la suite des réactions du complément (4e étape) en permettant en outre la phagocytose des complexes immuns (pouvoir pro-phagocytaire), l'adhérence des complexes antigènes-anticorps complément C1 C4 C2 C3 aux érythrocytes et leucocytes (immuno-adhérence), l'apparition d'un auto-anticorps anti-C3 de la classe des Ig M. Cet auto-anticorps prend le nom d'immuno-conglutinine.

d) Quatrième étape :

La fixation du complexe C5b C6 C7 à la surface d'une cellule entraîne sur la membrane de celle-ci des modifications irréversibles qui correspondent à un ré-arrangement des couches superficielles de la membrane.

Cette étape fait intervenir 3 composants du complément C5 C6 C7 qui, sous forme de complexe, circule déjà dans le sérum. Sous l'action peptidasique de C3b, le composant C5 perd un fragment C5a d'un poids moléculaire de 10.000, qui possède des propriétés anaphylactiques et leucotoxiques.

Le complexe C5b C6 C7 possède lui-même de puissantes propriétés chimiotactiques.

e) Cinquième étape :

Elle constitue la dernière étape et aboutit à la lyse de la cellule. Cette lyse est provoquée par le facteur C8, associé au complexe C5b C6 C7 qui permet la fixation du C8 sur la membrane. Quant au C9, il renforce l'activité du facteur C8. En outre, il induit la formation de diverses prostaglandines.

Le composant C8 vient se fixer si le complexe C5b C6 C7 est présent. Le C8, par action enzymatique, provoque des lésions de la paroi cellulaire : phénomène accéléré par la présence du C9.

Le C9 peut, directement ou par l'intermédiaire de la réaction d'hémolyse de la membrane cellulaire, induire la formation de diverses prostaglandines de type E et F.

A la voie classique d'activation du complément s'ajoute une voie dite alternée.

Des substances telles que le zymosan, la carraghénine, les endotoxines de certaines bactéries gram négatif, un facteur extrait du venin de Cobra, des substances immunologiques, sont capables de court-circuiter les trois premiers composants du complément et d'agir sur le C3.

Six composants interviennent dans le fonctionnement de cette voie alternée : cinq composants propres (facteurs B et D, properdine, β 1H et C3b INA) et un composant qui intervient également dans le fonctionnement de la voie classique : le C3 (PELTIER) (17).

- Le facteur B (ou C3 PA) qui est une β 1 globuline de poids moléculaire égal à 100 000.

- Le facteur D (ou C3 PAase) qui est une globuline de poids moléculaire égal à 25 000 et dont l'activité spécifique est de cliver le facteur B en deux fragments.

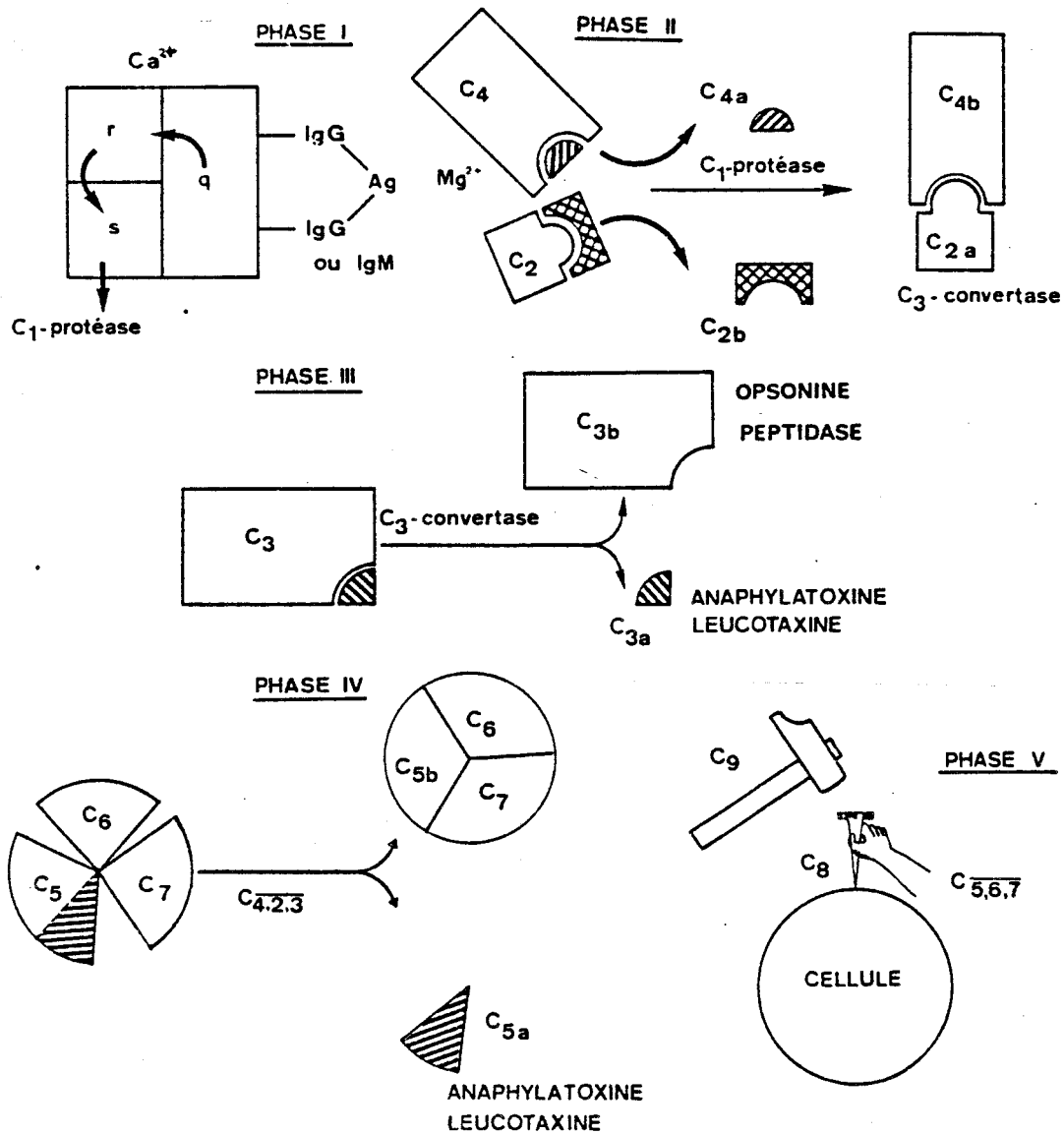


Figure 5

Séquence classique d'activation du complément d'après MASSON (15)

TABLEAU I

Principales propriétés physico-chimiques des composants du complément (voie classique) et des inhibiteurs (d'après GEWURZ)

NOM (synonymes)	constante de sédimentation	poids moléculaire	mobilité électro- phorétique	concentration sérique approximative ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	thermo- labilité 56°C - 30 mn	fragments principaux (synonymes)
C _{1q} (composant 11 S)	11,1 S	400 000	γ_2	100 à 200	+	
C _{1r}	7 S	170 000	β_1	20 à 30	+	
C _{1s} (C ₁ -estérase)	4 S	79 000	α_2	20 à 100	+	
C ₄ (β_1 E-globuline)	10 S	240 000	β_1	200 à 500	0	C _{4a} , C _{4b}
C ₂	5,5 S	117 000	β_2	20 à 40	+	C _{2a} , C _{2b}
C ₃ (β_1 C-globuline)*	9,5 S	185 000	β_1	1 000 à 1 300	0	C _{3a} , C _{3b} , C _{3c} (β_1 A-globuline) C _{3d} (α_2 D-glob.)
C ₅ (β_1 F-globuline)	8,7 S	185 000 à 200 000	β_1	75	+	C _{5a} , C _{5b}
C ₆	5 à 6 S	100 000 à 150 000	β_2	11 à 60	0	
C ₇	6 à 7 S	100 000 à 140 000	β_2	60	0	
C ₈	8 S	150 000	γ_1	10 à 40	+	
C ₉	4,5 S	79 000	α_2	1 à 5	+	
INHIBITEURS						
C ₁ INH (inhibiteur de la C ₁ -estérase)	—	90 000	α_2	100 à 200	0	
C _{3b} INH (conglutino- gen-activating fac- tor, KAF)**	6 S	100 000	β_1	25	0	
C ₆ INH***	—	—	β_1	—	—	

* Cette identité n'est pas admise par NELSON qui pense que la β_1 C globuline n'appartient pas au système complémentaire.

** Cet inhibiteur inactive le C_{3b} et révèle le site réactif avec la conglutinine (protéine non anticorps, présente dans le sérum normal de bœuf et capable de réagir spécifiquement avec le C_{3b} ainsi traité). Il est de ce fait également connu sous le nom de « conglutino-gen-activating factor » ou KAF.

*** Son existence est actuellement remise en question. Il pourrait en fait s'agir d'un inhibiteur du C₅.

N.B. Il existe également un puissant inhibiteur des anaphylatoxines (C_{3a}, C_{5a}); c'est une α -globuline douée de propriétés enzymatiques (carboxy-peptidase).



- La properdine est une gammaglobuline de poids moléculaire égal à 223 000, faite de 4 sous-unités apparemment identiques, de 45 000 de poids moléculaire chacune. L'activité de la properdine est liée à sa capacité de réagir avec le C3b et de retarder le "decoy" (inactivation) de la convertase C3b dépendante. Elle aurait donc un rôle stabilisateur sur la convertase.

- La β 1H est une β globuline de poids moléculaire égal à 150 000, capable de dissocier les C3/C5 convertases alternes et d'accélérer l'inactivation du C3b par le C3b INA.

- le C3b INA (ou C3b inactivateur) est une β globuline de poids moléculaire 90 000 clivant le C3b en C3b inactivé (C3b i).

Le rôle du complément ne se limite pas aux réactions inflammatoires immunes : certains auteurs ont discuté de son rôle dans la réaction inflammatoire aigüe non immune (DIAS da SILVA et al.) (18).

En effet, le complément entre en jeu dans des réactions non immunologiques telles que activation du C1 par le facteur XII HAGEMAN au cours de la coagulation, activation du C3 par des enzymes protéolytiques, activation du C6 par la trypsine et autres protéases (SOBEL et al.) (19).

3 - Les prostaglandines :

Les prostaglandines sont des acides gras insaturés à vingt atomes de carbone, possédant un cycle cyclopentane et deux chaînes aliphatiques latérales. Leur synthèse se fait biologiquement à partir de l'acide arachidonique libéré par action des phospholipases sur les phospholipides membranaires (voir figure 6 p. 22).

Les prostaglandines ont été identifiées dans des exudats inflammatoires (WILLIS (20), GIROUD et WILLOUGHBY (21)).

Ces auteurs avaient également remarqué que certains acides gras insaturés provoquaient des dilatations vasculaires, accroissaient la perméabilité vasculaire et enfin augmentaient la migration des leucocytes ; tous ces phénomènes étant en faveur d'une intervention de ces acides gras insaturés dans les processus inflammatoires. Plus tard, GIROUD (22) et GIROUD et DUNN (23) identifient chez l'homme et chez l'animal la présence des prostaglandines de type E2 et F2 α dans le culot cellulaire et le surnageant d'exudats inflammatoires.

Dès lors, de nombreux travaux confirment l'existence de ces prostaglandines au niveau de divers types de lésions inflammatoires d'origine immune et non immune (24, 25, 26). Cependant, toutes les prostaglandines ne semblent pas dotées de propriétés inflammatoires. WILLOUGHBY (27), en effet, montre dès 1968 que la prostaglandine de type F2 est susceptible de réduire l'augmentation de perméabilité vasculaire induite par l'histamine et la sérotonine, et de diminuer faiblement les effets du L.N.P.F. (Lymph Node Permeability Factor) dont les effets principaux sont l'action sur la perméabilité vasculaire et la migration leucocytaire.

L'ensemble des travaux menés tendent à prouver que les prostaglandines ne jouent pas un rôle essentiellement pro-inflammatoire, mais que certaines d'entre elles sont susceptibles de présenter des activités anti-inflammatoires.

Elles pourraient donc être de véritables régulateurs du processus inflammatoire.

Enfin, GOLBERG et al. (28) et WILLOUGHBY et al. (29) mettent en évidence une relation entre les prostaglandines de type E et l'AMP-cyclique. Aux variations de PGE, PGF, au cours du processus inflammatoire, correspondraient des variations concomitantes du rapport AMPc/GMPc.

Des données récentes indiquent que les intermédiaires de la voie de synthèse des prostaglandines sont des médiateurs dans les phénomènes inflammatoires (figure 6 p. 22).

Lors de la phagocytose, les phospholipases libèrent, à partir des phospholipides membranaires, des acides gras dont l'acide arachidonique. Celui-ci est le substrat de deux enzymes importantes, la cyclo-oxygénase et la lipoxigénase. La cyclo-oxygénase transforme l'acide arachidonique en endopéroxydes (PGG_2 et PGH_2) qui sont transformés en prostaglandines stables (PGF_2 et $\text{PGF}_{2\alpha}$), thromboxanes, prostacyclines. De son côté, la lipoxigénase fournit l'acide 12 L. Hydroxy. 5.8.10. heptadécatriénoïque (HPETE) qui, sous l'action de peroxydase, conduit à la formation de H.E.T.E., une production d'un radical libre dérivé de l'oxygène moléculaire. D'autre part, ZURIER (30) a prouvé que les polynucléaires libèrent des prostaglandines stables ainsi que des thromboxanes.

De plus, il a été montré que les polynucléaires possèdent des récepteurs pour les prostaglandines stables et que, lorsque ces prostaglandines stables sont exposées à des polynucléaires, la sécrétion lysosomiale est inhibée.

Enfin, WEISSMAN (31) démontre que l'acide arachidonique soumis à un système générateur de superoxyde produit un composé chimiotactique pour les polynucléaires. Ce facteur chimiotactique possède une chimiotaxie aussi importante que le plus puissant produit chimiotactique du complément : le C5a. Ces données sont en faveur d'une potentialisation de la réponse inflammatoire lorsque le superoxyde est élaboré à proximité de l'acide arachidonique libre.

Enfin, sur la figure 6 p. 22, nous avons indiqué les suites d'action des anti-inflammatoires dans la voie de synthèse de l'acide

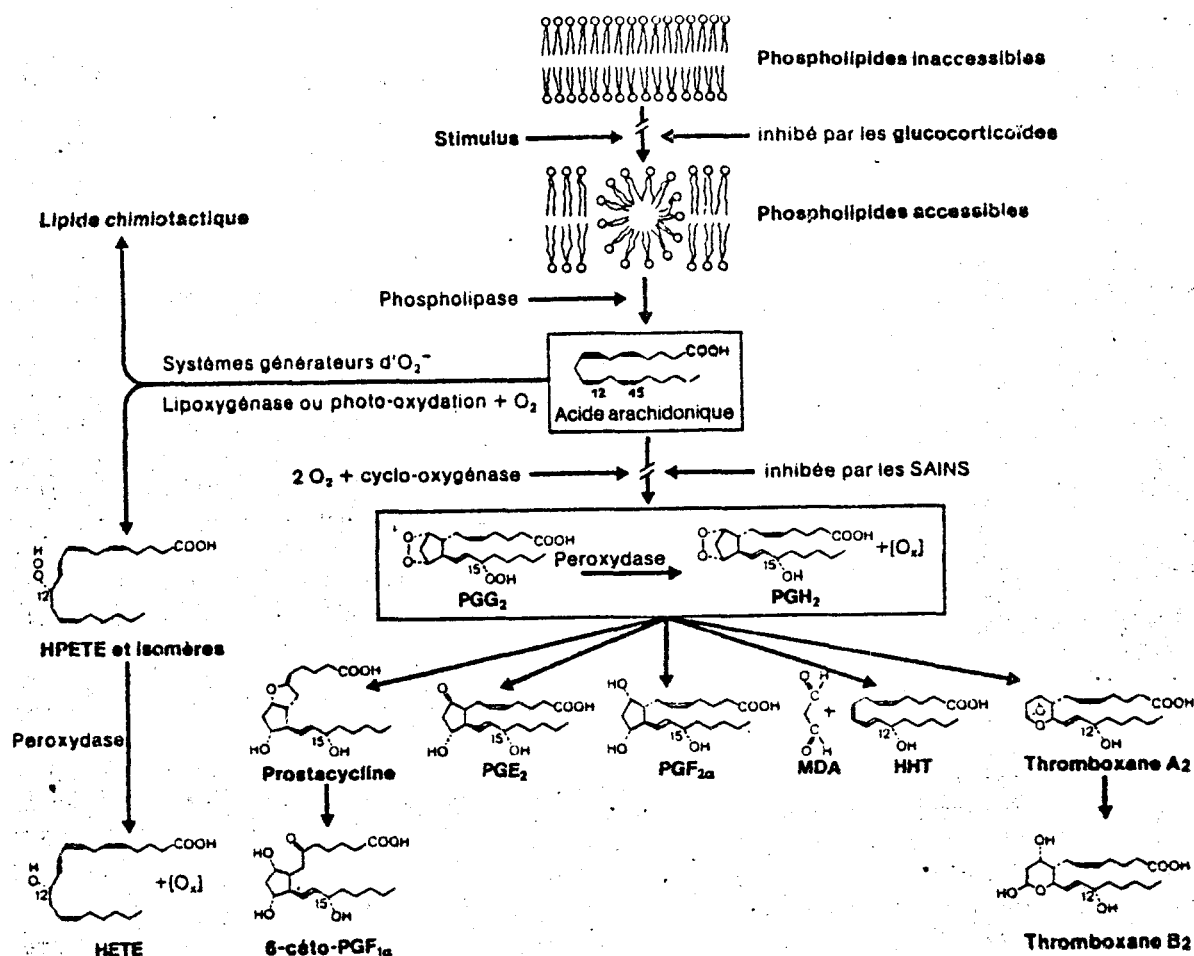


Figure 6

La voie métabolique de l'acide arachidonique. Schéma des réactions par lesquelles les cellules phagocytaires produisent des dérivés biologiquement actifs à partir des acides gras membranaires. Le plus important de ceux-ci est l'acide arachidonique qui est le substrat de deux enzymes importantes : la cyclo-oxygénase (inhibée par des substances anti-inflammatoires non stéroïdiennes, SAINS), et la lipoxygénase. Plusieurs des signes cardinaux de l'inflammation, dont l'accumulation de granulocytes (chimiotaxie), sont provoqués par des endoperoxydes (PGG₂, PGH₂), par le thromboxane A₂, par la prostacycline et par l'HHT (acide¹²-L-hydroxy-5, 8, 10-heptadécatriénoïque), l'HPETE et l'HETE (tous deux produits de l'acide arachidonique élaborés par la lipoxygénase). Les prostaglandines stables (PGE₂, PGF₂) ne sont pas des médiateurs essentiels de l'inflammation. Noter qu'un radical libre (Ox), dérivé de l'oxygène moléculaire, est produit par les deux voies lorsqu'un hydroperoxy-acide (PGG₂, HPETE) est transformé en hydroxy-acide (PGH₂, HETE) (d'après WEISSMANN)⁽³¹⁾

arachidonique : les corticoïdes agissent en bloquant la synthèse de l'acide arachidonique alors que les S.A.I.N.S. (substances anti-inflammatoires non stéroïdiennes) telles que : aspirine et indométacine, interviennent en inhibant la cyclo-oxygénase empêchant la synthèse des prostaglandines.

Nous pouvons donc conclure de l'étude de ces prostaglandines et des dérivés de l'acide arachidonique qu'ils occupent une place essentielle dans les phénomènes inflammatoires comme médiateurs de ce processus.

4 - Les facteurs de la coagulation sanguine :

A. Facteurs de la coagulation sanguine

L'hémostase comporte plusieurs systèmes liés entre eux. Ce sont l'hémostase primaire, la coagulation, le système fibrinolytique.

a) L'hémostase primaire commence par l'adhésion des plaquettes aux fibres sous-endothéliales des parois lésées suivie d'une agrégation plaquettaire. Celle-ci se produit sous l'influence de nombreuses substances telles que : enzymes, virus, endotoxines et complexes antigène-anticorps.

Les plaquettes interviennent donc dans les phénomènes inflammatoires soit par des phénomènes de coagulation, soit par l'intermédiaire des amines vaso-actives qu'elles contiennent (histamine ou sérotonine).

De nombreux mécanismes immunologiques impliquent les plaquettes dans la réaction inflammatoire par agrégation plaquettaire et libération de leur contenu (release), notamment par l'intermédiaire du complément jusqu'au C3 comme nous le verrons par la suite.

BENVENISTE (32) a mis en évidence un médiateur (P.A.F. : Platelet Activating Factor) libéré par les basophiles, capable d'agrégier fortement les plaquettes.

Ce "Platelet Activating Factor" est un phospholipide de poids moléculaire 700, de nature lysophosphotidylcholine, appelé également pour cette raison le lyso-PAF : il provient des phospholipides de la membrane cellulaire et donne naissance ensuite au PAF-ACETHER qui aura pour rôle essentiel de faire agréger les plaquettes sanguines.

Ce PAF est libéré par les basophiles humains non seulement par l'intermédiaire du système IgE-basophiles, mais également par les protéines cationiques des neutrophiles et les fragments C3a et C5a du complément.

Enfin, le PAF peut être libéré par les macrophages au cours de la phagocytose.

La structure chimique du PAF-acéther a été récemment élucidée par deux groupes, celui de J.J. HANAHAN (33) et celui de J. BENVENISTE (34) (voir figure 7 p. 25).

b) Le phénomène de coagulation : la formation de la fibrine se réalise selon deux voies : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

La voie intrinsèque est initiée par l'activation du facteur XII d'HAGEMAN. Le facteur HAGEMAN activé (XIIa) active le P.T.A. (Plasma Thromboplastin Antecedent ou facteur XI).

Le XI active le IX (facteur anti-hémoglobique B). Puis en présence de Ca^{++} , du facteur plaquettaire 3 (F.P.3) qui est un phospholipide, de IXa et de VIII (facteur anti-hémoglobique A) se forme un complexe qui active le facteur Stuart (X). La voie extrinsèque aboutit également à un complexe activant le X et comportant : le facteur VII (proconvertisé), le phospholipide issu de la thromboplastine tissulaire et le Ca^{++} .

Le Xa (facteur de Stuart activé) forme, avec le Ca^{++} , un phospholipide (d'origine plaquettaire ou thromboplastinique) et le V (accélé-rine) un complexe (prothrombinase) qui transforme la prothrombine (II) en thrombine. Les premières traces de thrombine formées accélèrent le

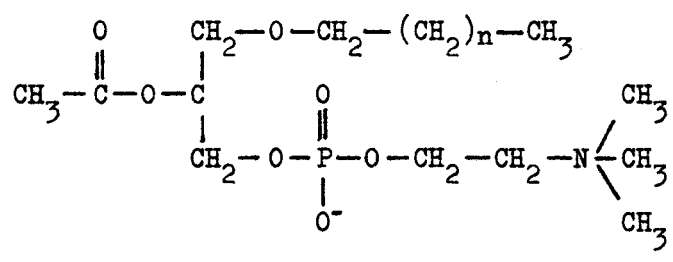


Figure 7

Structure de PAF-acéther ou 1-0 alkyl 2 acétyl-glycéryl-3 phosphoryl-choline (n = 12, 14 ou 16)

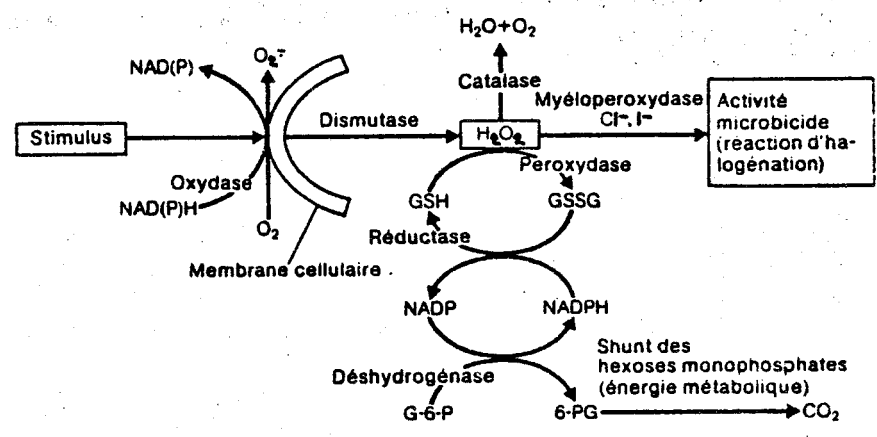


Figure 8

Phénomènes métaboliques suivant la phagocytose ou la rencontre de granulocytes humains avec des stimuli immuns. Les réactions s'enchaînent pour produire des produits oxygénés moléculaires qui jouent un rôle dans l'action microbicide de la cellule et qui activent la voie des hexoses monophosphates. NAD(P) : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) ; NAD(P)H : forme réduite ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; G-6-P : glucose-6-phosphate ; 6-PG : 6-phosphogluconate (D'après WEISSMANN G. (31)



mécanisme en activant le VIII et le V.

Puis, cette même thrombine, lorsque sa concentration s'élève, inhibe VIII et V réalisant une véritable auto-régulation de la coagulation.

c) La fibrinolyse est la dernière étape de l'hémostase : elle constitue également un système en cascade.

Le plasminogène, précurseur inactif, est clivé en plasmine sous l'influence de kinases d'origine pariétale (parois vasculaires) dont les rapports avec l'urokinase sont mal définis.

La plasmine, enzyme protéolytique également polyvalente, a une affinité très marquée pour la fibrine qu'elle détruit en libérant les divers produits de dégradation (P.D.F.).

A ce système lytique s'opposent les anti-activateurs et les anti-plasmines naturelles, d'une grande puissance et qui inhibent toute activité de la plasmine dans les conditions physiologiques.

B. Relations entre les facteurs de la coagulation sanguine avec les kinines d'une part et le complément d'autre part

1) Relation coagulation sanguine et kinines :

La liaison entre l'hémostase et les kinines se trouve au niveau du facteur HAGEMAN.

Dans le plasma, la prékallicréine ne peut être activée que si ce plasma contient du facteur XII. Il semble d'ailleurs que l'activation du facteur XII englobe plusieurs phénomènes ; d'une part, une modification stérique de la molécule qui serait essentielle pour la voie intrinsèque de la coagulation, d'autre part une fragmentation de la molécule avec apparition de fragments de poids moléculaire d'environ 3×10^4 Daltons, dits P.K.A. qui seraient essentiels pour l'activation de la prékallicréine.

Certains intermédiaires d'activation entre le XII et la prékallicréine, décrits sous le nom de PF/Dil (facteur de perméabilité capillaire du plasma dilué) et la prékininogénase II doivent être confondus avec le P.K.A.

De même, outre l'action du XII sur la prékallicréine, la kallikréine pourrait à son tour activer le XII.

2) Relations coagulation sanguine et complément :

Les relations entre le complément et la coagulation peuvent être étudiées schématiquement de la façon suivante :

a) Les enzymes protéolytiques de la coagulation, la plasmine notamment, peuvent agir sur d'autres substrats que le fibrinogène. Les travaux de RATNOFF (35) ont montré que, in vitro, la plasmine peut cliver C1 et la transformer en C1 estérase. Il s'agit donc d'une activation de la séquence complète mais en l'absence d'anticorps.

La plasmine intervient aussi à un autre niveau de la séquence du complément : la plasmine peut cliver directement C3, libérer l'activité anaphylatoxique TAYLOR (36) et WARD (37), et déclencher ainsi l'activation de la voie "alterne".

Ces enzymes protéolytiques, enfin, peuvent même dégrader complètement la molécule C3b et la transformer en C3c et C3d, produits de dégradation terminaux de C3.

b) Le rôle du C6 dans la coagulation a été mis en évidence par les travaux de l'équipe de MULLER-EBERHARD (38).

Chez des lapins carencés héréditairement en C6, ZIMMERMAN et MULLER-EBERHARD (38) ont étudié la coagulation globale et dosé certains facteurs. L'effet de l'adjonction de sérum de lapin normal ou de C6 purifié a été observé. Les lapins carencés en C6 ont un temps de coagulation global très allongé (plus de deux fois supérieur au témoin) et une très faible consommation en prothrombine.

Par contre, tous les facteurs de la coagulation sont présents et les plaquettes sont en nombre normal.

L'apport de C6 purifié corrige toutes les anomalies.

Ces expériences suggèrent une participation du complément et plus précisément du C6 dans la coagulation.

c) Action du complément comme constituant des complexes immuns

Tous les auteurs ne s'accordent pas sur la nécessité d'une intégrité du complément pour obtenir une coagulation intra-vasculaire. L'immuno-adhérence par contre, comme la libération du contenu des plaquettes dépend de la présence du complément.

Les relations entre complément et plaquettes peuvent se faire par l'intermédiaire des complexes immuns circulants.

En effet, les complexes immuns entraînent, in vitro, une agrégation plaquettaire avec libération du contenu des plaquettes (release). A l'inverse, les plaquettes activées par le PAF (Platelet Activating Factor) élaboré par les basophiles, pourraient sécréter l'histamine augmentant la perméabilité capillaire et permettant le dépôt des complexes immuns.

Nous avons résumé les différentes étapes de la coagulation sanguine et les relations entre coagulation et inflammation dans le tableau II p. 29 .

III. LES ELEMENTS CELLULAIRES DE L'INFLAMMATION

La différenciation entre facteurs chimiques et facteurs cellulaires dans le phénomène inflammatoire est trop arbitraire et nous ne la faisons que par souci de clarté, afin de mieux expliciter les divers phénomènes de l'inflammation.

TABEAU II

Relation coagulation et inflammation

Système de coagulation	Mode d'action	Inflammation	Action anti-inflammatoire
Adhésion plaquettaire	→ Sérotonine	Action pro-inflammatoire	Action anti-inflammatoire
Système extrinsèque Facteur XII (HAGEMAN)	→ Active les kallikréinogènes	Augmentation de la perméabilité vasculaire Vasodilatation. Diapédèse par activation du système kininogène-kinine	
Système intrinsèque Thrombine Fibrinogène → Fibrine Plasminogène → Plasmine	→ Active kininogène → Active C3	→ Action chémotactique directe → Diapédèse par facteur chémotactique → Vasodilatation par facteur histamino libérateur	→ Action anticoagulante par libération d'héparine → Anti-inflammatoire par destruction de la fibrine → Par activation des autres protéases → Par destruction du C3



Cependant, il ne faudra à aucun moment séparer les facteurs chimiques des facteurs cellulaires, ceux-ci étant trop étroitement liés les uns aux autres.

Nous verrons donc successivement les deux fonctions cellulaires les plus importantes, à savoir d'une part la fonction phagocytaire (polynucléaires et macrophages) et d'autre part les autres fonctions dont la fonction sécrétoire (lymphocytes, plasmocytes, fibroblastes et histiocytes).

1 - La fonction phagocytaire :

a) Les polynucléaires et les macrophages :

Ce sont eux qui interviennent les premiers sur les lieux du foyer inflammatoire.

Les polynucléaires neutrophiles sont constamment retrouvés dans les phénomènes inflammatoires aigus. Le neutrophile est élaboré dans la moelle osseuse grâce à un processus de maturation qui se caractérise par la production de deux types de granules : les granules azurophiles formés par les myélocytes (BAINTON et al. (39)). Les caractères biochimiques des granules ont fait l'objet de travaux depuis dix ans. Ces granules ont été séparés selon deux techniques, soit par sédimentation globulaire soit par centrifugation isopycniqne et leurs constituants ont été précisés :

enzymes microbicides (lysozyme et myéloperoxydase dans les granules azurophiles, lysozyme seul dans les granules spécifiques), protéases neutres (élastase, cathepsine G, protéinase 3 dans le granule azurophile, collagénase dans le granule spécifique), hydrolases acides uniquement dans le granule azurophile (béta-glucuronidase, béta-N acétyl gluco-aminidase, cathepsines B et D), enfin dans le granule spécifique on note la présence de lacto-transférine et de protéines liant la vitamine B12 (BAGGIOLINI (40)).

Lors de la phagocytose, les polynucléaires commencent par marginer le long de la paroi endothéliale, puis traversent la paroi par diapédèse ; les polynucléaires englobent alors les différents corps "étrangers" parfois après opsonisation de ces facteurs (souvent due au complément qui recouvre la particule à phagocyter et libère les facteurs chimiotactiques attirant les polynucléaires). Ceci précède alors la phagocytose elle-même.

Les macrophages contrairement aux neutrophiles sont des cellules à longue durée de vie. Les macrophages, outre leurs fonctions endocellulaires, possèdent des activités sécrétoires importantes. Les macrophages proviennent des monocytes circulants ou des histiocytes fixes du tissu conjonctif. Ils interviennent juste après les polynucléaires. L'activation du macrophage définit diverses modifications fonctionnelles de celui-ci. En effet, l'activation du macrophage a pour conséquence une sécrétion et production beaucoup plus importante d'enzymes digestives. Par exemple, la sécrétion de protéinases neutres telles que l'activateur du plasminogène, l'élastase et la collagénase est accrue chez les macrophages activés par rapport à celle observée chez le macrophage au repos. Par contre, la sécrétion des enzymes lysosomiales se fait dans les deux situations : activation ou repos.

Les macrophages sont activés et retenus dans la zone par le M.I.F. (Migrating Inhibitor Factor) sécrété par les lymphocytes. La présence de L-fucose sur la surface du macrophage semble indispensable à l'inter-action M.I.F. - macrophage (REMOLD) (41).

Les médiateurs lymphocytaires interviennent sur le macrophage en provoquant des modifications biochimiques (augmentation de l'absorption du calcium, de la glucosamine, production de prostaglandines, production de l'activateur du plasminogène et du composant C2 du complément)

et des modifications fonctionnelles (augmentation de la pinocytose, de l'activité microbicide ou microbiostatique, de la cyto-toxicité anti-tumorale ; ces deux dernières activités étant stimulées par le M.A.F. : Macrophage Activating Factor).

Enfin, l'activation des macrophages peut se faire par d'autres voies faisant intervenir l'interféron, des inducteurs d'interféron et les complexes immuns à IgE.

b) La phagocytose :

Les principaux stimuli des phagocytes sont des particules phagocytées. Il peut s'agir de micro-organismes opsonisés, de complexes immuns, de débris cellulaires ou tissulaires ou de particules-témoins comme des cellules de levures, du zymosan, des erythrocytes et des grains de latex.

Les phagocytes répondent aux particules qu'ils reconnaissent spécifiquement grâce à des récepteurs de surface par un accroissement de la consommation d'oxygène et de la production de superoxyde, par la formation d'une vacuole phagocytaire autour de la particule étrangère et par la libération d'enzymes stockées dans les granules (neutrophiles) ou les lysosomes (macrophages).

De nombreux matériaux inflammatoires sont libérés par les phagocytes quand ils sont soumis à des stimuli phagocytaires : c'est ainsi que les granulocytes humains exposés aux complexes immuns ou à des particules opsonisées libèrent des protéases neutres et des produits de la série de l'acide arachidonique tels que endo-peroxydes, thromboxanes et prostaglandines.

A partir d'une oxydase de surface, des produits toxiques dérivés de l'oxygène, comme le superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyl (OH), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène natif O_2 sont élaborés.

Les protéases sont antagonisées par des inhibiteurs de protéases plasmatiques (α 1 antitrypsine, α 2 macroglobuline), les endoperoxydes actifs (PGG2, PGH2) sont métabolisés en prostaglandines stables et en thromboxanes (TxA2, B2).

Enfin, la céruloplasmine capte les radicaux libres dérivés de l'oxygène (WEISSMANN (31)).

La phagocytose induit la libération du contenu des granules azurophiles (protéases neutres, myéloperoxydase), des granules spécifiques (lysosyme, lactotransférine) et des dérivés oxygénés toxiques, ce qui peut être décrit comme un couplage stimulus-sécrétion dans les polynucléaires humains.

Les différentes phases du couplage stimulus-sécrétion sont les suivantes :

1) Fixation du ligand aux récepteurs de surface du polynucléaire

Parmi les récepteurs, les mieux caractérisés du polynucléaire pour le stimuli-externe se trouvent les récepteurs Fc à la surface de la membrane plasmatisque (MESSNER et SELINEK) (42). Ceux-ci sont plutôt attirés par les immunoglobulines agrégées. Le déclenchement des récepteurs de surface Fc induit la sécrétion d'hydrolases lysosomiales lorsque l'immuno-globuline agrégée touche les récepteurs à la surface de la cellule (GOLDSTEIN et al.) (43).

2) Hyperpolarisation de la membrane

Cette hyperpolarisation de la membrane s'accompagne d'une perte locale de calcium et production d'anion superoxyde qui se transforme spontanément en H2O2 en solution aqueuse. Quand ceci se produit dans le phagosome, H2O2 et la myéloperoxydase, en présence d'un halogène, constituent le système microbicide de KLEBANOFF (44). L'eau oxygénée a pour effet une réaction en chaîne qui se termine par le shunt des hexoses monophosphates

(figure 8 p. 25). Ceci est suivi par la production de thromboxanes et de prostaglandines à partir des acides gras membranaires (voir paragraphe Prostaglandines).

3) Condensation locale des micro-filaments situés sous la membrane avec association des micro-tubules.

Les granules spécifiques et azurophiles fusionnent avec la membrane plasmique après déversement des enzymes dont le lysosyme pour les granules spécifiques.

Nous avons rassemblé les étapes de la phagocytose dans les figures 9 et 10 p. 35 et 36.

La phagocytose aboutit donc à la digestion complète de l'organisme étranger et à l'excrétion des déchets hors de la cellule.

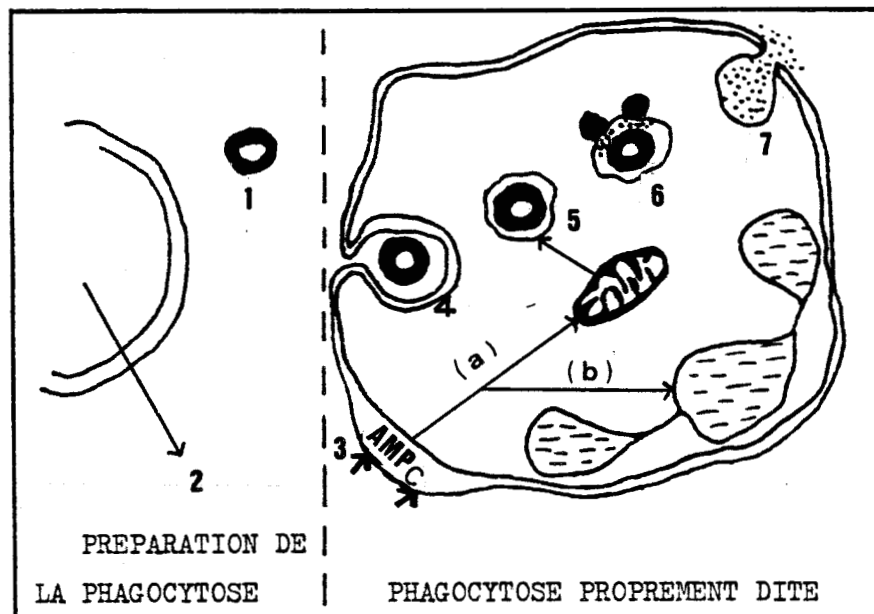
Cependant, la cellule peut mourir et dans ce cas, le déversement des enzymes lysosomiales dans les tissus voisins peut aggraver les lésions tissulaires et entraîner la libération de fragments antigéniques qui, à leur tour, sensibilisent les lymphocytes et induisent la synthèse d'anticorps responsables de la chronicité de l'inflammation.

Enfin, certains corps étrangers ne peuvent être digérés par les enzymes de la vacuole digestive, ainsi les particules d'amiante, de silice ou les cristaux d'urate de sodium, ce qui aboutit à la persistance de l'agent irritant et à la chronicité de l'état inflammatoire : ce sont les tristes conséquences de l'abestose, de la silicose, des crises de goutte.

2 - Les autres fonctions :

a) Les lymphocytes :

Les lymphocytes caractérisent par leur présence les réactions inflammatoires dans lesquelles l'immunité cellulaire est mise en jeu. Ils peuvent se transformer en lymphoblastes ou en immunoblastes. Les lympho-



(a) Active la respiration

(b) Active la synthèse

Figure 9 (d'après AMOR(3))

La phagocytose : préparation et déroulement

- 1) Opsonisation
- 2) Diapédèse ; kinines, C_3' et C_5' peptide ; facteur chémotactique
- 3) Récepteurs de la paroi
- 4) Englobement
- 5) Bactéricidie $H_2 O_2$
- 6) Digestion - dégranulation - lysosome
- 7) Libération d'enzymes



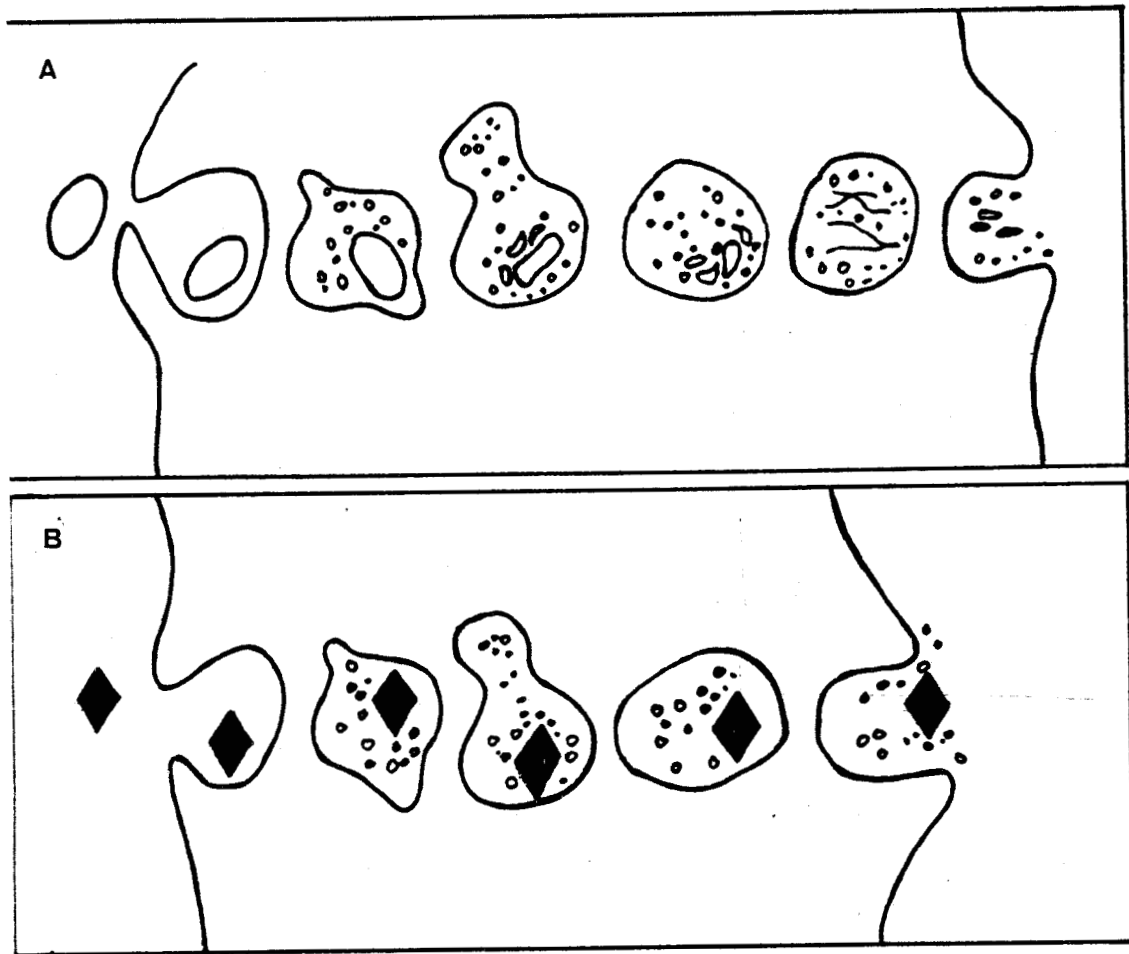


Figure 10

La membrane de la cellule mononucléaire s'invagine autour du corps étranger, bactérie, corps cristallin, qu'elle englobe : c'est l'endocytose.

Voie A : la vacuole de phagocytose ainsi formée fusionne avec un lysosome en une vacuole digestive. Là, les enzymes lysosomiales attaquent et détruisent le corps étranger.

Voie B : si ce dernier résiste (comme les cristaux d'urate), il est rejeté avec les enzymes destructrices lysosomiales dans les tissus extérieurs qui sont lésés (crise inflammatoire de goutte) - (WILLOUGHBY) (45)

cytes sensibilisés par un antigène spécifique libèrent au contact de cet antigène les lymphokines. Dès 1963, WILLOUGHBY et al. (5) ont isolé à partir des lymphocytes le L.N.P.F. (Lymph Node Permeability Factor) dont ils ont démontré "in vivo" les actions sur la perméabilité vasculaire et la migration leucocytaire.

Les lymphokines interviennent principalement dans les manifestations d'immunité cellulaire, d'origine infectieuse, dans les réactions d'hypersensibilité retardée et dans les phénomènes inflammatoires les accompagnant. Chaque lymphokine peut être responsable d'une action différente. Comme nous l'avons vu précédemment, le L.N.P.F. a une action sur la perméabilité vasculaire et la migration leucocytaire. Une autre lymphokine est cyto-toxique. Le M.I.F. (Migration Inhibitory Factor) provoque la fixation et l'activation des macrophages dans la zone de conflit. Ce M.I.F. peut prendre le nom de M.A.F. (Macrophage Activating Factor) ; les deux termes continuant à être utilisés, leur caractérisation n'étant pas suffisamment avancée pour apporter la preuve directe de leur identité. Cependant, des travaux de REMOLD et LIU (46) montrent que, dans les deux cas (M.I.F. et M.A.F.), les récepteurs membranaires de ces deux médiateurs sont des fuco. et sialogangliosides.

b) Les plasmocytes :

Ils n'agissent pas directement, mais par la sécrétion des anticorps qui, en présence de l'antigène spécifique, vont déclencher la réaction inflammatoire par l'intermédiaire de l'activation du complément et du système des kinines.

c) Les histiocytes et les fibroblastes :

Ces cellules interviennent par leurs produits de sécrétion. Les cellules du tissu conjonctif en se multipliant et en sécrétant la substance fondamentale et les fibres du collagène, sont l'élément essentiel de la formation d'un granulome inflammatoire si l'inflammation se

prolonge ou assurent la cicatrisation du foyer inflammatoire.

IV. CONCLUSION

La distinction que nous avons faite entre facteurs sériques et facteurs cellulaires ne doit être évidente que dans un but de clarification du phénomène inflammatoire.

En effet, il est impensable de dissocier ces divers facteurs dans la réaction inflammatoire.

De même, nous avons essentiellement étudié les aspects biochimiques de l'inflammation : il est évident que s'y rattachent également toutes les variations biologiques dues à ce phénomène.

L'ensemble du processus inflammatoire est illustré dans la figure 11 p. 39 empruntée à AMOR (3), et la figure 12 p. 41.

Dans cette figure, sont résumés les principaux aspects de la réaction inflammatoire. Pour résumer le scénario de cette réaction, nous pouvons prendre le cas de la polyarthrite rhumatoïde, ceci afin de mieux situer l'action des anti-inflammatoires.

La polyarthrite rhumatoïde débiterait par une erreur du système immunitaire. Des molécules figurant à la surface des cellules composant les membranes synoviales sont reconnues par erreur comme étrangères à l'organisme et deviennent des cibles pour les lymphocytes tueurs. Ceux-ci déversent alors au contact des cellules cibles leurs enzymes lysosomiales contenues dans les lysosomes. Selon d'autres hypothèses, l'attaque des cellules synoviales résulterait du dépôt, à leur niveau, de complexes immunologiques. Ceux-ci ont la propriété d'amorcer une cascade de réactions enzymatiques avec le complément. A la fin de cette réaction en chaîne, des enzymes sont formées qui activent une enzyme liée, sous

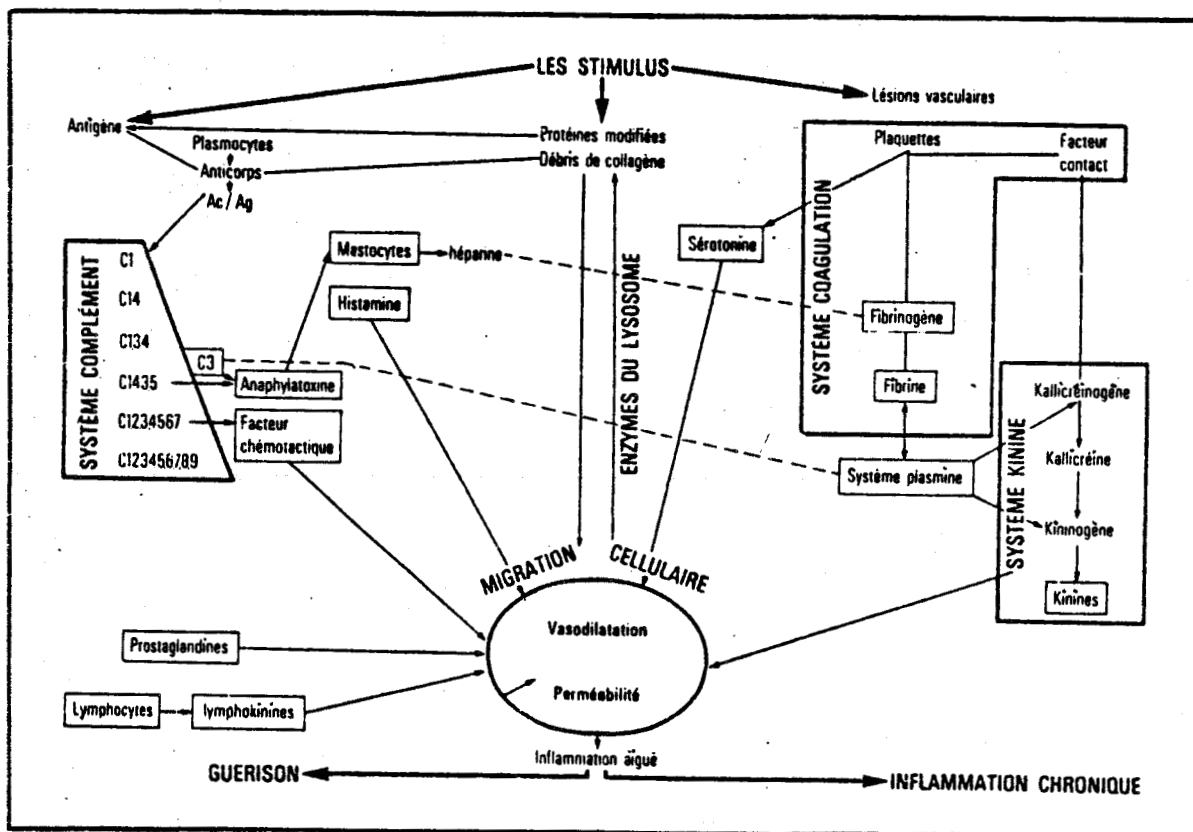


Figure 11

Schéma général de l'inflammation. (AMOR) (3)



forme non active, à la membrane cellulaire : la phospholipase A2. C'est cette enzyme qui va être à l'origine de la lésion de la membrane cellulaire et du déclenchement des réactions inflammatoires.

La phospholipase A2, en effet, est capable de cliver les phospholipides composant les membranes des cellules.

De même, pour le cas des membranes lésées par les lymphocytes tueurs, la phospholipase A2 paraît être dans les enzymes lysosomiales. La phospholipase A2 est à l'origine des médiateurs de l'inflammation par le fait qu'elle libère, à partir des phospholipides de la membrane, un acide gras à 20 atomes de carbone : l'acide arachidonique. Ce dernier est alors le substrat de deux enzymes : d'une part la cyclo-oxygénase, d'autre part la lipoxygénase. L'action de la cyclo-oxygénase conduit à la formation des prostaglandines qui sont capables seules ou avec d'autres médiateurs, libérés par les globules blancs dans la zone enflammée, de provoquer les principaux symptômes de l'inflammation : vaso-dilatation, diapédèse, excitation des fibres nerveuses spécialisées dans la perception de la douleur. L'action de la lipoxygénase conduit d'une part à toute une gamme de molécules à 20 atomes de carbone : les acides hydroxy-eicosatétraénoïques ou HETE. Ces HETE ont comme rôle d'attirer par chimiotactisme diverses catégories de globules blancs tels que leucocytes polynucléaires et macrophages, c'est-à-dire les globules blancs capables de phagocyter les débris cellulaires, les agrégats de molécules, etc. A leur tour, les globules blancs se mettent à déverser dans le milieu des enzymes lysosomiales ou bien des prostaglandines ou encore d'autres médiateurs tels que le P.A.F. (Platelet Activating Factor). Ce dernier va se faire agréger les plaquettes sanguines qui libèrent, à leur tour, de nombreux médiateurs de l'inflammation : des amines telles que l'histamine ou la sérotonine (vaso-dilatation), des enzymes telles que les protéases et enfin des prostaglandines.

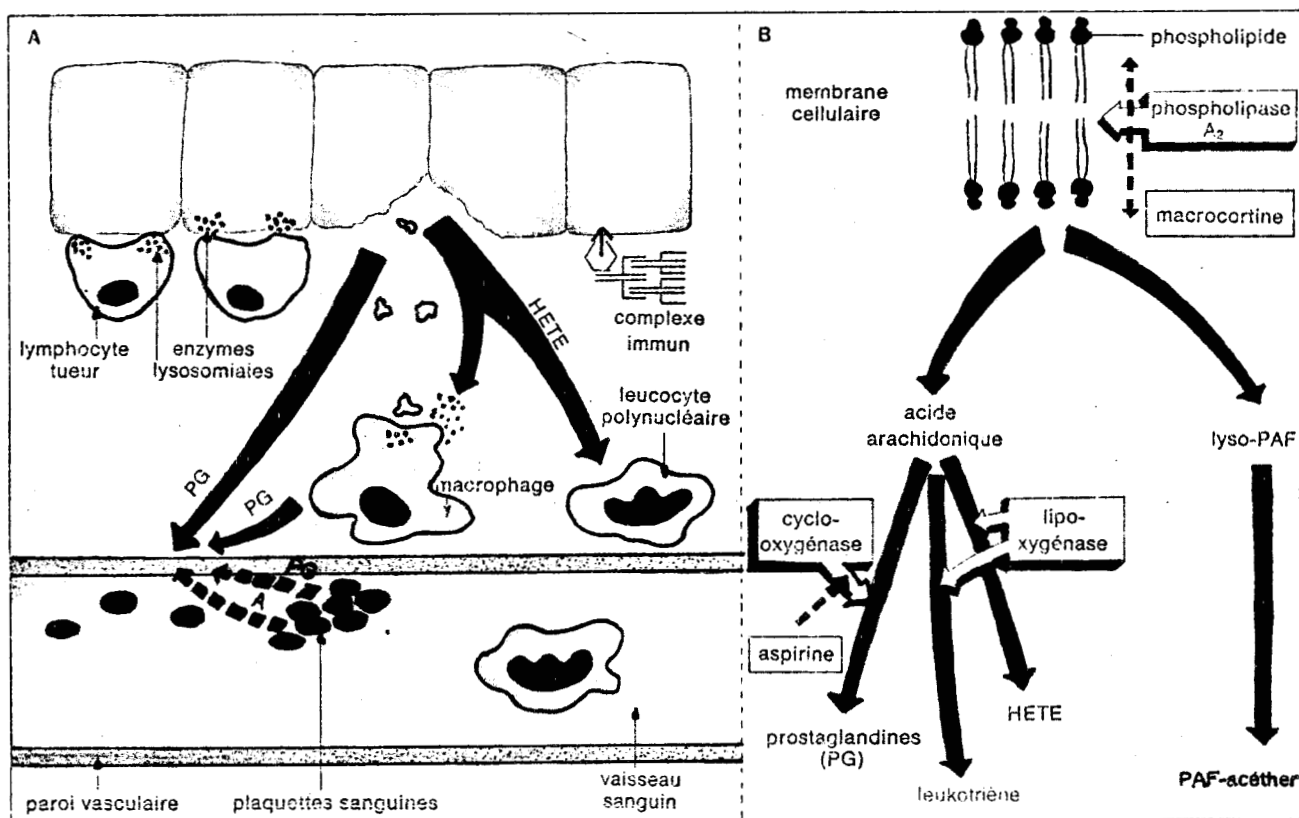


Figure 12

Schéma d'une réaction inflammatoire typique (rhumatismes)

- A. Différents éléments cellulaires sont impliqués dans cette réaction avec libération de divers médiateurs tels que prostaglandines (PG), H.E.T.E. et amines (A).
- B. Déclenchement de la libération des médiateurs de l'inflammation à partir des phospholipides de la membrane cellulaire.

D'après BLANC (47)



D'autre part, la lipoxigénase par action sur l'acide arachidonique conduit à la synthèse de dérivés à 20 atomes de carbone : les leukotriènes. Ces substances agissent soit sur les cellules cibles, soit sur les vaisseaux pour augmenter leur dilatation.

L'étude de ces différents aspects de la réponse inflammatoire a conduit à la découverte et à la connaissance de médicaments agissant à divers moments ou à divers endroits de la réponse inflammatoire.

V. LES ANTI-INFLAMMATOIRES

Nous étudierons rapidement les anti-inflammatoires physiologiques et les médicaments anti-inflammatoires.

1 - Les anti-inflammatoires physiologiques :

Ils proviennent des cellules telles que polynucléaires et macrophages, du foie et des hormones.

a) Les cellules :

Les polynucléaires et les macrophages détruisent grâce à la phagocytose certains stimuli de l'inflammation.

b) Le rôle du foie :

La synthèse dans le foie de certains protides à action anti- ou pro-inflammatoire montre le rôle de cet organe.

Par exemple, certains protides sont inflammatoires tels que facteurs de la coagulation, callicréines et kinines.

Dans la phase aiguë de l'inflammation, on peut mettre en évidence des anti-protéases : α 1 anti-trypsine et α 2 macroglobuline.

c) Les hormones :

De nombreuses hormones ont une activité anti-inflammatoire telles que :

- l'adrénaline et la Nor-adrénaline qui luttent contre la vaso-dilatation capillaire ;
- les gluco-corticostéroïdes tels que le cortisol, la cortisone. Ces hormones stimulent le catabolisme protéique et la néo-glucogénèse au niveau du foie. Elles agissent aussi sur les tissus conjonctifs et lymphoïdes en diminuant la perméabilité membranaire et en s'opposant aux processus inflammatoires.

d) Les prostaglandines :

Les prostaglandines augmentent la perméabilité capillaire et sensibilisent à la douleur et surtout, potentialisent ces effets avec d'autres médiateurs.

Toutes ne sont pas dotées d'activité pro-inflammatoire et elles pourraient être de véritables régulateurs du processus inflammatoire.

2 - Les médicaments anti-inflammatoires :

Les substances anti-inflammatoires se classent en trois groupes : les gluco-corticoïdes et l'A.C.T.H., les non-stéroïdiens, les enzymes et certains immuno-dépresseurs.

a) Les gluco-corticoïdes :

Ils inhibent le processus de phosphorylation oxydative en coupant la chaîne de transfert des électrons, c'est-à-dire le système des cytochromes dans les mitochondries.

Leurs principales propriétés sont les suivantes :

- inhibition de la formation des complexes Ag-Ac
- ralentissement de la migration cellulaire et de la phagocytose
- stabilisation de la membrane lysosomiale
- inhibition des médiateurs phlogogènes libérés par les enzymes lysosomiales
- inhibition de la prolifération histio-macrophagique et fibroblastique, de la synthèse des mucopolysaccharides et du tissu collagène

- inhibition de l'activation du callicrénogène en callicréine active.

D'autre part, les gluco-corticoïdes sont lymphocytolytiques.

Les stéroïdiens les plus connus sont : la cortisone, l'hydroxycortisone et les cortisoniques.

Leurs effets secondaires indésirables sont nombreux :

- effets endocriniens
- effets immunodépresseurs
- effets métaboliques ; ex. : rétention hydrosodée
- effets neuropsychiques ; ex. : euphorie ou dépression, psychoses, etc/
- effets oculaires
- effets cardio-vasculaires : hypertension artérielle.

L'action exacte de ces médicaments commence à se dévoiler en 1975, quand GRYGLEWSKI et al. (48) montrent qu'ils empêchent la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires en inhibant l'activité des phospholipases lysosomiales.

Cela démontre en outre pourquoi les corti-costéroïdes sont de plus puissants anti-inflammatoires que l'aspirine puisqu'en empêchant la libération de l'acide arachidonique, la formation à la fois des prostaglandines et des HETE (acides hydroxy-eicosatétraénoïques) ne se fait pas.

Ces travaux furent confirmés et affinés par l'équipe de G.J. BLACKWELL, R.L. FLOWER et J.R. VANE (49) qui précisent que la phospholipase inhibée par les corticostéroïdes était la phospholipase A2.

En 1978, A. DANON et G. ASSOULINE (50) montrent que l'action anti-inflammatoire des corticostéroïdes nécessite la mise en action, dans les cellules cibles de ces hormones, de la machinerie de synthèse des protéines.

Enfin, en 1979, les travaux de F. RUSSO-MARIE, M. PAING et D. DUVAL (51), montrent que les corticostéroïdes pénètrent dans les cellules cibles et se lient à des protéines particulières, fonctionnant comme récepteur hormonal spécifique au sein des cellules.

En 1979, R.J. FLOWER et G.J. BLACKWELL (52) prouvent que le complexe récepteur-hormone migre jusqu'au noyau, induisant l'activation d'un gène particulier et la synthèse d'une protéine particulière qui inhibe alors la phospholipase A2.

Ce résultat devait être confirmé par une équipe italienne (53) et ils baptisent cette protéine la macro-cortine (figure 12 p. 41). Ainsi donc, cette protéine, synthétisée après l'action des corticostéroïdes sur les cellules cibles, inhibe la phospholipase A2, empêchant donc la formation des prostaglandines et des HETE tous issus de l'acide arachidonique.

De plus, selon des travaux récents des équipes de J. POLONSKY et de J. BENVENISTE (54), le PAF-acéther serait synthétisé à partir d'un précurseur appelé le Lyso-PAF (P.A.F. : Platelet Activating Factor). Or, celui-ci est libéré à partir des phospholipides des membranes par la phospholipase A2.

Si ce résultat est confirmé, on comprend alors le pourquoi de la puissance anti-inflammatoire des corticostéroïdes : en effet, la macro-cortine inhiberait les principaux médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines, les HETE et le PAF-acéther.

On voit donc l'intérêt que suscite cette macro-cortine car, en la produisant en grande quantité (grâce au génie génétique), il serait possible de posséder un anti-inflammatoire aussi puissant que les corticostéroïdes mais ne possédant plus les effets secondaires de ces derniers.

b) Les non-stéroïdiens :

a') Les hydroxy-benzoates : dérivés salicylés

In vitro, les dérivés salicylés altèrent la phosphorylation oxydative. Le résultat est une inhibition de la formation d'A.T.P. donc, des réactions énergétiques.

Leurs principales actions sont :

- ralentissement de la migration leucocytaire et de la phagocytose
- diminution de la synthèse des prostaglandines phlogogènes
- inhibition de l'activation callicréinogène-callicréine
- prévention de la dénaturation protéique
- in vitro, diminution de l'agrégation plaquettaire
- inhibition de la libération des lysosomes des polynucléaires et protection de la membrane lysosomiale
- diminution du taux de complément par l'aspirine chez les malades atteints de polyarthrite aiguë.

L'action la plus précise de l'aspirine est l'inhibition qu'elle provoque au niveau de la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique, c'est-à-dire son action sur la cyclo-oxygénase (voir figure 12 p. 41).

b') Les dérivés pyrazoles :

La phénylbutazone découple la phosphorylation oxydative. In vitro, elle inhibe la Glucose-6-phosphatase et la 6-phosphogluconate deshydrogénase.

Leurs principales actions sont :

- inhibition de la synthèse de l'acide hyaluronique par les fibroblastes stimulés par les leucocytes -YARON et al. (55)
- prévention de la dénaturation protéique par la chaleur (56)
- inhibition de la libération des enzymes lysosomiales
- modification physique des mononucléaires.

Enfin, la phénylbutazone est douée de propriété fibrinolytique.

c') Les dérivés indoliques :

Telle que indométacine qui, comme la phénylbutazone et les salicylates, découple la phosphorylation oxydative. Elle inhibe l'histidine décarboxylase et la dopa-décarboxylase, enzymes qui induisent normalement la formation de l'histamine à partir de l'histidine et de la sérotonine à partir de la dihydroxyphénylalanine (Dopa).

L'indométacine inhibe la synthèse des prostaglandines phlogogènes (57),

- diminue la mobilité des polynucléaires (58)
- supprime la synthèse de l'acide hyaluronique par les fibroblastes stimulés par les leucocytes in vitro (55)
- diminue la prolifération histio-fibroblastique et la synthèse des mucopolysaccharides et du tissu collagène (59).

L'indométacine provoque des modifications physiques des leucocytes, inhibe l'activité protéolytique des enzymes lysosomiales, protège la membrane du lysosome, inhibe le facteur XII HAGEMAN et le système fibrinolytique in vitro, ainsi que le L.N.P.F. (Lymph Node Permeability Factor).

d') Les dérivés anthraniliques :

Tels que l'acide méfénamique et l'acide flufénamique qui découplent la réaction de phosphorylation de la réaction d'oxydation.

Actions diverses de l'acide flufénamique :

- prévention de la dénaturation protéique
- action fibrinolytique in vitro.

e') Les dérivés de l'acide isonicotinique :

Tels que l'acide niflumique qui a un pouvoir fibrinolytique.

f') Les dérivés phénothiaziniques :

Ex. : acide métiazinique.

g') Les dérivés arylalcanoïques :

Tels que Isoprofen, Naproxen, etc.

Naproxen, anti-inflammatoire exploité par les Laboratoires CASSENNE, est un dérivé de l'acide naphtyl-2-acétique. La formule exacte de ce médicament est l'acide + (méthoxy-6-naphtyl-2) -2- propionique.

Le Naproxen s'est révélé, en ce qui concerne les effets anti-inflammatoires, analgésique et antipyrétique chez les animaux, 11 fois plus actif que la phénylbutazone et 7 à 22 fois plus actif que l'acide acétyl-salicylique.

Son efficacité a été prouvée dans de nombreuses maladies ou phénomènes inflammatoires tels que le traitement des crises aiguës de goutte, arthropathies dégénératives, l'ostéo-arthrite, la spondylite ankylosante ou encore la polyarthrite rhumatoïde.

Son mode d'action semble identique à celui de l'aspirine ou de l'indométacine, à savoir une inhibition de la synthèse des prostaglandines (FERREIRA et al. (57) 1971 et VANE (60) 1971).

h') La colchicine :

Elle fait baisser la respiration cellulaire des polynucléaires et leur mobilité ainsi que leur réponse aux substances chimiotactiques.

Elle supprime le pouvoir des polynucléaires d'induire la formation de kinine à partir du kininogène plasmatique.

Enfin, elle diminue la libération des enzymes lysosomiales et la formation du phagosome.

Son action est d'empêcher la phagocytose des cristaux d'urate.

i') Les anti-malariques :

Tels que la chloroquine qui agit en inhibant la phosphorylation oxydative.

j') Les sels d'or :

In vitro, ils s'opposent à la dénaturation protéique en se liant aux radicaux SH, en outre ils inhibent les enzymes lysosomiales.

Les effets indésirables de ces anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont les suivants :

- effets digestifs
- accidents allergiques
- accidents hématologiques
- accidents neurosensoriels.
- rétention hydro-sodée au niveau des reins.

c) Les enzymes et anti-enzymes :

Certaines enzymes possèdent des activités phlogogènes après injection locale : par exemple, la trypsine, l'alphachymotrypsine, les bromélaïnes, les mucopolysaccharidases et la ribonucléase qui agissent en dégradant les protéines et les acides ribonucléiques formés au cours de l'inflammation (BROUIHET et al.) (61).

Les anti-enzymes comme le zymofren et l'iniprol possèdent une activité anti-enzymatique sur la trypsine, l'alphachymotrypsine et sur les peptidases.

L'effet anti-enzyme protéolytique joue un rôle important : notamment par leurs propriétés anti-phlogistiques (DI ROSA et al.) (62).

d) Les immunodépresseurs :

Certains anti-métabolistes ont une activité anti-inflammatoire intrinsèque s'ajoutant à leurs pouvoirs anti-néoplasique et immunodépresseur.

Cette activité anti-métabolique est peu spécifique et s'exerce sur de nombreuses cellules telles que cellules néoplasiques, immunocompétentes, inflammation, etc.

Nous venons de définir rapidement les principaux médicaments anti-inflammatoires connus.

De nombreuses recherches continuent dans ce domaine afin de trouver de nouveaux remèdes à ce phénomène inflammatoire qui a de si nombreux points d'impacts.

L'avenir appartient donc à la découverte d'anti-inflammatoires naturels qui posséderont le moins d'effets secondaires possibles : c'est le but que s'est fixé le Laboratoire CASSENNE en étudiant de nouveaux extraits bactériens dotés d'activité anti-inflammatoire.

—

TRAVAUX
PERSONNELS

I. PREPARATION DU PRINCIPE ACTIF *

Pour cette préparation du principe actif RC 1292, nous allons voir successivement les principaux stades de cette préparation :
stade A - la culture ; stade B - la lyse ; stade C - les extractions ;
stade D - la diafiltration.

Préparation de glycoprotéines à partir d'une culture d'Enterobacter Agglomerans

Stade A : Culture

On prépare un milieu de culture répondant à la formule suivante :

- Extrait de viande	200 g
- Chlorure de sodium	200 g
- Peptone de caséine	200 g
- Autolysat de levure	200 g
- Phosphate bipotassique	140 g
- Phosphate monopotassique	60 g
- Glucose	400 g
- Peptone papaïnique de soja	800 g
- Eau distillée	q.s.p. 40 litres

On prépare le milieu de culture en mélangeant successivement l'extrait de viande, le chlorure de sodium, la peptone de caséine, l'autolysat de levure, le phosphate bipotassique et le phosphate monopotassique dans environ 20 litres d'eau distillée. On ajuste le pH à 7,4 - 7,6.

On stérilise le milieu à 120°C pendant 40 minutes.

* Cette préparation est effectuée aux Laboratoires CASSENNE. Le travail qui nous a été confié est réalisé à partir du produit diafiltré sur membrane XM300.

Les solutions de glucose et de peptone papaïnique de soja sont introduites dans le milieu de culture au moment de l'ansemencement après avoir été stérilisées au préalable.

La souche d'Aerobacter Cloacae (souche Institut Pasteur n° 5549), cultivée sur milieu gélosé, est diluée dans 50 cm³ de milieu de culture additionné de billes de verre. Cette solution servant d'inoculum est introduite dans le reste du bouillon de culture. Le volume total du milieu de culture se trouve ainsi complété à 40 litres.

Le milieu de culture est maintenu à 37°C.

Le pH est maintenu automatiquement entre 7,4 et 7,6 (par addition de solution d'ammoniaque N/10 ou par addition de solution d'acide chlorhydrique N/10). Le débit de l'air est fixé à 4 l/minute et la vitesse d'agitation à 450 tours/minute.

La croissance des germes est appréciée au photomètre ; le nombre de germes est calculé en fonction de la densité optique déterminée en comparaison avec une courbe étalon.

Après complet développement, soit environ après 7 heures, le milieu renferme environ 100 milliards de germes au cm³.

Stade B : la lyse

A environ 40 litres de bouillon de culture obtenu au stade A ci-dessus, on ajoute une solution aqueuse de chlorhydrate de lysozyme (stérilisée par filtration sur membrane millipore 0,22 μ dans la proportion de 80 $\%$ de chlorhydrate de lysozyme par cm³ de milieu de culture.

On laisse en contact 1 heure à 56°C en présence de 0,25 g d'EDTA par litre de milieu de culture, de 34,5 cm³/l de milieu de culture d'une solution de mercurothiolate sodique à 2,5% et de 103 cm³/l de milieu de culture d'une solution de polysorbate commercialisée sous le nom de Tween 80 (solution à 33 %).

On poursuit la lyse dans des conditions stériles pendant 41 jours à 37°C.

On recueille le lysat, homogénéise par agitation puis lyophilise.

On obtient 2 926 g d'une poudre brun-jaune.

Stade C : Extraction

a) Par l'acétone :

On met en suspension dans 20 litres d'acétone froid la totalité de la poudre obtenue au stade B ci-dessus, puis agite vigoureusement pendant 4 heures à 1 500 tours par minute.

Après 4 heures, la suspension obtenue est décantée, la plus grande partie du surnageant est soutirée par siphonnage, le restant de la suspension est filtré sur verre fritté.

La poudre essorée est remise en suspension dans 10 litres d'acétone. La suspension est agitée, comme précédemment pendant 2 heures, puis filtrée sur verre fritté.

L'insoluble est séché à température ambiante sous vide pendant 24 heures.

On recueille 1 760 g d'une poudre beige clair.

b) Par le méthanol :

On met en suspension dans 20 litres de méthanol 1 760 g de la poudre obtenue ci-dessus et agite vigoureusement pendant 4 heures à 1 500 tours/minute.

Après 4 heures, la suspension obtenue est décantée, la plus grande partie du surnageant est soutirée par siphonnage, le restant de la suspension est filtré sur verre fritté.

La poudre essorée est remise en suspension dans 10 litres de méthanol, puis agitée comme précédemment pendant 4 heures. La suspension méthanolique est filtrée sur verre fritté.

L'insoluble est séché à température ambiante à l'étude sous vide pendant 48 heures, puis à 40°C à l'étuve sous vide pendant 10 jours.

Après 10 jours, on recueille 674 g d'une poudre beige clair.

Stade D : Diafiltration

On met en solution dans 20 litres d'eau distillée contenant 1 g/l de merthiolate, 358 g de poudre obtenue au stade C ci-dessus.

On maintient la solution sous agitation à +4°C pendant 60 heures, centrifuge pendant 2 heures à 4 000 tours/minute (centrifugeuse de type Robatel), puis sur une centrifugeuse en continu (de type Sharpless) à 90 000 g avec un débit de 6 l/heure.

On obtient 19 litres d'une solution limpide de couleur marron.

On complète à 20 litres avec de l'eau distillée et introduit dans le réservoir d'un appareil à diafiltrer comportant 3 tubes équipés de membranes poreuses de type XM300 (membranes commercialisées par la Société ROMICON - dépositaire en France : Société ANTHOUARD) (seuil d'arrêt PM 300 000) et dans lesquelles circule la solution à diafiltrer.

On fait circuler dans l'appareil 40 volumes d'eau distillée, soit un volume de 800 litres. La durée de l'opération est d'environ 60 heures.

On arrête la diafiltration, on récupère la solution diafiltrée, puis centrifuge cette dernière à 90 000 g sur une centrifugeuse en continu de type Sharpless avec un débit de 6 l/heure.

On obtient 19 litres d'une solution opalescente que l'on lyophilise.

II. COMPOSITION DU PRINCIPE ACTIF RC 1292

1 - Etude de la copule protéique :

a) Matériels et méthodes :

La composition de la copule protéique a été effectuée selon la technique de LOWRY (63) par dosage des protéines totales et par étude des acides aminés obtenus après hydrolyse chlorhydrique de l'extrait bactérien.

Dosage des protéines totales par la méthode de LOWRY :

Solution A : Na_2CO_3 2 % dans NaOH 0,1 N

Solution B : Sulfate de cuivre $5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 % dans tartrate de Na K 1 %

Solution C : 50 ml de la solution A + 1 ml de la solution B

A 1 ml d'une solution de protéines sont ajoutés 5 ml de la solution C, le mélange est agité puis laissé au repos pendant 10 minutes. Puis 0,5 ml du réactif de Folin Ciocalteus préalablement dilué au 1/2 est additionné. La solution ainsi formée est laissée 30 minutes 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.

Dosage des acides aminés :

Les acides aminés sont analysés à l'auto-analyseur. *

La glyco-protéine RC 1292 est hydrolysée par de l'acide chlorhydrique 5,6 N redistillée sous vide à 105°C pendant 24 heures. Les hydrolysats évaporés à siccité en exsiccateur en présence de soude sont dosés à l'auto-analyseur Beckman-Multichrom suivant le principe de SPACKMAN et al. (64) adapté par CHARET et al. (65) à l'analyse des glycoprotéines. Ce mode opératoire permet d'identifier et de doser les hexosamines.

b) Résultats :

La méthode de LOWRY (63) nous a permis d'identifier 33,8 % de protéines. Le dosage à l'auto-analyseur Beckman-Multichrom ne nous a

* Nous remercions très vivement Mme BENAÏSSA pour l'aide qu'elle nous a apportée pour les analyses d'acides aminés.

donné que 25,11 % d'acides aminés (Tableau III p. 59). Il est à noter que le principe actif ne renferme pas de cystéine et peu de méthionine et qu'il est très riche en acides aminés acides : acide aspartique et acide glutamique. L'examen du diagramme permet également d'identifier et de doser la glucosamine (4 %) et de mettre en évidence un pic de temps de rétention très voisin de l'hydroxy-lysine, que nous avons identifié à de la fucosamine (voir p. 115). En utilisant le même facteur de correction que pour la glucosamine, nous dosons 6,2 % de cette osamine.

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 (66) modifiée par RIMINGTON (67).

L'orcinol donne avec les oses, en milieu sulfurique et à chaud, une coloration brun-orangée. Le dosage s'effectue à 510 nm en prenant des sucres témoins à concentration connue.

Dosage des acides uroniques :

Les acides uroniques sont dosés par la méthode au carbazol sulfurique de DISCHE (68). Le carbazol donne avec les acides uroniques en milieu sulfurique et à chaud une coloration rose-violacés spécifique. La lecture de ce dosage se fait à 530 nm avec comme témoin une solution d'acide glucuronique (50 μ /ml) et des témoins hexoses afin de mesurer l'interférence causée par les hexoses dans le dosage des acides uroniques.

Dosage des acides sialiques :

Les acides sialiques totaux sont dosés par la méthode à la diphenylamine de NIAZI et STATE (69) modifiée par WERNER et ODIN (70).

TABLEAU III

Composition en acides aminés du principe actif RC 1292 calculée par rapport à 1 résidu d'alanine.

Asp	2,3	Ileu	0,2
Thr	0,4	Leu	0,3
Ser	0,7	Tyr	0,3
Glu	2,1	Phe	0,3
Pro	0,4	Lys	0,5
Gly	1	Hist	0,1
Ala	1	Arg	0,2
Val	0,34	GlcNH ₂	3,2
Met	0	FucNH ₂	5,0



Les acides sialiques, sous l'action des acides présents dans le réactif à la diphenylamine, sont rapidement désacetylés et décarboxylés en 2-deoxy-4-amino-octose qui subit ensuite une dégradation poussée qui donne un chromogène qui, se condensant avec la diphenylamine, fournit une coloration bleu violacé qui a un maximum d'absorption à 530 nm.

Dosage des osamines :

La méthode modifiée d'ELSON et MORGAN (71) permet de doser les osamines libérées après hydrolyse chlorhydrique (HCl 4N, 4 h 100°C). Les hexosamines ainsi libérées en milieu alcalin en présence d'acétyl-acétone donnent un chromogène qui réagit avec le réactif d'EHRlich pour donner une coloration rouge violacée.

- Identification et composition molaire des monosaccharides

1) Identification des monosaccharides après hydrolyse

. Hydrolyse par l'acide trifluoroacétique (ATFA).

Le RC 1292 (9 mg) est hydrolysé par l'acide trifluoroacétique 4N, 8 h, 100°C (2 ml). Après élimination de l'agent d'hydrolyse (par évaporation sous vide au rotavapor en présence d'éthanol), l'identification des monosaccharides est réalisée par chromatographie sur papier Whatman n° 3 dans un système solvant : acétate d'éthyle/acide acétique/acide formique/eau : 18 : 3 : 1 : 4 pendant 15 h.

. Hydrolyse par l'acide sulfurique selon SEAMAN (72)

10 mg de principe actif sont dissous dans l'H₂SO₄ 72 % en poids (3 ml), 5 minutes à température ambiante. La solution est ramenée à normalité puis portée à 100°C pendant 6 h. L'hydrolysate sulfurique est neutralisé par du carbonate de baryum, centrifugé et le précipité de sulfate de baryum est lavé à l'eau distillée. Le surnageant et les eaux de rinçage sont purifiés sur résines échangeuses de cations (Dowex 50 × 8 ; mesh 25-50 ; forme H⁺) et d'anions (Duolite A102D ; mesh 25-50 ; forme

HCOO⁻). On obtient alors une fraction neutre qui est chromatographiée sur papier Whatman n° 3 dans le système solvant acétate d'éthyle/acide acétique/acide formique/eau (18 : 3 : 1 : 4). L'élution de la Duolite A102D par l'acide formique 10 % fournit une fraction acide qui est chromatographiée sur papier Whatman n° 3 dans le même système solvant. L'élution de la Dowex 50 x 8 par l'acide chlorhydrique normal fournit une fraction basique qui est analysée par chromatographie sur papier dans les mêmes conditions.

2) Identification et dosage des monosaccharides après méthanolyse

La composition molaire en monosaccharides du principe actif RC 1292 a été effectuée après méthanolyse par chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides trifluoroacétylés.* 300 à 400 µg de produit RC 1292 sont méthanolysés en présence de 50 µg de mésoinositol (témoin interne) par 500 µl de méthanol chlorhydrique 0,5 N à 80°C pendant 24 h. Après séchage à l'azote, le résidu est trifluoroacétylé par 400 µl de mélange dichlorométhane/anhydride trifluoroacétique : volume/volume à 150°C pendant 2 fois 5 minutes (ZANETTA et al. (73)).

Les méthylglycosides trifluoroacétylés sont analysés en chromatographie en phase gazeuse sur colonne de silicone OV 210 à 50 % sur Varaport 30, température programmée de 100°C à 220°C à raison de 2°C minute sous un débit de gaz vecteur (azote) de 7,5 ml/mn.

- Isolement et identification d'une hexosamine particulière

1) Isolément

L'hexosamine particulière est isolée de l'hydrolysats total du principe actif par électrophorèse et chromatographie préparative sur papier. Le RC 1292 (140 mg) est hydrolysé par 3 ml d'HCl 4N pendant

Nous remercions très vivement M. Y. LEROY pour l'aide qu'il nous a apportée pour l'analyse des sucres par chromatographie en phase gazeuse.

4 heures, à 100°C. Après évaporation de l'agent d'hydrolyse sous vide en présence de méthanol, l'hydrolysate est soumis à une électrophorèse préparative sur papier Whatman n° 3 dans le tampon de MICHL (74) (Pyridine, acide acétique, eau : 3870, 100, 30), 400 volts par cm pendant 15 heures. La bande osamine éluée avec de l'eau distillée est soumise à une chromatographie préparative sur papier dans le solvant de FISHER et NEBEL (75) : pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau : 5/5/1/3.

2) Identification par GLC-MS de l'hexaminitol acétate

L'osamine isolée est dans un premier temps N réacétylée : 10 mg d'osamine sont dissous dans 500 µl de bicarbonate de sodium saturé, on ajoute ensuite à intervalles réguliers 5 fois 25 µl d'anhydride acétique. La solution est purifiée par passage sur colonne de Dowex (50 × 8 sous forme H⁺) 25-50 mesh. L'osamine N réacétylée est ensuite réduite par le borodutérure de sodium (1 mg de monosaccharide, 1 ml d'eau distillée, 10 mg de BD4 Na) pendant une nuit à température du laboratoire. Enfin, l'osamine est peracétylée (pyridine/anhydride acétique volume/volume, une nuit à température ambiante.

L'hexaminitol acétate est analysé par couplage gaz-liquide chromatographie, spectrométrie de masse dans les conditions expérimentales suivantes : colonne capillaire de carbowax 20 M (50 m × 0,3 mm), gaz vecteur : hélium 0,2 bar, température du four : 130° à 215°C à raison de 3°C par minute, spectromètre de masse Riber Mag 10.10, potentiel d'ionisation 70 ev.

3) Identification de l'hexosamine par chromatographie sur couche mince sous forme phényl-osazone *

* Ce travail a été réalisé par Y. KARAMANOS que nous remercions très vivement.

L'osamine particulière a été également déterminée sous forme phényl-osazone. 100 μ g d'hexosamine chlorhydrate sont dissous dans 100 μ l d'eau distillée et additionnés à 100 μ l d'un réactif constitué de 8 g d'acétate de sodium, 16 ml d'acide acétique, 4 ml de bisulfite de sodium, 4 ml de phénylhydrazine et 80 ml d'eau distillée. La solution obtenue est maintenue 45 minutes au bain-marie bouillant, refroidi lentement jusqu'à température ambiante et laisser enfin 24 heures à +4°C.

Après centrifugation (10 minutes à 3 000 tours/mn), les cristaux sont lavés à l'eau distillée à +4°C et redissous dans le chloroforme. La phénylosazone est purifiée sur colonne de silice 5 cm \times 0,4 cm (Kieselgel 60 : 70-230 mesh). Après lavage de la colonne par 10 ml de chloroforme, l'osazone est éluée par le solvant chloroforme/méthanol 10/2 (RICHTMYER) (76). L'osazone est chromatographiée en présence de témoins fucosazone et rhamnosazone sur couche mince de silice dans le système solvant chloroforme, dioxanne, tétrahydrofuranne, tétraborate de sodium 0,1 M dans les proportions suivantes : 40/20/20/1,5.

b) Résultats :

- Composition centésimale

Les compositions centésimale et molaire en monosaccharides ont été rassemblées dans le tableau IV page 75. Les résultats des dosages des oses neutres par la méthode TILLMANS et PHILIPPI (66) à l'orcinol sulfurique et des acides uroniques par la méthode de DISCHE ont été corrigés suivant le protocole décrit par MONTREUIL et SPIK (77) afin d'éliminer les interférences respectives des oses neutres et des acides uroniques lors des deux dosages. Le principe actif contient 31,9 % d'hexoses neutres et 5 % d'acide uronique.

Le dosage à la diphenylamine permet non seulement de doser les acides sialiques, mais également les acides nucléiques, les deux présentant un maximum d'absorption à 530 nm. Cependant, une légère différence de coloration existe ainsi qu'un spectre d'absorption différent. Les acides sialiques se colorent en mauve alors que les acides nucléiques se colorent en bleu. Avec le principe actif RC 1292, nous avons obtenu une coloration bleue et le spectre est plus proche de celui des acides nucléiques que de celui des acides sialiques. Nous pouvons donc conclure en l'absence d'acide sialique et à la présence d'une faible quantité d'acides nucléiques (2 %).

Après hydrolyse totale par l'acide chlorhydrique 4N pendant 4 heures à 100°C, nous dosons par la méthode d'ELSON-MORGAN 9 % d'hexosamines.

- Identification et composition molaire en monosaccharides

1) Identification des monosaccharides après hydrolyse

La chromatographie sur papier Whatman n° 3 des hydrolysats trifluoroacétique et sulfurique nous a permis d'identifier dans la fraction neutre un pentose : l'arabinose, deux méthylpentoses : le fucose et le rhamnose, trois hexoses : le glucose, le galactose et le mannose ; dans la fraction acide (élution de la quolite par HCOOH 10 %) un acide uronique, l'acide glucuronique et dans la fraction basique (élution de la dowex 50 x 8 par HCl N) deux osamines : la glucosamine et une osamine dont le R_{GlcNH_2} est 1,38.

2) Identification des monosaccharides après méthanolyse

L'étude des méthylglycosides trifluoroacétylés en chromatographie en phase gazeuse (figure 13 p. 65) nous a permis d'identifier de nouveau : le rhamnose, le fucose, l'arabinose, le glucose, le mannose, le galactose et la glucosamine. La chromatographie permet également de

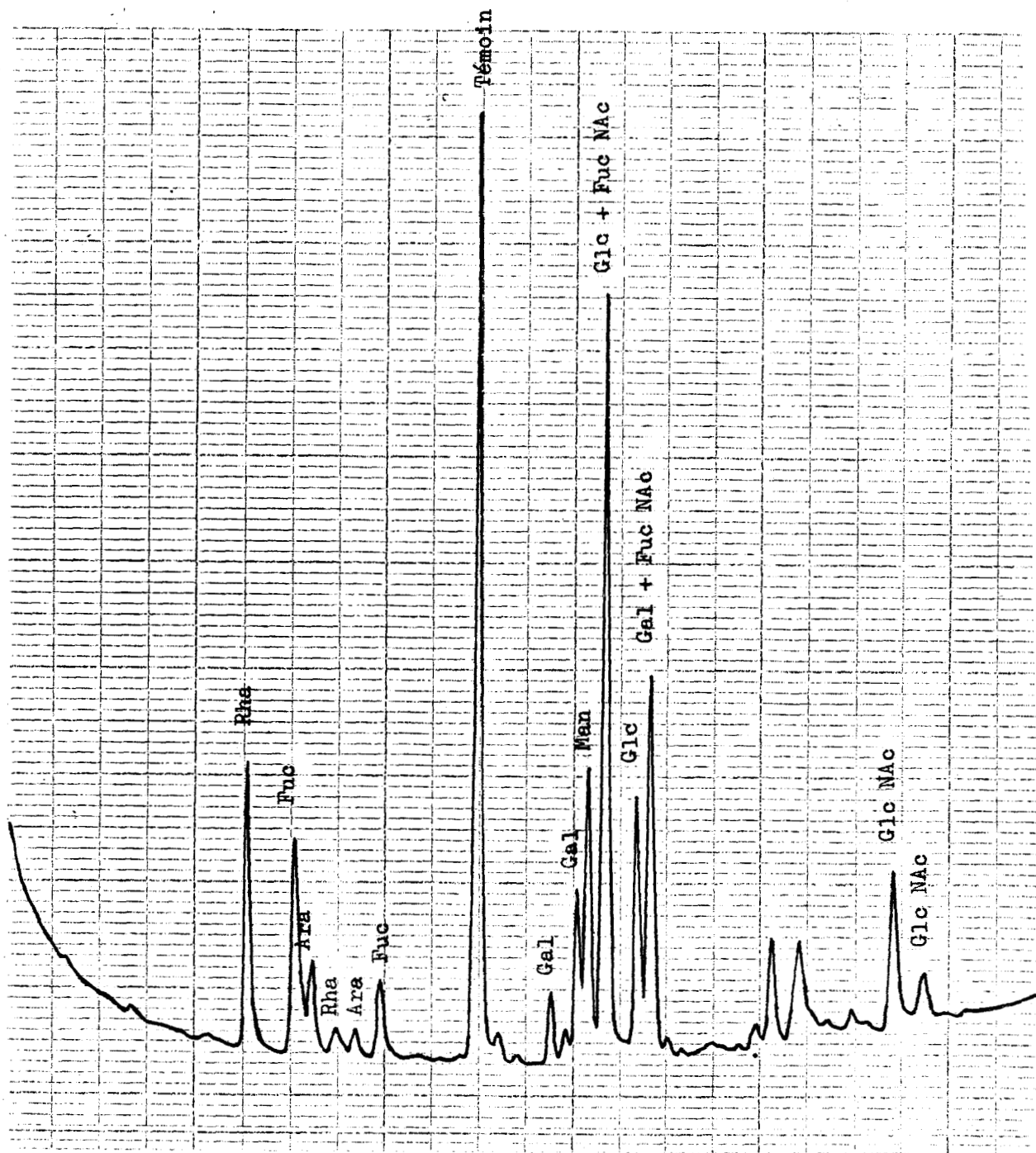


Figure 13

Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du principe actif RC 1292. Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV 210 à 5 % sur varaport 30 "Mesh" 80.100 ; température programmée de 100 à 220°C à raison de 2°C/mn, sous un débit de gaz vecteur (azote) 10 ml/mn.



mettre en évidence deux pics de temps de rétention identiques à celui de la forme anomérique α du glucose et à celui de la forme anomérique du galactose. Ce produit n'avait jamais été identifié au laboratoire parmi les produits glucidiques étudiés. Ce produit inconnu a été identifié par la suite à de la fucosamine (fig.14,p.67). Les rapports molaires de ces différents monosaccharides, calculés sur la base d'un résidu de galactose, sont donnés dans le tableau IV p. 75 .

- Isolement et identification d'une hexosamine particulière

1) Isolement

L'électrophorèse préparative de l'hydrolysats total de 140 mg du principe actif RC 1292 a fourni 12 mg d'un mélange de composés basiques qui ont été chromatographiés sur papier Whatman n° 3. Cette chromatographie révèle deux taches mineures correspondant à des constituants oligosacchariques et deux taches importantes, l'une ayant un R_f identique à la glucosamine et l'autre ayant une migration plus rapide ($R_{GlcNH_2} = 1,38$) (figure 15 p. 68). La chromatographie préparative de cette fraction électrophorétique basique (26 mg) nous a finalement conduit à préparer 11,5 mg de cette hexosamine.

2) Identification de l'hexosamine par GLC-MS sous forme d'hexosaminitol

Nous avons rassemblé dans la figure 16 p. 69 les résultats du couplage GLC-MS du polyol acétate obtenu par réduction et peracétylation de l'hexosamine particulière. L'analyse de ce spectre permet de dire qu'il s'agit d'un 2 acétamido-2-6 dideoxy hexitol sur la base des fragments primaires de masse m/e 302 (fragments secondaires m/e 260 par perte d'un radical cétène, m/e 242 par perte d'une molécule d'acide acétique), m/e 145 (fragment secondaire de m/e 103 par perte d'un radical cétène), m/e 87 ($\text{CH} = \text{O}^+ - \text{AC}$) spécifique des carbones 5 et 6.

CH_3

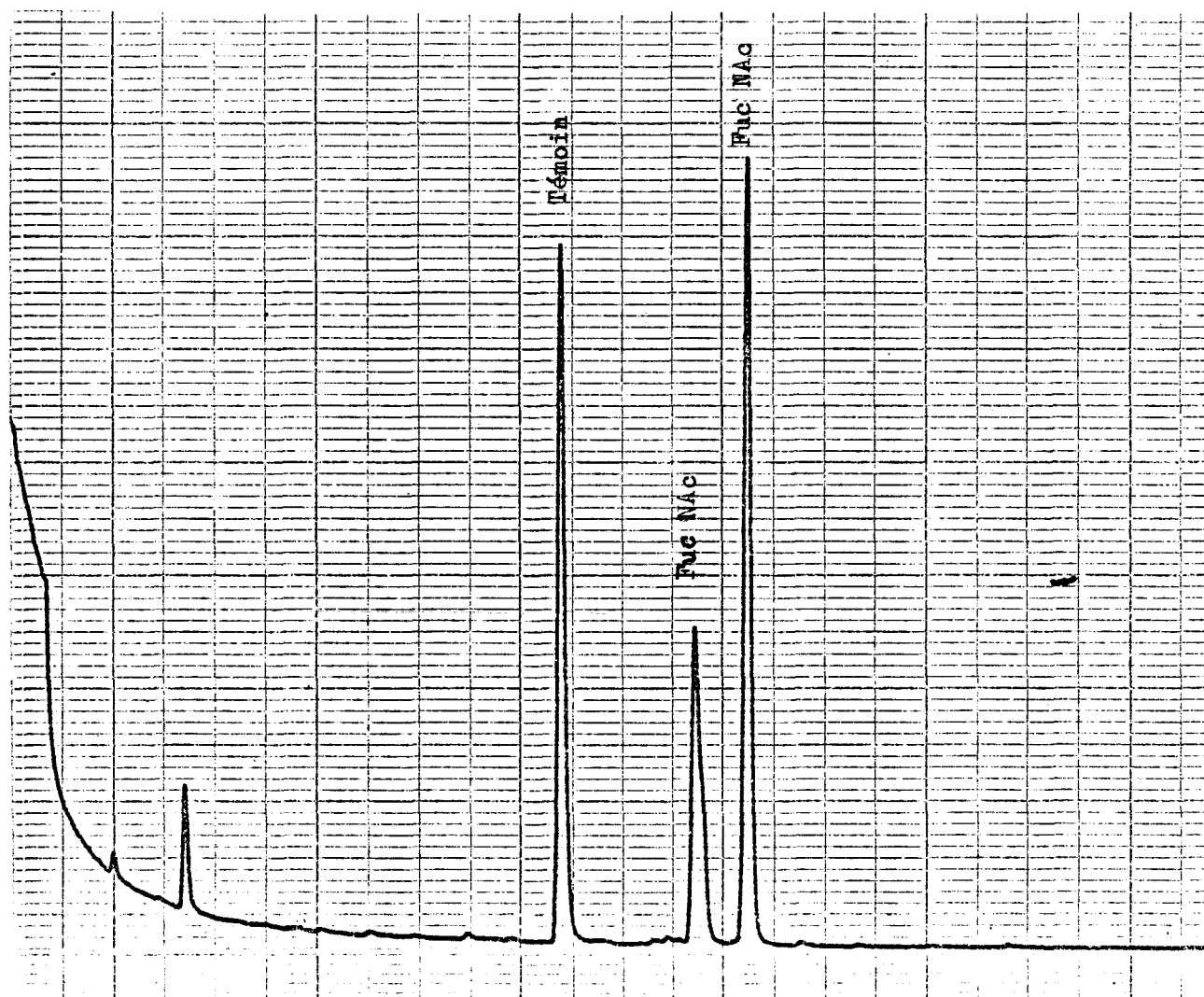


Figure 14

Chromatographie en phase gazeuse des méthyl glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation de la fucosamine. Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV 210 à 5 % sur varoport 30 "Mesh" 80.100, température programmée de 100 à 220°C à raison de 2°C/mn sous un débit de gaz vecteur (azote) : 10 ml/mn.



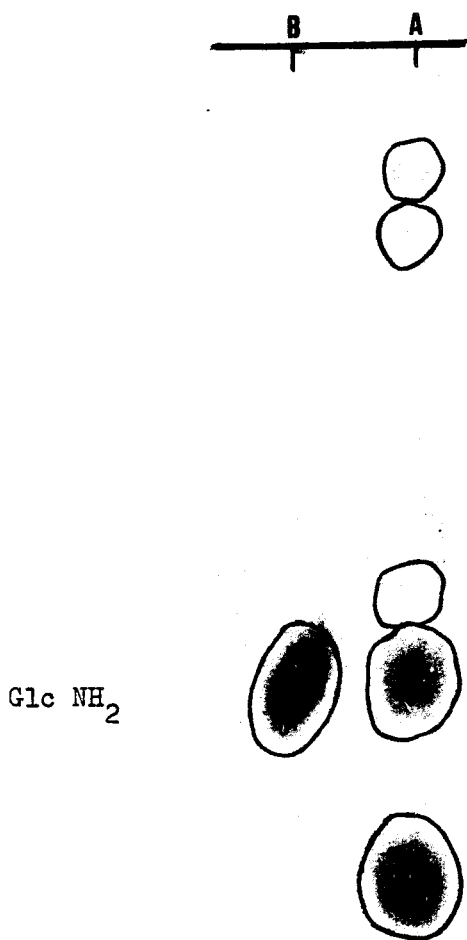


Figure 15

Chromatographie de la fraction basique (A) (après électrophorèse de l'hydrolysate du principe actif) en présence du témoin glucosamine (B) 15 h dans un tampon pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau :

5/5/1/3

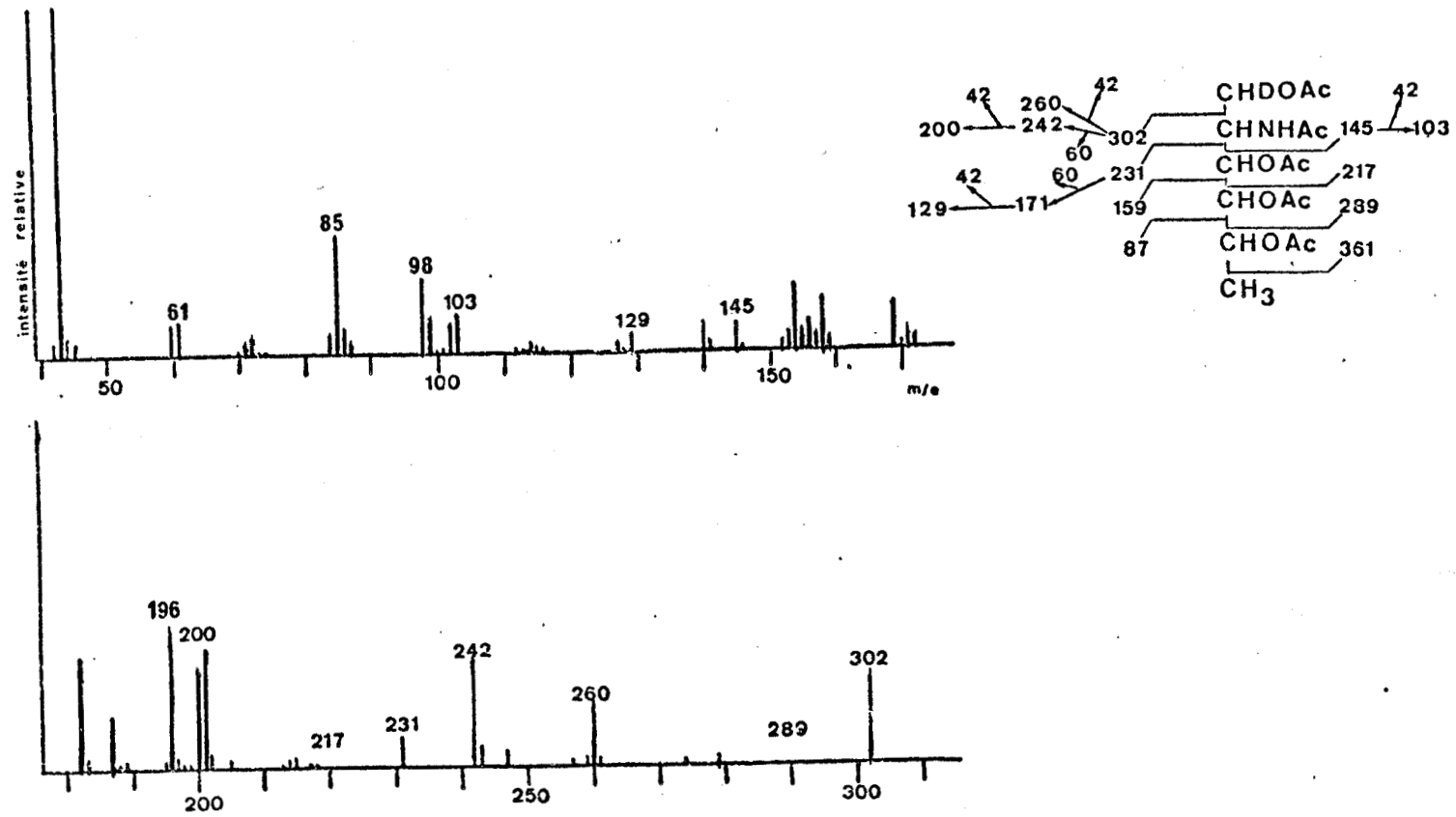


Figure 16

Spectre de masse du 2 acétamido 2,6-dideoxy-hexitol peracétate obtenu après hydrolyse de la fraction I de la chromatographie sur ultrogel Aca 34 du surnageant S₁ cetavlon

3) Identification de l'hexosamine par chromatographie sur couche mince sous forme phényl-osazone

L'étude bibliographique que nous avons effectuée montre que les bactéries peuvent synthétiser 4 types de 2 acétamido, 2,6 dideoxy-hexose. Il s'agit de la fucosamine (2-amino-2,6-dideoxy-galactose), de la quinovosamine (2-amino-2,6-dideoxy-glucose), de la rhamnosamine et de la pneumosamine (2-amino-2,6-dideoxy-talose).

La chromatographie en phase gazeuse du méthyl glycoside trifluoroacétylé de la quinovosamine * montre que ce didéoxysucre a une mobilité chromatographique différente de notre hexosamine (figure 17 p. 71), Nous avons donc cherché à l'identifier à la fucosamine et à la rhamnosamine (la pneumosamine semble spécifique des pneumocoques).

La chromatographie sur couche mince des ozazones préparées à partir du fucose et du rhamnose d'une part et à partir de l'hexosamine particulière d'autre part (figure 18 p. 72) montre que cette dernière présente le même comportement chromatographique que la fucosamine témoin. Nous pouvons donc conclure que le composé isolé est de type 2-amino-2,6 didéoxy-galactose. Toutefois, il sera indispensable d'effectuer l'étude du pouvoir rotatoire de cette hexosamine pour connaître la nature D ou L du monosaccharide.

3 - Etude des éléments minéraux

a) Matériels et méthodes :

Humidité

100 mg de RC 1292 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 RC 1292 est de

* Nous remercions très vivement le Professeur N. SHARON (Rehovot - Israël) de nous avoir fourni l'échantillon de quinovosamine.

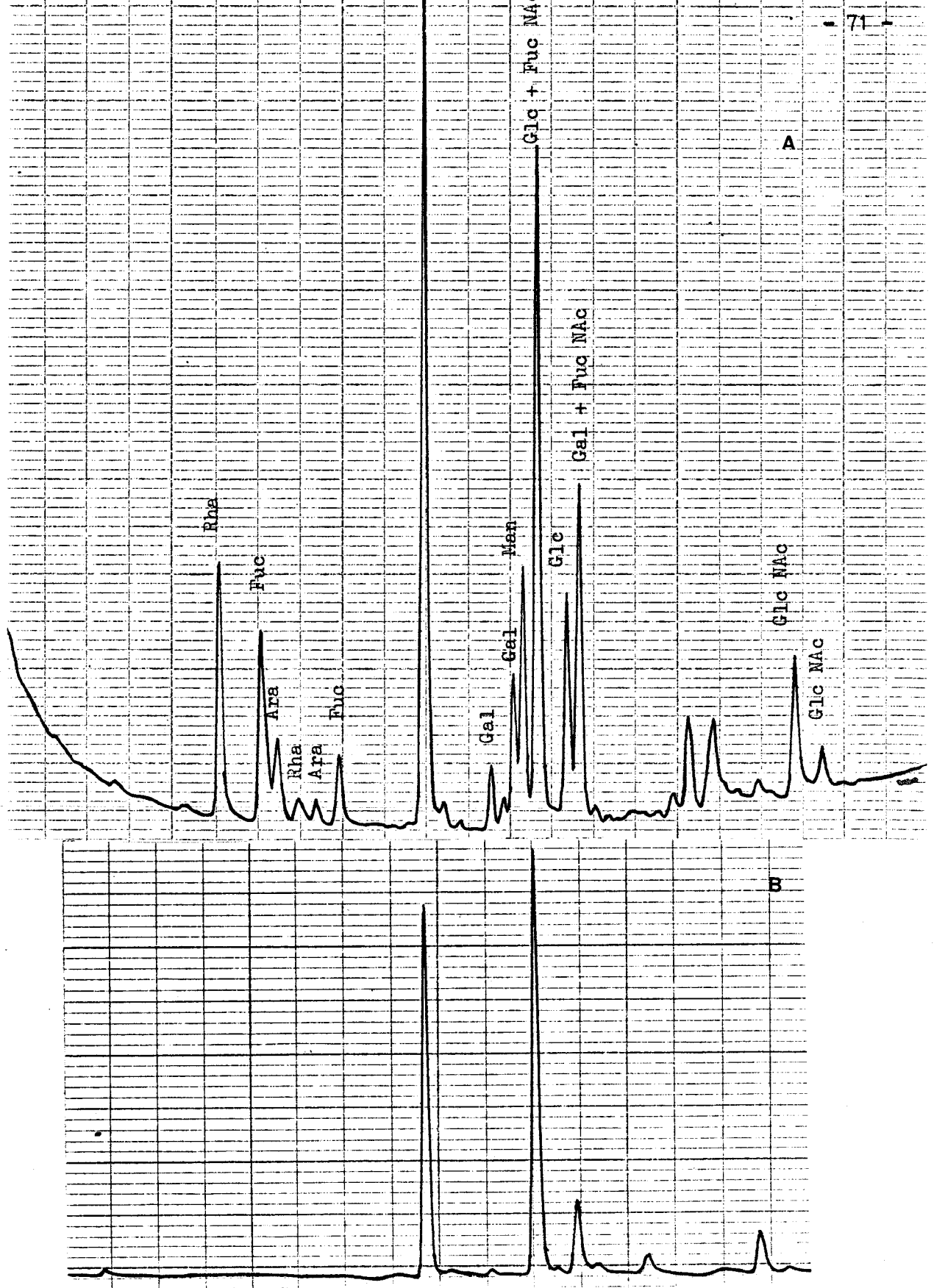


Figure 17

Comparatif des deux diagrammes de chromatographie de phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés de RC 1292 (A) et de la quinovosamine (B) (mêmes conditions expériences que diagramme RC 1292 (Fig.13 pl 65))



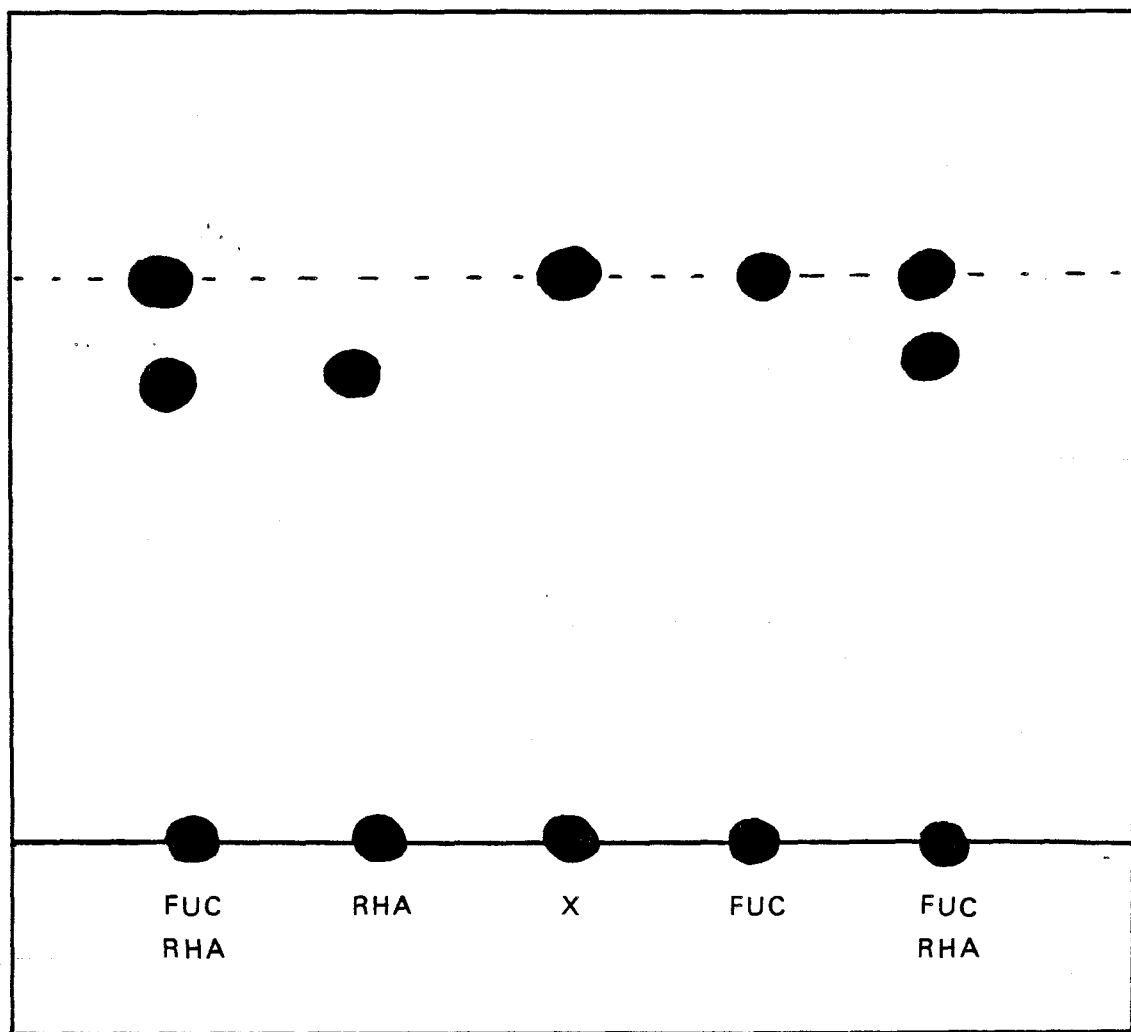


Figure 18

Chromatographie sur couche mince de silice (Alu 60) de la phényl-osazone de l'osamine X avec comme témoins les phényl-osazones du rhamnose et du fucose dans le solvant : chloroforme, dioxanne, tétrahydrofuranne, tétraborate de Na 0,1 M 40/20/20/1,5



nouveau pesé. La différence de poids nous permet ainsi de connaître le taux d'humidité.

Dosages de sulfates

La méthode utilisée est celle de TERHO et al. (78). 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

BaCl₂ : 0,005 M 2 ml

NaHCO₃ : 0,02 M 8 ml → qsp 100 ml avec de l'éthanol

- solution de rhodizonate de sodium : 5 mg de rhodizonate 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 standard de sulfate : solutions de 2 à 12 g 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 spectrophomètre 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 (HClO_4 2 V, H_2SO_4 3 V), la solution est laissée pendant une 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 1/2 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 standard sont dosées en même temps que les échantillons et permet de tracer la droite de la densité optique en fonction de la concentration en phosphore.

b) Résultats :

Le taux d'humidité est de 8 % et les teneurs en sulfate et en phosphore sont très faibles (voir tableau IV p. 75).

4 - Hétérogénéité du RC 1292

a) Matériels et méthodes :

L'hétérogénéité de RC 1292 a pu être déterminée par une étude en ultracentrifugation.*

Le principe actif RC 1292, dissous dans un tampon Tris HCl 0,1 M 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 (79) et d'autre part la masse moléculaire déterminée selon la technique de YPHANTIS (80) modifiée par CHERVENKA (81).

b) Résultats :

L'ultracentrifugation du principe actif indique la présence de 3 constituants.

*Nous remercions très vivement Madame Myriam CONIEZ qui a effectué ces analyses.

TABEAU IV

Composition centésimale (A) en protéines, monosaccharides, sulfate, phosphate et taux d'humidité du principe actif RC 1292
 Composition molaire (B) en monosaccharides calculée sur la base d'un résidu de galactose

Protéines (Lowry)	Oses neutres (orcinol)	Acides uroniques (carbazol)	Osamines (Elson Morgan)	Acides nucléiques (Niazil State)	Sulfates SO ₄ =	Phosphates PO ₄ =	H ₂ O	Total dosé
33,8 %	31,9 %	5 %	9,9 %	2,2 %	0,35 %	0,13 %	8 %	91,3 %

Rha	Ara	Fuc	Gal	Man	Glc	Glc NAc	Fuc NAc
0,7	0,3	0,9	1	0,8	2,4	0,7	0,9

B

La constante de sédimentation calculée sur le deuxième pic qui forme le constituant majeur a donné une valeur de 1.95 S.

5 - Conclusion

Le principe actif RC 1292 est donc constitué essentiellement d'une copule glucidique (47 % environ) et d'une copule protéique (32 %). La nature glycoprotéinique de cette fraction reste cependant à démontrer par l'étude de la liaison glycane-protéine.

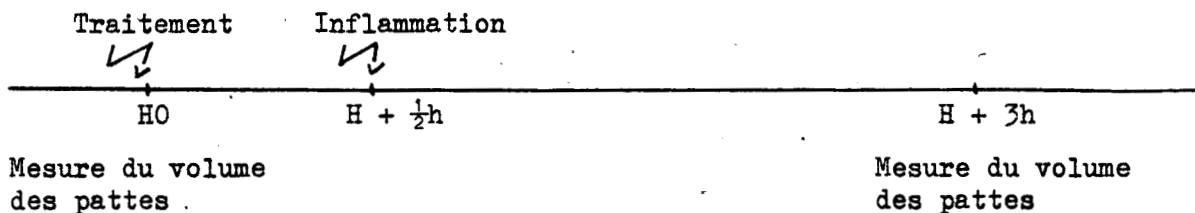
Il est à noter que la principe actif RC 1292 est riche en hexosamines (10 %) et que cette fraction renferme du 2 acétamido 2.6 dideoxy galactose (fucosamine). Cette hexosamine (D fucosamine) a été identifiée dans le lipopolysaccharide de *Chromobacterium Violaceum* (82), dans le polysaccharide de *Bacillus Subtilis* et de *Bacillus Licheniformis* (83).

L'isomère L a été isolé du polysaccharide capsulaire du pneumocoque type V (84). En outre, la copule glucidique renferme un pentose : l'arabinose et deux méthyl-pentoses : le fucose et le rhamnose.

III. ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

Le test anti-inflammatoire qui sera employé sur le principe actif RC 1292 total et sur les différentes fractions testées est le suivant : à un rat Wistar/Cesal femelle (180 à 200 g), on administre le traitement (principe actif) à diverses concentrations par voie I.V. une demi-heure avant de provoquer une inflammation.

Cette inflammation est réalisée par l'injection dans la patte du rat, une demi-heure après l'administration du principe actif, de l'agent inflammatoire choisi pour ce test, à savoir la carraghénine (1 %). La régression de l'oedème podal provoqué par la carraghénine est observé 3 heures après la prise du principe actif.

Schéma du test

Un lot de 6 rats n'ayant reçu aucune injection du principe actif constitue le lot témoin (augmentation maximale de l'œdème podal).

Le calcul de l'activité anti-inflammatoire est effectué comme suit :

$$\% \text{ augmentation} = A = \frac{\text{Volume à 3 h} - \text{volume temps 0}}{\text{Volume temps 0}}$$

$$\% \text{ régression} = R = \frac{A \text{ témoins carraghénine} - A \text{ traités}}{A \text{ témoins carraghénine}} \times 100$$

Enfin, la réponse anti-inflammatoire maximale du RC 1292 a été recherchée après 3 h, 5 h et 24 h après l'inflammation (le temps 3 h a été retenu). En ce qui concerne les doses utilisées, la dose de 10/kg a été choisie pour tester l'activité anti-inflammatoire.

Les laboratoires CASSENNE ont donc effectué à chaque fois les tests concernant l'activité anti-inflammatoire des diverses fractions purifiées à partir du principe actif total RC 1292.

Grâce à ce test, nous avons pu ainsi suivre la purification du principe actif.

IV. FRACTIONNEMENT DU PRINCIPE ACTIF RC 1292

1 - Précipitation au sulfate d'ammonium

a) Matériels et méthodes

500 mg du principe actif RC 1292 sont mis en solution dans 50 ml d'eau distillée. Par différentes étapes de saturation en sulfate

d'ammonium et de changement de pH, nous arrivons à obtenir 11 fractions. Nous avons rassemblé dans la figure 19 P. 79 le fractionnement qui conduit à l'obtention de 10 précipités et d'un surnageant.

b) Résultats

α . Biochimiques

Nous avons effectué 3 séries de précipitation au sulfate d'ammonium, les deux premières en isolant les différents produits, la 3e en groupant différents précipités. Les produits provenant de ces précipitations au sulfate d'ammonium ont été étudiés quant à leur composition centésimale et à leur composition molaire en monosaccharides. Ces différents produits ont été donnés aux Laboratoires CASSENNE afin de rechercher leur activité anti-inflammatoire. Nous avons rassemblé dans les tableaux V et VI (p. 80, 81), les résultats des rapports molaires en monosaccharides ainsi que les compositions centésimales en oses neutres et osamines calculées sur la base des résultats de la chromatographie en phase gazeuse.

β . Pharmacologiques

Les différentes fractions du 3e et 4e fractionnement au sulfate d'ammonium ont été données aux Laboratoires CASSENNE pour y rechercher les activités anti-inflammatoires. Ces résultats ont été rassemblés dans les tableaux VII et VIII p. 82 et 83. Pour le 3e fractionnement, l'activité anti-inflammatoire est présente jusqu'au précipité P₇ inclus, puis l'activité peut être considérée comme nulle (20 % de régression étant considéré comme nul). Les précipités intéressants semblent être P₁, P₄, P₆ et P₇, ce qui nous a amenés à simplifier la précipitation à 4 fractions correspondant au : P₁ ; P₂ ; P₃ ; P₄ ; P₅ ; P₆ ; P₇ ; P₈ ; P₉ ; P₁₀. Pour ce fractionnement, les activités se trouvent dans le précipité P₄ P₅ P₆ et le P₇ essentiellement. Nous pouvons constater qu'en ce qui concerne les fractions actives au test anti-inflammatoire, leurs compositions glucidiques

Solution RC 1292 amené à 33 % saturation en Am_2SO_4
et à pH 7

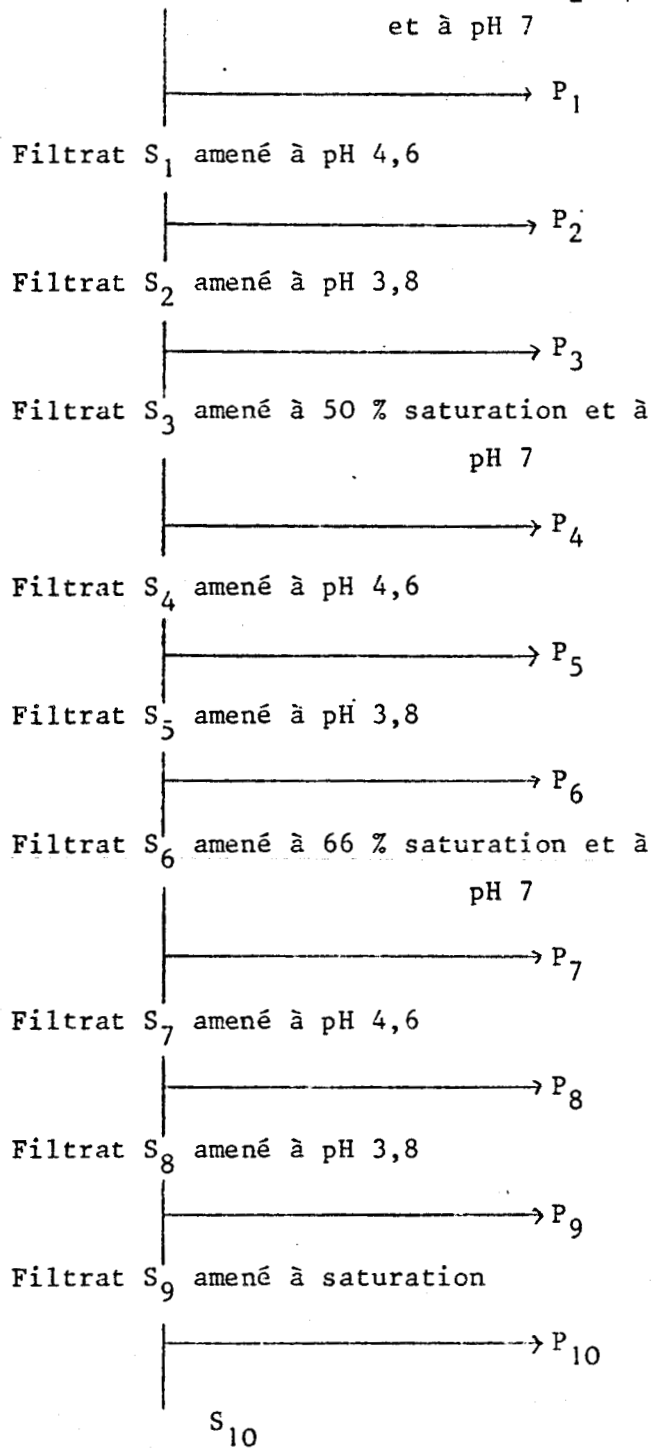


FIGURE 19



TABLEAU V

Composition centésimale et molaire et rendements des différentes fractions obtenues par la précipitation au sulfate d'ammonium du principe actif RC 1292

Rendement (500 mg)	Rha	Ara	Fuc	Gal	Man	Glc	GlcNAc	FucNAc	ON	Osamines
P ₁ (20,8 mg)	1.40	0.25	0.66	1	0.47	4.98	0.98	1.86	21,1 %	5,0 %
P ₂ (9,8 mg)	1.34	0.38	0.91	1	0.78	3.04	-	1.37	28,6 %	6,2 %
P ₃ (6,2 mg)	0.97	0.42	1.11	1	0.87	2.61	-	1.42	30,4 %	7,3 %
P ₄ (122 mg)	2.25	0.30	0.31	1	0.27	6.09	3.16	4.13	15,2 %	14,3 %
P ₅ (26,3 mg)	2.07	0.38	0.64	1	0.43	4.95	2.31	3.60	19,1 %	16,5 %
P ₆ (22,6 mg)	2.88	0.25	0.65	1	0.38	5.42	1.27	4.38	26,1 %	19,8 %
P ₇ (76,7 mg)	0.98	0.08	1.51	1	0.30	2.97	0.53	1.49	37,0 %	15,0 %
P ₈ (7,5 mg)	0.08	0.23	2.19	1	0.26	1.17	-	-	54,1 %	-
P ₉ (14,4 mg)	0.04	0.1	2.34	1	0.25	1.49	-	-	43,3 %	-
P ₁₀ (14,1 mg)	0.09	0.21	2.0	1	0.27	1.41	-	0.86	42,3 %	-
S ₁₀ (32,3 mg)	0.26	0.56	0.40	1	1.89	1.43	0.03	0.04	78,2 %	2,7 %

MS
SMB
1977

TABLEAU VI

Composition molaire, centésimale et rendements des divers précipités P₁.P₂.P₃ ; P₄.P₅.P₆ ; P₇ ; P₈.P₉.P₁₀
 au sulfate d'ammonium du RC 1292

RC 1292 500 mg	Rha	Ara	Fuc	Gal	Man	Glc	GlcNH ₂	FucNAc	O.N.	Osamines
P ₁ .P ₂ .P ₃ 26,8 mg	1.45	0.30	1.26	1	0.64	4.65	1.43	1.65	25,3 %	11,7 %
P ₄ .P ₅ .P ₆ 165,3 mg	3.23	0.31	0.63	1	0.39	6.42	3.77	4.51	19,7 %	19,0 %
P ₇ 83,1 mg	0.79	0.16	2.43	1	0.43	2.78	0.88	1.10	46,9 %	17,0 %
P ₈ .P ₉ .P ₁₀ 23,9 mg	-	0.36	1.58	1	0.31	1.71	-	0.09	66,4 %	1,4 %



TABLEAU VII

Résultats des tests anti-inflammatoires effectués sur
les précipités au sulfate d'ammonium

	% de régression de l'œdème	
	0,1 γ /kg	1 γ /kg
RC 1292	0	58
P ₁	42	61
P ₂	25	55
P ₃	25	40
P ₄	41	50
P ₅	Précipité non testé	
P ₆	50	77
P ₇	40	50
P ₈	7	30
P ₉	0	20
P ₁₀	22	27
S ₁₀	8	30



TABLEAU VIII

Résultats des tests anti-inflammatoires effectués sur les précipités groupés du fractionnement au sulfate d'ammonium du principe actif RC 1292

	% régression de l'œdème	
	0,1 γ/kg	1 γ/kg
RC 1292	30	55
P ₁ ·P ₂ ·P ₃	23	47
P ₄ ·P ₅ ·P ₆	47	49
P ₇	35	59
P ₈ ·P ₉ ·P ₁₀	9	20



se caractérisent de nouveau par une proportion importante d'hexosamine (entre 15 et 20 %), et par la présence de deux hexoses neutres : le rhamnose et le glucose. La fraction P₇ qui présente également une activité pharmacologique positive possède en plus du fucose.

2 - Purification du précipité P₇ par chromatographie de gel filtration et d'échange d'ions sur DEAE Séphadex

Au regard des activités trouvées après les premiers fractionnements au sulfate d'ammonium, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la fraction P₇ qui semblait posséder une activité anti-inflammatoire égale ou même supérieure à celle du principe actif total. Cette fraction a donc été étudiée quant à sa composition molaire et centésimale et nous avons essayé de la fractionner à nouveau dans un deuxième temps sur ultrogel AcA 34 et sur D.E.A.E. Séphadex.

A. Fractionnement du P₇ sur AcA 34

a) Matériel et méthodes :

La chromatographie sur AcA 34 (gel filtration) permet de séparer des composés de masse moléculaire comprise entre 20 000 et 350 000.

50 mg du P₇ sont dissous dans 5 ml de bicarbonate d'ammonium 0,1 M. Cette solution est alors injectée sur une colonne d'AcA 34 (1,25 m × 2,5 cm). Le débit de la colonne est 9 ml/heure. Les différentes fractions sont repérées par le réactif au phénol sulfurique de DUBOIS et al. (85) ainsi que par lecture au spectrophotomètre à 280 nm pour le repérage des protéines. Nous avons ainsi recueilli 2 fractions F I, F II.

b) Résultats :

Le rendement de la chromatographie sur AcA 34 est réparti de la façon suivante : F I : 33,9 mg ; F II : 6,4 mg, soit 40,3 mg récupérés (80,6 %).

Les rapports molaires de ces deux fractions ont été rassemblés dans le tableau IX p. 86. Ces deux fractions ont également été testées pour leur activité anti-inflammatoire (tableau X p. 86). L'activité se retrouve dans la fraction F I, mais nous ne constatons pas d'enrichissement de l'activité par rapport à la fraction P₇ de départ.

B. Fractionnement du P₇ sur D.E.A.E. Séphadex

a) Matériels et méthodes :

20 mg de la P₇ en solution dans un tampon phosphate 0,05 M pH 7,4 sont injectés sur une colonne de DEAE Séphadex A-50 (3,3 x 60 cm). L'élution est effectuée par le tampon phosphate 0.05 pH 7,4, puis par un gradient continu de chlorure de sodium 0 à 2 M dans le tampon phosphate de départ. Le débit de la colonne est de 9 ml/heure.

b) Résultats :

La chromatographie sur DEAE Séphadex fournit 3 fractions éluées par le gradient en chlorure de sodium. Après dialyse et lyophilisation, ces 3 fractions ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse (tableau XI p. 87), et envoyées aux Laboratoires CASSENNE pour étude de leur pouvoir anti-inflammatoire. Les résultats de ces tests sont rassemblés dans le tableau XII p. 87.

C. Conclusion :

Le fractionnement au sulfate d'ammonium conduit à une fraction P₇ qui est hétérogène et que nous avons de nouveau fractionnée par gel filtration et par chromatographie d'échange d'ions. Par cette dernière technique, nous avons obtenu une fraction active (F I) qui, de nouveau, possède une composition glucidique caractérisée par une richesse en hexosamines : présence de glucosamine et de fucosamine et présence d'hexoses neutres : rhamnose et glucose. La complexité du fractionnement au sulfate

TABLEAU IX

Composition centésimale, molaire du P₇ et rendements des pics I et II de la chromatographie sur ultrogel ACA 34 du précipité P₇

	Rha	Ara	Fuc	Gal	Man	Glc	GlcNac	FucNac	Oses Neutres	Osamines	Poids Obtenus 20mg de P ₇
F I	0.4	-	0.7	0.4	-	1	0.2	0.5	47,3 %	18,6 %	13,5 mg
F II	0.2	-	0.1	1.32	0.1	1	0.1	0.1	14,2 %	1,5 %	4,3 mg
P ₇	0.3	-	0.5	0.3	0.1	1	0.1	0.5	46,9 %	17.0	

TABLEAU X

Résultats des tests anti-inflammatoires effectués sur les fractions F I et F II de la chromatographie sur ultrogel ACA 34 du précipité P₇

	% de régression de l'œdème	
	0,1 Y /kg	1 Y/kg
P ₇	52	68
F I	28	59
F II	0	0



TABLEAU XI

Composition molaire, centésimale et rendement des 3 fractions obtenus par chromatographie sur D.E.A.E. Séphadex A-50 du précipité P₇

	Rha	Ara	Fuc	Gal	Man	Glc	GlcNAc	FucNAc	Poids 20 mg P ₇
F I	0.4	-	-	0.2	-	1	0.4	0.45	7,18 mg
F II	0.1	-	1.5	0.6	0.2	1	0.1	0.1	5,45 mg
F III	0.3	0.2	0.8	0.5	-	1	0.2	0.1	2,51 mg
P ₇	0.3	-	0.5	0.3	0.1	1	0.1	0.5	

TABLEAU XII

Résultats des tests anti-inflammatoires effectués sur les fractions F I, F II, F III

	% régression de l'œdème	
	0,1 γ/kg	1 γ/kg
F I	11	22
F II	0	28
F III	8	26
RC 1292	38	51



d'ammonium dont nous venons de donner les résultats et l'impossibilité de le reproduire à un niveau industriel nous a conduit à essayer un autre type de purification de cette molécule douée d'activité anti-inflammatoire et caractérisée par une composition glucidique simple formée de rhamnose, glucose, fucosamine et glucosamine. La présence dans la fraction native RC 1292 d'acide uronique et l'expérience acquise au laboratoire par le travail effectué sur des extraits de *Klebsiella Pneumoniae* (BRUVIER) (86) nous ont conduit à essayer le fractionnement au cetavlon (bromure de cetyl-trimethyl ammonium).

3 - Précipitation au Cetavlon

a) Matériels et méthodes :

Le principe actif a été fractionné selon la méthode au Cetavlon de SCOTT (87). 333 mg de bromure de cetyl-triméthyl-ammonium ont été ajoutés progressivement à 11 ml d'eau pour former une solution de cetavlon à 3 %. Ce mélange a été ajouté à la solution du principe actif (100 mg dans 12,5 ml) sous agitation magnétique douce. On laisse la solution une nuit à 4°C. Le précipité est centrifugé et redissous dans une solution de NaCl 0,1 M. On ajoute alors 6 volumes d'éthanol et on laisse la solution une nuit à 4°C : le précipité est recueilli par centrifugation, redissous dans l'eau, dialysé et lyophilisé. Ce produit est appelé P₁. La fraction non précipitante au cetavlon est précipitée par 6 volumes d'éthanol et la solution est laissée une nuit à 4°C. Le précipité est recueilli par centrifugation, redissous dans l'eau, dialysé et lyophilisé : ce produit est appelé S₁. (Schéma de fractionnement : fig. 10 p. 89).

b) Résultats :

α) Biochimiques :

Le rendement de la précipitation au cetavlon est de 69 %. Le surnageant S₁ représentant 34 % et le précipité P₁ 35 %. L'analyse centésimale et les rapports molaires en sucres figurent dans le tableau XIII p. 90.

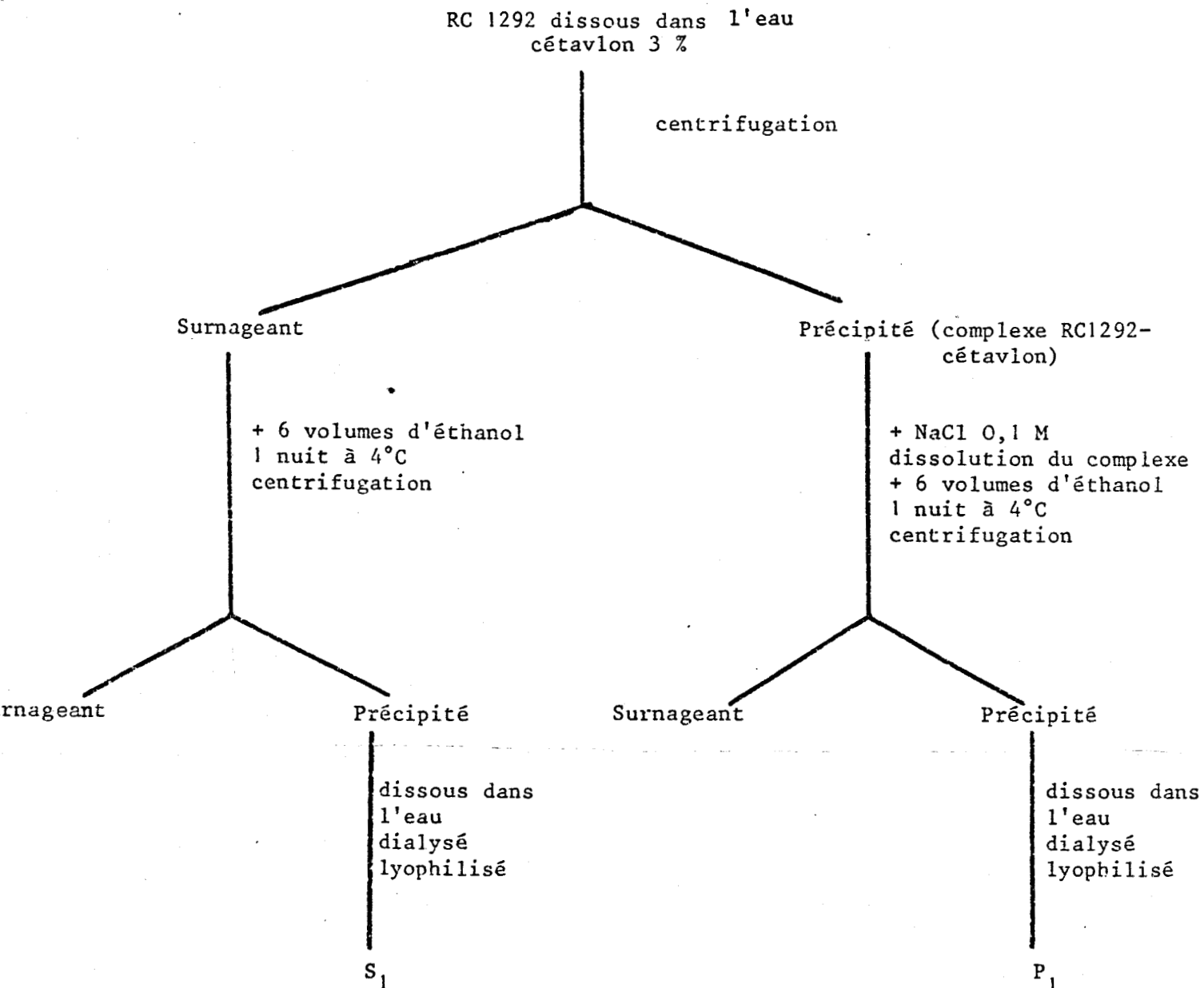


FIGURE 20



Schéma de fractionnement de RC 1292 selon la méthode de SCOTT (37) au cétavlon (bromure de cetyl-triméthyl-ammonium).

TABLEAU XIII

Composition centésimale et molaire des fractions S₁ et P₁ obtenues par fractionnement au cétavlon du principe actif

	Oses Neutres	Acides Uroniques	Protéines	Total dosé	Rha	Ara	Fuc	Gal	Man	Glc	GlcNac	FucNac
S ₁	30,64 %	2,36 %	30,66 %	63,6 %	0.4	0.1	0.4	0.3	0.5	1	0.5	0.6
P ₁	35,96 %	9,85 %	32,92 %	78,7 %	0.3	0.1	0.3	0.8	0.1	1	0.2	0.2

TABLEAU XIV

Résultats des tests anti-inflammatoires effectués sur S₁ et P₁

	% de régression de l'œdème - 1 γ/kg
RC 1292	44
P ₁	29
S ₁	36



β) Pharmacologiques :

Les activités anti-inflammatoires ont été mesurées en prenant comme témoin l'activité du principe actif total RC 1292. Les résultats sont illustrés dans le tableau XIV p. 90. L'activité anti-inflammatoire se retrouve dans les deux fractions du cetavlon. Cependant, nous constatons une activité plus marquée dans la fraction surnageante. D'autre part, aucune fraction ne possède la même activité que le principe actif de départ. Enfin, nous remarquons que le surnageant S₁ possède une composition glucidique proche des fractions sur D.E.A.E. et ultrogel Aca 34 (pharmacologiquement actives), notamment en ce qui concerne la grande richesse en hexosamines.

A) Fractionnement du S₁ sur colonne ultrogel Aca 34

a) Matériels et méthodes :

30 mg du surnageant S₁ ont été dissous dans 3 ml de bicarbonate d'ammonium 0,1 M. Cette solution est injectée sur une colonne d'ultrogel Aca 34 (1,25 m × 2,5 cm). Le débit de la colonne est de 9 ml/heure. Les différentes fractions sont repérées par le réactif au phénol sulfurique de DUBOIS et al. (85), ainsi que par la lecture au spectrophotomètre à 280 nm pour le repérage des protéines.

b) Résultats :

La chromatographie sur ultrogel Aca 34 de 30 mg de fraction surnageante S₁ nous a fourni 10,8 mg d'une fraction F I, 6 mg d'une fraction F II et 12,1 mg d'une fraction F III représentant ainsi un rendement de 96,3 % (figure 21 p. 92). Les trois fractions ont été étudiées quant à leur composition en oses neutres, acides uroniques et leur composition molaire (tableaux XV p. 93).

Les activités anti-inflammatoires de ces 3 fractions sont rassemblées dans le tableau XVI p. 93.

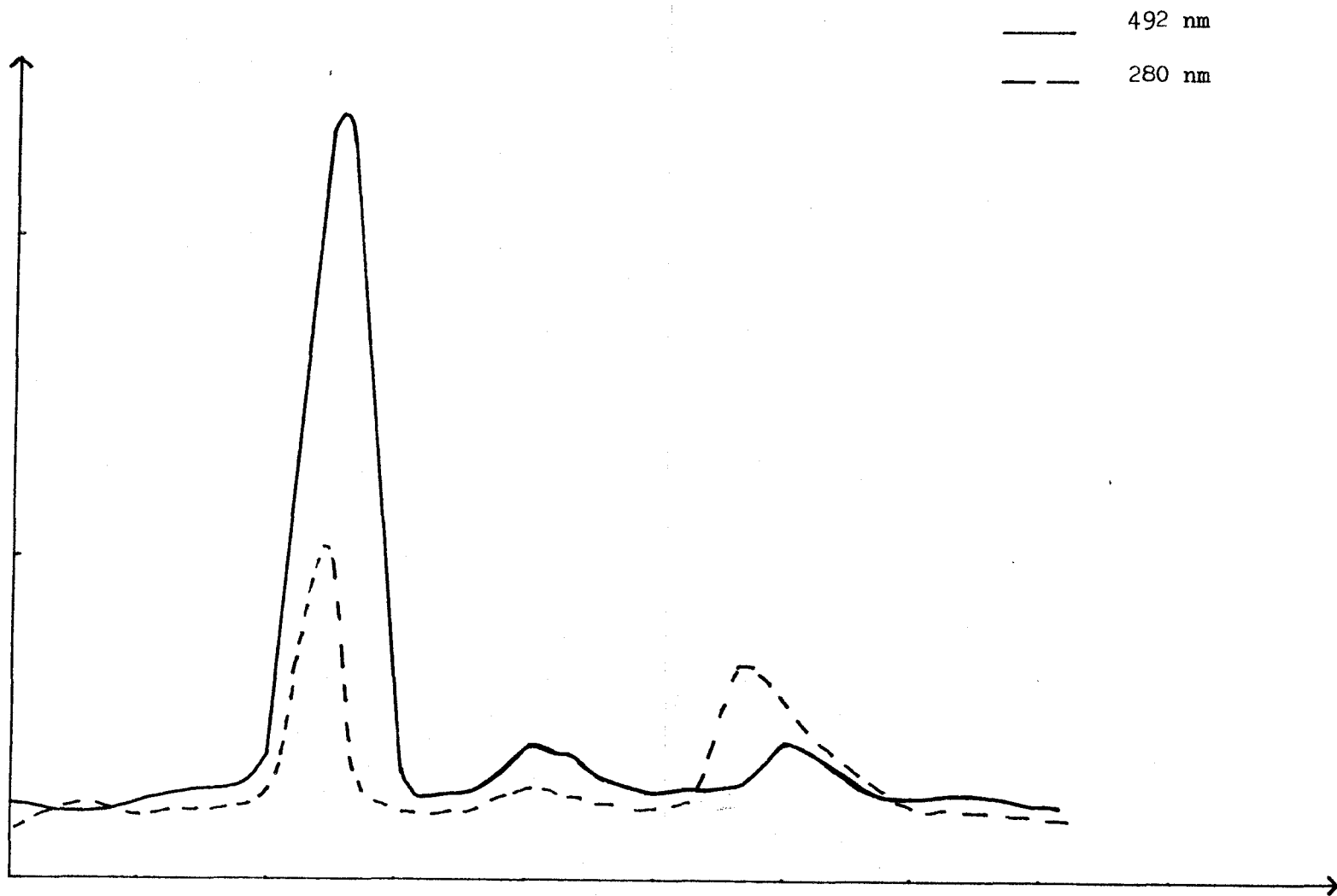


Figure 21



Chromatographie sur colonne d'AcA 34 ultrogel de la fraction surnageante S₁ obtenue par le fractionnement au Cetavlon du RC 1292 - Colonne 1,25 m x 2,5 cm, débit 9 ml/h

TABLEAU XV

Composition centésimale et molaire des fractions I à III de la chromatographie sur ultrogel Aca 34 de la fraction surnageante S₁ calculée sur la base d'un résidu de glucose

	Rha	Ara	Fuc	Gal	Man	Glc	GlcNAc	FucNAc	O.N.	A.U.
F I	0.5	0.03	0.06	0.2	0.04	1	0.7	0.8	19,4 %	1,3 %
F II	0.4	0.6	0.2	1.2	2.1	1	0.4	0.2	19,9 %	0,8 %
F III	0.3	0.4	0.4	1.3	1.2	1	-	-	15 %	0,8 %

TABLEAU XVI

Résultats des tests anti-inflammatoires effectués sur les fractions F I, F II, F III de la chromatographie sur Aca 34 du surnageant S₁

	% de régression de l'oedème à 1 σ /kg
RC 1292	44
F I	31
F II	10
F III	20



c) Conclusion :

La chromatographie du surnageant sur ultrogel AcA 34 fournit 3 fractions. L'activité pharmacologique se concentre dans la fraction I et se caractérise, comme dans le cas des fractions actives obtenues par le sulfate d'ammonium, d'une part par une simplification de la composition en monosaccharides neutres (principalement du rhamnose et du glucose) et d'autre part par sa grande richesse en hexosamine (glucosamine et fucosamine).

B) Chromatographie du S₁ sur gel d'hydroxy-apatite

a) Matériels et méthodes :

La fraction surnageante S₁ a été chromatographiée sur une colonne d'ultrogel hydroxy-apatite (22 cm × 3,5 cm), avec un débit de 18 ml/heure. L'élution de la colonne se fait par KCl 0,01 M, puis 0,2 M et par des tampons phosphates de 0,01 M et 0,2 M.

Les différentes fractions ont été étudiées en chromatographie en phase gazeuse. Les activités anti-inflammatoires de ces fractions ont également été déterminées aux Laboratoires CASSENNE.

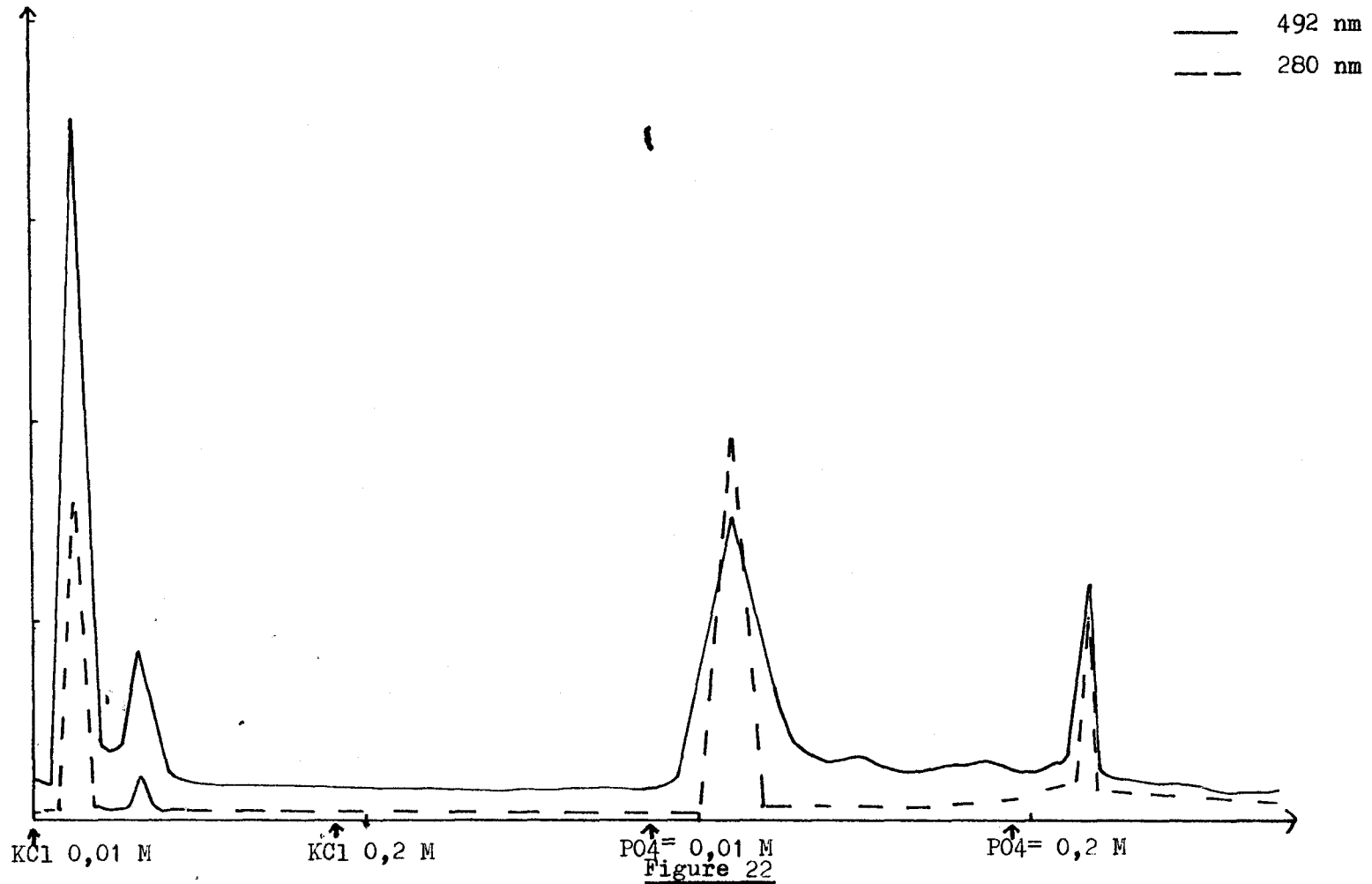
b) Résultats :

Le fractionnement sur colonne d'hydroxy-apatite nous a fourni quatre fractions : deux éluées par KCl 0,01 M, deux éluées par les tampons phosphates 0,01 M et 0,2 M (voir figure 22 p. 95).

Les compositions centésimales et molaires de ces différentes fractions ont été représentées dans le tableau XVII p. 96. L'activité anti-inflammatoire de ces fractions est reproduit dans le tableau XVIII p. 97.

c) Conclusion :

Les conclusions que nous pouvons tirer de ce fractionnement sont les suivantes : la fraction FI S₁ HA est particulièrement intéressante.



Chromatographie sur colonne d'ultrogel hydroxy-apatite (HA) de la fraction surnageante S₁
 obtenue par le fractionnement au Cetavlon du RC 1292 - Colonne HA 22 × 3,5 cm, débit 18 ml/h



TABLEAU XVII

Compositions molaires en monosaccharides des fractions I à IV obtenues par chromatographie sur colonne d'ultragel hydroxy-apatite de la fraction surnageante S₁

	Rha	Ara	Fuc	Gal	Man	Glc	GlcNac	FucNac	% de S ₁
FI S ₁ HA	0.6	-	-	0.1	-	1	0.8	1.4	31,6
FII S ₁ HA	0.5	0.8	0.5	0.9	0.6	1	0.4	0.3	12,4
FIII S ₁ HA	0.4	1.5	0.4	2.0	2.1	1	0.2	0.2	12
FIV S ₁ HA	0.5	0.2	0.1	0.3	6.5	1	0.4	0.6	16,6



TABLEAU XVIII

Résultats des tests anti-inflammatoires des fractions F I, II, III, IV obtenus par chromatographie du surnageant sur colonne d'ultrogel hydroxy-apatite :

	% de régression de l'œdème à 1 γ /kg
RC 1292	41
FI S ₁ HA	42
FII S ₁ HA	26
FIII S ₁ HA	8
FIV S ₁ HA	21

TABLEAU XIX

Comparatif des activités anti-inflammatoires des fractions FI S₁ HA et FI AcA 34 vis-à-vis du principe actif total RC 1292

	% de régression de l'œdème à 1 γ /kg
RC 1292	53
FI S ₁ HA	50
FI AcA 34	47



En effet, sa composition molaire simplifiée est identique à celle de deux fractions déjà étudiées : la FI Ac A 34 (fraction I de S₁ passée sur ultrogel AcA 34) et la FI P₇ D.E.A.E. (fraction I du précipité P₇ au sulfate d'ammonium passé sur colonne de D.E.A.E. Séphadex). On trouve en effet que deux oses neutres, le rhamnose et le glucose, et deux osamines, la glucosamine et la fucosamine

L'activité anti-inflammatoire de FI S₁ HA vis-à-vis de RC 1292 total et de FI S₁ AcA 34 et la relative facilité à préparer cette fraction nous a incités à prendre ce fractionnement sur hydroxy-apatite pour la suite de nos travaux (tableau XIX p. 97).

V. ETUDE D'UNE FRACTION ACTIVE FI S₁ HA obtenue par chromatographie sur colonne d'hydroxy-apatite du surnageant de la précipitation au cetavlon

1 - Etude de la copule protéique

a) Matériels et méthodes :

Les techniques employées pour l'étude de la copule protéique sont décrites p. 57.

b) Résultats :

Par la méthode de LOWRY, nous obtenons 14,84 % de protéines.

Les rapports molaires des acides aminés ont été rassemblés dans le tableau XX p. 99.

Le calcul du pourcentage des acides aminés par le diagramme donné par l'autoanalyseur nous a donné 10,4 % de protéines et 29 % d'osamines. On peut noter le fort pourcentage des acides aminés acides : acide glutamique et aspartique et l'absence de cystéine.

TABLEAU XX

Composition molaire des acides aminés de la fraction FI S₁ HA
calculés par rapport à un résidu d'alanine

Asp	2	Ileu	0.3
Thr	0.4	Leu	1
Ser	1	Tyr	0.6
Glu	0.9	Phe	0.6
Pro	0.4	Lys	0.8
Gly	0.8	His	0.3
Ala	1	Arg	0.9
Val	0.6	GlcNH ₂	14.6
Met	0.3	FucNH ₂	18.3



2 - Etude de la copule glucidique

a) Matériels et méthodes :

- Compositions centésimale et molaire

Les compositions centésimale et molaire ont été déterminées selon les méthodes décrites p. 58.

- Nature des points d'attache des liaisons glycosidiques par permethylation

La fraction FI S₁ HA a été perméthylée par la méthode d'HAKOMORI (88) modifiée par SANFORD et CONRAD (89) au diméthylsulfinyle carbanion, iodure de méthyle.

Nous allons voir successivement la préparation de la base méthylsulfinyle carbanion, la perméthylation elle-même et l'analyse des produits méthylés obtenus par méthanolyse des perméthyl-glycoprotéines.

. Préparation de la base :

Dans un flacon 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 est gardé à l'obscurité à 4°C.

. Perméthylation du FI S₁ HA :

3 mg de FI S₁ HA 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 ajouté à l'aide d'une aiguille

hypodermique. Le flacon est ensuite remplacé dans le 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 remplacé 30 minutes au bain ultrasonique. La solution contenant le FI S₁ HA perméthylé est versée dans 10 ml d'eau distillée. Le sucre méthylé est extrait par trois fois 5 ml de chloroforme. Les phases organiques sont rassemblées et 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 de Séphadex 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. (85) à 200 µl de solution, on additionne 200 µl de phénol à 5 % et 1 ml d'acide sulfurique concentré. Les fractions sont rassemblées, puis séchées pendant 24 heures sous P2 O5.

. Analyse des éthers méthyliques :

Les éthers méthyliques libérés par méthanolyse (méthanol, HCl 0,5 N, 80°C, 24 h) sont analysés avant et après peracetylation (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 OV 101 (60 m × 0,4 mm) WCOT, température programmée de 110°C à 230°C à raison de 3° min ; gaz vecteur azote 0,4 bar et d'autre part sur colonne de carbowax 6000 (3 m × 2 mm) à la température programmée de 120°C à 200°C, à raison de 4° min sous un débit de gaz vecteur azote 20 ml/min.

D'autre part, les éthers méthyliques ont été caractérisés par couplage GC-MS dans les conditions expérimentales suivantes : appareil quadripolaire RIBER Mag 10-10, énergie d'ionisation 70 ev, courant d'ionisation 0,2 mA. Les éthers méthyliques ont été également étudiés après

électrophorèse à pH 3,9 de l'hydrolysate chlorhydrique de la fraction FI S₁ HA perméthylée.

- Oxydation périodique

Nous avons utilisé la méthode de GOLDSTEIN et al. (90).

Une solution de 50 mg de FI S₁ HA dans 12,5 ml d'eau distillée est additionnée de 25,5 ml de métapériodate de sodium 0,05 M. 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 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 est repris par 10 ml H₂O et la solution est amenée à pH 1 par de l'acide sulfurique 2 N. L'hydrolyse est poursuivie pendant 18 heures à température ambiante. La solution est alors neutralisée par de l'hydroxyde de barium et le précipité de sulfate de barium est abondamment lavé par de l'eau distillée. Le surnageant et les eaux de lavage sont lyophilisées. L'oligosaccharide résistant à l'oxydation périodique 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 p. 61) et d'autre part en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse après méthylation.

b) Résultats et discussion :

- Composition centésimale et molaire en monosaccharides de la glycoprotéine FI S₁ HA (figure 23 p. 103)

Les rapports centésimaux et molaires ont été rassemblés dans le tableau XXI p. 106. Nous avons constaté une très bonne reproductibilité

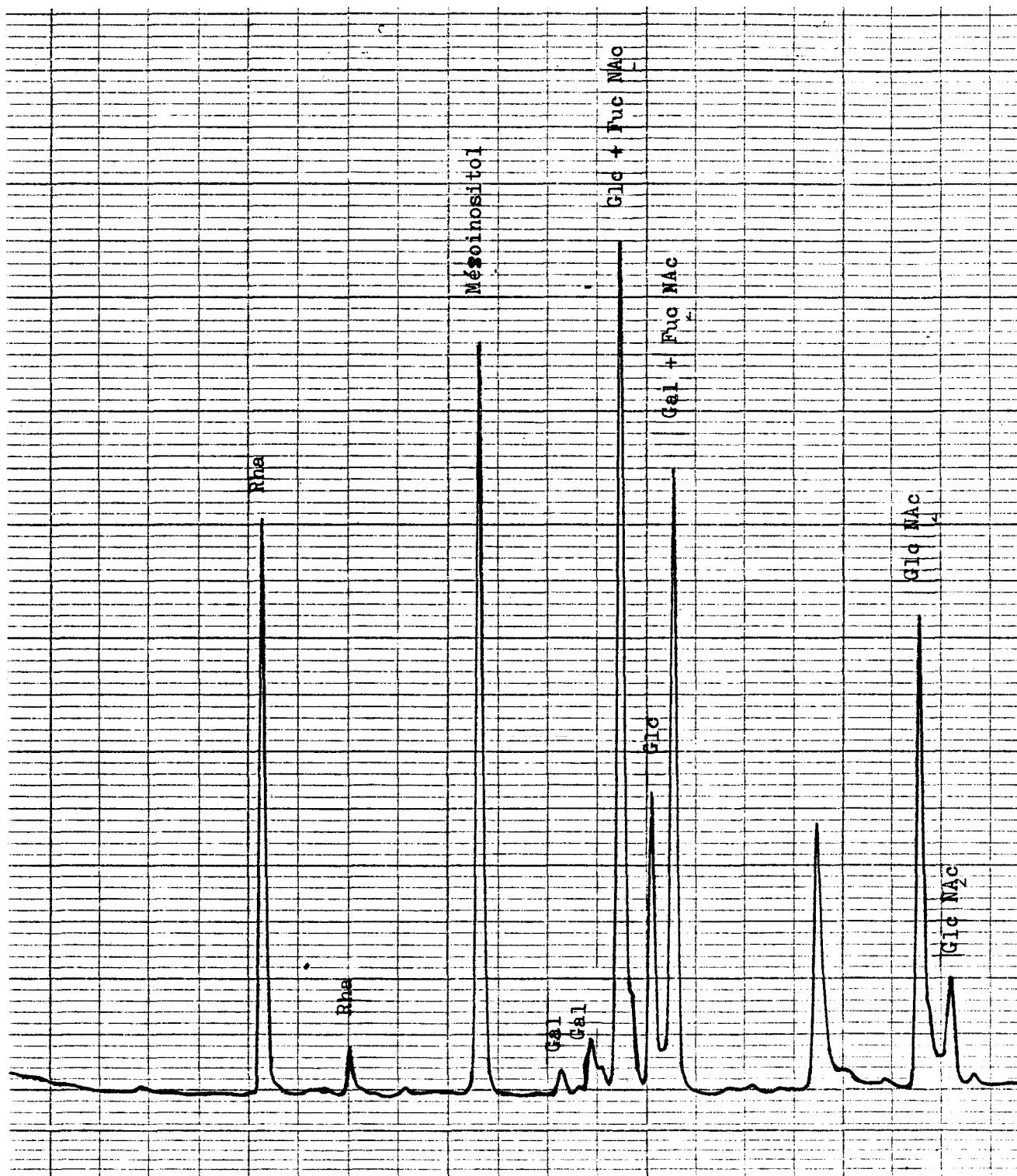


Figure 23

Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation de la fraction I de la chromatographie sur ultrogel hydroxy-apatite (HA) du surnageant de la précipitation au cetavlon S₁ appelée FI S₁ HA. Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie OV 210 à 5 % sur varaport 30 "Mesh" 80-100 ; température programmée de 100 - 220°C à raison de 2°C/mn sous un débit de gaz vecteur (azote) : 10 ml/mn.

des rapports molaires lors des différentes préparations de cette fraction FI S₁ HA.

A la lumière de ces résultats, nous remarquons par rapport au principe actif de départ une très grande simplification dans la composition des monosaccharides. En effet, nous ne retrouvons que deux monosaccharides neutres : le glucose et le rhamnose, et deux osamines : la glucosamine et la fucosamine. En ce qui concerne les rapports molaires, nous obtenons sur la base de 2 résidus de glucose, 1 rhamnose, 1,25 résidu de glucosamine et 2,4 résidus de fucosamine.

- Nature des points d'attache des liaisons glycosidiques

Les éthers méthyliques obtenus par perméthylation et méthanolyse de la fraction FI S₁ HA ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire OV 101 avant et après acétylation (figure 24 p. 105) et par couplage gaz liquide chromatographie, masse spectrométrie.

Nous avons pu identifier le 2.3.4.6.tétra-O-méthyl glucose, le 3.4 di-O-méthyl rhamnose et après acétylation la 4 mono-méthyl fucosamine et la 4 mono-méthyl glucosamine. D'autre part, l'analyse des fractions neutre et basique de l'électrophorèse préparative de l'hydrolysate de la fraction FI S₁ HA perméthylée nous a permis de préciser les rapports molaires des différents éthers méthyliques. Dans la fraction neutre, nous identifions pour deux perméthyl-glucose, un 3.4 di-méthyl rhamnose et dans la fraction basique pour deux résidus de 4 mono-méthyl glucosamine, trois résidus de 4 mono-méthyl fucosamine.

- Conclusion

Grâce à la perméthylation et la méthanolyse de la fraction FI S₁ HA, nous pouvons conclure ceci :

- . Le glucose se trouve en position externe (présence de perméthyl glucose)

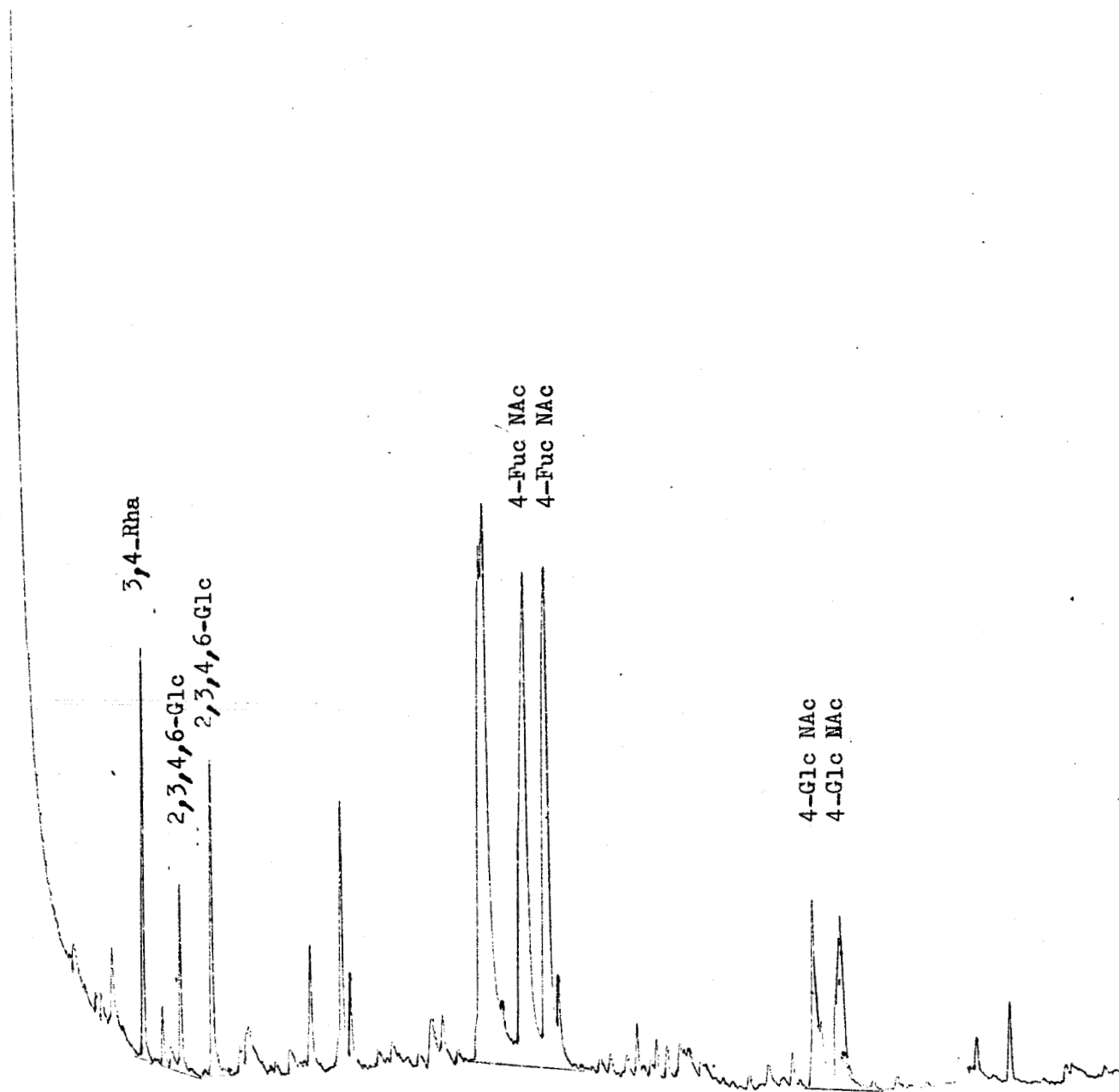


Figure 24

Chromatographie en phase gazeuse de la fraction FI S₁ HA perméthylée, méthanolysée et peracétylée. Injection sur colonne de verre (capillaire) OV 101 ; température programmée de 130 à 225 °C à raison de 3°C/mn, gaz vecteur (azote) : 0,4 bar. Injecteur de ROSS



TABEAU XXI

Composition molaire et centésimale de FI S₁ HA

	Composition molaire						Composition centésimale	
	Rha	Gal	Man	Glc	GlcNAc	FucNAc	Oses neutres	Osemines
	1	-	-	2	1.25	2.4	17 %	39,9 %



- . Position à l'intérieur de la chaîne du rhamnose branché en 2
- . Enfin, la présence de la 4 mono-méthyl glucosamine indique une structure branchée et un branchement en 3 sur la chaîne osaminique.

- Oxydation périodique :

L'oxydation périodique suivie de la réduction et de l'hydrolyse sulfurique nous a fourni sur biogel P2, à l'exclusion de la colonne, une fraction sucrée dont nous avons étudié la composition molaire en sucres et la structure après méthylation.

1° Composition molaire

Nous avons rassemblé dans le tableau XXII p. 109 l'étude comparée entre la fraction active FI S₁ HA et la fraction oxydée. Nous constatons la disparition complète du glucose et du rhamnose, attestant ainsi la position externe de ces deux sucres. Nous notons sur les diagrammes des composés trifluoroacétylés la présence d'un pic d'érythritol et des deux osamines : glucosamine et fucosamine dans des rapports 1/2 (figure 25 p. 108).

2° Etude de la structure de la fraction oligosaccharidique

L'oligosaccharide a été méthylé selon la méthode décrite p. 101. L'étude de cette fraction glucidique perméthylée en spectrométrie de masse n'a donné aucun résultat, aussi bien en couplage GLC-MS qu'en injection directe : le polysaccharide ayant une masse moléculaire trop importante pour être analysé dans ces modes. Par contre, après méthanolyse et peracétylation de cette fraction glucidique perméthylée, nous avons pu identifier la 4 mono-méthyl fucosamine, la 4.6 di-O-méthyl glucosamine et la 4 mono-méthyl glucosamine dans des rapports : 4/2/1 (figure 26 p. 110). La 4 mono-méthyl glucosamine nous pose un problème ; en effet, étant donné l'hypothèse de structure de FI S₁ HA, nous nous attendions à ne pas trouver de

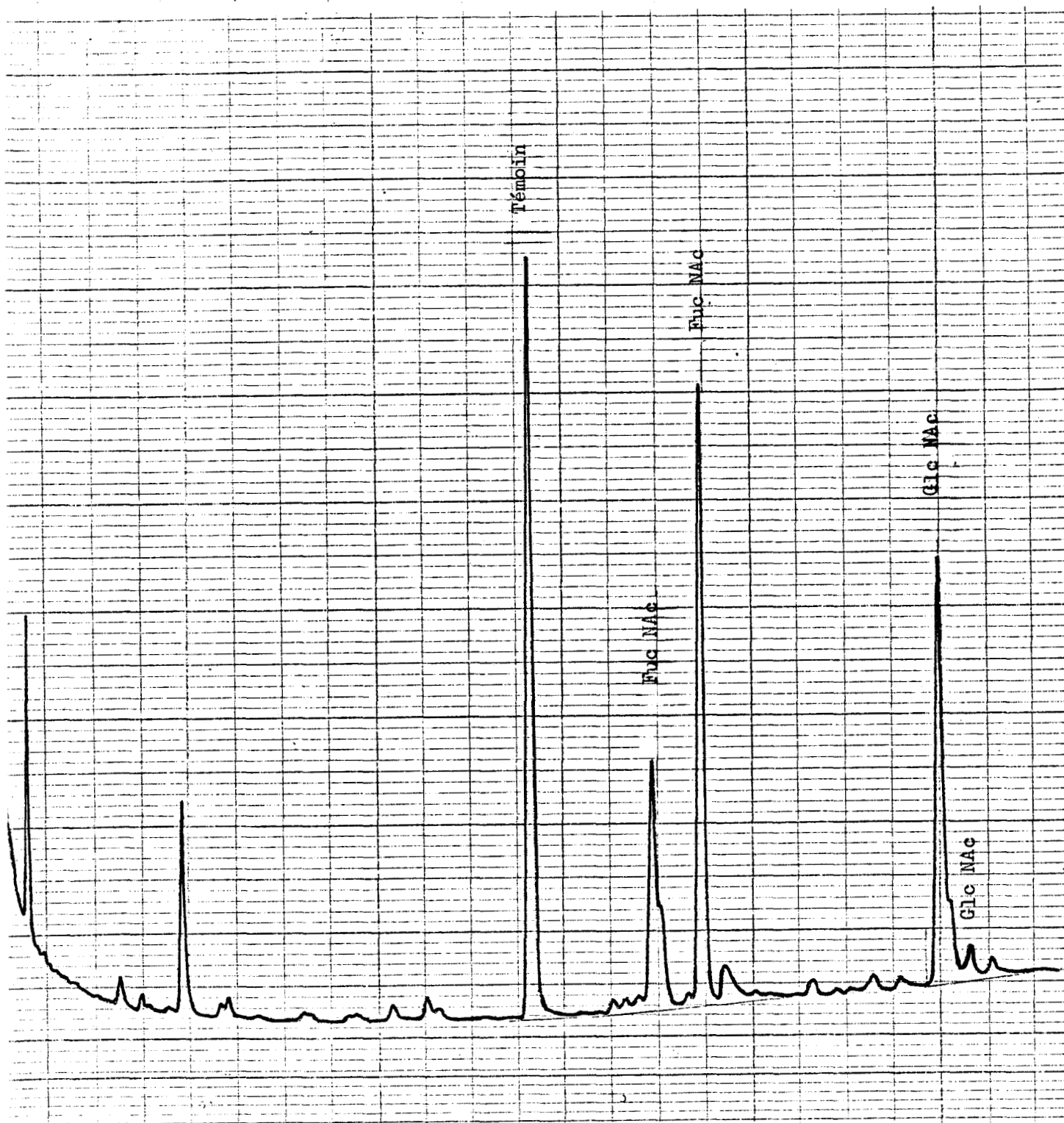


Figure 25

Chromatographie en phase gazeuse des méthyl glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation de la fraction FI S₁ HA.oxydée (IO₄H) Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV 210 à 5 % sur varaport 30 "Mesh" 80.100 Température programmée de 100 à 200°C à raison de 2°C/mn sous un débit de gaz vecteur (azote) 10 ml/mn.



TABLEAU XXIIComposition molaire de FI S₁ HA avant et après IO₄H

	Rha	Glc	GlcNAc	FucNAc
FI S ₁ HA	1	2	1.25	2.4
FI S ₁ HA après IO ₄ H	-	-	1	2



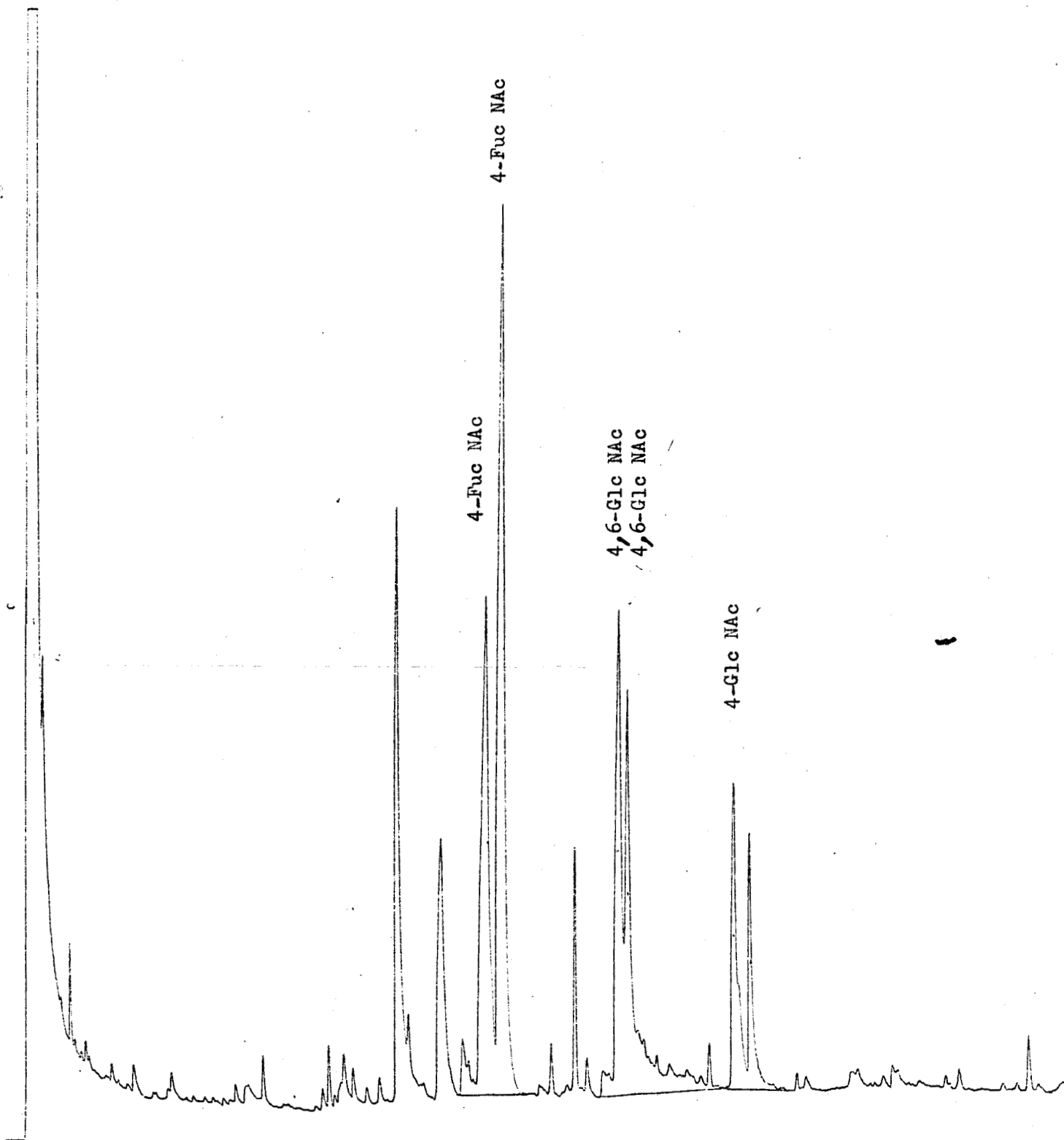


Figure 26

BUS
LILLE

Chromatographie en phase gazeuse de la fraction FI S₁ HA après oxydation périodique. Fraction réduite, perméthylée, méthanolysée, peracétylée. Injection sur colonne de verre (capillaire) OV 101 ; température programmée de 130 à 225°C à raison de 3°C/mn, gaz vecteur (azote) : 0,4 bar. Injecteur de ROSS

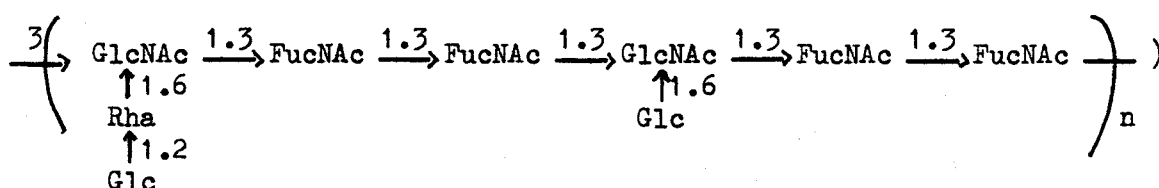
4 mono-méthyl glucosamine, la glucosamine nous semblant être le point de branchement du glucose et du rhamnose.

En conclusion, l'absence totale du glucose et du rhamnose, après l'action de l'acide périodique, est en faveur de leur position externe sur la chaîne.

D'autre part, l'identification du perméthyl glucose et du 3.4 di-o-méthyl rhamnose permet de conclure à la présence de disaccharides externes Glc 1.2 Rha.

La présence de la 4.6 di-o-méthyl glucosamine est en faveur d'un branchement du disaccharide Glc 1.2 Rha sur la glucosamine. Enfin, les dérivés méthylés des osamines prouvent la nature de la chaîne principale composée d'une succession de glucosamine et fucosamine liées en 1.3.

Les résultats de la composition molaire en sucres d'une part et l'étude de la séquence des monosaccharides effectués par méthylation et oxydation périodique d'autre part permettent de poser en hypothèse la structure de l'unité de réception oligosaccharidique.



3° Etude de la nature glycoprotéinique du FI S₁ HA

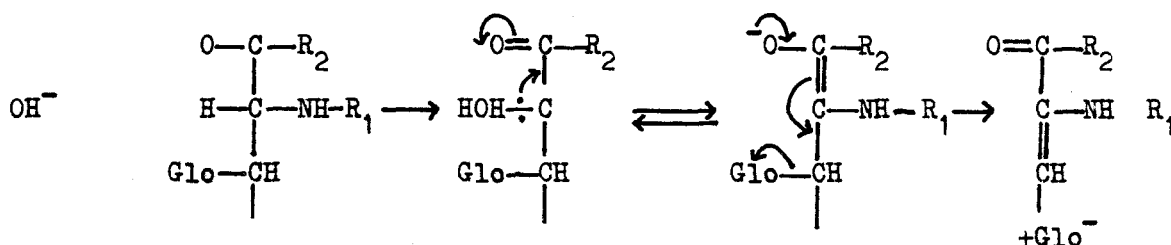
La présence dans la fraction active FI S₁ HA d'une copule protéique (15 %) nous a incités à rechercher quel type de liaison unissait cette protéine à la copule glucidique. Nous avons donc effectué des recherches sur le type de liaison, soit O glycosidique, soit N glycosidique dans ce produit actif FI S₁ HA.

ℒ) Matériels et méthodes :

- . Recherches des liaisons O glycosidiques

Les glycanes liés O glycosidiquement sur une chaîne protéique peuvent être séparés de cette dernière par un mécanisme de élimination en milieu alcalin (NaOH 0,1 N) 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 copule glucidique)

Pour cette expérience, nous avons pris la technique de TANAKA (91), c'est-à-dire une incubation de 1 mg de FI S₁ HA dans 3 ml 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 composé FI S₁ HA d'une proportion très importante d'osamines et notamment de N acetyl glucosamine nous a incités à rechercher le chaînon asparaginy-glucosamine qui constitue le point d'attache de nombreuses glycoprotéines.

Nous avons utilisé deux techniques permettant une approche de ce point d'attache qui devront être confirmées par d'autres, notamment par l'isolement du chaînon asparagine-glucosamine.

1) Rupture de la liaison N glycosidique

L'hydrazinolyse permet de se débarrasser de la copule protéique (rupture des liaisons peptidiques et de la liaison asparaginy-glucosamine).

2) Rupture sodique en milieu réducteur qui fournit la copule glucidique avec le sucre au point d'attache réduit.

• Rupture de la liaison N glycosidique

1) Hydrazinolyse

La technique que nous avons employée est celle de BAYARD (92). La fraction active FI S₁ HA 50 mg est traitée par de l'hydrazine (5 ml) pendant 30 heures à 100°C. L'hydrazinolysat est séché à l'évaporateur rotatif en présence de toluène, puis placé à l'excicateur en présence d'acide sulfurique afin de le neutraliser complètement. L'hydrazinolysat est ensuite repris par de l'acide acétique 5 % et purifié sur une colonne de G 50 Séphadex élué par de l'eau distillée à raison de 10 ml heure.

Le premier repérage se fait au phénol sulfurique (200 μ l de solution, 200 μ l phénol 5 %, 1 ml d'acide sulfurique concentré : lecture à 492 nm au spectrophotomètre), afin d'identifier la fraction glucidique désacétylée, puis un second repérage à la ninhydrine permettant d'identifier les acides aminés sous forme d'hydrazides. La fraction glucidique désacétylée est N réacétylée par la méthode de SPIRO.(93).

Les oligosaccharides sont dissous dans une solution de bicarbonate de sodium saturée. L'anhydride acétique est ajoutée, 25 fois en excès par rapport aux fonctions amines et alcools libres, à température ambiante, en 5 aliquotes égales en une heure. La fraction ainsi N réacétylée est ensuite chromatographiée sur Dowex 50 x 8 (4 fois en excès) pour éliminer les sels. La fraction glucidique N réacétylée est analysée à l'auto-analyseur après une hydrolyse chlorhydrique (HCl 5,6 N, 100°C, 24 heures en présence d'un témoin interne : la norleucine) (voir technique p. 57). Nous avons donc réussi par cette technique à récupérer une fraction dépourvue de sa chaîne protéique. Cette fraction a été étudiée en chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et après méthylation pour

avoir confirmation des résultats trouvés sur la fraction FI S₁ HA totale.

2) Rupture sodique en milieu réducteur

La technique que nous avons employée sur la fraction FI S₁ HA est celle de MARSHALL et NEUBERGER (94). Une solution de glycoprotéine (3 mg dans 1 ml NaOH 0,2 M contenant BH₄K M) est chauffée à 100°C pendant 10 heures dans un bain-marie en ajoutant à intervalles réguliers 200 µl de la solution NaOH-BH₄K. La solution est refroidie, puis hydrolysée en présence d'un témoin interne : la norleucine par de l'acide chlorhydrique 5,6 N pendant 24 heures à 100°C. L'hydrolysate est séché dans un excicateur en présence de soude et analysé à l'autoanalyseur pour détecter la présence éventuelle de glucosaminitol provenant de la réduction de la glucosamine liée à l'asparagine.

β) Résultats :

. Recherche des liaisons O glycosidiques

La cinétique de la réaction est suivie à 240 nm au spectrophotomètre. L'augmentation d'absorbance du milieu réactionnel à 240 nm est due à la formation de dehydroamino-acides formés au cours de la β élimination. Lors de nos expériences, nous n'avons jamais mis en évidence de variation de densité optique lors de l'hydrolyse alcaline de la glycoprotéine FI S₁ HA. De ces expériences, nous concluons à l'absence de liaisons O glycosidiques dans le composé FI S₁ HA.

. Recherche des liaisons N glycosidiques

Rupture de la liaison N glycosidique

1) Hydrazinolyse

Les liaisons peptidiques et la liaison asparaginyglucosamine sont coupées par l'hydrazine en libérant les hydrazides. On peut noter la différence de composition en acides aminés sur les deux diagrammes de la fig. 27 p 115, avant et après hydrazinolyse. Après hydrazinolyse, nous

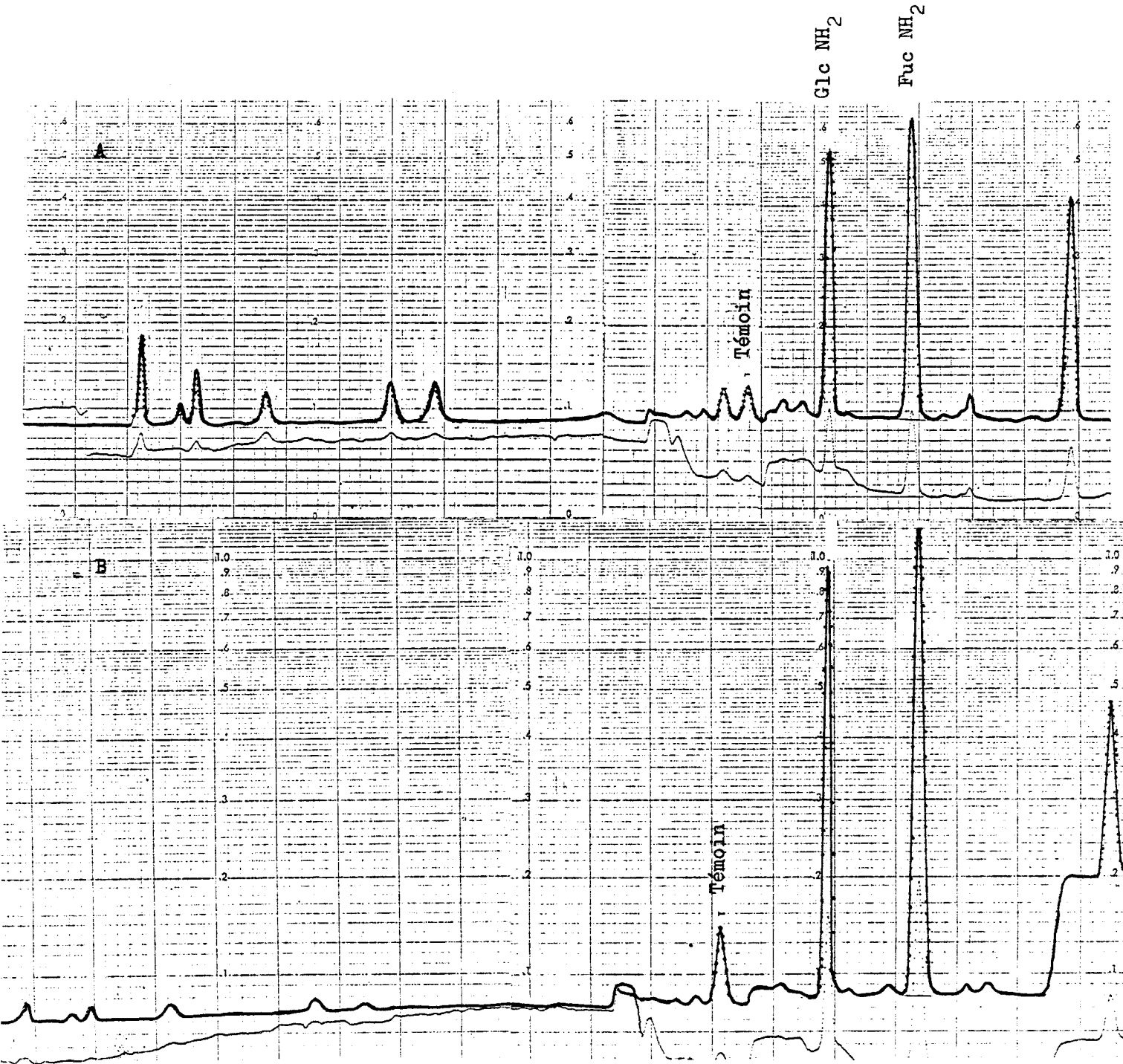


Figure 27

Etude comparée des diagrammes d'analyse des acides aminés à l'autoanalyseur Beckman des fractions FI S₁ HA (A) et FI S₁ HA hydrazinolyse (B)



ne retrouvons pratiquement plus d'acides-amino, par contre les osamines persistent : glucosamine et fucosamine. Cette expérience est en faveur d'une liaison de type asparaginy-glucosamine dans le composé FI S₁ HA. Le polysaccharide isolé après hydrazinolyse et passage sur G 50 Séphadex a été étudié en chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et méthylation afin de confirmer les résultats obtenus lors de telles expériences sur la glycoprotéine totale.

Après chromatographie sur colonne de G 50 Séphadex, nous avons observé la présence de deux fractions sucrées (l'une étant à l'exclusion de la colonne et l'autre incluse dans le gel) et une fraction répondant à la ninhydrine et étant composée des hydrazides. Ce fractionnement est exposé dans la figure 28 p.117. Ces composés, fraction I et fraction II de l'hydrolysate, ont été étudiés quant à leur composition molaire avant et après N réacétylation. Ces résultats sont rassemblés dans le tableau XXIII p. 118.

Avec ces résultats de l'hydrazinolyse de FI S₁ HA, nous pouvons conclure à la présence de deux sortes de chaînes sur la protéine : 83 % des chaînes glucidiques auraient une masse moléculaire supérieure à 9 000 et 17 % de la copule glucidique seraient constitués de courtes unités oligosaccharidiques. Ces résultats demandent à être confirmés, en particulier en ce qui concerne la masse moléculaire et l'homogénéité des fractions recueillies.

Les études de méthylation et d'oxydation périodique sur la fraction I obtenue après passage sur G 50 Séphadex de l'hydrazinolyse nous ont fourni des renseignements analogues à ceux obtenus par l'application de ces techniques sur la glycoprotéine native.

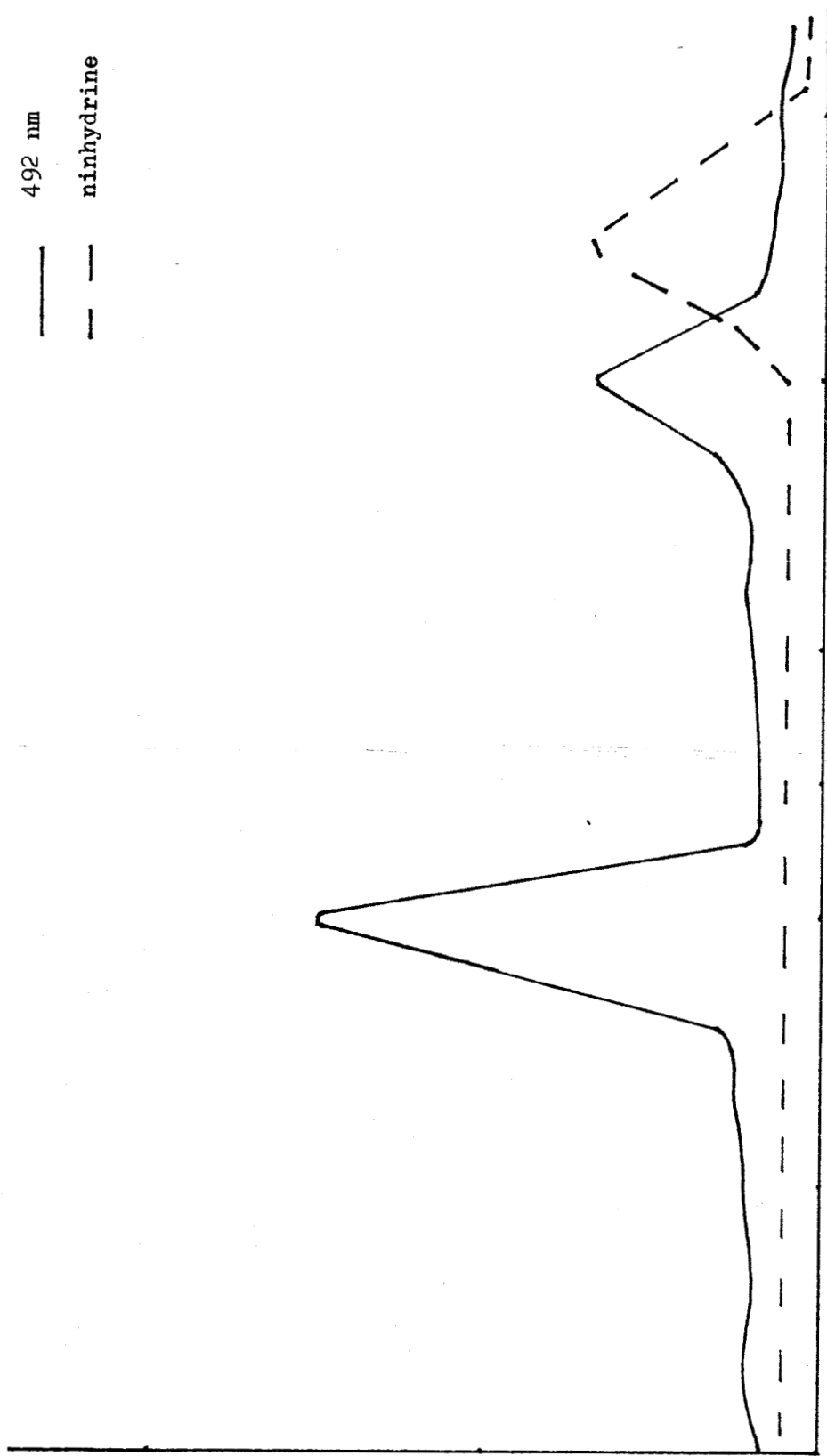


Figure 28

Chromatographie de l'hydrazinolysat de FI S₁ HA sur colonne de Séphadex G 50 (50 x 3 cm), débit 12 ml/h



TABLEAU XXIII

Composition molaire des fractions I et II de la chromatographie
sur G 50 Séphadex de FI S₁ HA hydrazinolysé avant et après
N réacétylation

	Gal	Man	Glc	GlcNAc	FucNAc	Rha	Rendement FI S ₁ HA
FI Non N Réac.	0.2	-	1	0.7	1.2	0.6	43,4 %
FI N Réac.	0.2	-	1	0.8	1.5	0.6	
F II Non N Réac.	0.1	-	1	0.9	1.4	0.9	8,8 %
F II N Réac.	0.1	-	1	1	2.6	1.4	



2) 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. Nous avons identifié, après hydrolyse chlorhydrique du FI S₁ HA ainsi traité, de la glucosamine et du glucosaminitol (figure 29 p.120). Nous n'avons pas pu calculer le nombre exact de résidus d'osamines restantes, étant donné que cette réaction n'est pas quantitative. Cependant, cette expérience est une preuve supplémentaire de l'existence d'une liaison de type N glycosidique dans la glycoprotéine FI S₁ HA.

3) Conclusion

A la lumière de ces différents résultats, nous pouvons conclure :

- L'hydrazinolyse a libéré une fraction oligosaccharidique, exempte d'acides aminés, dont la composition molaire en sucre est identique à la glycoprotéine native FI S₁ HA. Cette expérience permet de conclure à la nature glycoprotéinique de notre fraction active.

- L'hydrazinolyse a fourni deux fractions saccharidiques séparées sur G 50 Séphadex de masse moléculaire différente, prouvant ainsi la présence de deux types de chaînes glucidiques sur la protéine.

- La rupture sodique en milieu réducteur nous a donné sur les diagrammes d'analyses des acides aminés au Beckman-Multichrom de la glucosamine et du glucosaminitol. Les conditions utilisées pour effectuer cette lyse étant celles décrites pour rompre les liaisons asparaginy-glucosamine (95), nous pouvons poser en hypothèse la présence de liaison de type asparaginy-glucosamine dans notre glycoprotéine active FI S₁ HA.

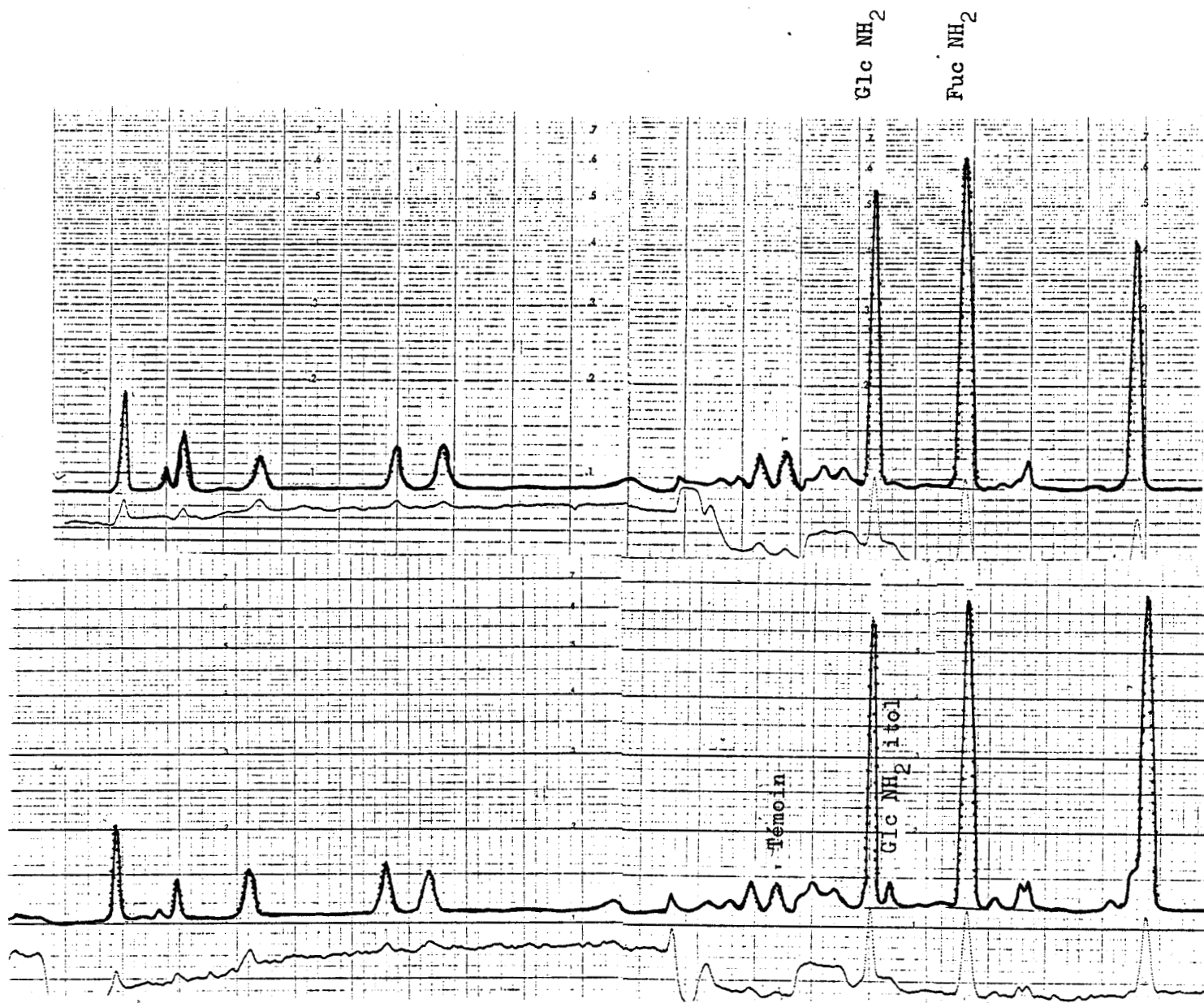


Figure 29

Etude comparée des diagrammes d'analyse des acides aminés à l'autoanalyseur Beckman de la fraction FI S₁ HA avant et après rupture sodique en milieu réducteur

Afin de lever toute ambiguïté sur le point d'attache, il sera nécessaire d'entreprendre l'isolement de la liaison asparagine-glucosamine après traitement à la pronase de la partie protéique de la glycoprotéine et hydrolyse partielle de la fraction glycanique.

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'étude du principe actif RC 1292 sont les suivantes.

1) Le principe actif se caractérise par sa richesse en glucides (47 %) avec une très grande diversité en monosaccharides : pentose (arabinose) ; methyl pentose (rhamnose et fucose) ; hexoses neutres (galactose, mannose et glucose) ; acide uronique ; hexosamine (glucosamine et fucosamine). Cette dernière a été identifiée d'une part après isolement, en spectrométrie de masse sous forme polyolacétate : cette première expérience a permis de préciser la nature 2 amino 2-6 dideoxyhexose et d'autre part par chromatographie sur couche mince sous la forme de son dérivé ozazone, ce qui a permis de l'identifier à la fucosamine : 2 amino 2-6 dideoxygalactose.

La copule protéique du principe actif (32 %) se caractérise par une proportion importante d'acides aminés acides : acide aspartique, acide glutamique.

2) Le principe actif RC 1292 est hétérogène en ultracentrifugation (3 pics distincts). Cette hétérogénéité nous a amenés à le fractionner en recherchant dans chaque fraction obtenue l'activité pharmacologique.

3) Le fractionnement du RC 1292 total par divers procédés (cétavlon, gel filtration, sulfate d'ammonium, résines d'échange d'ions, hydroxy apatite) conduit à un certain nombre de fractions dont les plus actives possèdent une composition glucidique très proche les unes des

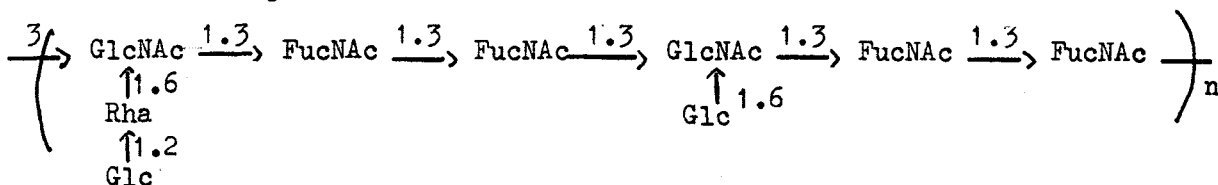
autres. La molécule qui possède l'activité anti-inflammatoire vis-à-vis de la formation d'œdème podal à la carraghénine se caractérise par sa richesse en hexosamine : glucosamine et fucosamine et par une simplification au niveau des monosaccharides neutres : présence de rhamnose et de glucose presque exclusivement.

Parmi toutes les méthodes de fractionnement, la chromatographie du surnageant au cétaïlon sur colonne d'hydroxy apatite nous a fourni les résultats les plus intéressants. La fraction I éluee par KCl 0,01 M possède une activité pharmacologique aussi importante que le principe actif RC 1292 et une composition glucidique simple. De plus, cette méthode de fractionnement est simple et reproductible aisément.

4) Cette fraction I de la chromatographie sur hydroxy apatite (FI S₁ HA) se caractérise par sa richesse en osamines (40 %) ; elle contient en outre 17 % d'oses neutres et 15 % de protéines. Dans cette fraction protéique, il est à noter une forte proportion d'acides aminés acides (acide glutamique surtout) et l'absence de cystéine.

La composition en sucres de cette fraction FI S₁ HA apparaît relativement simple : deux oses neutres : le rhamnose et le glucose ; et deux osamines : la glucosamine et la fucosamine dans les rapports molaires suivants : 2 glucose ; 1 rhamnose ; 1,25 glucosamine et 2,4 fucosamine.

5) L'application des techniques d'étude de structure des polysaccharides : perméthylation et spectrométrie de masse, oxydation périodique sur la glycoprotéine FI S₁ HA nous a permis d'identifier un polysaccharide de répétition :



Cette structure est en accord avec les résultats de méthylation : identification de perméthyl glucose et de 3.4 di-o-méthyl rhamnose ; mise en évidence d'une structure branchée sur la glucosamine par l'identification de la 4 mono-O-méthyl glucosamine et enfin, position interne de la fucosamine par caractérisation de la 4 mono-O-méthyl.

Cette structure est en accord avec les résultats de l'oxydation périodique : absence totale d'hexoses neutres (rhamnose et glucose) dans le polysaccharide résistant à l'acide périodique et présence d'hexosamine dans les rapports molaires suivants : 1 glucosamine pour 2 fucosamine.

L'identification des éthers méthyliques des hexosamines (4.6 di-O-méthyl glucosamine et 4;mono-O-méthyl fucosamine) permet de conclure à des enchaînement polyhexosaminyliques (1→3) dans la séquence de l'oligosaccharide résistant à l'oxydation périodique.

6) Cette fraction FI S₁ HA est de nature glycoprotéinique.

a) L'hydrazinolyse libère le polysaccharide de sa combinaison avec la protéine.

b) L'hydrolyse alcaline en milieu réducteur et à chaud de la glycoprotéine conduit à l'identification de glucosaminitol provenant de l'osamine du point d'attache.

c) L'hydrolyse alcaline de la glycoprotéine à froid n'a donné aucune variation de densité optique à 240 nm, donc absence de liaisons O glycosidiques dans le FI S₁ HA.

Compte tenu de ces différents résultats, nous pouvons poser en hypothèse que le polysaccharide est attaché à la protéine par une liaison faisant intervenir la N acétyl glucosamine. Le nombre de résidus de glucosamine au point d'attache reste à déterminer plus précisément. D'autre

part, l'isolement et l'identification du chaînon asparagine-glucosamine lèverait toute ambiguïté sur la nature du point d'attache.

7) La fraction FI S₁ HA possède une activité anti-inflammatoire égale à celle du RC 1292 total. L'intégrité de la glycoprotéine semble être nécessaire à l'activité anti-inflammatoire. En effet, la fraction hydrazinolysée possède une activité beaucoup moins importante que la glycoprotéine totale.

8) Le travail que nous ont confié les Laboratoires CASSENNE a permis de faire avancer la compréhension de ce nouveau produit anti-inflammatoire et de poser une hypothèse de structure de la fraction active de ce produit après purification. Cependant, d'autres travaux seront à entreprendre afin de confirmer d'abord cette hypothèse de structure. L'étude de la protéine pourra être envisagée, de même que l'isolement du chaînon asparagine-glucosamine, afin d'affirmer sa nature glycoprotéique.

9) Ce travail, qui nous a permis de purifier une glycoprotéine bactérienne à activité anti-inflammatoire, doit être poursuivi. Il sera en effet nécessaire de préciser la masse moléculaire de la glycoprotéine, d'étudier le nombre de chaîne glycaniques précis sur la protéine et de prouver définitivement la structure répétitive de la fraction glycanique. Ces données connues, nous pourrons enfin étudier la relation entre la structure et l'activité pharmacologique de cette glycoprotéine.

: :
: B I B L I O G R A P H I E :
: :

Réf.

- 1 - GOLOVTCHEK A.M., Thèse Pharmacie 1973, Université de Paris-Sud
- 2 - SPECTOR W.G., WILLOUGHBY D.A., The Pharmacology of Inflammation, English University Press, 1968
- 3 - AMOR B., Vie Med., 1972, 11, 1309
- 4 - DE DUVE C., PRESMAN B.C., GIANETTO R., WATTEAU R., APPELMANS F., Biochem. J., 1955, 60, 604
- 5 - WILLOUGHBY D.A., SPECTOR W.G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964, 116, 874-879
- 6 - SALTHOUSE T.N., MATLAGA B.F., Experientia, 1972, 28, 3, 326
- 7 - HOUCK J.C., FORSHER B.K., "Chemical Biology of Inflammation", Pergamon Press, 1967
- 8 - MOVAT H.Z., FERNANDO N.V.P., Lab. Invest. 1963, 12, 895-910
- 9 - COTRAN R.S., MAJNO G., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 116, 750
- 10 - MURPHY B.C., HAMMARSTROM S., SAMUELSSON B., Proc. Natl. Acad. Sci. 1979, 76, 4275
- 11 - MORRIS H.R., TAYLOR G.W., PIPER P.J., TIPPINS J.B., Nature, 1980, 285, 104
- 12 - MULLER-EBERHARD H.J., "Complement", Ann. Rev. Biochem. 1969, 38, 389-414
- 13 - RATNOFF O.D., Adv. Immunol., 1969, 10, 145-227
- 14 - DONALDSON V.H., J. Exp. Med., 1968, 127, 411-423
- 15 - MASSON P., Louvain Med. 1972, 91, 61-78
- 16 - FONTAGNE J., GIROUD J.P., "Pathopharmacologie expérimentale de la réaction inflammatoire aiguë". Revue des Sciences Médicales, 1976, 218
- 17 - PELTIER A.P., "Le Complément en Immunologie" (J.F. BACH), Flammarion Ed. 1972, p. 235-265

- 18 - DIAS DA SILVA W., EISELE J.W., LEPOW M.D., J. Exp. Med. 1967, 126,
1027
- 19 - SOBEL A., MARCEL G.A., LAGRUE G., Sem. Hôp. Paris, 1974, 50, 8, 549-559
- 20 - WILLIS A.L., J. Pharm. Pharmacol. 1969, 21, 126
- 21 - GIROUD J.P., WILLOUGHBY D.A., J. Path., 1970, 101, 241
- 22 - GIROUD J.P., Ph. D. Thesis, University of London, 1973
- 23 - GIROUD J.P., WILLOUGHBY W.A., DUNN C.J., Colloque INSERM, Physio-
pathologie de l'articulation, années 1972, 73, 74
- 24 - ANGGARD E., JONSSON C.E., Prostaglandins in cellular biology 1972
Ed. Plenum Press, N.Y. p. 269
- 25 - EAKINS K.E., WITHELOCKE R.A.F., PERKINS E.S., BENNETT A., UNGER W.G.
Advances Biosciences, 1973, 427
- 26 - JONSSON C.E., HAMBERG M. Advances in the Biosciences, Ed. Pergamon
Press, Vieweg 1974, 441
- 27 - WILLOUGHBY D.A., J. Path., 1968, 96, 381
- 28 - GOLDBERG N.D., HADDOX M.K., DUNHAM E., LOPEZ C., HADDEN J.W.,
Nature, 1973, 245-458
- 29 - WILLOUGHBY D.A., GIROUD J.P., DI ROSA M., VELG G.P., Ed. R. H. KHAN
et W.E.M. LANDS. Academic Press Inc. 1973
- 30 - ZURIER R.B., WEISSMAN G., HOFFSTEIN S., KAMMERMAN S., TAI H.H.,
J. Clin. Invest., 1974, 53, 297
- 31 - WEISSMAN G., TRIANGLE, 1980, XX - n°1/2
- 32 - BENVENISTE J., HENSON P.M., COCHRANE C.G., in LEPOW I.H. and WARD P.A.
Ed., Acad. Press New-York and London, 1972, 779
- 33 - DEMOPOULOS C.A., PINCKARD R.N., HANAHAN D.J., J. Biol. Chem., 1979,
254, 9355
- 34 - BENVENISTE J., TENCE M., VARENNE P., BIDAULT J., BOULET C.,
POLONSKY J., C.R. Acad. Sci. Paris (D), 1979, 289, 1077

- 35 - RATNOFF O.D., Adv. Immunol. 1969, 16, 145
- 36 - TAYLOR F.B., MULLER-EBERHARD H.J., Nature, 1967, 216, 1023
- 37 - WARD P.A., J. exp. Med., 1967, 126, 189
- 38 - ZIMMERMAN T.S., ARNOYAVE C., MULLER-EBERHARD M.J., J. exp. Med.
1971, 134, 1591
- 39 - BAINTON D.F., ULLYOT J.L., FARQUHAR M.G., J. exp. Med., 1971, 134,
907
- 40 - BAGGIOLINI, TRIANGLE, 1980, XX, n°1/2
- 41 - REMOLD H.G., J. exp. Med., 1973, 130, 1065-1076
- 42 - MESSNER R.P., SELINEK J., J. clin. Invest., 1970, 49, 2165
- 43 - GOLDSTEIN I.M., MALMSTERN C.L., SAMUELSSON B., WEISSMAN G.,
Inflammation, 1977, 2, 309
- 44 - KLEBANOFF S.J., Ed. J.A. BELLANTI ; D.H. DAYTON, Raven Press, New-
York, 1975, p. 45
- 45 - WILLOUGHBY D.A., La Recherche, 1978, 9, n° 85
- 46 - LIU D.Y., HIGGINS T.J., PETSCHKE K., REMOLD H.G., DAVID J.R. Fed.
Proc. 1978, 78, 1400
- 47 - BLANC M., La Recherche, 1981, 12, n° 120
- 48 - GRYGLEWSKI et al., Prostaglandins, 1975, 10, 343
- 49 - BLACKWELL, FLOWER R.L., VANE J.R., Brit. J. Pharmacol., 1978, 62,
79
- 50 - DANON A., ASSOULINE G., Nature, 1978, 273, 552
- 51 - RUSSO-MARIE F., PAING M., DUVAL D., J. Biol. Chem., 1979, 254, 8498
- 52 - FLOWER R.J., BLACKWELL G.J., Nature, 1979, 278, 456
- 53 - CARNUCCIO R., DI ROSA M., PERSICO P., Brit. J. Pharmacol., 1980,
68, 14
- 54 - POLONSKY J., TENCE M., VARENNE P., DAS B.C., LUNEL J., BENVENISTE J.,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, 77

- 55 - YARON M., YARON I., ALLADOUF D., Ann. Rheum. Dis. 1971, 71, 613
- 56 - BROWN J.H., MACKEY H.K., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1968, 225
- 57 - FERREIRA S.H., MONCADA S., VANE J.R., Nature, 1971, 231, 237
- 58 - PHELPS P., Mc CARTY D.J., J. Pharmacol. exp. Ther., 1967, 158, 540
- 59 - WAGNER H., HRUBESCH M., JUNGE-HULSING, HAUSS W.H., "Symposium international sur l'inflammation en rhumatologie. Sa thérapeutique. Expérience de l'indométacine." Florence, Avril 1971
- 60 - VANE J.R., Nature New Biology, 1971, 231, 232
- 61 - BROUJHET H., KAHAN A., DELBARRE F., "Etudes expérimentales des anti-inflammatoires", Ed. DOIN, Paris 1968
- 62 - DI ROSA M., SORRENTINO L., Europ. J. Pharmacol., 1968, 4, 340
- 63 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARA A.L., RANDALL R.J., J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275
- 64 - SPACKMAN D.H., STEIN W.A., MOORE S., Anal. Chem. 1958, 30, 1190
- 65 - CHARET P., TETAERT D., HAN K.K., MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci. 1973, 276, 1629
- 66 - TILLMANS J., PHILIPPI K., Biochem. Z, 1929, 214, 36
- 67 - RIMINGTON G., Biochem. J., 1931, 25, 1062
- 68 - DISCHE Z., J. Biol. Chem., 1947, 167, 189
- 69 - NIAZI S., STATE D., Cancer Research, 1948, 8, 653
- 70 - WERNER I., ODIN L., Acat Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230
- 71 - ELSON L.A., MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1933, 27, 1824
- 72 - SEAMAN J.S., MOORE W.E., MITCHELL R.L., MILLER M.A., Tappi, 1954, 37, 336
- 73 - ZANETTA J.P., BRECKENBRIDGE W.C., VINCENDON G., J. Chromatog. 1972, 69, 291
- 74 - MICHL H. Monatsch. Chem. 1951, 82, 489
- 75 - FISCHER F.G., NEBEL H.G., Z. Physiol. Chem. 1955, 302, 10

- 76 - RICHTMYER N.K., "Phenyl-osazones" in WHISTLER R.L. et WOFROM M.L.,
Methods in carbohydrate chemistry, Academic Press Ed. New-York, 1963
- 77 - MONTREUIL J., SPIK G., "Microdosage des glucides : méthodes colori-
métriques de dosages des glucides totaux", 1963, 1
- 78 - TERHO T.T., HARTIALA K., Anal. Bioch., 1971, 41, 471-476
- 79 - SVEDBERG Th., PEDERSON K.O., "Die Ultrazentrifuge", STEINKOPFF Th.
Dresden et Leipzig, 1940
- 80 - YPHANTIS D.A., Biochemistry, 1964, 3, 297
- 81 - CHERVENKA C.H., Ann. Biochem. J., 1970, 34, 24-29
- 82 - CRUMPTON M.J., DAVIES D.A.L., Biochem. J., 1958, 70, 729
- 83 - SHARON N., SHIF I., ZEHAVI V., ibid, 1964, 93, 210
- 84 - BARKER S.A. et al., Nature, 1961, 189, 303
- 85 - DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F.,
Nature, 1951, 168, 167 - Anal. Chem. 1956, 28, 350
- 86 - BRUVIER C., Thèse 3e cycle, Lille, 1979
- 87 - SCOTT J.E., Meth. in Carbohyd. Chem., 1965, V, 38
- 88 - HAKOMORI S.I., J. Biochem. (Tokyo), 1964, 55, 205
- 89 - SANDFORD P.A., CONRAD H.E., Biochemistry, 1966, 5, 1508
- 90 - GOLDSTEIN I.J., HAY G.W., LEWIS B.A., SMITH F., Meth. in Carbohyd.
Chem., 1965, 5, 361-370
- 91 - TANAKA K., BERTOLINI M., PIGMAN W., Biochem. Biophys. Res. Com.,
1964, 16, 404
- 92 - BAYARD B., MONTREUIL J., Actes du colloque international, CNRS n° 221,
Ed. Paris, 1974, 209-218
- 93 - SPIRO R, 6, Meth. Enzymol., 1972, 3, XXVIII
- 94 - MARSHALL R.D., MEUBERGER A., Meth. in Carbohyd. Chem., 1976, VII,
212-219

