

50376
1983
241

50376
1983
241

N° d'ordre : 583

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

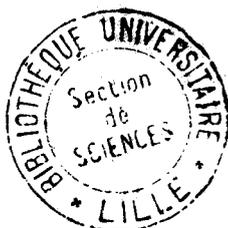
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Christine BRUVIER

**ETUDE D'UN IMMUNOMODULATEUR BACTERIEN
EXTRAIT D'UN LYSAT DE
KLEBSIELLA PNEUMONIAE O₁ K₂**



Présentée le 14 Juin 1983 devant la Commission d'Examen

Président :	M.	J.	MONTREUIL
Rapporteurs :	MM.	B.	FOURNET
		J.	AGNERAY
		P.	SMETS
Examineurs :	MM.	J.P.	BURET
		H.	MAYER
	Melle	G.	SPIK

A MES PARENTS ET AMIS

Je remercie

Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL

*Professeur à l'Université des Sciences et Techniques
de LILLE I*

*C'est au sein de votre laboratoire
que ce travail a pu être réalisé,
je vous suis très reconnaissante
de m'y avoir accueillie et tiens à
vous témoigner mon profond respect .*

Monsieur Jean Pierre BURET

*Président Directeur Général des Laboratoires
CASSENNE*

*Que ce mémoire qui concrétise le
travail de Recherches que vous nous
avez confié , me permette de vous
exprimer toute ma reconnaissance .*

Monsieur le Docteur Pierre SMETS

Directeur de Recherches des Laboratoires CASSENNE

Vous m'avez donné la possibilité de continuer ce travail et depuis quelques mois , vous m'avez accueillie dans votre laboratoire de Recherches .

Veillez accepter , le témoignage de ma profonde gratitude .

Monsieur le Professeur Jean AGNERAY

Professeur à l'Université PARIS-SUD

*Vous avez accepté de juger ce
travail .*

*Permettez-moi de vous adresser
tous mes remerciements .*

Mademoiselle le Professeur Geneviève SPIK

*Professeur à l'Université des Sciences et
Techniques de LILLE I*

*J'ai l'honneur de vous compter
parmi mes juges .*

*Veillez accepter mes
remerciements .*

Monsieur le Professeur Hubert MAYER

*Professeur à l'Institut Max-Planck d'Immunobiologie
à Fribourg (Allemagne)*

*Vous me faites l'Honneur de juger
ce travail .*

Veillez , accepter mes remerciements.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à

Monsieur le Professeur Bernard FOURNET

*Professeur à l'Institut Universitaire de Technologie de
VILLENEUVE D'ASCQ*

*Vous m'avez accueillie avec gentillesse
et bienveillance dans votre groupe et guidée
tout au long de ce travail en me faisant
bénéficier de votre expérience et
compétence scientifique .*

*Permettez-moi de vous exprimer ma plus
vive reconnaissance .*

*Je remercie les Laboratoires CASSENNE de m'avoir permis
d'accomplir ce mémoire .*

Je remercie très sincèrement

Monsieur René ZALISZ dont les conseils, suggérés avec grande gentillesse, m'ont été très bénéfiques .

Mes remerciements s'adressent également à

Messieurs Yves LEROY et José PAZ-PARENTE dont les conseils m'ont toujours été très précieux et qui ont su donner au groupe l'ambiance chaleureuse dans laquelle ce travail a été réalisé .

Qu'ils soient , ici , assurés de mon Amitié .

Monsieur Guy RICART qui m'a toujours si gentiment accueillie dans le laboratoire de Chimie Organique pour les analyses de spectrométrie de masse .

Madame Béatrice PRAT qui m'a beaucoup aidée dans la réalisation de ce mémoire .

Que tout ceux , qui par leur aide et gentillesse ont contribué
à la réalisation de ce mémoire , soient assurés de ma
reconnaissance .

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNOT Ernest	Biologie végétale

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FOURET René	Physique du solide
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean Pierre	Catalyse
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie physique

.../...

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, électrotechnique, automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre

Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences économiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAHIEU Jean Marie	Physique atomique et moléculaire.
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean Paul	Physiologie animale
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique

M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Géologie générale
Informatique fondamentale appliquée
Hydrométallurgie
Algèbre

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	P. 1
GENERALITES	6
I - REACTION IMMUNITAIRE	6
A- Réponse immunitaire	6
1 - Les cellules immunocompétentes	
a - les lymphocytes	6
α - les lymphocytes B	
β - les lymphocytes T	
b - les cellules tueuses	10
α - les lymphocytes " T tueurs "	
β - les cellules K	
γ - les cellules NK	
c - les cellules phagocytaires	12
α - la lignée monocyttaire	
β - les polynucléaires neutrophiles	
2 - Les anticorps	19
3 - Coopération cellulaire	21
4 - Les médiateurs	22
a - médiateurs actifs sur les macrophages	
α - facteur chimiotactique	
β - macrophage activator factor (MAF)	
γ - macrophage migration inhibition factor (MIF)	
δ - SMAF	
b - médiateur sécrété par les macrophages	
c - médiateur sécrété par les lymphocytes	
5 - Tolérance immunitaire	26
6 - Réaction spécifique des molécules de reconnaissance avec l'antigène	28
7 - Spécificité immunologique	28
8 - Fonctions immunologiques	30
B- Régulation de la réponse immunitaire	31

II - IMMUNOMODULATEURS ISOLES DE MICROORGANISMESP.	32
A- Adjuvant de FREUND	32
B- <i>Le Corynebacterium parvum</i>	33
C- Mycobactéries et leurs dérivés	34
1 - Le bacille de Calmette et Guérin		
2 - Le MER		
3 - Immunomodulateurs mimant certains motifs structuraux dans les extraits de mycobactéries		
D- CPS-K	37
E- Picibanil ou OK-432	37
F- Rhodexman	39
G- Les Lipopolysaccharides	39
H- Bestatine	40
I- FK 156	40
J- Glucans isolés de la paroi de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
K- Glucan isolé de <i>Coriolus versicolor</i>	42
L- Glucan isolé de <i>Lentinus edodes</i>	43
M- Glucan isolé de <i>Schizophyllum commune Fries</i>	...	43
N- Immunomodulateurs isolés d'Ascomycètes et de Basidiomycètes	44
III - IMMUNOMODULATEURS SYNTHETIQUES	44
A- Le Lévamisole	44
B- Le DTC	46
C- L'Azimexon	46
D- Les polynucléotides de synthèse	47
E- L'Isoprinosine	47
F- Le NPT 15392	48
G- Le Tilorone	48
H- La Tufsine	48
I- Le lauryl tétrapeptide (LTP)	48
IV - IMMUNOMODULATEURS D'ORIGINE LEUCOCYTAIRE	48
A- L'interféron	48
B- Facteur de Transfert	49

V - IMMUNOMODULATEURS D'ORIGINE THYMIQUE	49
TRAVAUX PERSONNELS	
ETUDES BIOCHIMIQUES	55
I - PREPARATION DU PRINCIPE ACTIF	55
II - ETUDE DU PRINCIPE ACTIF	58
A - Composition du principe actif	58
B - Etude de la copule protéique	58
C - Etude de la copule glucidique	59
1 - Composition centésimale	59
2 - Composition molaire	60
D - Mise en évidence de groupements pyruvyls	63
E - Hétérogénéité du principe actif	63
F - Conclusions	64
III - PURIFICATION DU PRINCIPE ACTIF	65
A - Précipitation du principe actif par le cetavlon	65
B - Chromatographie sur Ultrogel AcA34 de la fraction surnageante	69
C - Conclusion	72
IV - ETUDE DE LA FRACTION PRECIPITANTE AU CETAVLON	73
A - Etude de la copule protéique	73
B - Etude de la copule glucidique	74
1 - Composition centésimale et molaire en monosaccharides	74
2 - Identification des résidus d'acide uronique	76
3 - Positionnement des résidus d'acides uroniques dans la chaîne glucidique	78

a - réduction des acides uroniques	P. 78
b - dégradation uronique	79
c - nature des points d'attache des liaisons glycosidiques	84
5 - Enchainement des monosaccharides après oxydation periodique	89
6 - Anomérie des liaisons après oxydation chromique	96
7 - Conclusion	99
 C - Identification de la liaison glycanne-protéine ...	102
1 - Recherche des liaisons O-glycosidiques	102
2 - Recherche des liaisons N-glycosidiques	102
a - approche du point d'attache	105
α - hydrolyse pronasique	
β - hydrolyse par l'acide fluorhydrique	
b - rupture de la liaison N-glycosidique ...	107
α - hydrazinolyse	
β - rupture sodique en milieu réducteur	
3 - Conclusion	109
 V - ETUDE DE LA FRACTION FI	110
 A - Composition de la fraction FI	111
1 - Copule protéique	111
2 - Copule glucidique	111
 B - Structure de la copule glucidique de la fraction fraction FI	119
1 - Méthylation	119
2 - Oxydation periodique	119
3 - Oxydation chromique	123
 C - Nature lipopolysaccharidique	128
1 - Etude de la fraction polysaccharidique	129
2 - Etude de la fraction lipidique	129

D - Conclusion	P. 133
 ETUDES IMMUNOLOGIQUES	 135
I - ETUDE DU PRINCIPE ACTIF	135
A - Cellules phagocytaires	135
1 - Le chimiotactisme des phagocytes	135
2 - La phagocytose du microorganisme	137
B - Immunité humorale	138
C - Immunité à médiation cellulaire	139
D - Infections expérimentales	140
 II - ACTIVITE DES FRACTIONS P ₁ ET FI	 142
A - Les cellules phagocytaires	142
B - L'hypersensibilité retardée à l'ovalbumine .	142
C - Infection à <i>Klebsiella pneumoniae</i>	142
 III - ORIGINE DES FRACTIONS P ₁ ET FI	 144
 IV - CONCLUSION	 144
 CONCLUSIONS GENERALES	 151

APPENDICE TECHNIQUE	P.	158
I - DOSAGES COLORIMETRIQUES		158
A - Dosage des protéines totales		158
B - Dosage des oses neutres		158
C - Dosage des acides uroniques		159
D - Dosages des osamines		160
E - Dosage des acides sialiques		161
F - Dosage de sulfates		162
G - Dosage de phosphore		163
II - EXTRAIT SEC		163
III - ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE		164
A - Identification et composition molaire en monosaccharides		164
B - Identification des liaisons O-glycosidiques après perméthylation		165
C - Identification des lipides		169
IV - REDUCTION ET PERACETYLATION		169
V - ETUDE A L'AUTO-ANALYSEUR		169
VI - FRACTIONNEMENT SELON LA METHODE AU CETAVLON ...		170
VII - ELIMINATION DE GROUPEMENTS PYRUVYLS		170
VIII - ETUDE EN ULTRACENTRIFUGATION		170
IX - ISOLEMENT D'UN DISACCHARIDE		171
X - CHROMATOGRAPHIE SUR ULTROGEL ACA 34		172
XI - IDENTIFICATION DE L'ACIDE AMINE N-TERMINAL ..		172

XII - IDENTIFICATION DE L'ACIDE AMINE C-TERMINAL .. P.	173
XIII - REDUCTION DES ACIDES URONIQUES	173
XIV - DEGRADATION DES ACIDES URONIQUES	174
XV - OXYDATION PERIODIQUE	174
XVI - OXYDATION CHROMIQUE	175
XVII - RECHERCHE DE LIAISON O-GLYCOSIDIQUE	175
XVIII - RECHERCHE DE LIAISON N-GLYCOSIDIQUE	175
A - Hydrolyse pronasique	175
B - Hydrolyse par l'acide fluorhydrique	176
C - Hydrazinolyse	176
D - Rupture sodique en milieu réducteur	177
XIX - HYDROLYSE PAR L'ACIDE ACETIQUE 1%	177
BIBLIOGRAPHIE	178

INTRODUCTION

Le conflit, créé par l'agression d'un être vivant, est la résultante de l'antagonisme existant entre l'agent agresseur et les moyens de défense de l'être vivant. Cet agent agresseur, qu'il soit de nature bactérienne, virale ou parasitaire, devra vaincre les mécanismes immunitaires de l'hôte infecté. Depuis longtemps, les êtres vivants se protègent contre certains agents infectieux en créant, par le biais de la vaccination ou de la sérothérapie, une immunité spécifique. Parallèlement à cette immunité dirigée contre un type particulier d'agents infectieux, il est possible de stimuler les mécanismes immunitaires d'un être vivant de différentes façons et, ce point est d'importance, l'immunostimulation ainsi obtenue peut s'exercer envers un grand nombre d'agents infectieux. Elle est non spécifique.

Les immuno-adjuvants, substances ajoutées à l'antigène au moment de l'immunisation en vue d'obtenir un accroissement de la réponse spécifique, peuvent être considérés comme les premiers immunomodulateurs. Ils ont surtout été utilisés chez l'animal et l'homme en vue d'augmenter le taux d'anticorps dans les vaccinations. C'est RAMON en 1926 qui décrit le premier adjuvant. Il était connu que certains chevaux, immunisés de façon répétée par l'endotoxine diphtérique, continuaient à présenter une augmentation du titre des anticorps antitoxines alors que les autres chevaux voyaient leur titre d'anticorps se stabiliser après quelques injections. Il fut montré par la suite que le mélange endotoxine diphtérique-tapioca permettait d'obtenir un titre d'anticorps nettement plus élevé que lors de l'injection de l'anatoxine seule.

A cet effet, de nombreuses substances ont été utilisées, parmi les plus connues, on peut citer : l'alun de potassium, le phosphate d'alumine, la saponine ; l'adjuvant incomplet et complet de FREUND. Après les travaux de FREUND (1), les adjuvants de l'immunité furent utilisés comme un moyen d'étude des réactions immunitaires.

Les immunostimulants sont des substances capables de potentialiser les réactions immunitaires. Depuis quelques années, il est apparu qu'il existe des interactions multiples, telles que toute modification d'un type cellulaire ayant sa fonction immunitaire définie, elles entraînent une stimulation (ou une inhibition) des fonctions d'autres types cellulaires impliqués dans la réaction immune. En effet, des interactions multiples entre sous populations de lymphocytes T ou B et macrophages sont réalisées par l'intermédiaire de nombreux facteurs.

En 1959, HALPERN et al. (2) et OLD et al. (3) ont démontré l'effet stimulant du BCG vivant sur le système réticulo-endothélial. PREVOT et al. (4), en 1958 ont montré que le *Corynebacterium parvum* possède des propriétés analogues. Ceci marquait le début d'une période dominée par la recherche de substances qui, introduites dans l'organisme, indépendamment d'une immunostimulation, en modifient les réponses immunes.

L'immunosuppression et l'immunostimulation sont, au même titre, des phénomènes actifs. De nombreuses observations ont permis de dégager quelques notions essentielles : selon la dose utilisée, la voie d'administration, l'intervalle de temps qui sépare l'injection de l'antigène de celle de l'immunostimulant, des effets de potentiation ou, au contraire, de suppression des fonctions immunitaires peuvent être observés. Ces effets ont conduit au concept plus général d'immunomodulateurs.

La liste des substances actuellement considérées comme immunomodulatrices s'est considérablement allongée ces dernières années. En effet, à côté de bactéries entières, vivantes ou inactivées, des extraits bactériens ont été étudiés, la purification a pu dans certains cas, conduire à des substances qui ont, ultérieurement, été synthétisées. Par ailleurs, d'autres substances chimiques ont été synthétisées et possèdent des propriétés immunomodulatrices.

Dans le cadre d'une collaboration Université-Industrie, les laboratoires CASSENNE (Unité d'immunologie, centre de recherches ROUSSEL-UCLAF, OSNY) nous ont confié l'étude d'un immunomodulateur extrait de *Klebsiella pneumoniae* serotype 2. L'exposé de nos recherches effectuées à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I, dans le laboratoire de Chimie Biologique (laboratoire associé au CNRS n° 217) du Professeur Jean MONTREUIL, sous la direction du Professeur Bernard FOURNET, sera précédé par une revue générale sur les mécanismes de la réaction immunitaire et le mode d'action de divers immunostimulants. Enfin, dans une troisième partie, nous présenterons quelques propriétés immunologiques du principe actif et de ses fractions. Cette étude a été menée aux laboratoires CASSENNE.

L'ensemble de nos travaux a fait l'objet des communications et des brevets suivants :

COMMUNICATIONS

- 1.- C. BRUVIER, B. FOURNET, J. MONTREUIL et R. ZALISZ
Etude d'une glycoprotéine possédant une activité anti-bactérienne isolée d'un lysat de *Klebsiella pneumoniae*
Présenté au Forum des Jeunes, ORLEANS LA SOURCE, Septembre 1979.
- 2.- C. BRUVIER, B. FOURNET, J. MONTREUIL, R. ZALISZ and M.F. SALLES
Study of a glycoprotein possessing an anti-bacterial activity isolated from *Klebsiella pneumoniae*
Présenté au IVème Congrès international d'Immunologie, PARIS, Juillet 1980.

- 3.- C. BRUVIER, B. FOURNET, J. MONTREUIL et R. ZALISZ
Etude d'une glycoprotéine possédant une activité immunostimulante isolée d'un extrait bactérien issu de *Klebsiella pneumoniae* serotype 2.
Présenté au Congrès d'automne sur les glycoconjugués, LILLE, Septembre 1980

- 4.- C. BRUVIER, J. MONTREUIL, B. FOURNET, R. ZALISZ, J.P. BURET, C. GRISCELLI and J. AGNERAY
Study of a glycoprotein possessing an immunostimulant activity isolated from *Klebsiella pneumoniae*
Présenté au premier symposium européen sur les glucides et glycoconjugués, VIENNE, Septembre 1981.

- 5.- C. BRUVIER, J. MONTREUIL, B. FOURNET, R. ZALISZ, P. SMETS and J.P. BURET
Structure and properties of a glycoprotein with an anti-bacterial activity isolated from *Klebsiella pneumoniae* serotype 2
Présenté au XIème Symposium international sur les glucides, VANCOUVER, Août 1982.

- 6.- C. BRUVIER, J. MONTREUIL, B. FOURNET, R. ZALISZ, P. SMETS, J.P. BURET, C. GRISCELLI, J. AGNERAY
Study of a glycolipoprotein possessing an immunostimulant activity isolated from *Klebsiella pneumoniae*
Présenté au XIème symposium International sur les glucides, VANCOUVER, Août 1982

BREVETS

- Nouvelles glycoprotéines de *Klebsiella pneumoniae*, procédé d'obtention, application à titre de médicaments et compositions les renfermants

Brevet n° 2 462 477 A₁ 79 19652 du 31 juillet 1979

Brevet n° 80 20 187 du 9 septembre 1980

Brevet n° 80 20 188 du 9 septembre 1980

- Contribution à l'autorisation de mise sur le marché (A.M.M.) d'une spécialité pharmaceutique : le Biostim ; Février 1981.

GENERALITES

Il a été clairement établi, que l'on pouvait stimuler les mécanismes immunitaires d'organismes soumis à diverses agressions bactériennes, virales ou parasitaires.

Expérimentalement, cette stimulation, dont l'intérêt est d'être non spécifique, peut être induite par l'administration préalable de bactéries entières (mycobactéries, *Listeria monocytogenes*, corynebactéries anaérobies), d'extrait bactériens (endotoxines bactériennes, composés mycobactériens ...), de composés synthétiques mimant certains motifs structuraux actifs dans les extraits bactériens ou encore de composés synthétiques).

Elle se traduit par une augmentation du taux des anticorps naturels et de la concentration sérique en interféron, par une stimulation non moins importante des défenses cellulaires : leucocytose, augmentation du nombre et activation des facultés d'ingestion et de digestion des macrophages, augmentation du nombre des cellules immunocompétentes.

I.- REACTION IMMUNITAIRE

Pour se défendre contre les agressions extérieures (virus, bactéries, cellules étrangères), un individu doit distinguer le "soi" c'est-à-dire ses propres substances ou auto-antigènes du "non-soi" c'est-à-dire les antigènes d'origine étrangère, et éliminer ce "non-soi" en le détruisant ou le rejetant.

A.- Réponse immunitaire

L'appareil cellulaire à la base du processus immunitaire est constitué : * par des cellules de la lignée blanche du système hématopoïétique : les lymphocytes où l'on distingue deux groupes de populations appelées lymphocytes B et T selon qu'elles ont subi ou non l'influence du thymus au cours de leur maturation ; les cellules K, NK ; et les cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires neutrophiles)

* par des anticorps .

1.- Les cellules immunocompétentes

a.- les lymphocytes :

Les lymphocytes sont des cellules du système immunitaire dont ils assurent les fonctions essentielles. Leur inactivation expérimentale par un sérum anti-lymphocytaire ou leurs déficits congénitaux dépriment et démantèlent les défenses immunitaires.

Le transfert de suspensions pures de lymphocytes à des animaux irradiés restaure la compétence immunologique des receveurs et leur confère les particularités du donneur : réactivité aux antigènes contre lesquels le donneur avait été immunisé, tolérance des antigènes auxquels le donneur avait été rendu tolérant.

Les lymphocytes proviennent de la maturation de pré-curseurs, les lymphoblastes, dérivant eux-mêmes des cellules-souches originaires de la moëlle osseuse. Au cours de leur différenciation, les cellules-souches reçoivent une stimulation de la part des tissus où elles se multiplient. Deux grandes lignées de lymphocytes sont ainsi différenciées : les lymphocytes T (thymo-dérivés) et les lymphocytes B (médullo-dérivés) selon que leurs précurseurs ont ou non reçu une induction du réticulum thymique (voir figure 1 P. 9)

α - les lymphocytes B :

Certaines cellules se différencient directement dans la moëlle osseuse pour former la classe des lymphocytes appelés lymphocytes B (de "bone marrow" ou "bourse de Fabricius" du poulet). Les lymphocytes B, qui représentent 20 à 25 % des lymphocytes du sang humain se répartissent dans tout l'organisme. Leur mise en contact avec un antigène hétérologue les active et provoque leur multiplication. Les lymphocytes B vont alors donner naissance aux plasmocytes qui fabriquent et secrètent des anticorps dirigés contre l'antigène.

Les cellules B se reconnaissent par leurs marqueurs de surface qui sont en fait, les anticorps ou immunoglobulines insérés dans leur membrane. Ces immunoglobulines sont insérées dans la membrane lymphocytaire par leur fragment Fc, et représentent les précurseurs des récepteurs d'antigènes à la surface des lymphocytes B. Le contact entre l'anticorps et l'antigène stimule la cellule B.

β - les lymphocytes T :

Ces lymphocytes, qui prennent naissance dans la moëlle osseuse, migrent vers le thymus où ils acquièrent leur

maturité en se différenciant en cellules T ("thymo-dépendantes") qui portent à leur surface un marqueur particulier, l'antigène thêta. Cette maturation se fait grâce à l'intervention de facteurs thymiques. Une hormone thymique isolée et purifiée de séquence non-peptidique a la propriété d'induire l'apparition de l'antigène thêta à la surface des lymphocytes T. Lors de l'arrivée d'un antigène, les lymphocytes T stimulés, ou sensibilisés, se transforment (transformation blastique) et se divisent pour donner naissance à des cellules-filles qui sont responsables des réactions immunologiques dites " cellulaires".

Les lymphocytes T ont plusieurs propriétés :

- Ils secrètent des facteurs solubles qui ont la particularité d'intervenir dans l'hypersensibilité retardée (ex. : réaction à la tuberculine) et dans les réactions inflammatoires.
- Ils sont capables de tuer directement des cellules étrangères, ce sont les "T Tueurs"
- Ils jouent un rôle d'ordinateur de la réponse immunologique. En effet, les cellules T peuvent soit activer la réponse immunitaire, ce sont les "T helpers" qui stimulent la production d'anticorps par les lymphocytes B, soit la réduire, voire l'inhiber, ce sont les "T suppressives". Ces deux types de lymphocytes T entrent en action selon la réponse à faire. Lorsqu'il y a peu d'antigène, les "Thelpers" interviennent pour stimuler la production d'anticorps. Les "T supprimeurs" ne semblent pas agir sur le déclenchement de la réponse immunitaire, mais plutôt sur l'arrêt, en supprimant la production d'anticorps et en inhibant la formation de cellules "T tueuses". Tous deux agissent en produisant des facteurs, des médiateurs solubles, les uns spécifiques, les autres non spécifiques de l'antigène.

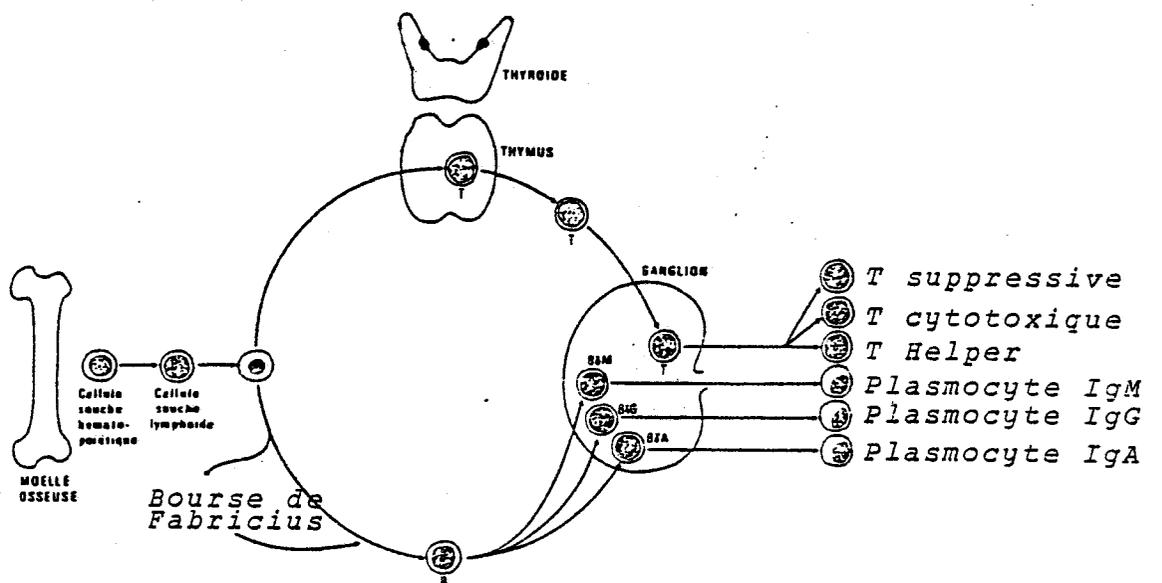


Figure 1 : Maturation des lymphocytes B et T .

SIS
LILL

b- Les cellules tueuses :

Il existe trois catégories de lymphocytes capables d'accomplir la fonction de cellules tueuses à la suite d'un contact avec une cellule-cible : le lymphocyte-tueur, la cellule K et la cellule NK. (voir figure 2 P.11)

α Les lymphocytes "T Tueurs" :

Il s'agit de globules blancs pourvus à leur surface de récepteurs qui se lient spécifiquement aux signaux moléculaires ou antigènes d'histocompatibilité portés par les cellules étrangères. Les lymphocytes T tueurs n'existent pas dans les populations de globules blancs circulant chez un organisme normal, ils n'apparaissent que lors d'une réaction de défense contre des cellules cibles porteuses de signaux d'histocompatibilité étrangers. Au microscope électronique, ils se présentent comme des cellules très riches en lysosomes.

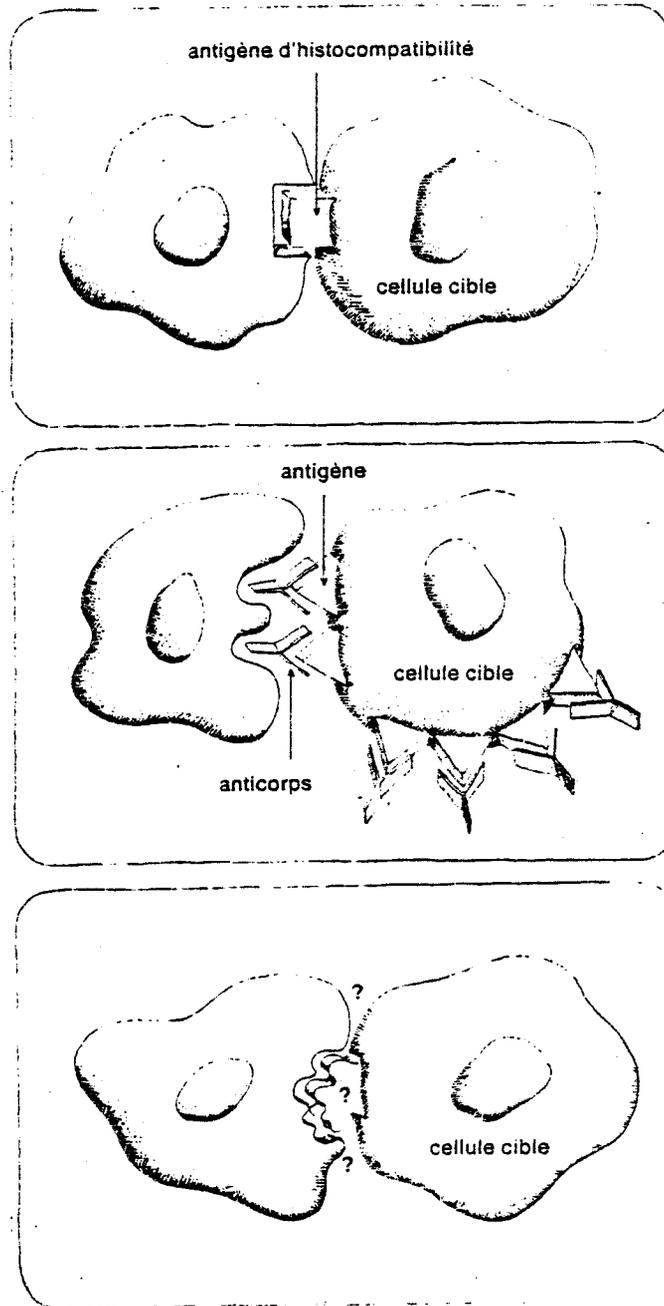
β Les cellules K :

Elles ont la particularité, comme les lymphocytes "T Tueurs" de détruire les cellules étrangères ou les cellules infectées par un virus, mais à la différence des lymphocytes, elles agissent avec l'aide des anticorps.

Les cellules K possèdent à leur surface un récepteur, appelé "récepteur Fc" sur lequel se fixent les anticorps par leur extrémité Fc, alors que leur extrémité active (fragment Fab) se fixe sur les antigènes de la membrane d'une cellule étrangère. Ainsi, grâce au complexe formé par la cellule étrangère, la cellule K et son anticorps spécifique, la cellule K devient capable de tuer la cellule-cible .

γ Les cellules NK :

Ces cellules sont présentes dans le sang, et détruisent spontanément certains types de cellules-cibles : par exemple , *in vitro* , les cellules NK humaines détruisent les cellules de la lignée tumorale humaine K 562 .



A

B

C

Figure 2 : Les cellules tueuses .

A - Lymphocytes tueurs

B - Cellules K

C - Cellules NK



L'activité cytotoxique naturelle non spécifique ("Natural Killer ") est augmentée par l'induction ou l'administration, *in vivo* , d'interféron chez l'animal (5) .

Comment les cellules tueuses mènent-elles leur travail de destruction des cellules-cibles ? Pour les lymphocytes " T tueurs " , comme pour les cellules K et peut-être les cellules NK la tâche est décomposée en trois phases successives : - la reconnaissance de la cellule-cible
- le coup mortel à la cellule-cible
- la destruction proprement dite de la cellule-cible

Dans un premier temps , les cellules tueuses se lient aux antigènes d'histocompatibilité des cellules-cibles. Puis le " coup mortel " est ensuite infligé par la cellule tueuse . Cette dernière contient des lysosomes , organites riches en enzymes hydrolytiques , qui se concentrent ¹ dans la région de contact de la tueuse avec sa cible . Leurs membranes fusionnent ² et les enzymes sont déversés dans la zone de contact ³ . La membrane de la cible est gravement endommagée à ce niveau ⁴ par des microlésions (figure 3 P.13) .

La troisième étape est la cytolysse de la cible . Des déséquilibres physico-chimiques ioniques ou osmotiques apparaissent et entraînent sa mort . Dès le début de la cytolysse , la cellule tueuse se sépare spontanément de la cellule-cible .

c - Les cellules phagocytaires :

La capacité de capter et , dans la majorité des cas , de dégrader des substrats particulaires ($\geq 100 \text{ \AA}$) inertes ou viables définit la phagocytose , laquelle est une fonction des macrophages et des polynucléaires neutrophiles .

α - Les cellules du système phagocytaire mononuclées (lignée monocyttaire) :

Une fois recrutés dans les sites inflammatoires , les monocytes , formes sanguines circulantes , acquièrent les caractères morphologiques et fonctionnels d'un stade différencié connu sous le nom de macrophage , cellule à longue durée de vie tissulaire (voir figure 4 P. 15) .

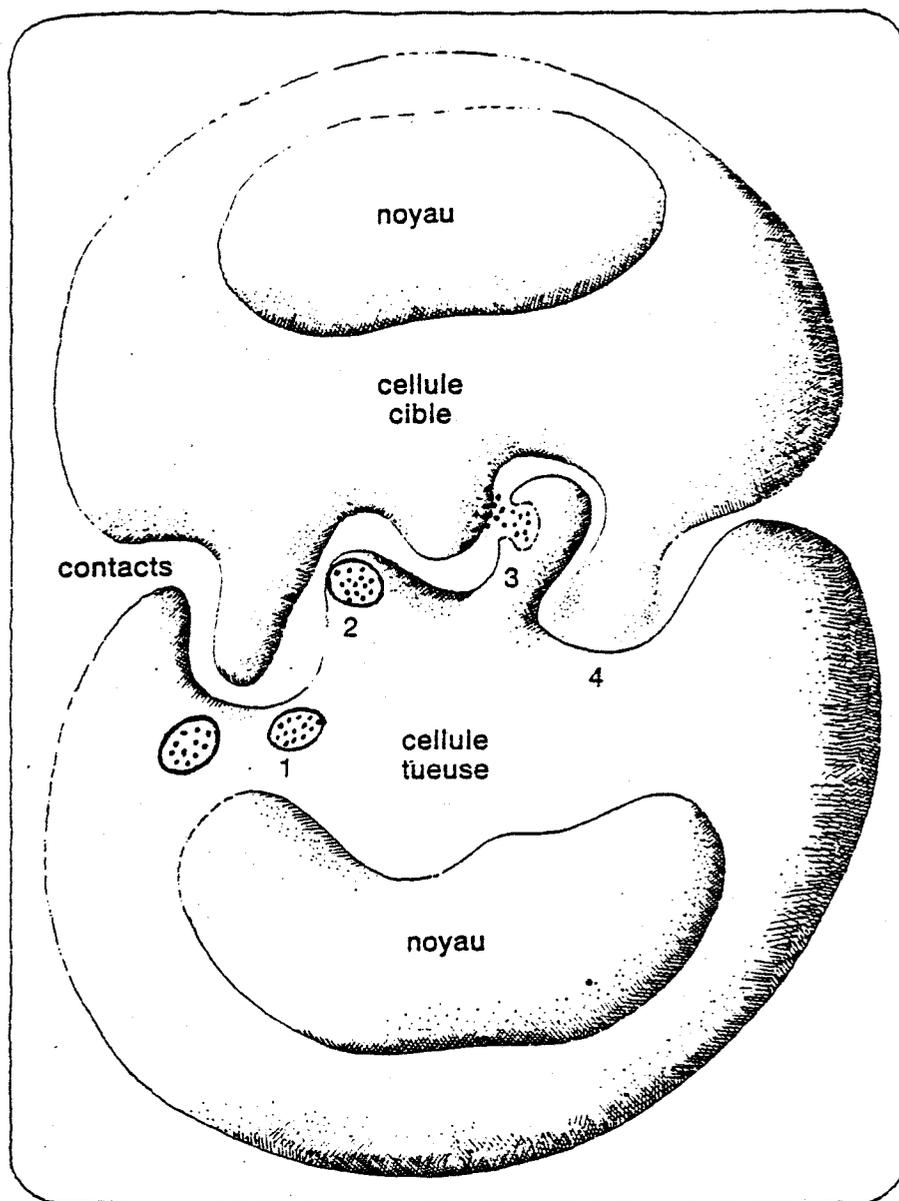


Figure 3 : Mécanisme du "coup mortel" infligé par une cellule tueuse à une cellule-cible.

- * Cellules de taille et d'aspect variables selon les espèces et les organes dont ils proviennent, les macrophages ont en commun un certain nombre de caractéristiques cytologiques. Morphologiquement, il s'agit de cellules mononucléées. La cellule est animée de mouvements incessants avec émission de voiles hyaloplasmiques, cette activité membranaire assurant à la fois les déplacements cellulaires et la fonction phagocytaire.
- * Selon leur organe d'origine, les macrophages présentent une différenciation morphologique et fonctionnelle, traduisant une adaptation aux conditions de vie et au rôle dans les différents tissus de l'organisme : macrophages mobiles du péritoine, macrophages libres ou mobiles de la rate et des ganglions, histiocytes du tissu conjonctif, cellules de Küpffer du foie, macrophages alvéolaires du poumon. Le métabolisme cellulaire peut-être profondément modifié : par exemple les macrophages alvéolaires évoluant en aérobiose tirent leur énergie de la phosphorylation oxydative tandis que les macrophages péritonéaux utilisent la voie de la glycolyse.
- * La phagocytose est constituée de 3 étapes :
 - La première phase est celle de l'adhésion de la particule étrangère à la membrane de la cellule et aux voiles hyaloplasmiques qu'elle émet. De nombreux facteurs sont susceptibles de favoriser ce phénomène : charges électriques respectives de la particule à ingérer et de la membrane, température, PH et teneur en ions Ca^{++} et Mg^{++} du milieu, présence de protéines à activité opsonisante non spécifique et de différentes fractions du complément favorisant l'immuno-adhérence, présence d'anticorps spécifiques, notamment IgG pour lesquelles le macrophage dispose de récepteurs de membrane. Lors d'une infection bactérienne, l'hôte répond par la production d'anticorps spécifiques. La bactérie, recouverte d'un complexe anticorps-complément, est alors présentée aux phagocytes. Les anticorps et le complément en modifiant son hydrophobicité, permettent l'adhérence de la bactérie sur les récepteurs membranaires. Des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines et les composants C_3b et C_3d du complément sont présents à la surface des cellules phagocytaires.

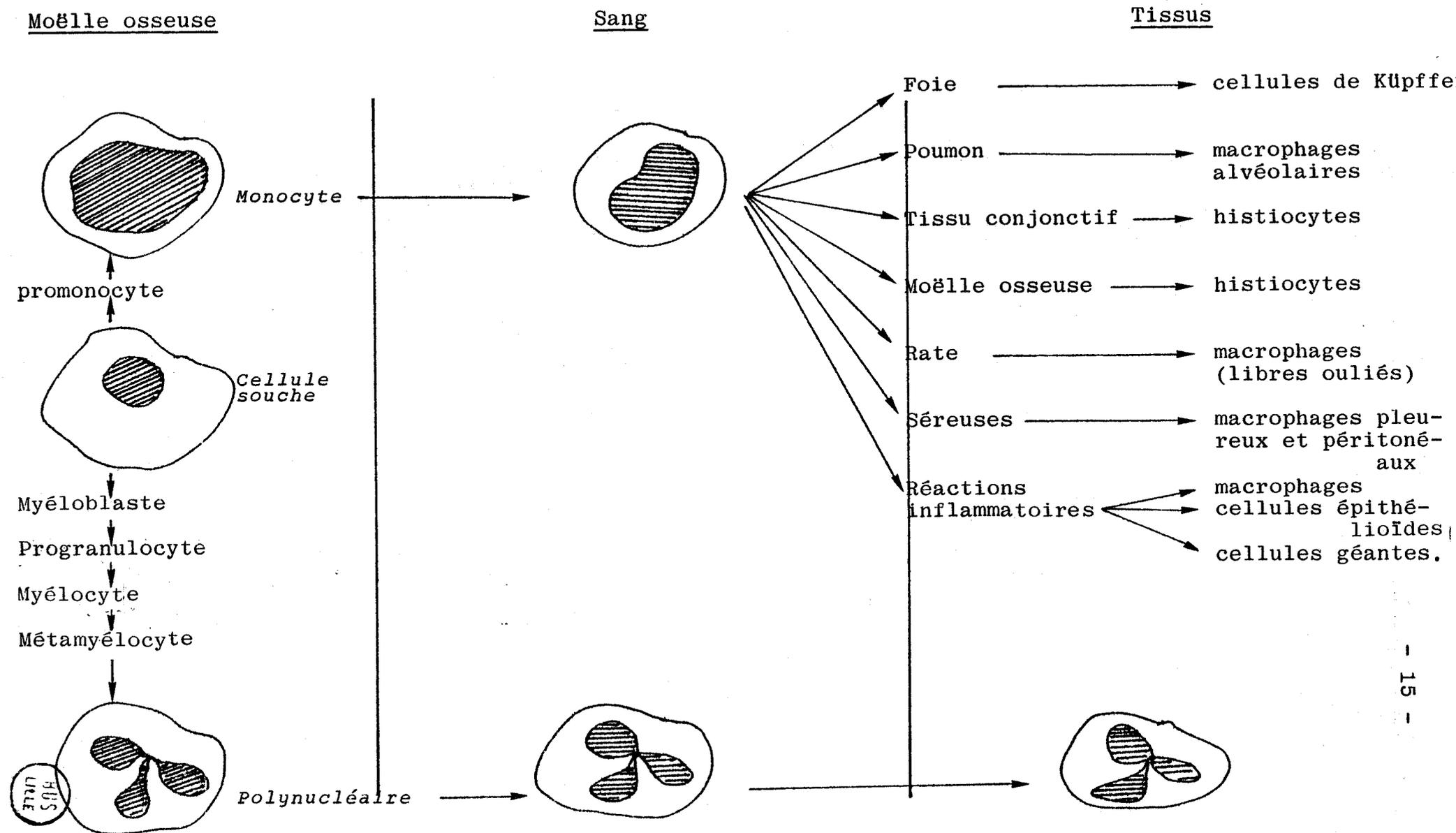


Figure 4 : Origine des cellules phagocytaires

- La deuxième phase est l'ingestion, caractérisée par une invagination de la membrane en regard de la particule, les extrémités de l'invagination se rejoignant pour former une vacuole ou phagosome. Ce stade nécessite une importante dépense d'énergie de la part de la cellule qui se caractérise par une augmentation de la consommation d'oxygène et de l'oxydation du glucose. La phagocytose est un processus consommant de l'énergie fournie par l'ATP qui provient essentiellement de la glycolyse.
- La troisième phase est intracellulaire. Les lysosomes viennent s'accoler à la vacuole contenant la particule étrangère et y déversent leurs enzymes entraînant une "dégranulation" cellulaire apparente.
 - La particule peut être complètement digérée et disparaître (cas de microorganismes).
 - La particule peut subsister à l'intérieur de la cellule (cas de bactérie à développement intracellulaire telle que Listeria monocytogenes, voire se multiplier).
 - La particule peut persister dans la cellule (cas de particules minérales captées par le macrophage alvéolaire qui se limite à en assurer l'élimination mécanique)(voir figure 5 P.17)
- * Lors d'une réaction inflammatoire les phagocytes mononucléés arrivent au niveau du foyer d'agression après les polynucléaires neutrophiles. Les monocytes gagnent le tissu par diapédèse, puis se transforment en macrophages.
- * De nombreux facteurs sont susceptibles d'affecter l'intervention macrophagique, les uns diminuent la réponse cellulaire, d'autres, au contraire, stimulent l'intervention macrophagique. Le processus d'immunité à médiation cellulaire accélère l'arrivée et la multiplication des macrophages au niveau du foyer lésionnel. La cellule subit une "activation", laquelle est sous la dépendance de lymphokines libérées par les lymphocytes T sensibilisés en présence de l'antigène. L'activation est représentée par une augmentation de la taille de la cellule, le développement du réticulum endoplasmique, une activité accrue de la membrane cellulaire, des pouvoirs phagocytaires et une multiplication du nombre de lysosomes responsables d'une bactéricidie efficace.

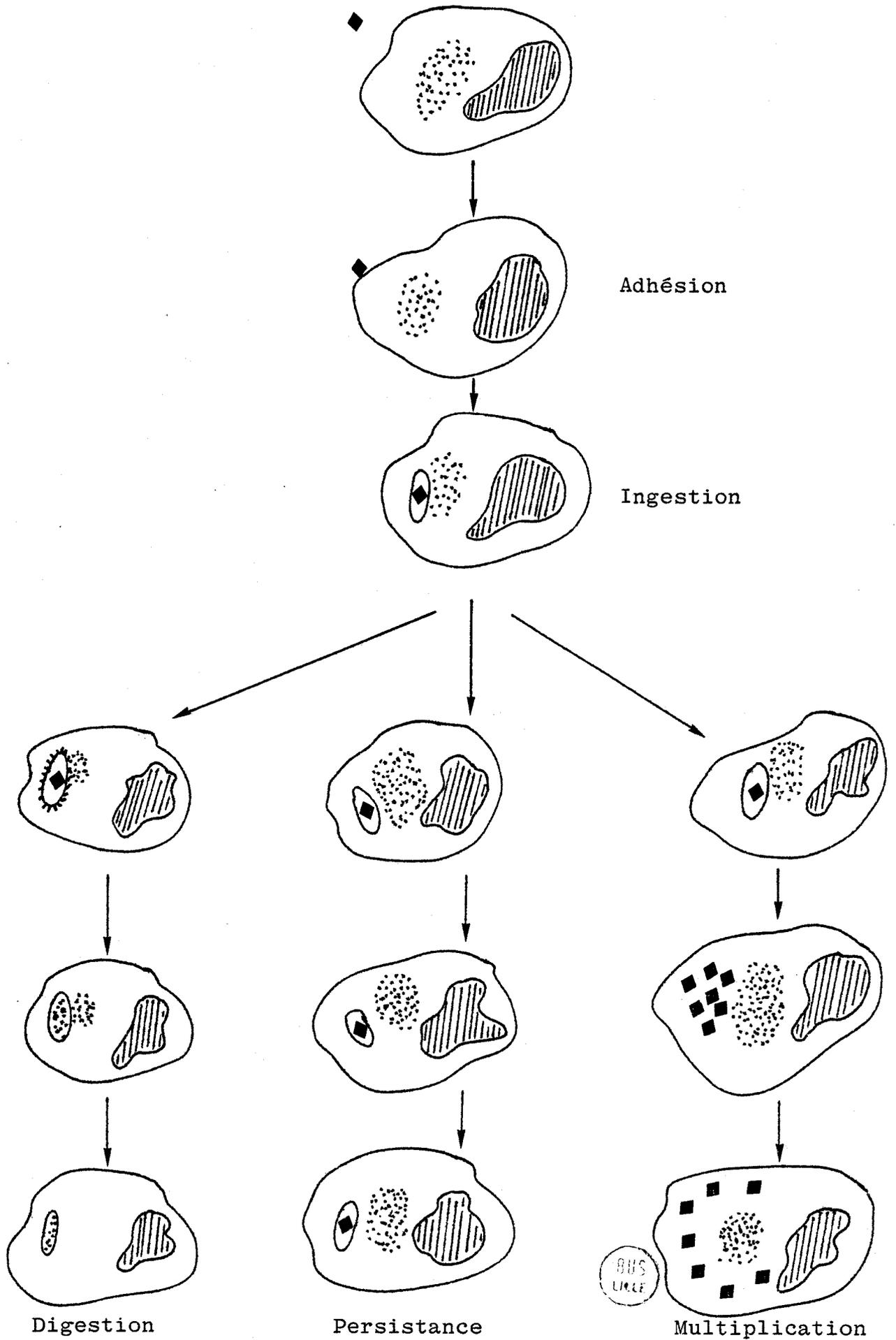


Figure 5 : Devenir d'un germe après la phagocytose.

- * Des agents variés peuvent augmenter sensiblement les activités phagocytaires en armant les macrophages. Les endotoxines, mycobactéries (BCG), corynébactéries provoquent une hyperplasie du système réticulo-histocytaire et une potentialisation des diverses fonctions cellulaires.
- * Il existe deux étapes dans la génèse de l'immunité cellulaire :
 - interaction entre le macrophage et l'antigène .
 - interaction entre le complexe macrophage-antigène et les lymphocytes T.
- * Il faut rappeler que si les macrophages sont indispensables à la réponse lymphocytaire, celle-ci par l'intermédiaire de lymphokines, va influencer en retour le comportement de ces macrophages, en contribuant à immobiliser la cellule par le "migration inhibitory factor" ou MIF et en stimulant les différentes activités cellulaires.
- * Les substances synthétisées par les macrophages armés sont variées: production de lysozyme, libération d'enzymes (collagénase, élastase, protéinase neutre, hydrolases actives au voisinage de la neutralité contrairement aux hydrolases lysosomiales qui agissent à PH acide), production de substances biologiquement actives (interféron, facteurs du complément, diverses protéines, la transferrine, AMP cyclique, des prostaglandines), des facteurs stimulant la maturation de granulocytes ou de monocytes au niveau de la moëlle osseuse et des facteurs assurant la maturation, la différenciation ou l'inhibition des lymphocytes T et B.

β- Les polynucléaires neutrophiles (lignée granulocytaire), cellules sanguines de courte durée de vie au terme de la différenciation (voir figure 4 P.15) exerçant leur activité phagocytaire au sein des foyers inflammatoires où elles apparaissent très rapidement.

- * La phagocytose est là encore séparée en trois étapes : adhésion, ingestion et digestion de la substance internalisée (figure 6 P.20)
 - Durant l'ingestion, seconde phase de la phagocytose les microfilaments interviendraient dans le déplacement du polynucléaire et la formation de vacuole.

Le système des microtubules jouerait un rôle déterminant dans la dégranulation en guidant la migration granulaire. Il existe au moins deux types de granules à l'intérieur des polynucléaires, les granules azurophiles ou primaires et les granules "spécifiques" ou secondaires, qui apparaissent successivement au cours de la maturation médullaire des granulocytes. Les granules cytoplasmiques migrent vers la vacuole phagocytaire, fusionnent leur membrane avec celle du phagosome puis déversent leur contenu dans l'espace vacuolaire. On obtient le phagolysosome à l'intérieur duquel s'accomplit la bactéricidie.

- Lors de la bactéricidie, un premier mécanisme oxygène indépendant est caractérisé par la dégranulation. Les granules secondaires riches en phosphatase alcaline, lysozyme, lactoferrine, se vident les premières, puis les granules azurophiles contenant peroxydase, lysozyme, hydrolases acides, protéines cationiques à activité anti-microbienne se déversent dans le phagosome.

- Il existe un second mécanisme appelé "oxygène dépendant". Après l'ingestion de la particule, des mécanismes biochimiques complexes interviennent à l'intérieur du polynucléaire traduisant une "explosion respiratoire" induite par le contact avec la particule à endocyter. L'explosion respiratoire se traduit par une augmentation de la consommation d'oxygène, de l'activité de la voie de la glycolyse et de la voie des pentoses. Tous ces événements métaboliques vont aboutir à la génération d'agents microbicides par une réduction partielle de l'oxygène présent sous forme de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), d'anions superoxydes (O_2^-), de radical hydroxyl OH

2.- Les anticorps

- * Les anticorps ou immunoglobulines sont présents à la surface des lymphocytes B et sont excrétés et libérés par les plasmocytes dans les liquides biologiques. Leurs effets peuvent être bénéfiques (anticorps protecteurs contre de nombreux germes infectieux, toxines, venins,.... ou au contraire néfastes (allergie, anaphylaxie)

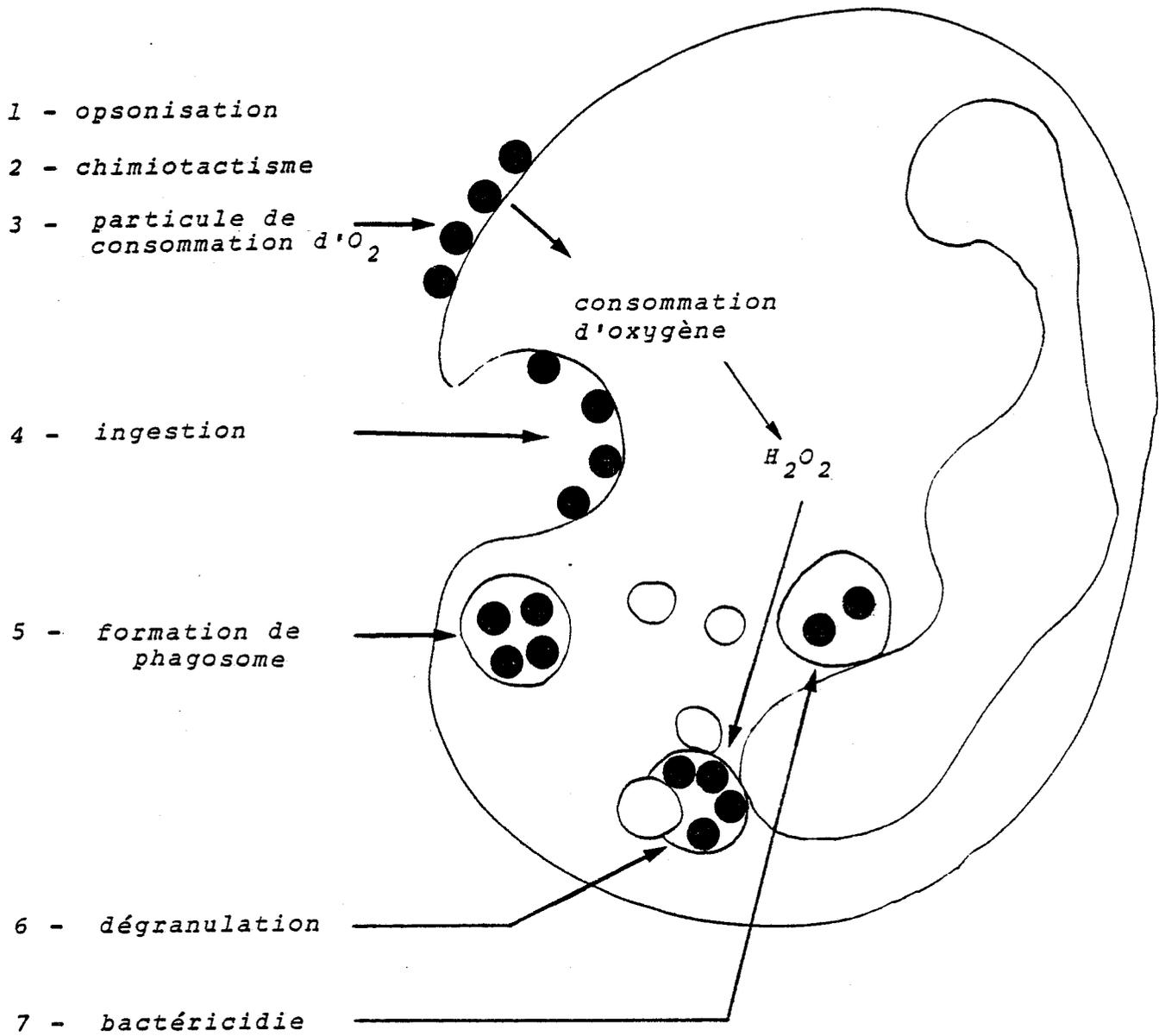


Figure 6 : Mécanisme de la phagocytose du polynucléaire neutrophile .

- Il existe cinq classes d'immunoglobulines : IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, (tableau I P.23). Les anticorps ont deux types de fonctions essentielles :

- une fonction de reconnaissance spécifique des antigènes
- des fonctions effectrices comme la fixation du complément, la fixation à certaines cellules. Les anticorps sont capables d'agglutiner ou de lyser des bactéries : dans ce dernier cas ils fixent le complément qui est, lui, directement responsable de la cytolyse.

3.- Coopération cellulaire :macrophages, lymphocytes T et B

- * La réponse immunitaire n'apparait qu'à la condition que la substance introduite ne soit pas structurellement identique à un constituant du tissu du receveur. La réponse met en jeu les cellules de la lignée blanche du système hématopoïétique : les macrophages et les lymphocytes B et T.

- * A côté de ce processus général (captation de l'antigène par le macrophage et information des lymphocytes), se met en même temps en marche un processus (figure 7 P.24)

- d'inactivation de l'antigène par l'anticorps
- de suppression : le processus met en jeu les cellules T suppressives (TS) activées par les cellules T helper (T_h) qui en retour, viennent supprimer tant la production d'anticorps par les cellules B que l'activation par les cellules T_h

- * La réponse immunitaire (figure 8 P.25) déclenchée et amplifiée par l'antigène est ainsi caractérisée par une prolifération de clones cellulaires qui synthétisent des molécules de reconnaissance, ce qui permet de distinguer deux types de réponse :

- la réponse "humorale" déterminée par la synthèse d'anticorps (molécules de reconnaissance)
- la réponse à "médiation cellulaire" affectant les lymphocytes T

Ces cellules "sensibilisées" sont les vecteurs de l'immunité cellulaire dont relèvent : l'hypersensibilité de type retardé, le rejet de greffe, la résistance à la plupart des tumeurs, l'immunité contre de nombreux agents bactériens (surtout

. intracellulaires) et viraux, certaines

allergies médicamenteuses, certaines maladies auto-immunes et une série de phénomènes expérimentaux (cytotoxicité, réaction lymphocytaire mixte).

La mémoire immunologique se caractérise d'une part par une réaction immunitaire plus intense (synthèse accrue d'anticorps) et plus rapide (réaction secondaire) que lors d'un premier contact de l'organisme avec l'antigène (réaction primaire) et d'autre part par des variations qualitatives des anticorps (commutation IgM \rightarrow IgG). La mémoire immunologique se manifeste au niveau de la réponse humorale et de la réponse cellulaire et est supportée par des sous-populations de lymphocytes (B et T) spécialisés dites "cellules à mémoire".

4.- Les médiateurs :

De nombreux médiateurs solubles jouent un rôle important dans la réponse immune. Ils sont principalement sécrétés par les lymphocytes ou les macrophages.

a - médiateurs actifs sur les macrophages

α - Facteur chimiotactique : facteur contribuant à l'attraction des macrophages vers le lieu de l'interaction lymphocyte-antigène. Ces facteurs sont d'origine très variée.

β - Macrophage activator factor (MAF) :
Ce facteur libéré par les lymphocytes sensibilisés, permettrait d'expliquer les observations de résistance non spécifique aux infections.

γ - Macrophage Migration inhibition factor (MIF)
Des extraits de lymphocytes immobilisés, incubés quelques heures en présence d'antigène montrent une capacité à fixer le macrophage au lieu où il doit agir.

δ - Facteur spécifique "armant" les macrophages contre les cellules tumorales (SMAF).
Ce facteur est spécifique des cellules cibles. Les macrophages "armés" ne sont tueurs que pour les cellules utilisées lors de l'immunisation, la présence de lymphocytes T est nécessaire.

TABLEAU I
*Caractères physico-chimiques majeurs des
différentes classes d'immunoglobulines.*

	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Poids moléculaire	150 000	900 000	160 000 (sérum) 380 000 (secrétion)	170 000	185 000
Constante de sédimentation	6,5 à 7,5 S	18 à 20 S	7, 10, 13 et 15S	6,5 S	7,9 S
Glucides	3 %	12 %	8 %	11 %	12 %
Dénomination de la chaîne H	γ	μ	α	δ	ϵ
Poids moléculaire de la chaîne H	51 000	70 000	64 000	67 000	75 000
Sous classes	1 à 4	1 et 2	1 et 2		



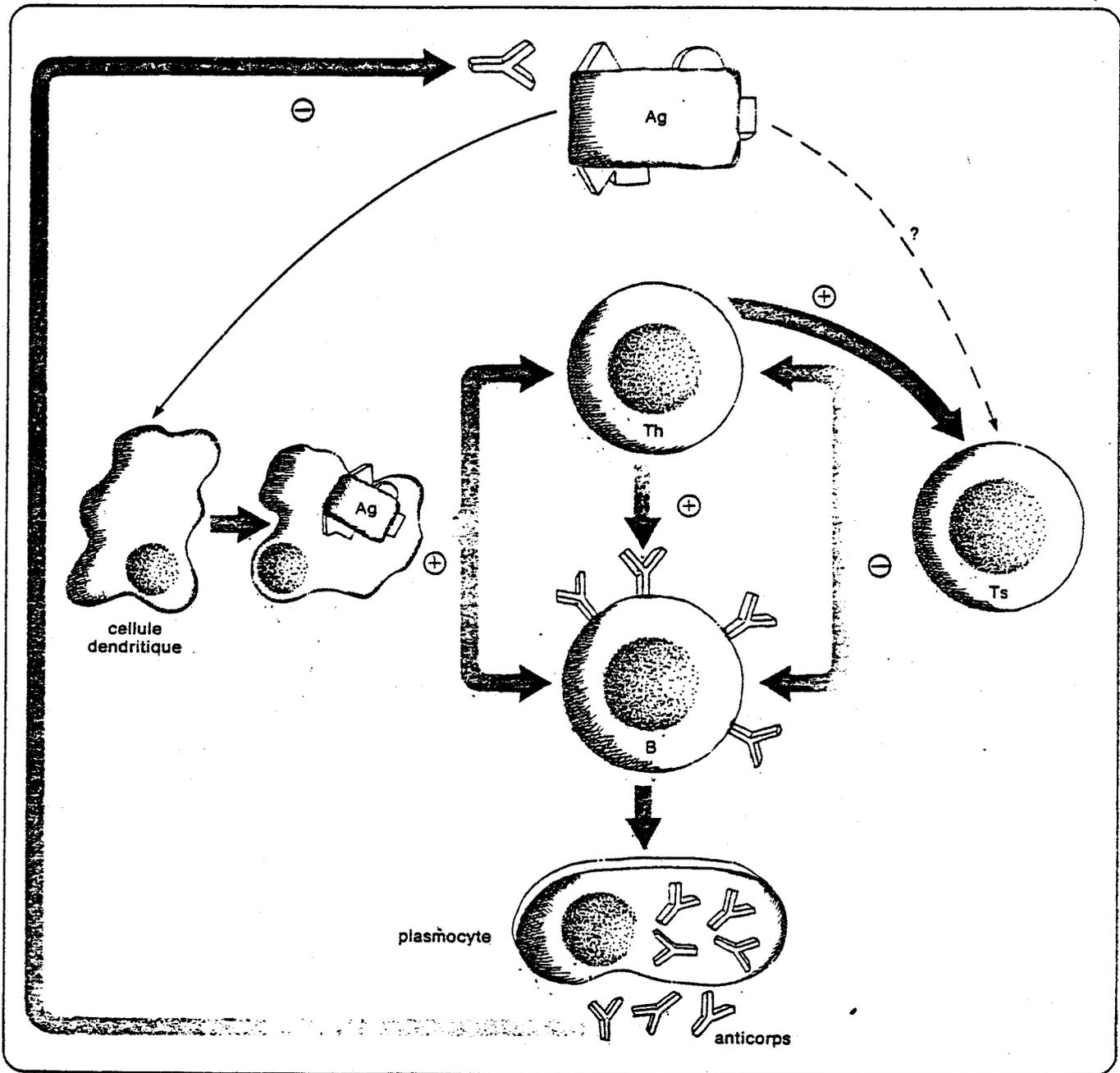


Figure 7: Régulation de la réponse immunitaire dite "humorale"

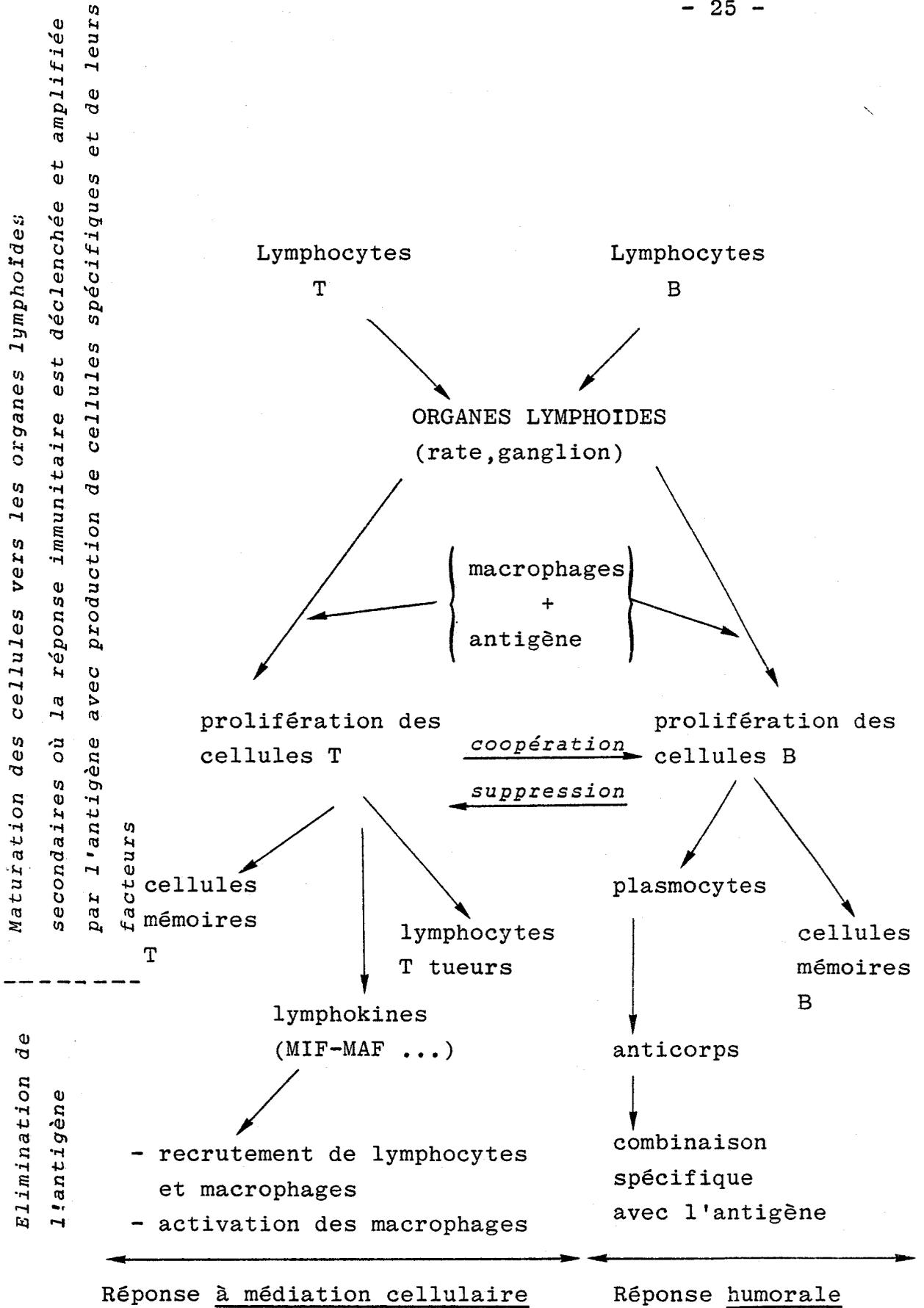


Figure 8 : Représentation schématique du système immunitaire .



b - Méiateur sécrété par les macrophages :

- * Les macrophages modulent la réponse immune par la sécrétion de nombreux facteurs lymphostimulants ou supresseurs, d'interféron, d'enzymes, de facteurs du complément. Parmi ces facteurs solubles non spécifiques l'interleukine 1 (IL1) ou LAF (Lymphocyte Activating Factor) . Ce facteur est sécrété par les macrophages, les monocytes du sang circulant normaux ou stimulés . De nombreux agents capables de stimuler les activités macrophagiques (bactéries entières, produits d'origine bactérienne (LPS , PPD , WSA) mitogènes ou des composés synthétiques (MDP) induisent la sécrétion d'IL1 . Les macrophages sécrètent l'IL1 suite à la phagocytose de l'antigène ou bien par action des lymphocytes T activés par l'antigène . L'activité de l'IL1 se manifeste grâce à l'intervention d'un second médiateur, l'interleukine 2 , qui a pour effet d'induire la prolifération de lymphocytes T effecteurs . Ceci se traduit par une amplification des réponses humorale et cellulaire (tableau II P.27).

c - Méiateur sécrété par les lymphocytes :interleukine 2 (IL2)

- * Ce facteur est produit par les lymphocytes T et agit sur le recrutement des autres lymphocytes(tableau II P. 27)

5.- Tolérance immunitaire

- * La réaction immunitaire chez le receveur qualifié d'immuno-compétent peut se manifester soit par une réponse immunitaire , soit par un état de tolérance .
- * La tolérance est généralement définie comme une incapacité spécifique de répondre à un antigène, induite par une première exposition au même antigène .

TABLEAU II

*Propriétés chimiques de l'interleukine 1
et de l'interleukine 2 murine et humaine.*

	IL ₁		IL ₂	
	murine	humaine	murine	humaine
Poids moléculaire (polypeptide)	12 000-16 000	12 000-15 000	30 000	15 000
stable à PH	3,0 - 11		2,0 - 9,0	2,0 - 9,0
stable à tem- pérature	- 70 à + 56°	< 56°C		



On distingue: * l'état de tolérance naturelle qui caractérise le fait fondamental qu'un organisme n'induit pas, sauf exception dans les processus auto-immuns, de réponse immunitaire contre les constituants de ses propres tissus.

* l'état de tolérance induite qui se rapporte à la capacité de répondre à un antigène normalement immunogène chez l'hôte. On désigne parfois par tolérogène un antigène capable d'induire une tolérance.

6.- Réaction spécifique des molécules de reconnaissance avec l'antigène.

* Les anticorps et les molécules de reconnaissance responsables de l'immunité cellulaire présents à la surface des lymphocytes ont la propriété fondamentale de se combiner spécifiquement avec la molécule d'antigène qui a induit leur synthèse. Cette recombinaison s'effectue au niveau de structures restreintes de la molécule d'antigène appelées déterminants (ou sites) antigéniques ou épitopes (terminologie de Jerne).

* Les déterminants antigéniques sont représentés par des configurations tridimensionnelles de tailles limitées en moyenne de l'ordre d'un tri à un hexasaccharide (ou d'un tri à un décapeptide) à la surface de la molécule immunogénique. Le nombre et la nature de ces déterminants varient selon la structure et la taille de l'antigène (ex. 7 pour l'albumine). Ils peuvent être: * "immunodominants" en raison de leur exposition privilégiée à la surface de la molécule.

* ou cryptiques (immunosilencieux) c'est-à-dire plus ou moins masqués dans la molécule native en raison d'encombrement stérique

7.- Spécificité immunologique

* La combinaison antigène/anticorps (molécule de reconnaissance homologue) s'effectue par des liaisons non covalentes entre les déterminants antigéniques et les régions également limitées des molécules de reconnaissance stéréospécifiquement complémentaires des premiers.

- * Une molécule d'antigène est "vue" par l'hôte comme un ensemble de sites antigéniques. Chaque site déterminera la production d'une famille d'anticorps spécifiques tous plus ou moins étroitement adaptés à ce site (notion d'avidité ou d'affinité de l'anticorps). Les anticorps pourront différer également par diverses caractéristiques (classes, sous-classes, nature de la chaîne légère, charge de la molécule) ce qui amène à les qualifier d'hétérogènes. Il faut souligner que chez un hôte donné, les déterminants d'un antigène peuvent ne pas s'exprimer dans leur totalité.
- * La spécificité antigénique est l'aptitude d'une molécule à se combiner spécifiquement avec les sites d'anticorps ou avec des récepteurs cellulaires. Un antigène peut se définir par :
 - son pouvoir immunogénique (ou éventuellement tolérogénique) qui est la capacité à induire une réaction immunitaire (immunogénicité)
 - sa spécificité antigénique qui est la combinaison spécifique avec les molécules de reconnaissance.
- * En 1921 LANDSTEINER a introduit le terme d'haptène, substance de faible PM qui ne possède que la spécificité antigénique sans propriété immunogénique. Afin de faire la distinction entre les deux propriétés d'un antigène (immunogénique, spécificité antigénique) le terme d'immunogène désigne une molécule douée d'un pouvoir immunogénique .
- * LANDSTEINER a déterminé le concept d'haptène en montrant qu'il suffisait de coupler une molécule organique donnée non immunogène par elle-même sur une protéine immunogénique pour obtenir un conjugué qui, introduit chez un animal, donnera naissance à une réponse immunitaire spécifique de la molécule fixée qui se comporte donc comme un déterminant nouveau à la surface de la protéine "porteuse."

Un haptène peut être: - une molécule naturelle nonimmunogénique par elle-même mais pouvant manifester sa spécificité sur une molécule à laquelle elle peut se trouver naturellement associée.

- un fragment d'un immunogène, portant un ou plusieurs épitopes de ce dernier, ou bien une molécule non-immunogénique chez une espèce animale donnée, mais immunogénique chez une autre espèce.

8.- Fonctions immunologiques d'un antigène

* Un antigène est doué d'un certain nombre de fonctions immunologiques qui permettent de le caractériser sur le plan de sa réactivité au niveau global (hôte) ou moléculaire (interaction avec les molécules de reconnaissance).

* L'immunogénicité (ou pouvoir immunogénique) est la capacité d'induction d'une réponse immunitaire humorale et (ou) cellulaire indépendamment de la spécificité des molécules de reconnaissance (vis-à-vis des structures épitopiques de l'antigène) qui apparaissent chez l'hôte consécutivement à l'introduction de l'antigène. Les structures conditionnant l'immunogénicité d'une molécule (régions dites "immunopotentes") et celles déterminant la spécificité antigénique (épitopes) relèvent le plus souvent de zones distinctes de la molécule.

* La spécificité antigénique (ou antigénicité) est la capacité d'une molécule de se combiner sélectivement à une immunoglobuline donnée ou avec les récepteur (molécules de reconnaissance) fonctionnellement similaires présents à la surface des lymphocytes spécifiques apparus dans le cas de la réponse cellulaire.

* L'allergénicité (pouvoir allergisant) est la capacité d'induction de réactions allergiques et de lésions tissulaires chez un hôte dit "sensibilisé" (ayant été précédemment en contact avec la molécule étrangère) et possédant des immunoglobulines et (ou) des lymphocytes pouvant réagir spécifiquement avec la molécule introduite.

Les allergènes (antigène parasitaire ou de divers organismes végétaux ou microbiens) peuvent induire préférentiellement l'apparition d'une classe d'immunoglobulines (IgE) ou de certaines sous-classes d'IgG (IgG₄)

- * La tolérogénicité (pouvoir tolérogène) est la capacité d'induction dans certaines conditions d'un état de tolérance chez l'animal.

B. - Régulation de la réponse immunitaire

- * La réponse immunitaire est contrôlée à plusieurs niveaux et met en jeu :
 - une régulation génétique : BIOZZI et al.(6) en 1974 ont entrepris un programme de sélection génétique de lignées de souris d'après les caractères "bonne productrice" et "mauvaise productrice" d'anticorps envers les globules rouges de mouton.
 - une régulation physiologique : qui est destinée à empêcher une réaction immune de devenir préjudiciable soit parce qu'elle est trop importante et provoque l'hyperimmunité, soit parce qu'elle est mal dirigée et entraîne une auto-immunité.

II.- Immunomodulateurs isolés de microorganismes

A.- Adjuvant de FREUND

FREUND en 1947 montra la capacité d'émulsions d'huile dans l'eau, ou d'eau dans l'huile, d'augmenter les réponses immunitaires. L'addition de mycobactéries favorisait de façon importante l'activité adjuvante des substances huileuses. Ce principe actif, contenu dans des fractions extraites de *Mycobacterium tuberculosis* est composé de glycolipides et de peptidoglycolipides qui sont responsables de l'activité adjuvante.

L'adjuvant, puis l'antigène, peuvent être injectés séparément avec un intervalle de quelques jours, si les deux injections sont faites au même endroit. L'effet de l'*adjuvant complet de FREUND (CFA)* est important pour les petites doses d'antigènes et est efficace vis-à-vis d'haptènes et d'antigènes très variés (polypeptides, protéines, bactéries, virus), ce qui élimine le rôle des réactions croisées entre les mycobactéries et l'antigène, il n'est actif que sur les réponses immunitaires vis-à-vis d'antigènes thymo-dépendants.

L'adjuvant complet de FREUND (CFA) et l'adjuvant incomplet de FREUND (IFA) sans mycobactéries augmentent de façon importante la production des anticorps et rendent même immunogéniques des doses d'antigènes qui ne l'étaient pas spontanément. Le CFA peut modifier la classe des anticorps normalement produits en son absence en favorisant la production d'IgG plutôt que d'IgM et d'IgG₂ plutôt que d'IgG₁, il stimule ainsi la réponse secondaire.

Le CFA favorise le développement des réactions d'hypersensibilité retardée. Par contre, l'IFA est sans effet sur l'immunité à médiation cellulaire. Le CFA entraîne une prolifération lymphocytaire dont témoigne l'hyperplasie des organes lymphoïdes. Les effets préférentiels du CFA sur l'immunité à médiation cellulaire et la production d'anticorps vis-à-vis d'antigènes thymodépendants incitent à penser que le CFA stimule le plus particulièrement la prolifération des lymphocytes T. En effet, l'activité adjuvante du CFA sur la production d'anticorps n'est plus observée chez les souris appauvries en cellules T.

L'adjuvant complet de FREUND (émulsion d'eau contenant l'antigène dans l'huile minérale et des mycobactéries tuées) fut le plus utilisé chez l'animal comme adjuvant de l'immunité, tant humorale que cellulaire mais n'est pas utilisable chez l'homme en raison de nombreux effets secondaires induits.

B.- Le *Corynebacterium parvum*

Les propriétés immunostimulantes ont été démontrées par PREVOT et al. (4), lequel a décrit les différents aspects de cette stimulation jusqu'à la mise en évidence de la protection de souris contre le développement du processus cancéreux.

Les préparations inactivées de *Corynebacterium parvum* ont des propriétés immunostimulantes. Ce sont des immunopotentiateurs généraux. Leur inoculation entraîne chez l'animal d'expérience

- une stimulation des organes du système réticulo-endothélial, une augmentation de l'épuration des particules circulant dans le sang et de leur phagocytose
- un effet adjuvant sur l'immunité humorale (augmentation d'anticorps)
- un effet adjuvant sur l'immunité à médiation cellulaire (hypersensibilité retardée)

Le *Corynebacterium parvum* est un très puissant stimulant des macrophages et une seule injection de bactéries tuées chez la souris a une action prolongée sur la résistance aux infections. L'activité immunostimulante est due principalement à son action sur les macrophages. Il augmente aussi bien la production d'anticorps contre les antigènes thymo-dépendants que contre les antigènes thymo-indépendants. Les lymphocytes T ne semblent pas nécessaires à son action adjuvante.

Le *Corynebacterium parvum* est un immunostimulant des mécanismes de défense anti-infectieuse : son inoculation augmente la résistance d'animaux à des épreuves parasitaires, bactériennes et virales ou permet la survie à une épreuve bactérienne des souris artificiellement immunodéprimées.

C'est un immunostimulant des mécanismes de défense anti-tumorale : son inoculation unique ou répétée peut augmenter la résistance des animaux à certaines tumeurs expérimentales. Actif sur de nombreuses tumeurs expérimentales, il a été largement utilisé chez l'homme (3,8).

L'action immunostimulante a été utilisée chez l'homme dans l'immunothérapie des cancers (9).

C.- Mycobactéries et leurs dérivés

1.- Le bacille de Calmette et Guérin (BCG)

Sous forme vivante, le BCG est un immunostimulant non spécifique largement utilisé en thérapeutique humaine anti-tumorale (10, 11). Injecté par voie intraveineuse, le BCG induit chez la souris une résistance à de nombreuses bactéries. Il stimule les macrophages, augmente la production d'anticorps vis-à-vis de nombreux antigènes et a une action sur les cellules T. Son action anti-tumorale est établie dans de nombreux modèles expérimentaux (10)

2.- le MER (methanol-extract-residu)

La fraction MER est obtenue par extraction à l'acétone puis au méthanol de mycobactéries. Elle comprend différents fragments de la paroi bactérienne non définis chimiquement. Ses propriétés immunostimulantes ont été démontrées chez le cobaye infecté par *Pasteurella* et dans d'autres infections expérimentales. Par voie intra-veineuse, le MER induit en quelques heures chez la souris, un accroissement des capacités phagocytaires. Il a un effet anti-tumoral, stimule les cellules B et les macrophages. Son action se fait par stimulation directe des macrophages et des cellules T : *in vitro*, il a été montré que les cellules T stimulées par des fractions de mycobactéries produisaient un facteur stimulant les cellules B. Son utilisation chez l'homme est limitée par ses effets toxiques. Des résultats cliniques ont été obtenus dans le traitement de tumeurs malignes digestives (12) et de leucémies aigües myéloblastiques (13)

3.- Immunomodulateurs mimant certains motifs structuraux dans les extraits de mycobactéries

Les travaux du groupe de LEDERER ont porté sur l'isolement et l'étude des activités biologiques des produits dérivant de la paroi des mycobactéries.

Le MDP (N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) est la plus petite partie active de toute la mycobactérie ayant une activité immunostimulante. Il augmente la production d'anticorps, l'hypersensibilité retardée et stimule fortement la résistance non spécifique. Le MDP s'est révélé être pyrogène. Les activités adjuvantes et pyrogène ont été dissociées par administration d'indométhacine qui inhibe l'activité pyrogène sans diminuer son activité adjuvante. L'activité pyrogène peut être éliminée en préparant un dérivé du MDP tel que le N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D-glutaminyl -n-butyl-ester, lequel a la même activité adjuvante que le MDP.

L'inclusion du MDP dans les liposomes semble avoir beaucoup d'avantages. Encapsulé, il est actif à plus faible dose. Les dérivés lipophiliques du MDP, en particulier le 6-O-stearyl MDP dans des liposomes est un bon adjuvant pour un vaccin antimalarique chez le singe *Aotus* et le B 30-MDP (6-O- α -tetradecyl-hexadecanoyl)-MDP) encapsulé augmente l'immunogénicité de la toxine du choléra lié à un récepteur gangliosidique.

Des auteurs japonais (14,15) ont montré que le 6-O-acylesters du MDP possédant des propriétés adjuvante et anti-tumorale, est moins pyrogène que le MDP et semble le plus actif dans la résistance non spécifique contre *Escherichia coli*.

Un dérivé lipophile du MDP portant un groupement mycolyl à la fin de la chaîne peptidique (Mur NAc-L-Ala-D-iso Gln-L-Ala-glycerol-mycolate) stimule fortement l'activité adjuvante l'hypersensibilité retardée et la résistance antibactérienne non spécifique contre *Klebsiella pneumoniae* et *P. aeruginosa* et *S. pneumoniae*.

Deux autres dérivés du MDP, le phosphatidyl-MDP (Mur NAc-L-Ala-D-iso Gln-L-Ala-phosphatidyl éthanolamine) et le dipalmityl glycerophosphoéthanolamine lié au carbone 6 de l'acide muramique se sont révélés être de puissants immunopotentialeurs.

Le dérivé "desmuramyl-peptide" (L-Ala-D-iso Gln-L-Ala glycerol mycolate) est aussi actif que le dérivé possédant l'acide muramique dans la résistance antibactérienne mais est inactif dans l'immunité humorale et cellulaire. Ceci prouve que l'acide muramique est essentiel à l'activité adjuvante.

Le Cord factor, isolé en 1956 (16) peut être obtenu de mycobactéries ou synthétisé. C'est un glycolipide (6,6'-dimycolate de tréhalose : TDM) possédant une activité anti-tumorale (17,18). PARANT et al. (19) ont montré que l'homologue du Cord factor isolé de *Corynebacterium diphtheria* (avec des acides corynomycoliques de C₂₈ à C₃₆) et son analogue synthétique (acide mycolique C₃₂ synthétique) protègent les souris contre l'infection à *Klebsiella pneumoniae* ou à *Listeria monocytogènes* avec la même efficacité que le Cord factor mycobactérien (6,6'-diesters de tréhalose avec des acides mycoliques de C₈₀ à C₉₀).

L'émulsion MDP + TDM dans du squalane est plus actif que l'émulsion de MDP seul (régression complète d'un hépatocarcinome transplanté chez le cobaye). LEHN a proposé une structure possible du complexe (MDP + TDM + squalane). Les chaînes des deux acides mycoliques sont en contact avec le squalane, les 6 groupements hydroxyliques libres du TDM sont dans la phase aqueuse et peuvent être liés au MDP par des ponts hydrogène. La partie TDM-squalane "pousserait" le MDP vers la membrane cellulaire où se situerait son "récepteur". L'émulsion MDP-TDM possède une activité adjuvante dans les vaccins. L'injection intraveineuse de cette émulsion donne une protection complète chez la souris infectée par le virus *influenza*. Les émulsions étaient aussi utilisées comme adjuvant chez le cobaye lors d'une vaccination de *Brucella abortus*.

Le MDP, ses dérivés et les tréhaloses diesters naturel et synthétique sont de puissants adjuvants pour la production d'anticorps. Il augmente la résistance non spécifique montrée chez les animaux d'expérience par leur activité antibactérienne, antiparasitaire et anti-tumorale.

L'immunostimulation combinée (MDP + TDM + squalane) offre de nouvelles possibilités pour la régression de tumeurs et l'augmentation de l'efficacité des vaccins. Ces immunostimulants trouvent leur application chez les sujets immunodéprimés. (figure 9 P. 38)

D.- CPS-K : polysaccharide capsulaire de *Klebsiella pneumoniae* type 1.

L'antigène capsulaire de *Klebsiella pneumoniae* type 1 purifié après addition de cétyl-pyridinium chloride libère deux fractions : acide et neutre.

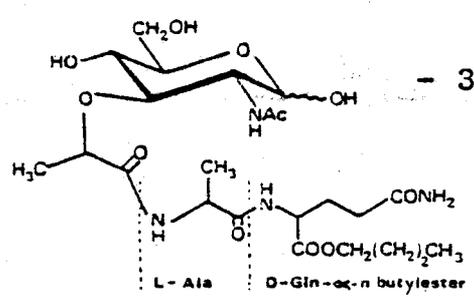
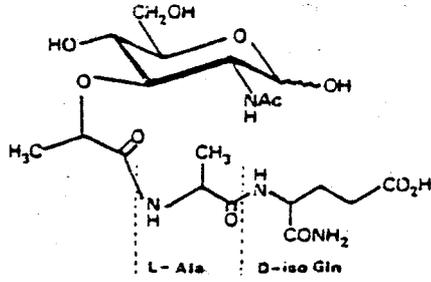
L'antigène neutre, distinct de l'antigène O, composé de monosaccharides (61 %), contient de petites quantités de protéines (2,3 %), lipides et hexosamines. Cette substance homogène est responsable d'une importante activité adjuvante sur la production d'anticorps (réponse secondaire) à la sérum albumine bovine chez la souris (20). L'action adjuvante est beaucoup plus importante que le LPS d'*Escherichia coli* et le zymosan (21). La réponse primaire aux anticorps est plus rapide après une injection de BSA mélangée au CPS-K qu'après une injection de la même quantité de BSA dans CFA (21). L'addition de CFA à une injection de BSA et CPS-K n'augmente pas l'effet adjuvant du CPS-K (22). Le CPS-K est un activateur polyclonal des cellules B sans l'aide des cellules T et des macrophages (23) et induit la production d'interféron dans le sang chez la souris quand il est injecté par voie intraveineuse (24).

E.- Picibanil ou OK - 432

Le picibanil est extrait d'un lysat de *Streptococcus pyogenes*. Il possède une activité anti-tumorale.

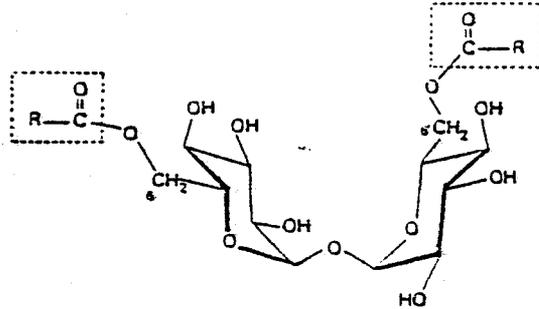
L'action principale du Picibanil provoque une augmentation des fonctions des cellules T et du système réticulo-endothélial. *In vivo*, les cellules T agissent en relation avec les macrophages activés par cet immunomodulateur (25).

YAMASHITA (26) a démontré le rôle des macrophages activés par une préparation de *Streptococcus pyogenes* sur la maturation de thymocytes en cellules T immunocompétentes.



1 MDP (N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine)

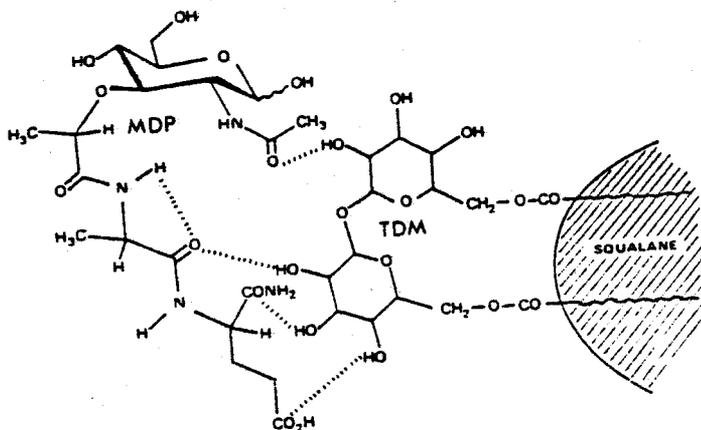
2 N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-glutaminyl- α -n-butyl-ester



A

Total carbon number	Structure of R-C(=O)-OH
$\approx C_{150}$ <u>3</u> (Cord factor=TDM=P ₃)	Mycobacterial mycolic acids, for instance : $CH_3(CH_2)_{19}CH(CH_2)_{14}CH(CH_2)_{17}CH(CH_2)_{24}CO_2H$ $C_{34}H_{164}O_5$
<u>4</u> C ₇₆	Synthetic racemic $CH_3(CH_2)_{13}CH(OH)CO_2H$ $C_{32}H_{64}O_5$

Trehalose 6,6'-diesters (TDM, 3 and C₇₆, 4)



B

Figure 9 : A- Structure de l'acide muramyl dipeptide (MDP) 1, de son dérivé n butyl-ester 2, du tréhalose dimycolate (TDM) 3 et 4

B- Schéma hypothétique du complexe MDP-TDM-squalane

BUS
LILLE

L'immunochimiothérapie (association immunothérapie (OK-432) et chimiothérapie (mytomycin C, 5 fluorouracil et cytosine arabinoside) favorise une augmentation du temps de survie de malades atteints de cancer gastrique ayant subi au préalable l'élimination de la tumeur (27)

F.- Rhodexman

Extrait du milieu de culture de *Rhodotorula rubra*, cet immunomodulateur est composé de chaînes linéaires de mannopyranose lié alternativement par des liaisons β -1,3 et β -1,4 et à un poids moléculaire de $6,5 \cdot 10^4$ daltons (28). Il possède une activité anti-tumorale et a un effet protecteur contre l'infection à *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. *In vitro*, il active les macrophages mais inhibe leur migration. Il a une action sur l'immunité humorale en favorisant la sécrétion d'anticorps envers les globules rouges de mouton.

G.- Les lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) bactériens sont isolés de l'Outer membrane des bactéries à gram négatif. Ils ont des effets adjuvants quand ils sont ajoutés à la préparation antigénique. Ils augmentent ainsi la production d'anticorps en stimulant les lymphocytes B. Des LPS d'entérobactéries encapsulées dans des liposomes ont une action immuno-adjuvante (immunité à médiation cellulaire anti-virale chez la souris adulte (29)). *In vitro*, des endotoxines isolées de *Serratia marcescens* ont été utilisées pour stimuler l'immunité humorale aux globules rouges de mouton dans des cultures spléniques infectées par FLV (Friend Leukemia Virus). Ce virus déprime les réponses humorale et cellulaire. Il induit la suppression de la réponse d'anticorps, ce phénomène peut être contreversé par la présence de LPS qui déclenche la production de lymphokine ou monokine (30).

Une injection de LPS augmente la résistance non spécifique vis-à-vis d'infection bactérienne (gram + ou -) ainsi que vis-à-vis de divers virus. Chez l'hôte, les endotoxines provoquent une variété d'effets biologiques. C'est la partie lipide A qui est responsable de la toxicité des endotoxines. (voir tableau III P.41)

H.- Bestatine

La Bestatine (2 S, 3 R) 3-amino -2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-L-leucine, est un métabolite dipeptidique isolé de *Streptomyces olivoreticuli* (Actinomycètes) (31). C'est un inhibiteur de la leucine aminopeptidase et de l'aminopeptidase B (exopeptidase) qui hydrolysent une liaison peptidique N-terminale contenant un résidu d'arginine ou de lysine en position N- terminale (31). Ces deux enzymes sont présents à la surface cellulaire. Il se forme ainsi un complexe Bestatine-enzyme à la surface cellulaire (32).

La Bestatine, administrée par voie orale, augmente l'activité phagocytaire de granulocytes humains dans l'ingestion de particules de levures *in vitro* chez des patients atteints de cancer. (33).

C'est un immunomodulateur pour une utilisation clinique. Administrée per os, elle n'est pas toxique pour l'animal et l'homme.

NOMA et al. (34) ont étudié l'effet de la Bestatine sur les fonctions lymphocytaires de patients atteints de cancer d'organe digestif. Elle potentialise l'activité helper des cellules T dans la formation d'anticorps ou par la réduction de l'activité des cellules T suppressives préexistantes ou augmentation de l'activité des cellules T helpers elles-mêmes.

Ainsi la Bestatine améliore les fonctions des cellules NK et K, spécialement chez les patients dont les fonctions ont été altérées.

I.- FK 156

Le FK 156 (tétrapeptide) a été isolé de la paroi de *Streptomyces*. Cet extrait bactérien agit sur la fonction phagocytaire (test de la clearance au carbone), stimule l'hypersensibilité retardée et protège les animaux d'expérience contre les infections à *Escherichia coli* (35).

TABLEAU III

Activités biologiques des lipopolysaccharides

Immunologique

mitogène des lymphocytes B

adjuvant

activateur polyclonal des cellules B

antigène thymo-indépendant

Activateur des macrophages

Augmentation de la phagocytose

Augmentation de la résistance non spécifique à l'infection

Augmentation de la synthèse: de prostaglandines
d'interféron

Activation du complément

Un nombre important de β - (1 \rightarrow 3) glucans naturels isolés de sources variées (plantes supérieures, champignons, bactéries) sont connus pour stimuler la résistance non spécifique et l'activité immunologique spécifique.

J.- glucans isolés de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*.

Un glucan, β 1,3 - poly -D-glucose, provenant de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae* est un stimulant du système phagocytaire aussi bien qu'un modulateur de l'immunité à médiation cellulaire et humorale (36, 37). L'administration parentérale de ce polymère chez le rat et la souris montre une augmentation de la clearance de particules dans le sang, inhibe la croissance de certaines tumeurs expérimentales et augmente le temps de survie des souris après infection à *Staphylococcus aureus*. (38)

K.- glucan isolé de *Coriolus versicolor*

Le Krestin ou PSK isolé d'un basidiomycète, *Coriolus versicolor* est composé d'une chaîne polysaccharidique renfermant des résidus de glucose (composé majeur), de mannose, de galactose, de xylose et de fucose. La chaîne protéique (18 - 38%) apparaît être liée covalentiellement à la partie monosaccharidique. Les études pharmacologiques et immunologiques de cette protéine liée au polysaccharide indiquent que le PSK inhibe la croissance de tumeurs expérimentales chez les rongeurs (39), restaure la réponse immune d'animaux déprimés bien qu'il n'a pas d'influence sur la réponse immune d'animaux normaux (40). MAYER et al. (41) ont montré que le PSK a une activité adjuvante, stimule l'activité phagocytaire des macrophages chez les souris (augmentation de la clearance du carbone dans le sang) ne favorise pas la réaction d'hypersensibilité retardée chez la souris normale. Le PSK protège les animaux contre l'infection expérimentale à *Klebsiella pneumoniae*.

L.- Glucan isolé de *Lentinus edodes*

D'autres groupes de glucans immunostimulants ayant une activité anti-tumorale sur des tumeurs expérimentales entraînent la stimulation de l'immunité à médiation cellulaire.

Le lentinan isolé de *Lentinus edodes*, de poids moléculaire de 500 000 daltons est composé d'unités de répétition de 5β -(1-3)-glucopyrannoside liées avec 2 chaînes β -(1-6)-glucopyrannoside. Ce polysaccharide, défini chimiquement, composé uniquement de glucose, a été découvert par CHICHARA et al. (42) en 1969.

Aucune activité anti-tumorale n'est observée chez les souris thymectomisées (43) traitées avec un sérum antilymphocyte ou chez les souris nude athymiques (44).

Le mode d'action du lentinan a été étudié dans l'immunothérapie du cancer chez l'homme (45). Il a des effets stimulants multiples sur les mécanismes de défense.

L'élévation de la production d'anticorps suggère la stimulation de production d'anticorps spécifiques de la tumeur et l'interféron déclenche l'activation des cellules NK, T tueuses. L'interaction cellule à cellule par le lentinan est aussi nécessaire pour restaurer l'état immunodéprimé des patients atteints de cancer à l'état normal. Le lentinan agent immunothérapeutique en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques, est actif chez des patients atteints de cancer gastrique (46)

M.- Glucan isolé de *Schizophyllum commune Fries*

Le schizophyllan, composé d'unités de répétition de 3β -(1-3)-glucopyrannoside liées avec une chaîne β -(1-6) glucopyrannoside, de poids moléculaire 450 000 daltons, purifié de *Schizophyllum commune Fries* a une activité anti-tumorale contre les tumeurs syngéniques (47) aussi bien qu'allogéniques chez la souris. Les propriétés immunologiques sont évaluées par sa capacité d'augmenter la réactivité immunologique telle que l'hypersensibilité retardée. Il restaure l'activité des cellules T helpers et d'autre réponse immune chez les animaux d'expérience (souris) immunodéprimés traités avec des antigènes cancéreux.

Le schizophyllan induit la cytotoxicité des macrophages chez la souris normale mais pas chez les souris déficientes en cellules T . Le schizophyllan est un immunopotentiateur ayant une activité adjuvante T-cell aussi bien qu'une activité sur les macrophages.

L'interaction des cellules T et des macrophages joue un rôle important dans l'expression de son activité antitumorale. C'est un agent immunothérapeutique donnant un effet thérapeutique contre des tumeurs expérimentales, spécialement en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques (48)

N. - Immunomodulateurs isolés d'Ascomycètes et de Basidiomycètes

Le matériel soluble dans l'eau, de beaucoup d'espèces de champignons dont pezizaceae dans les Ascomycètes ou polyporaceae dans les Basidiomycètes, possède une activité mitogénique (49). Cela suggère l'existence d'un immunomodulateur commun. Un composé extrait de *Peziza vesiculosa* possède une activité mitogénique, stimule les cellules B murines (activateur polyclonal) et induit la formation d'anticorps non spécifiques(50).

III.- Immunomodulateurs synthétiques

A.- Le Lévamisolé

Le Lévamisolé, synthétisé en 1964, est utilisé depuis 1966 comme une drogue initialement connue en pratique vétérinaire pour ses propriétés antihelminthiques (51), il s'est vu conférer un intérêt nouveau depuis que RENOUX en 1971 (52) a montré son pouvoir immunostimulant chez la souris. Administré à des souris en même temps que le vaccin antibrucellien, ce produit amplifie le pouvoir protecteur du vaccin vis-à-vis de *Brucella abortus*. Il semble dépourvu d'action sur les lymphocytes B, responsable de l'immunité humorale, ne provoquant en particulier aucune modification du nombre de ces cellules ou aucune augmentation du taux d'anticorps circulants. Il agit par contre sur les granulocytes et surtout sur les lymphocytes T, supports de l'immunité à médiation cellulaire. Le Lévamisolé a un effet sur les cellules phagocytaires lorsque la phagocytose est altérée, particulièrement les macrophages de la souris et de l'homme. Il favorise une restauration du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles.

Aussi le rôle essentiel du Lévamisole n'est pas une action sur la production d'anticorps. En revanche, il restaure jusqu'à un niveau normal la fonction immunitaire cellulaire quand elle est déprimée naturellement, pathologiquement ou expérimentalement (activité mise en évidence chez l'homme et l'animal d'expérience).

L'action freinante du Lévamisole sur la croissance de tumeurs n'est remarquée que si celles-ci ont d'abord été réduites par chimiothérapie ou radiothérapie. Tant chez l'homme que chez l'animal, ce produit semblerait apte à maintenir dans certains cas un état de rémission apparente. La masse tumorale se développe du fait d'un trouble des défenses de l'organisme, stimule l'immunité humorale et la production d'anticorps anti-tumoraux spécifiques. Ces anticorps formant des complexes immuns avec les antigènes tumoraux seraient aptes à paralyser la production des médiateurs de l'immunité cellulaire. A mesure que le nombre de cellules croît, les symptômes d'une paralysie progressive de l'immunité cellulaire se développent.

L'application d'une chimiothérapie permet de réduire à la fois le volume tumoral et le nombre de cellules B. Le nombre de cellules tumorales immunogènes étant réduit, de même que celui des cellules B, les anticorps spécifiques ne sont pas synthétisés, levant ainsi la paralysie de l'immunité cellulaire. Le Lévamisole semble capable de restaurer les fonctions normales des cellules T et des macrophages permettant ainsi l'action des facteurs cytotoxiques et des cellules tueuses (cellules K). Il permet l'éradication complète des cellules tumorales ou du moins les maintient à un nombre faible (rémission complète apparente) .

Il existerait ainsi une " balance " entre les immunités cellulaire et humorale . La polyarthrite rhumatoïde se caractérise par l'existence de phénomènes d'auto-immunité humorale , le plus connu étant le facteur rhumatoïde , immunoglobuline dirigée contre les propres IgG du patient , mais de nombreux autres anticorps peuvent être retrouvés . Des complexes immuns sont retrouvés dans la synoviale . Une déficience en lymphocytes T fut mise en évidence : tendance anergique des patients vis-à-vis des antigènes testés par voie cutanée , également les lymphocytes T incorporent moins de thymidine

tritiée en présence de mitogène.

La polyarthrite rhumatoïde pourrait résulter d'une déficience en lymphocytes T plus particulièrement destinés à refreiner les réactions auto-immunes aussi bien cellulaires qu'humorales : ce sont les T suppresseurs.

Le Lévamisole a été utilisé comme traitement de fond de la maladie. Il agit vraisemblablement en modulant la réponse immune surtout cellulaire et induit une restauration ou une augmentation des tests cutanés à la tuberculine de ces malades. L'indication du Lévamisole sur les malades atteints de polyarthrite rhumatoïde ayant résisté aux autres thérapeutiques, est basé sur des critères cliniques (53).

MIWA et al. (54) ont étudié le Lévamisole dans l'immunochimiothérapie du cancer. Le temps moyen de survie des malades atteints de cancer gastrique est augmenté quand le médicament est administré dans des cas où la tumeur est prélevée chirurgicalement..

Les meilleures indications semblent la polyarthrite rhumatoïde et les cancers où il est une arme supplémentaire. De nombreux auteurs ont étudié l'action du Lévamisole dans différents cancers (sein, poumon, leucémies aiguës).

B.- le DTC

Un composé soufré, le diéthylthiocarbamate (DTC) augmente spécifiquement la synthèse d'anticorps en réponse primaire, accroit la réponse aux mitogènes T et conduit à des réactions d'hypersensibilité retardée plus élevées et plus soutenues.

C.- L'Azimexon

L'Azimexon (2-(2-cyanaziridinyl-(1)-2-[2-carbamoylazaridinyl-(1)]propane) amplifie les réactions d'hypersensibilité retardée, la production d'anticorps T dépendants et l'activité Natural-Killer. La thérapie adjuvante avec ce composé immunomodulateur pourrait être une chimiothérapie antibactérienne en utilisation clinique. Il augmente la résistance de la souris aux infections à *Candida albicans* (55). Les animaux immunodéprimés (administration de cyclophosphamide) infectés par *Candida albicans* ont un taux de mortalité élevé, par contre quand l'Azimexon leur est administré, le taux de mortalité est réduit. (55).

D.- Polynucléotides de synthèse

Dès 1956, JARASLOW et TALIAFERRO (56) ont observé le pouvoir restaurateur des tissus riches en acides nucléiques sur la synthèse des anticorps. Par la suite, des polynucléotides furent synthétisés. L'acide polyinosinique mélangé à l'acide polycytidilique conduit au Poly I : C qui est un bon adjuvant et un bon inducteur d'interféron. C'est un bon produit pour l'immunothérapie des tumeurs. L'acide polyadénylique mélangé à l'acide polyuridylique forme le Poly U : A, actif comme adjuvant et des essais cliniques ont été réalisés dans les cancers du sein. Le Poly U : A agit comme un activateur polyclonal des cellules T, activant à la fois les cellules T helpers, les cellules proliférant en culture mixte et les cellules T cytotoxiques. Cette activation polyclonale des cellules T se développe sans augmentation de la synthèse du DNA et en l'absence de macrophages. Le poly U : A corrige le déficit thymique observé chez les souris nude et âgées. Par ailleurs, il active *in vitro* et *in vivo* les macrophages. Expérimentalement, les polynucléotides synthétiques sont révélés efficaces au cours d'infections virales chez la souris. LACOUR et al. (57) ont traité des patients atteints de cancer du sein avec les Poly U : A. Les résultats obtenus semblent être la conséquence d'un effet immunomodulateur. Le bienfait obtenu serait dû à une combinaison d'une diminution dans les cellules tumorales par chirurgie et d'une amplification des cellules réactives aux antigènes. Les patients sont d'abord soumis à une chirurgie et une thérapie au cobalt avant de recevoir le Poly U : A. C'est ainsi une forme efficace de la thérapie adjuvante dans le cancer du sein.

E.- Isoprinosine

L'isoprinosine, complexe d'inosine et de p. acétamid benzoate de N,N-diméthyl-amino-2-propanol, a été étudié pour ses propriétés antivirales. *In vivo*, il diminue la réplication du virus de la grippe chez la souris et protège le hamster de l'encéphalite herpétique. Il potentialise les effets de l'interféron et augmente la prolifération lymphocytaire induite par la phytohémaglutinine. Il modifierait à la fois les cellules T à fonctions T helpers et suppresseurs.

F.- Le NPT 15392

Le NPT 15392 (9-erythro-2-hydroxy, 3, nonyl hypoxanthine) agit sur les cellules T (immunité à médiation cellulaire) et sur la fonction des macrophages. *In vivo*, il augmente l'activité Natural-Killer et inhibe partiellement ou complètement les tumeurs chez la souris. Chez les patients atteints de cancer, le NPT 15392 active l'immunité à médiation cellulaire et l'activité Natural-Killer

G.- Le Tilorone

Le Tilorone (2,7-bis [- (diéthylamino) ethoxy] - fluorène -9- dihydrochloride) est un puissant inducteur d'interféron qui augmente la synthèse des anticorps alors qu'il diminue l'immunité cellulaire.

H.- La Tufsine

La Tufsine, de nature tétrapeptidique (L thréonyl-L-lysyl-L-Propyl-L Arginine), copie un fragment de la chaîne lourde des immunoglobulines qui se fixe sur les polynucléaires neutrophiles et les macrophages. Elle stimule la phagocytose, l'activité bactéricide et tumoricide et est capable d'augmenter les réponses immunes vis-à-vis d'antigènes T dépendants.

I.- Le lauryl tétrapeptide (LTP)

Le lauryl tétrapeptide est obtenu par laurylation d'un tétrapeptide de paroi de *Streptomyces* (L-Ala → D-iso-Glu-L-L-Dap ← Gly) (58). Le LTP possède une activité adjuvante et protège les souris contre une infection à *Listeria monocytogènes*. FLOC'H et al. (59) ont démontré que le LTP induit la production d'interféron *in vitro*, stimule l'activité NK des cellules spléniques de souris, la production d'interleukine 2, et augmente l'activité des macrophages.

IV.- Immunomodulateurs d'origine leucocytaire

A.- L'interféron

L'interféron peut être isolé de cellules infectées par des virus (infection par le virus de Sendai de leucocytes humains). Une étude clinique contrôlée a démontré l'efficacité clinique de l'interféron leucocytaire humain chez des malades atteints de cancer (60,61).

L'interféron qui inhibe la réplication virale, inhibe aussi la croissance cellulaire. Il s'est montré capable de diminuer la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*. Par contre l'interféron est capable d'augmenter l'activité Natural-Killer *in vitro* et *in vivo*.

B.- Facteur de transfert

C'est en 1955 que LAWRENCE (62) décrit le transfert de réaction d'hypersensibilité retardée à la tuberculine par des extraits dialysables de leucocytes. Ce facteur dialysable de poids moléculaire inférieur à 10 000 est appelé Facteur de Transfert (TF) de structure polypeptidique. Il s'est révélé bénéfique chez des malades immunodéficients (63)

V.- Immunomodulateurs d'origine thymique

Certains facteurs thymiques qui jouent un rôle important dans le développement de la réponse immune et dont l'absence conduit à des déficits immuns ont été isolés et caractérisés.

En 1966, le groupe de GOLDSTEIN isolait du thymus de rat, de souris puis de veau, le facteur appelé thymosine dont la fraction 5 (composé de plusieurs polypeptides), obtenue ultérieurement, a été utilisée en clinique chez des malades, présentant des déficits immunitaires ou atteints de cancer du poumon (64).

Un nonapeptide a été isolé du sérum normal. Ce facteur thymique sérique (FTS) est absent du sérum de souris nude, disparaît quelques heures après thymectomie et réapparaît après greffe du thymus (65).

Ces facteurs ont pu être synthétisés et ont permis d'obtenir ainsi des fractions pures. Ces peptides synthétiques que sont le FTS, la Thymosine α 1 ou la Thymopoïétine (polypeptide de 49 acides aminés) ont de multiples activités biologiques sur les lymphocytes T (induction de marqueurs et de la prolifération aux mitogènes T, augmentation des fonctions de cytotoxicité et desuppression). Le FTS synthétique est considéré comme une substance de synthèse pharmacologiquement active, aux actions multiples sur les lymphocytes T.

TABLEAU IV

Récapitulatif des différents immunostimulants

IMMUNOMODULATEURS	ORIGINE	INDICATIONS	IMMUNITÉ			FONCTION PHAGOCYTAIRE	INFECTION
			HUMORALE	CELLULAIRE			
<u>A - MICROORGANISMES</u>							
<i>Corynebacterium parvum</i>	bactéries inactivées	cancer infection	x	x	x	x	x
BCG	bactéries vivantes	cancer infection	x	x	x	x	x
MER	mycobactéries	cancer (tumeurs malignes digestives (leucémies aiguës myeloblas- (tiques (infection	x				
CPS-K	<i>Klebsiella pneumoniae</i>				x		
Picibanil	<i>Streptococcus pyogenes</i>	cancer immunochimiothérapie					x

IMMUNOMODULATEURS	ORIGINE	INDICATIONS	IMMUNITÉ		FONCTION PHAGOCYTAIRE	INFECTION
			CELLULAIRE	HUMORALE		
* MDP et dérivés	mycobactéries	-Pouvoir adjuvant lors des vaccinations -cancer -immunodéficience -infection	x	x	x	x
Rhodexman	<i>Rhodotorula rubra</i>	- cancer	x	x	x	x
Glucan	polymère de glucose de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- cancer - infection	x	x	x	x
Krestin	<i>Coriolus versicolor</i>	- cancer - infection - immunodéficience	x	x	x	x
Lentinan	<i>Lentinus edodes</i>	- cancer (association avec chimiothérapie) - immunodéficience	x	x	x	x

IMMUNOMODULATEURS	ORIGINE	INDICATIONS	IMMUNITE		FONCTION PHAGOCYTAIRE	INFECTION
			HUMORALE	CELLULAIRE		
Schizophyllan	<i>Schizophyllum commune</i>	- immunodéficience - cancer (association chimiothérapie)	x	x	x	
Bestatine	<i>Streptomyces olivoreticuli</i>	- cancer - immunodéficience	x	x	x	
FK 156	<i>Streptomyces</i>			x	x	x
B - <u>SYNTHETIQUE</u> Levamisole		- pouvoir adjuvant lors de vaccinations - immunodéficience - cancer (association avec chimiothérapie ou radiothérapie) - polyarthrite rhumatoïde (auto-immunité)		x	x	
DTC		- cancer - immunodéficience	x	x		



IMMUNOMODULATEURS	ORIGINE	INDICATIONS	IMMUNITE		FONCTION PHAGOCYTAIRE		INFECTION	
			CELLULAIRE	HUMORALE				
Azimexon		- immunodéficience	x	x	x	x	x	x
Poly U : A		- cancer (en association avec radiothérapie)	x					
Poly I : C		- cancer		x				
Isoprinosine		- infection virale			x	x		
NPT 15392		- cancer						
Tilorone								
Tufsine								
LTP								
<u>C - D'ORIGINE LEUCOCYTAIRE</u>								
Interféron		- infections bactériennes						
		- cancer						
		- infection virale						
TF		- immunodéficience						



IMMUNOMODULATEURS	ORIGINE	INDICATIONS	IMMUNITE		FONCTION PHAGOCYTAIRE	INFECTION
			HUMORALE	CELLULAIRE		
D - <u>D'ORIGINE THYMIQUE</u> * Thymosine (fraction 5) * Facteur thymique sérique (FTS)		<ul style="list-style-type: none"> - cancer - immunodéficience - cancer - immunodéficience 		x x		



TRAVAUX PERSONNELS

ETUDES BIOCHIMIQUES

I - PREPARATION DU PRINCIPE ACTIF

La préparation du principe actif a été réalisée par les Laboratoires CASSENNE (66).

Après revivification de la souche de *Klebsiella pneumoniae* O₁K₂, NCTC 5055 lyophilisée, la culture est réalisée en fermenteur Biolafitte et la pousse bloquée peu avant la fin de la phase exponentielle de croissance du microorganisme. La préparation est alors sensibilisée par chauffage à 56°C et la lyse parfaite par voie enzymatique. Le lysat de 30 jours est lyophilisé. Une délipidation poussée est effectuée par l'acétone et le méthanol. Les produits non solubilisés par ces solvants sont remis en suspension dans de l'eau puis centrifugés une première fois à faible vitesse (20 000t/mn) pour éliminer les débris cellulaires, substances insolubles

ou rendues insolubles par le traitement précédent (protéines dénaturées). La solution ainsi clarifiée est alors centrifugée en continu sous de fortes accélérations (60.000 g). La fraction hydrosoluble surnageante est alors diafiltrée sur membranes microporeuses calibrées à 300.000 (cartouche Romicon LTC 1015 XM300). Après lavage par quarante volumes d'eau, la fraction retenue dans ces conditions est centrifugée, lyophilisée et constitue le principe actif (voir figure 10 P. 57)

A chaque étape de la fabrication, pour assurer la qualité du principe actif de nombreux contrôles sont pratiqués : virulence de la souche, pureté et contamination des cultures, stérilité du lysat, qualité des extractions et tamisage moléculaire par étude des propriétés physico-chimiques du principe actif.

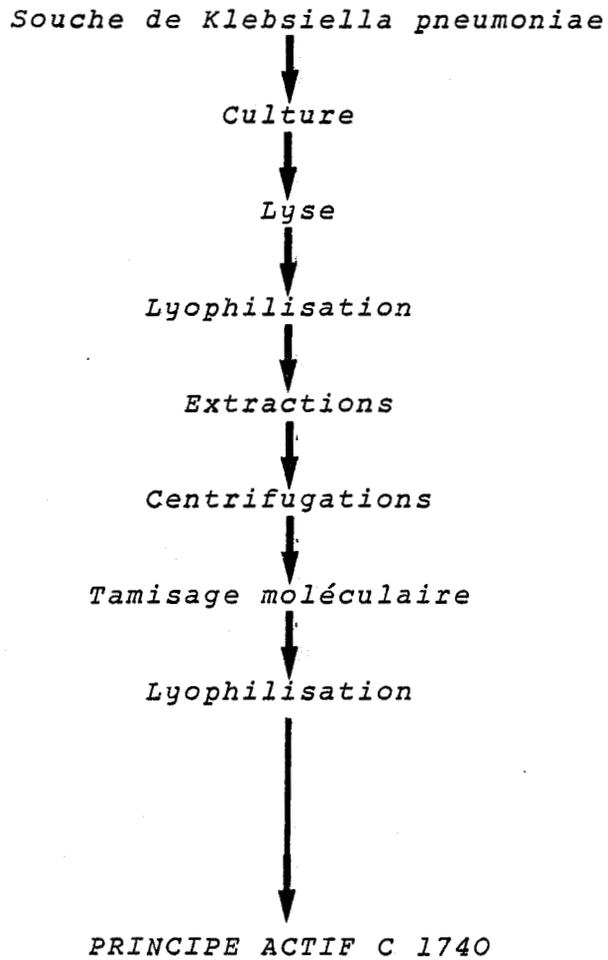


Figure 10

Schéma de fabrication du principe actif C 1740.



II - ETUDE DU PRINCIPE ACTIF

Les techniques analytiques sont présentées dans un appendice technique page 158.

A - COMPOSITION DU PRINCIPE ACTIF

Le principe actif renferme essentiellement des protéines (26,3%), des glucides (60%) et des éléments minéraux : phosphate (0,43%) et sulfate (0,3%).

L'extrait sec met en évidence 10% d'humidité. Enfin des traces d'acide nucléique ont été identifiées (1.6%).

B - ETUDE DE LA COPULE PROTEIQUE

La fraction protéique a été mise en évidence après dosage des protéines totales selon LOWRY (67) et identification des acides aminés après analyse à l'autoanalyseur Beckman-Multichrom suivant le principe de SPACKMAN et al. (68) adapté par CHARET et al. (69) à l'analyse des glycoprotéines.

Le principe actif est constitué de 26,3% de protéines selon LOWRY. Tous les acides aminés sont présents, à l'exception de la cystéine.

TABLEAU V

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

Asp	1.16	Gly	0.69	Leu	0.70
Thr	0.34	Ala *	1	Tyr	0.24
Ser	0.62	Val	0.36	Phe	0.22
Glu	0.77	Met	0.15	Lys	0.40
Pro	0.30	Ileu	0.16	Hist	0.13
				Arg	0.37

L'analyse à l'autoanalyseur permet de doser les acides aminés (11,9%), mais également la glucosamine (0,98%). Le dosage de la glucosamine a été vérifié par la méthode modifiée d'ELSON et MORGAN (1,23%).(70)

C - ETUDE DE LA COPULE GLUCIDIQUE

1 - Composition centésimale :

Le principe actif renferme 60% de glucides totaux qui se décomposent en oses neutres (50,15%), acides uroniques (8,76%) et en osamines (1,23%).

TABLEAU VI

Composition centésimale en glucides, protéines et éléments minéraux.

Oses Neutres	Acides Uroniques	Osamines	Protéines	Phosphate	Sulfate
50,15	8,76	1,23	26,3	0,43	0,30

L'interférence des hexoses lors du dosage des acides uroniques par la méthode au Carbazol sulfurique de DISCHE (71) et l'interférence des acides uroniques lors du dosage des hexoses par la méthode à l'orcinoïl sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (72) ont été éliminées après correction des résultats suivant le protocole préconisé par MONTREUIL et SPIK (73).

Le dosage à la diphénylamine selon NIAZI et STATE (74) permet de doser les acides sialiques mais également les acides nucléiques car tous présentent un maximum d'absorption à 530 nm, la différence qui existe est la coloration. Les acides sialiques présentent une coloration mauve et les acides nucléiques une coloration bleue. Lors du dosage, le principe actif présente une coloration bleue, ce qui signifie que l'échantil-

lon renferme, en faible quantité, des acides nucléiques.

2 - Composition molaire :

La chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides libérés par méthanolyse a permis d'identifier le galactose, le glucose et le mannose dans les rapports 0.5/1/0.3 ainsi qu'un constituant ayant un temps de rétention supérieur à l'acide N-acétylneuraminique.

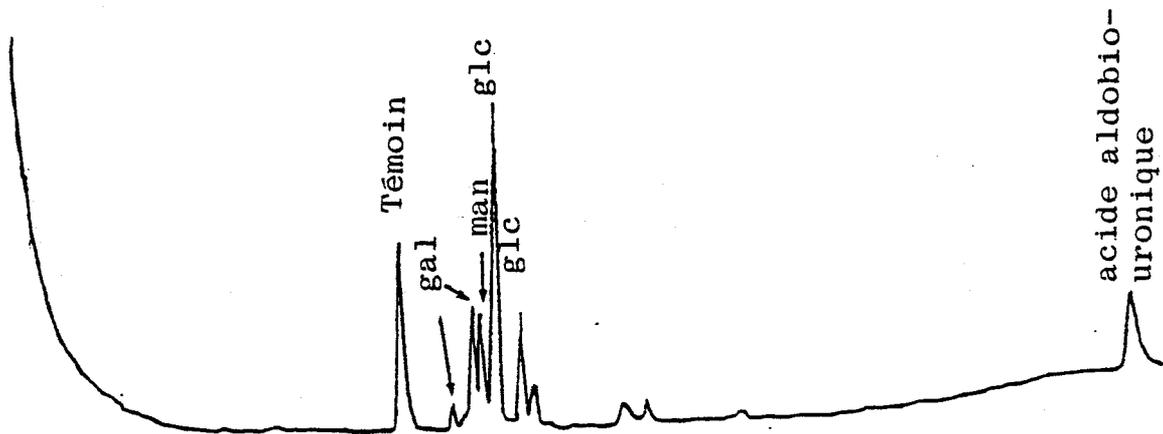


Figure 11 : Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du principe actif.

Colonne de verre (0.3x300 cm) remplie de silicone OV210 à 5% sur VARAPORT 30 "mesh" 80-100 ; température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C par minute ; sous un débit de gaz vecteur (azote) : 10 ml/mn.

TABLEAU VII

Composition molaire* en monosaccharides du principe actif.

Galactose	Mannose	Glucose	Acide aldobiouronique HexUA $\xrightarrow{1,3}$ Man
0,53	0,29	1	++

* calculée sur la base de 1 résidu de glucose.

Ce composé a été isolé et caractérisé comme étant un disaccharide. L'hydrolyse sulfurique selon SEAMAN (75) a permis d'obtenir une fraction acide après neutralisation de l'hydrolysats, purification sur résines échangeuses d'ions et élution de la résine échangeuse d'anions (Duolite A102D, forme HCOO⁻) par l'acide formique 10%. La fraction acide ainsi recueillie est purifiée après chromatographie sur Sephadex G 10 et chromatographie sur papier.

L'oligosaccharide pur ainsi obtenu a été identifié, après réduction au borodéutérure de sodium, perméthylation et analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

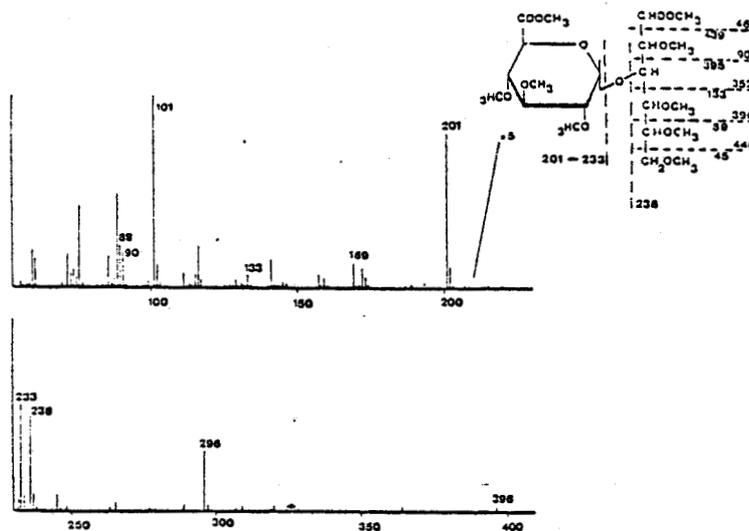


Figure 12 : Spectre de masse de l'acide aldobiouronique réduit et perméthylé. (Analyse par couplage GLC-MS sur colonne SE 30 , température programmée de 150° à 280°C à raison de 5°C/min)

Il s'agit d'un disaccharide UA $\xrightarrow{1,3}$ Hexitol caractérisé par les pics de masse m/e 233 spécifique d'un résidu d'acide uronique en position terminale non réductrice, m/e 236 spécifique du résidu d'hexitol et m/e 396 et 133 caractéristiques de la liaison sur l'hydroxyde en 3 de l'hexitol du résidu d'acide uronique.

Afin de déterminer la nature de l'hexose, une méthanolyse de ce disaccharide suivie d'une trifluoroacétylation et analyse en chromatographie en phase gazeuse a été nécessaire. L'hexose s'est révélé être un résidu de mannose.

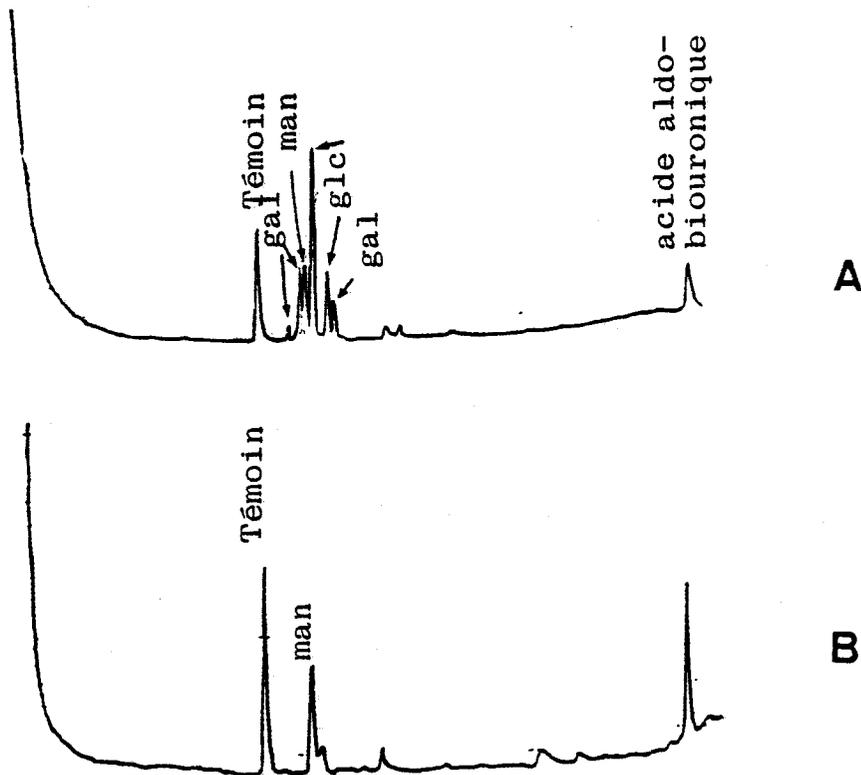


Figure 13 : Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du principe actif (A) et de la fraction acide (B).

Colonne de verre (0.3x300 cm) remplie de silicone OV210 à 5% sur Varaport 30 "mesh" 80-100, température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C/mn sous un débit de gaz vecteur (azote) : 10ml/mn.

Les liaisons des résidus d'acide uronique étant particulièrement stables, les monosaccharides libérés par méthanolyse sont dosés par défaut ; c'est le cas des résidus de mannose et d'acide uronique. Il sera en conséquence nécessaire de réduire les résidus d'acides uroniques en leurs hexoses correspondants afin de pouvoir libérer quantitativement les monosaccharides engagés dans des liaisons avec les acides uroniques. Cet objectif pourra être obtenu en utilisant une deuxième technique fondée sur l'élimination spécifique de l'acide uronique (dégradation uronique).

D - MISE EN EVIDENCE DE GROUPEMENTS PYRUVYLS

La coupure des liaisons acétaliques des groupements pyruvyls aux monosaccharides est réalisée selon la technique de LEW et al. (76) utilisant l'acide sulfurique. Le principe actif, débarrassé de ces groupements, est méthylé selon HAKOMORI (77) méthanolysé et étudié en chromatographie en phase gazeuse. La perméthylation ne révèle aucun éther métylique nouveau, ce qui signifie que le principe actif ne renferme aucun groupement pyruvyl.

E - HETEROGENEITE DU PRINCIPE ACTIF

L'étude en ultracentrifugation a permis de déterminer l'hétérogénéité du principe actif et de connaître la masse moléculaire moyenne selon la technique de YPHANTIS (78) modifiée par CHERVENKA (79) et le coefficient de sédimentation selon SVEDBERG (80). La plaque photographique obtenue nous montre la présence de trois composés. La masse moléculaire moyenne est de 165 000 et la constante de sédimentation est de $1,6 \cdot 10^{-13}$ s.

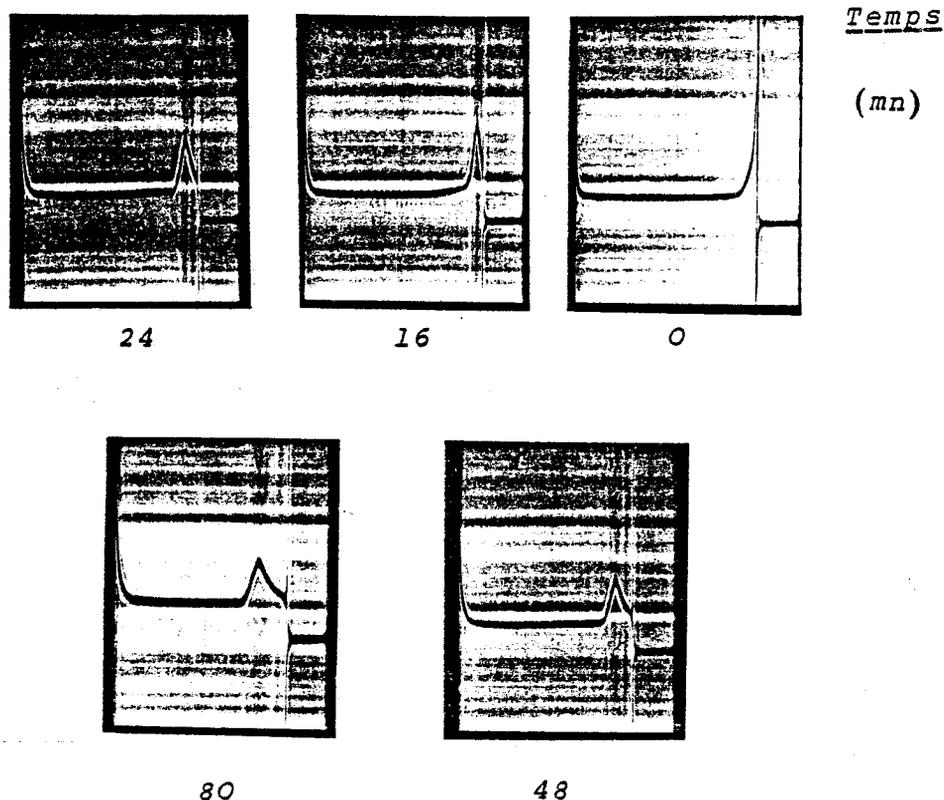


Figure 14 : Plaque photographique du principe actif obtenu après ultracentrifugation.

F - CONCLUSIONS

Le principe actif, hétérogène, de masse moléculaire moyenne 165 000, est constitué de 26,3% de protéines riches en acides aminés acides et de 60% de monosaccharides neutres (galactose, glucose, mannose) et acides (acide uronique). Un disaccharide a été identifié comme étant un acide aldo-biouronique (UA $\xrightarrow{1,3}$ Man).

Afin de connaître les différents constituants de ce principe actif pour essayer d'attribuer à chacun d'eux les propriétés biologiques (antibactérienne et immunostimulante), nous avons entrepris de le fractionner.

III - PURIFICATION DU PRINCIPE ACTIF

A - PRECIPITATION DU PRINCIPE ACTIF PAR LE CETAVLON (81)

La présence d'acide uronique (8,76%) dans le principe actif nous a conduit à utiliser son caractère polyanionique dans une précipitation sélective à l'aide d'ions ammonium quaternaire tels que le bromure du cétyl-triméthylammonium ou cetavlon (voir schéma de fractionnement figure 15 P. 66).

Cette technique fournit un précipité P1 contenant la totalité des acides uroniques et une fraction surnageante neutre appelée S1. Le protocole expérimental de précipitation au cetavlon est décrit dans l'appendice technique p.170.

. Le rendement moyen des fractionnements au cetavlon est de l'ordre de 70% réparti de la façon suivante : 33% de fraction précipitante et 36% de fraction surnageante.

La fraction précipitante P1, homogène en ultracentrifugation, est riche en oses neutres (69%) et contient la totalité des acides uroniques (18%) présents dans le principe actif (Tableau VIII P.67). Elle possède essentiellement deux monosaccharides neutres, le glucose et le mannose (Tableau IX P. 67 et figure 16 P. 68). En outre elle renferme 19% de protéines.

La fraction surnageante S1, hétérogène en ultracentrifugation est plus riche en protéines (25%) que le précipité (Tableau VIII P. 67). La fraction glucidique (58%) renferme principalement deux monosaccharides, le glucose et le galactose (Tableau IX P. 67 et figure 16 P. 68).

Principe actif dissous dans l'eau

Cetavlon 3%

Centrifugation

Surnageant

Précipité (complexe
cetavlon-principe actif)

- Précipitation par
6 volumes d'éthanol
- 1 nuit à + 4°C
- centrifugation

- dissolution dans NaCl 0,2M
- précipitation par
6 volumes d'éthanol
- 1 nuit à + 4°C
- centrifugation

Surnageant

Précipité

Surnageant

Précipité

- Dissolution
dans l'eau
- dialyse
- lyophilisation

- dissolution
dans l'eau
- dialyse
- lyophilisation

Surnageant S_1

Précipité P_1

Figure 15 : Schéma de fractionnement du principe actif selon la méthode de SCOTT (81) au cetavlon (bromure de cétyl-triméthyl-ammonium).



TABLEAU VIII

Composition centésimale en monosaccharides et en protéines du principe actif, de la fraction surnageante S_1 et de la fraction précipitante P_1 obtenues par fractionnement au cetavlon du principe actif.

	Oses neutres	Acides uroniques	Osamines	Protéines
Principe actif	50.18%	8.76%	1.17%	26.3%
Fraction surnageante S_1	57.8%	6.8	1.75	25%
Fraction précipitante P_1	69.24%	18.2	0.76	19

TABLEAU IX

Composition molaire* en monosaccharides neutres du principe actif, de la fraction surnageante S_1 et de la fraction précipitante P_1 .

	Galactose	Glucose	Mannose	Acide aldobiouronique
Principe actif	1.06	2	0.57	++
Fraction surnageante S_1	4.1	2	1.2	+
Fraction précipitante P_1	0.36	2	0.43	+++

* calculée sur la base de 2 résidus de glucose.



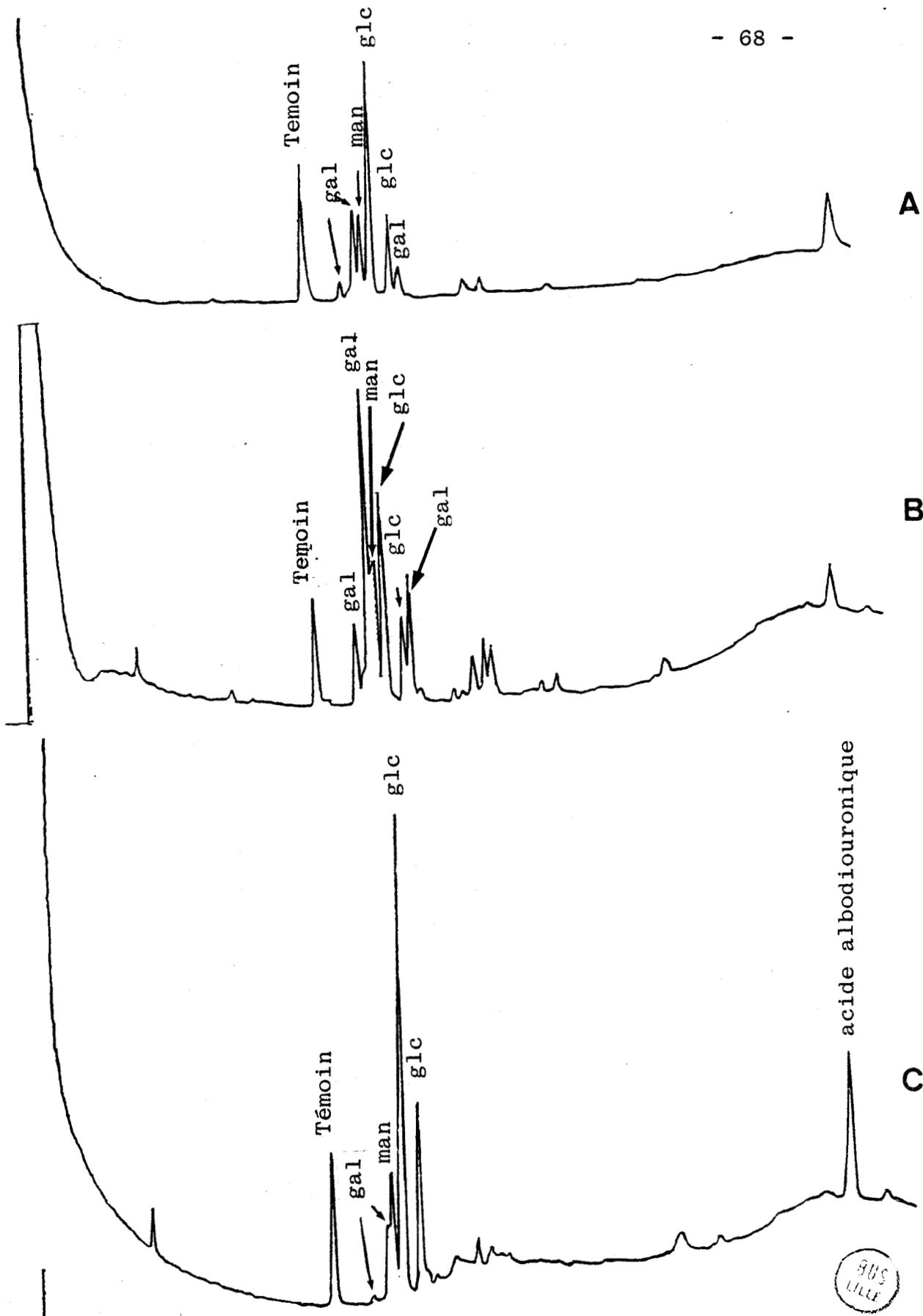


Figure 16 : Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides tri fluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du principe actif (A), de la fraction surnageante S_1 (B) et de la fraction précipitante au cetavlon (C) Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5 % sur varoport 30 "mesh" 80-100 ; température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C par minute ; sous un débit de gaz vecteur (azote) : 10 ml/mn.

Une étude en ultracentrifugation a été réalisée sur les deux fractions recueillies.

La fraction précipitante P1 s'est révélée être homogène, ayant une constante de sédimentation de $1,2 \cdot 10^{-13}$ s. et de masse moléculaire 95500, par contre la fraction surnageante S₁ est hétérogène.

Il a été nécessaire de la purifier à l'aide d'une technique chromatographique.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR ULTROGEL Aca34 DE LA FRACTION SURNAGEANTE

La chromatographie de gel filtration sépare des composés de masse moléculaire comprise entre 20 000 et 350 000.

Appliquée à la fraction surnageante S1, cette technique a permis de séparer deux fractions bien distinctes

FI et FII .

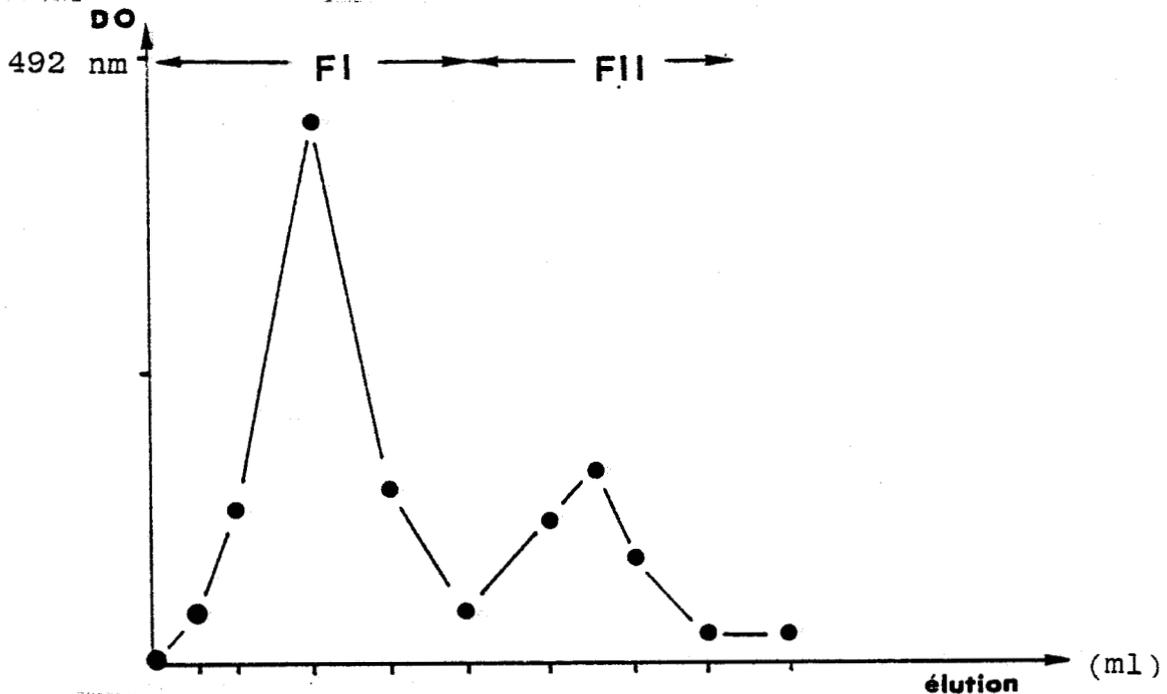


Figure 17 : Chromatographie sur Ultrogel Aca34 de la fraction surnageante S1.

La fraction FI, neutre, est dépourvue d'acides uroniques et d'acide aldobiouronique (UA $\xrightarrow{1,3}$ Man) par contre elle possède plus de résidus d'osamines, de protéines (voir

tableau X P.70) et la quasitotalité du galactose (tableau XI P. 70). La fraction FII riche en acide uronique et en mannose (tableau XI P. 70 et figure 18 P. 71) correspond à une souillure de la fraction surnageante par du précipité P1 .

TABLEAU X

Composition centésimale en glucides et en protéines de la fraction surnageante S1 et des constituants F1 et FII de la chromatographie sur Ultrogel AcA34.

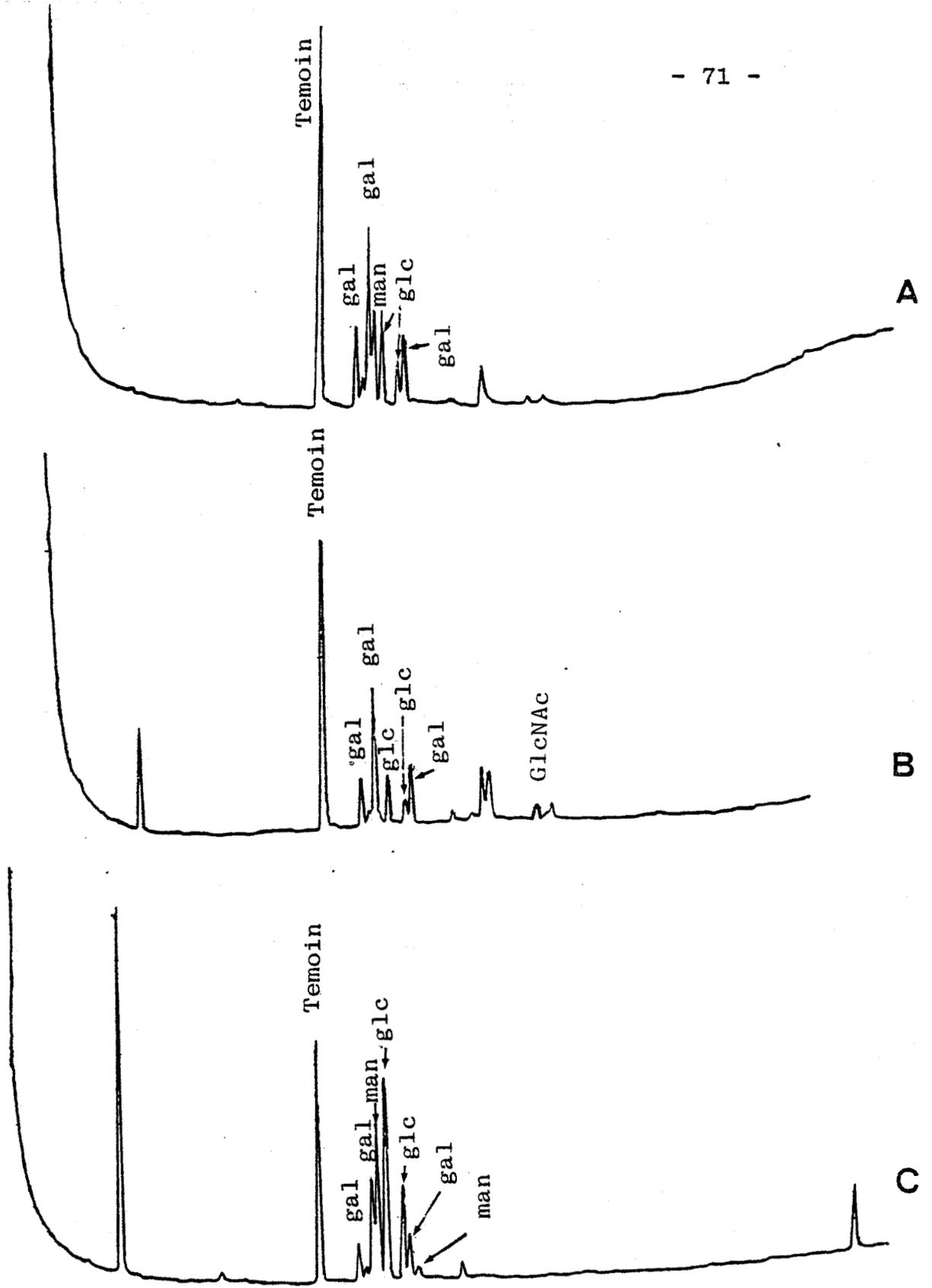
	Oses neutres %	Acides uroniques %	Osamines %	Protéines %
Fraction surnageante	57	6.8	1.8	26
Fraction FI	35.3	—	3.5	39.4
Fraction FII	57	+	0.86	13

TABLEAU XI

Composition molaire* en monosaccharides neutres de la fraction surnageante S1 et des fractions FI et FII.

	Galactose	Mannose	Glucose	Osamines	Acide al- dobiouro- nique
Fraction surnageante S1	1.38	0.49	1	-	+
Fraction FI	3.2	-	1	0.21	-
Fraction FII	0.61	0.51	1	-	++

*calculée sur la base de 1 résidu de glucose.



RIIS
LILLE

Figure 18 : Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation de la fraction surnageante (A) de la fraction F_I (B) et de la fraction F_{11} (C).
Colonne de verre (0.3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5 % sur Varaport 30 "mesh" 80-100 ; température programmée de 110 à 220°C à raison de 2°C/mn, sous un débit de gaz vecteur (azote) 10 ml/mn.

Le rendement de la chromatographie est de l'ordre de 80% réparties comme suit :

F I : 50% - FII 30%.

En ultracentrifugation la fraction FI montre un seul pic symétrique, de constante de sédimentation $17,5 \cdot 10^{-13}$ s. La masse moléculaire déterminée dans un milieu dissociant, est de 410.000.

C - CONCLUSION

Par deux méthodes de purification (l'une au cetavlon, l'autre après tamisage moléculaire), nous avons réussi à isoler deux fractions homogènes P_1 et FI à partir du principe actif total.

La fraction P_1 , obtenue par précipitation du complexe polyanionique du cetavlon, s'est révélée être riche en acides uroniques et en glucose. La fraction précipitante possède des monosaccharides neutres (69%), acides (18%) et des protéines (19%).

La fraction FI, isolée après chromatographie sur Ultrogel AcA34 de la fraction surnageante S_1 , renferme 35% d'oses neutres, 3,5% d'osamines, et 39% de protéines.

Ces deux constituants majeurs du principe actif seront étudiés d'un point de vue biochimique et les activités biologiques seront effectuées en parallèle sur le principe actif, le précipité P_1 et la fraction FI provenant du surnageant S_1 .

IV - ETUDE DE LA FRACTION PRECIPITANTE AU CETAVLON P1

A - ETUDE DE LA COPULE PROTEIQUE

1 - Dosage des acides aminés et des protéines totales.

Après étude à l'autoanalyseur, la fraction précipitante P1 renferme 15% d'acides aminés, riche en acides aminés acides (acide aspartique, acide glutamique) et est dépourvue de cystéine.

Le dosage colorimétrique selon LOWRY (67) révèle la présence de 19% de protéines totales.

TABLEAU XII

Composition en acides aminés de la fraction précipitante P1, calculée par rapport à 1 résidu d'alanine.

Asp	1.59	Gly	0,83	Leu	0.52
Thr	0.26	Ala*	1	Tyr	0.35
Ser	0.40	Val	0.28	Phe	0.04
Glu	0.69	Met	0.12	Lys	0.36
Pro	0.15	Ileu	0.15	Hist	0.13
				Arg	0.19

2 - Identification de l'acide aminé N-terminal.

La technique de dansylation de GROS et al.(82) modifiée par PERCY et al.(83) a fourni comme acide aminé N-terminal, l'acide aspartique.

3 - Identification de l'acide aminé C-terminal.

L'acide aminé C-terminal a été identifié après hydrolyse par la carboxypeptidase B. L'analyse à l'autoanalyseur révèle la présence de 3 acides aminés (lysine, arginine, tyrosine). L'hydrolyse enzymatique, étant très rapide, ne permet pas d'identifier l'acide aminé C-terminal.

Nous pouvons admettre l'existence d'une chaîne protéique monocaténaire après identification de l'acide aminé N-terminal (acide aspartique).

B - ETUDE DE LA COPULE GLUCIDIQUE

1 - Composition centésimale et molaire en monosaccharides.

Le fractionnement au cetavlon a permis d'isoler une fraction enrichie en glucose (Figure 19 P.76) et en acides uroniques par la présence du pic acide aldobiouronique (Tableaux XIII et XIV)P.74), ce qui est logique puisque les sels de cétyltriméthylammonium précipitent sélectivement les polyanions.

TABLEAU XIII

Composition molaire en monosaccharides du principe actif et de la fraction précipitante au cetavlon.*

	Galactose	Mannose	Glucose	acide aldobiouronique
Principe actif	1.06	0.57	2	++
Fraction précipitante	0.36	0.43	2	+++

*calculée sur la base de 2 résidus de glucose.

TABLEAU XIV

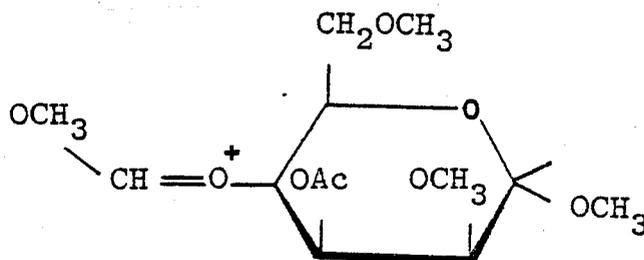
Composition centésimale en monosaccharides et en protéines du principe actif et de la fraction précipitante.

	Oses neutres	Acides uroniques	Osamines	Protéines
Principe actif	50.18	8.76	1.17	26.3
Fraction précipitante	69.2	18.2	0.76	19

2 - Identification des résidus d'acide uronique.

La présence d'acide uronique a été mise en évidence par le dosage colorimétrique selon DISCHE (71) et en chromatographie en phase gazeuse d'une part après méthanolyse et trifluoroacétylation, identifié par la présence d'acide aldobionurique (Figure 19 P.76) et d'autre part après méthylation (77) et méthanolyse et couplage au spectromètre de masse (Figure 20 P.77).

La fraction P1 perméthylée et méthanolysée a été acétylée puis étudiée sur colonne de Dexil 1% qui permet d'identifier des oligosaccharides. L'analyse des spectres de masse permet de conclure à la présence d'un disaccharide (AU → hexose). Le pic de masse m/e 233 correspond à un résidu d'acide uronique en position terminale non réductrice. Le pic de masse m/e 247 représente un hexose méthylé et acétylé en position terminale réductrice. Nous pouvons remarquer le pic de masse m/e 307 (247+60) qui constitue l'ion baJ1 :



m/e 307

La position de l'acide uronique sur le mannose ne peut-être résolue par cette technique. Cette ambiguïté est levée par l'étude de structure du disaccharide isolé à partir du principe actif total (voir page 61).

L'identification de l'acide aldobionurique indique que la liaison acide uronique → mannose est très faiblement coupée. Le mannose est en conséquence dosé par défaut. Le dosage quantitatif de cet hexose pourra être réalisé après réduction ou élimination des résidus uronosidyles.

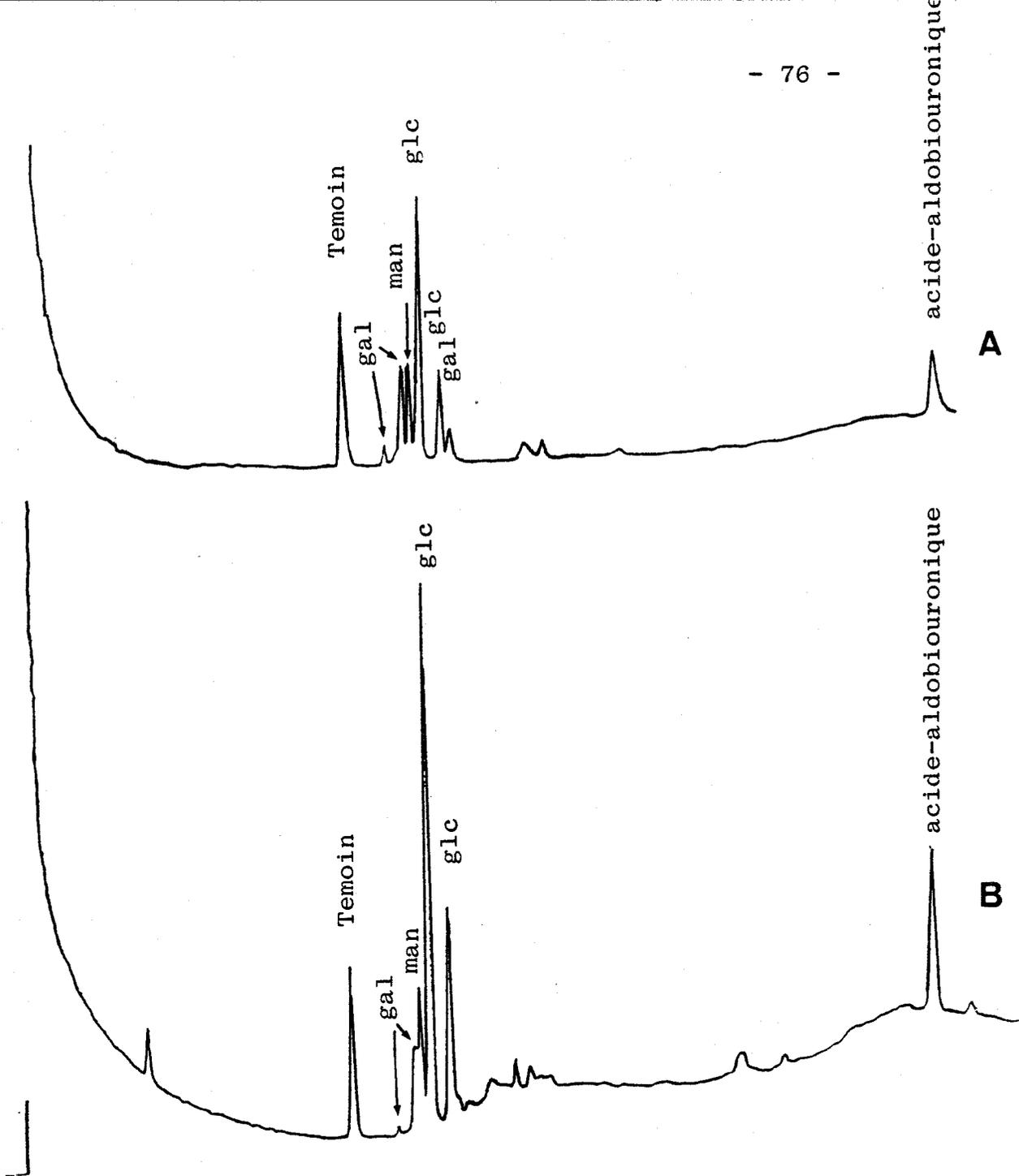


Figure 19 : Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du principe actif (A) et de la fraction précipitante P₁ (B)

Colonne de verre (0.3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5 % sur varaport 30 "mesh" 80-100, température programmée de 100°C à 220°C à raison de 2°C/mn, sous un débit de gaz vecteur (azote):10ml/mn.

BIS
LILLE

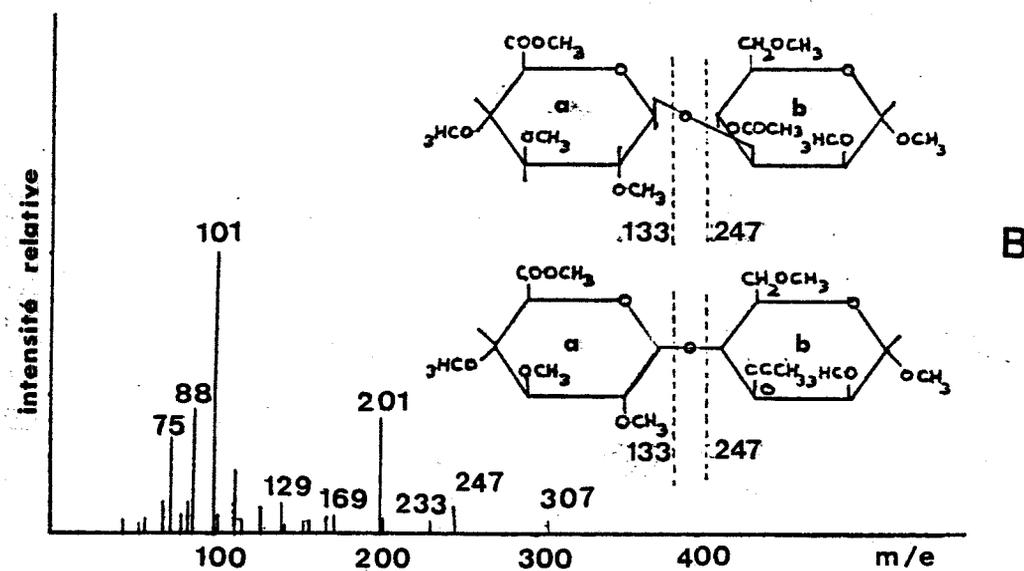
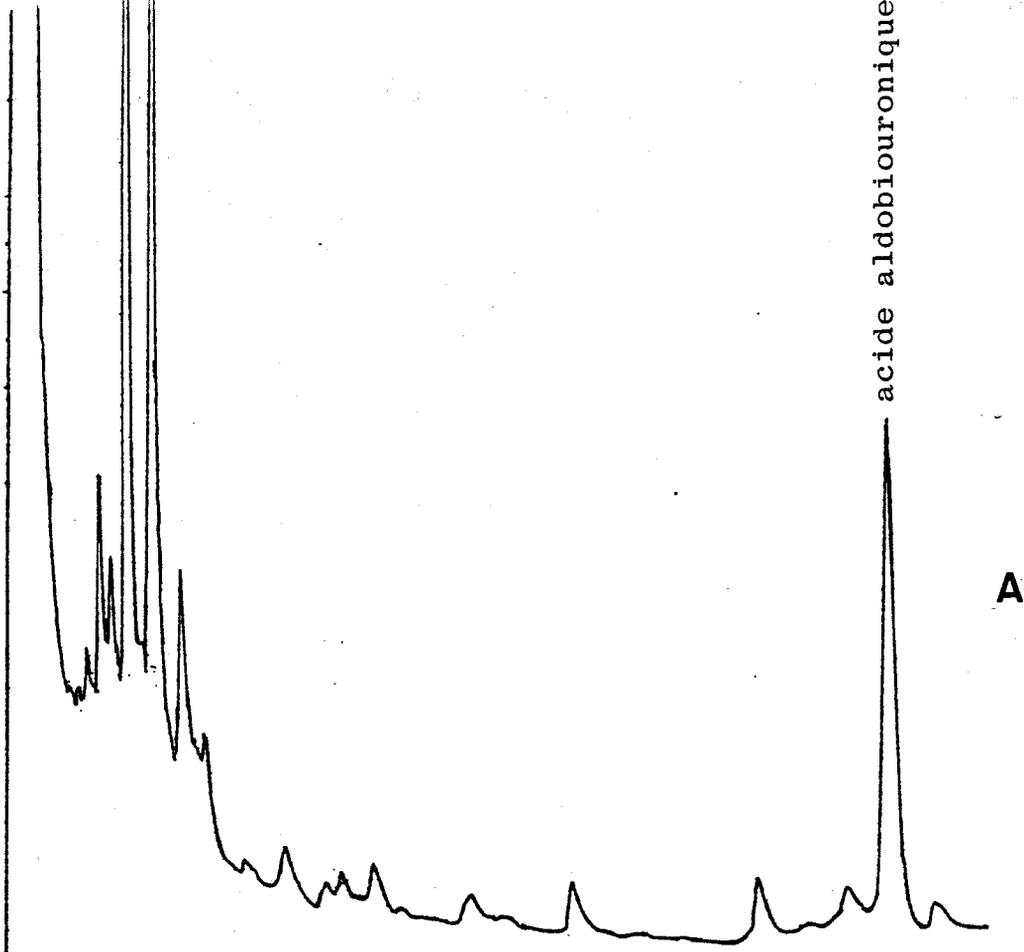


Figure 20 : Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques libérés par méthanolyse de la fraction P₁ et analysés après acétylation sur colonne de Dexil 300 à 1 % sur supelcoport "mesh" 100-120 , à la température programmée de 100 à 200°C à raison de 2°C/mn sous un débit de gaz vecteur (azote) de 20 ml/mn (A), couplée au spectromètre de masse Riber-Mag 10-10 (énergie d'ionisation 70 eV) (B)



3 - Positionnement des résidus d'acides uroniques dans la chaîne glucidique.

a - réduction des acides uroniques selon la technique de TAYLOR et CONRAD (84).

Le dérivé N-cyclohexyl-N'-(β-(N-méthyl-morpholino) - éthyl) - carbodiimide-p-toluène sulfonate (CMC) se condense à la fonction carboxylique de l'acide uronique pour donner le dérivé A. En milieu acide, ce dérivé se transforme en un chlorure d'acide (B) qui se réarrange en une lactone (C) ou ester intramoléculaire qui est ensuite réduit en un sucre neutre (D).

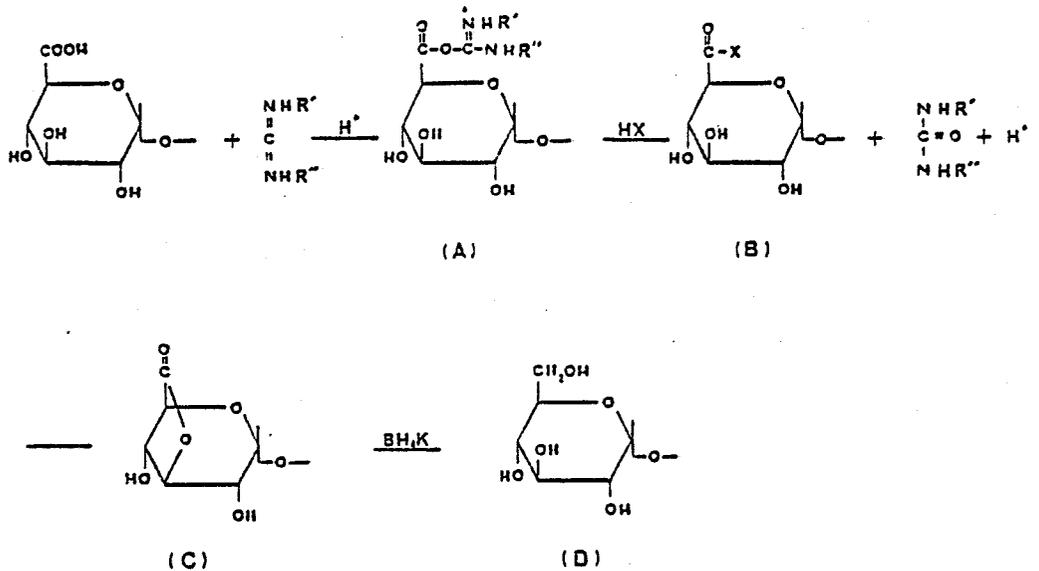


Figure 21 : Mécanisme de la réduction au carbodiimide selon TAYLOR et CONRAD (84) .

La figure 22 P.80 illustre le résultat obtenu après méthanolyse et trifluoroacétylation de la fraction précipitante réduite. Nous constatons :

* la disparition du pic correspondant à l'acide aldobionurique,

* une augmentation du glucose indiquant que l'acide uronique est de l'acide glucuronique,

* une augmentation de mannose pouvant conclure à une conjugaison acide uronique → mannose (Tableau XV P. 81).

Ces résultats permettent de déterminer les rapports molaires des monosaccharides neutres et acides présents. Sur la base des déterminations centésimales et molaires des monosaccharides ainsi que de la détermination de la masse moléculaire de 95500 déterminée par ultracentrifugation, nous pouvons admettre que la fraction précipitante au cetavlon est composée de galactose (26 résidus), glucose (246 résidus), mannose (115 résidus) et acide glucuronique (90 résidus).

b - dégradation uronique

Les résidus uronosidyles sont éliminés selon la technique de LINDBERG et al.(85). La fraction précipitante au cetavlon est peracétylée. La β élimination est réalisée en présence d'anhydride acétique et de triéthylamine (dérivé B). L'acide uronique modifié est éliminé sélectivement après hydrolyse par l'acide acétique. Après désacétylation en milieu alcalin, nous recueillons une fraction dépourvue de résidus d'acides uroniques (R_1OH).

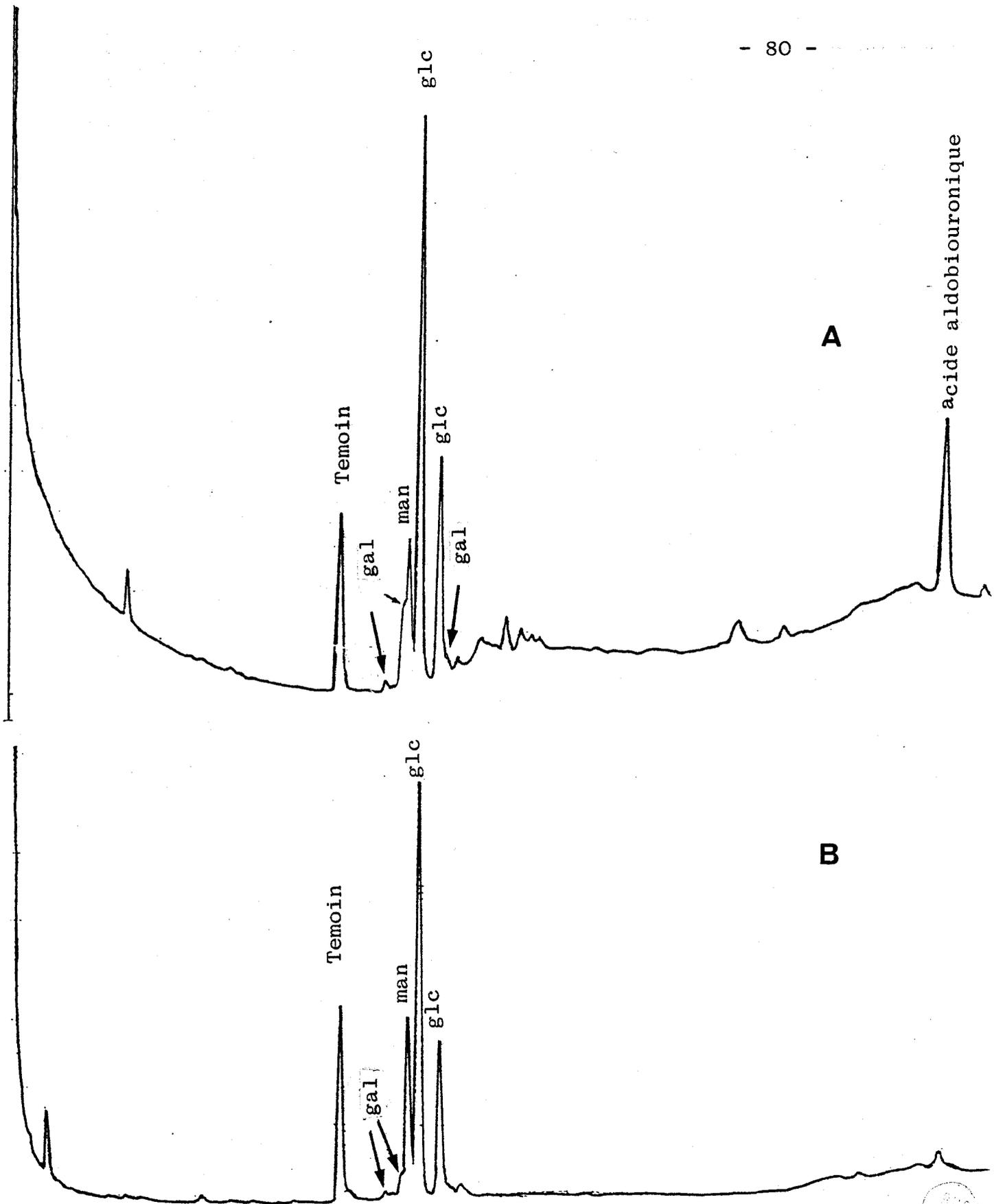


Figure 22 : Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du précipité P_1 natif (A) et du précipité P_1 réduit (B). Colonne de verre (0.3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5 % sur varoport 30 "mesh" 80-100 ; température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C/mn sous un débit de gaz vecteur (azote) : 10 ml/mn.

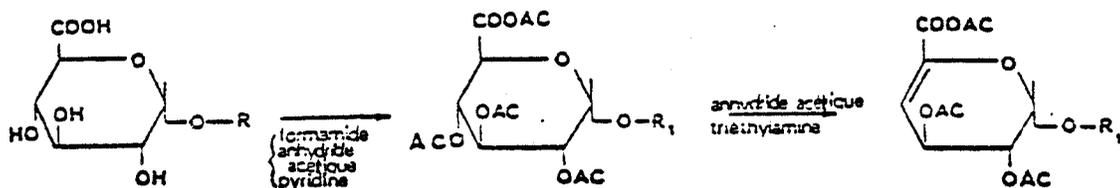
TABLEAU XV

Nombre de résidus de chacun des monosaccharides présents dans la fraction précipitante au cetavlon P₁.

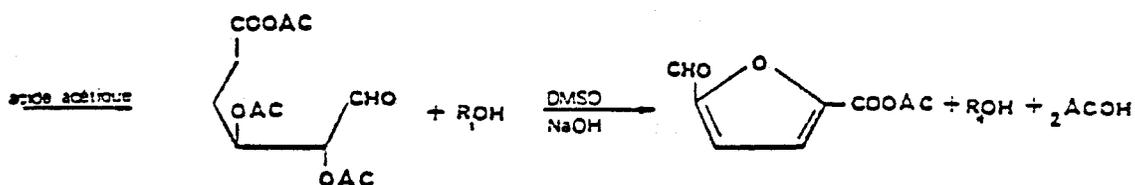
	P ₁ natif		Nombre de résidus réels			
	Osés neutres	Acides uroniques (GLCUA)	Galactose	Mannose	Glucose	Acide glucuronique
Composition centésimale	69.1%	18.2%				
Rapports molaires*	90 %		0.35	0.43	2	1
Nombre de résidus calculés sur la base d'une MM de 95 500			0.23	1.01	2	
			<u>26</u>	<u>115</u>	<u>246</u>	<u>90</u>

* calculés sur la base de 2 résidus de glucose.





(B)



R : composé non acétylé

R₁ : composé acétylé

Figure 23 : Mécanisme d'action de la dégradation uronique (85).

Après méthanolyse, trifluoroacétylation et analyse en chromatographie en phase gazeuse (Figure 24 P. 83) , nous constatons :

- * la disparition de l'acide aldobiouronique
- * une augmentation du mannose prouvant que les résidus d'acides uroniques sont liés sur les résidus de mannose.

Les résultats des rapports molaires en monosaccharides concordent tout à fait avec ceux obtenus après réduction de l'acide uronique à savoir un résidu de mannose pour deux résidus de glucose.

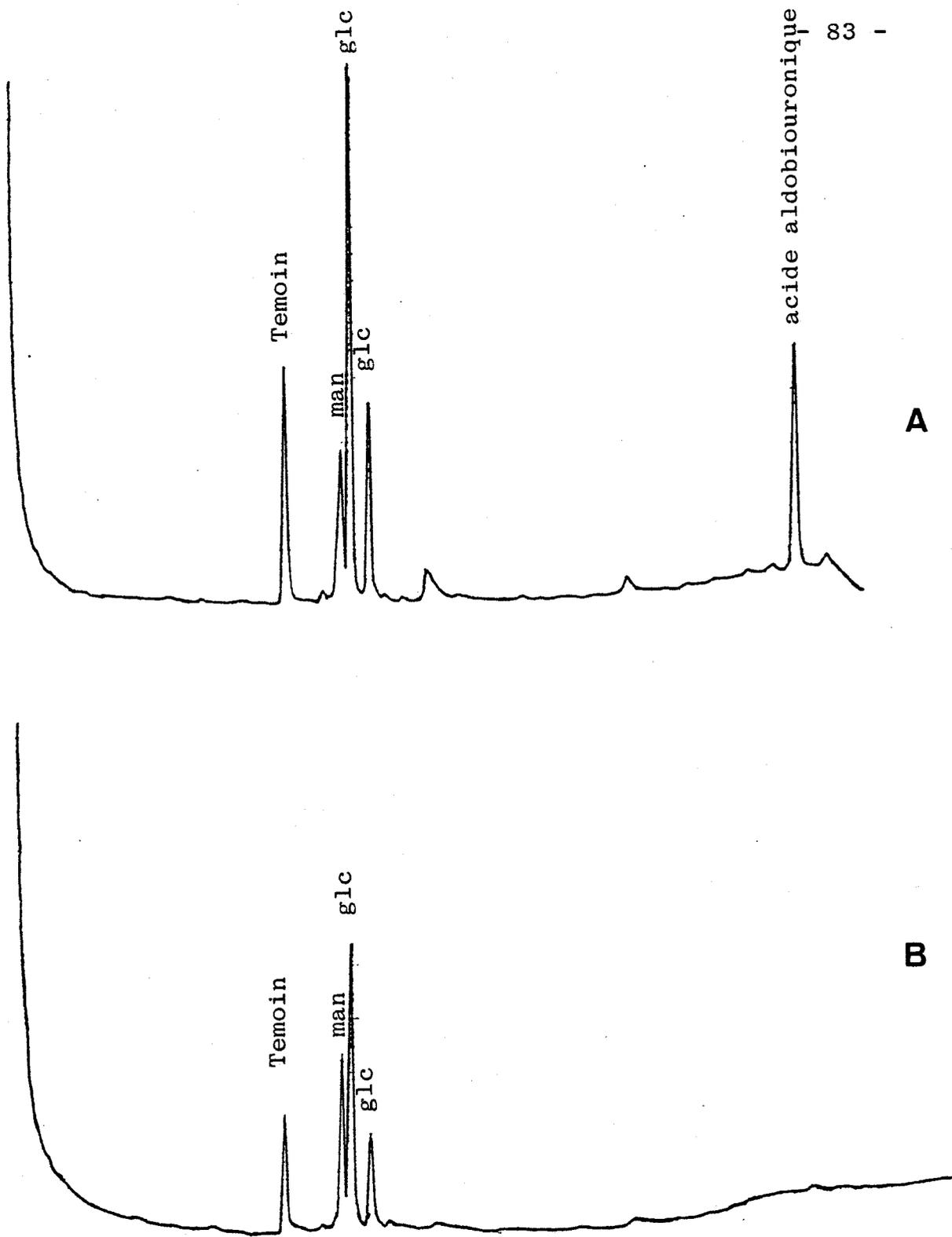


Figure 24 : Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du précipité P_1 natif (A) et du précipité P_1 ayant subi une dégradation uronique (B).

(colonne de verre (0.3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5 % sur varoport 30 "mesh" 80-100 ; température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C/mn ; sous un débit de gaz vecteur (azote) : 10 ml/mn.

TABLEAU XVI

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

	Galactose	Mannose	Glucose	Acide aldobiouronique
Précipité natif	0,26	0,50	2	+++
Précipité dégradé	0,22	1,04	2	-

*calculée sur la base de 2 résidus de glucose.

c - nature des points d'attache des liaisons glycosidiques après perméthylation

**Les éthers méthyliques obtenus après perméthylation (77) et méthanolyse de la fraction précipitante native, réduite et dégradée ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire carbowax 20 M, (Figures 25 et 26 P.86 et 87).

Nous pouvons identifier :

1 - Dans la fraction précipitante native :

- 2,3,6-tri-O-méthyl-glucose
- 2,4,6-tri-O-méthyl-glucose
- 2,4,6-tri-O-méthyl-galactose
- 2,6-di-O-méthyl-mannose.

Le diméthyl mannose est dosé par défaut du fait de la liaison acide uronique-mannose (Tableau XVII P. 88)

2 - Dans la fraction précipitante réduite :

- 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-glucose
- 2,3,6-tri-O-méthyl-glucose
- 2,4,6-tri-O-méthyl-glucose
- 2,4,6-tri-O-méthyl-galactose
- 2,6-di-O-méthyl-mannose

Nous constatons :

* l'apparition de tétra-O-méthyl-glucose, ce qui signifie que les résidus d'acide uronique sont de l'acide glucuronique et qu'ils sont situés en position terminale non réductrice

* une augmentation des résidus de mannose (Tableau XVII P.88) prouvant la liaison acide uronique → mannose.

3 - Dans la fraction précipitante dégradée :

2,3,6-tri-O-méthyl-glucose

2,4,6-tri-O-méthyl-glucose

2,3,6-tri-O-méthyl-mannose

2,6-di-O-méthyl-mannose

La présence du 2,6-di-O-méthyl-mannose prouve que la dégradation uronique n'a pas été totale. Par contre, l'apparition du 2,3,6-tri-O-méthyl-mannose signifie que l'acide glucuronique était lié sur le carbone 3 du mannose avant l'élimination de l'acide glucuronique.

** Après acétylation des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse de la fraction précipitante P₁ perméthylée , nous avons identifié par couplage GLC-MS un dissaccharide (voir figure 20 P. 77).

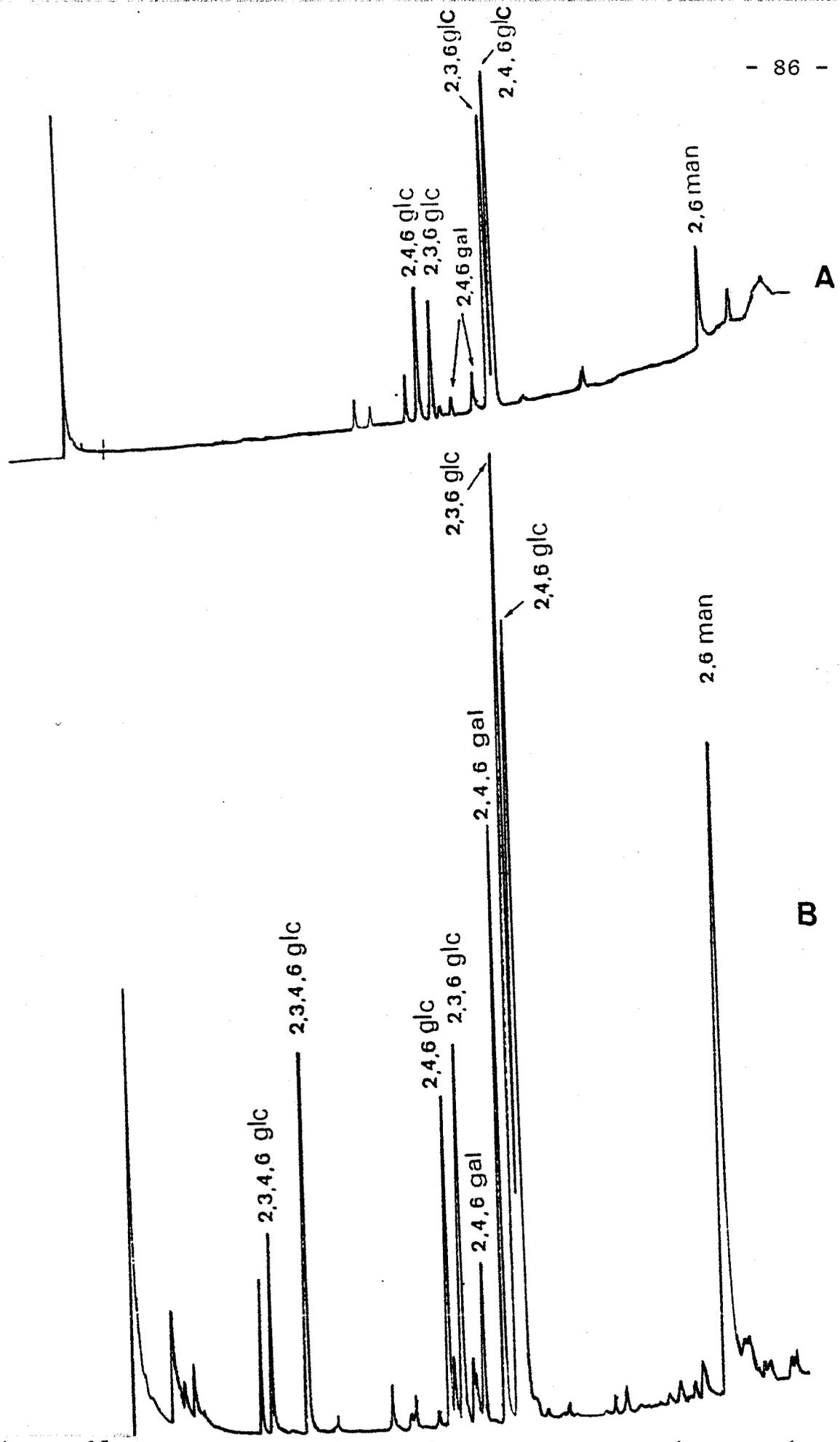


Figure 25 : Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques du précipité P₁ natif et perméthylé (A) et du P₁ réduit et perméthylé (B) obtenus par méthanolyse. (Colonne de verre (capillaire) de Carbowax 20M (60 m x 0.4 mm) ; température programmée de 150°C à 225°C à raison de 2°C/mn. gaz vecteur (azote) : 0.4 bar.

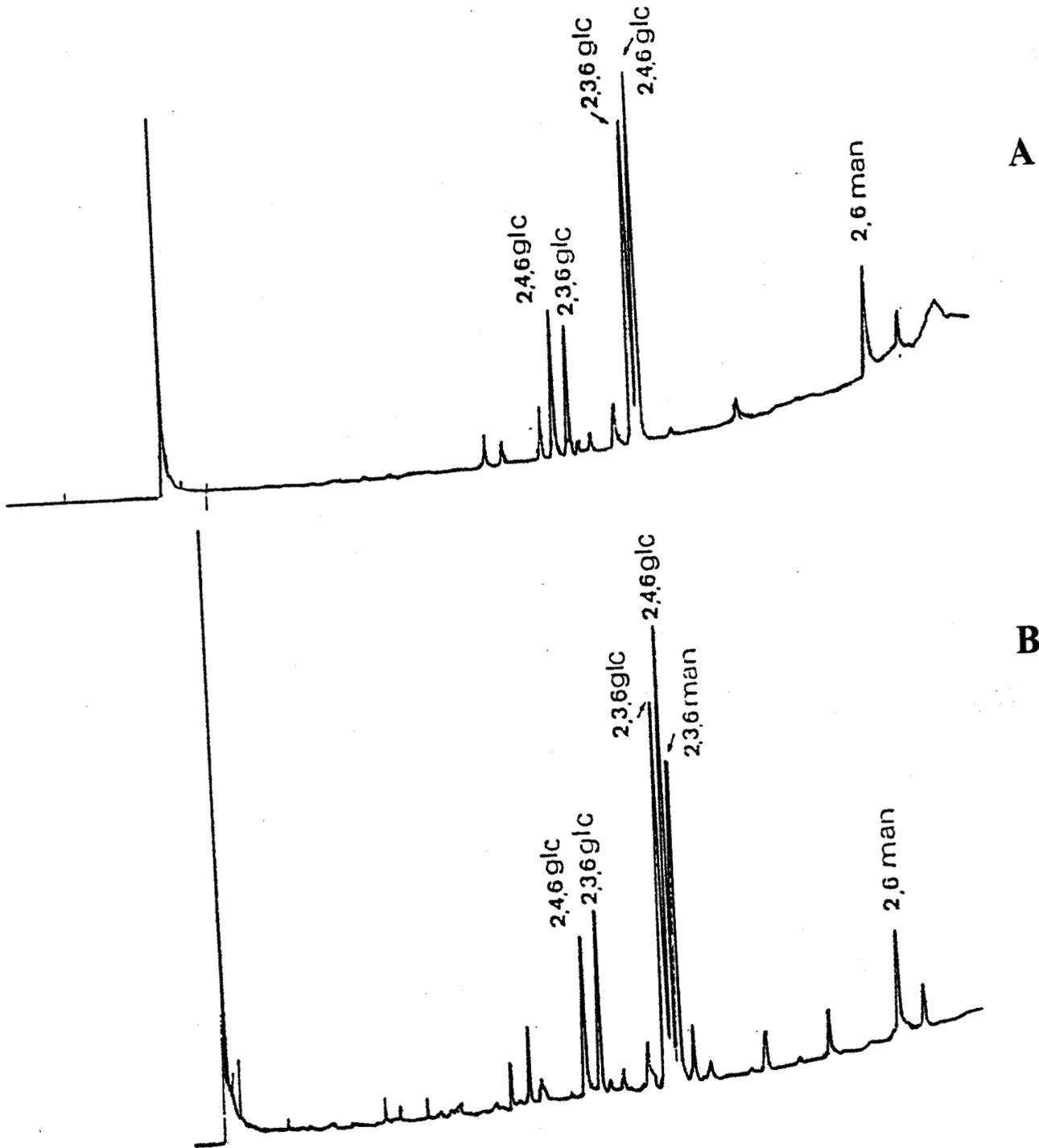


Figure 26 : Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques du précipité P_1 natif (A) et du P_1 modifié après dégradation uronique (B) obtenus par méthanolyse de ces deux fractions perméthylées. (Colonne de verre (capillaire) de Carbowax 20M (60 m x 0.4 mm) ; température programmée de 150°C à 225°C à raison de 2°C/mn ; gaz vecteur (azote) : 0.4 bar.

TABLEAU XVII

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

Ethers méthyliques						
	2,3,4,6-tétra-O-méthyl-glucose	2,3,6-tri-O-méthyl-glucose	2,4,6-tri-O-méthyl-glucose	2,4,6-tri-O-méthyl-galactose	2,3,6-tri-O-méthyl-mannose	2,6-di-O-méthyl-mannose
Fraction P ₁		0,9	1	0,13		0,23
Fraction P ₁ réduite	0,32	1,03 (1)	1	0,49		0,78 (1)
Fraction P ₁ ayant subi dégradation uronique		0,94 (1)	1	0,11	0,52 (1)	0,2

* calculés sur la base de 1 résidu de 2,4,6-tri-O-méthyl-glucose.



5 - Enchaînement des monosaccharides après oxydation periodique.

La glycoprotéine a été oxydée par l'acide periodique à l'aide de la technique de GOLDSTEIN et al. (86) (appendice technique page 174).

En présence de periodate de sodium, tous les groupements α glycols (B) sont rompus. Les fonctions aldéhydiques formées sont réduites par du borohydrure de potassium (C). L'oligosaccharide (D) résistant à l'oxydation est libéré après hydrolyse par l'acide sulfurique (Figure 27 P. 91).

La fraction oligosaccharidique résistante à l'oxydation renferme un résidu de glucose et un résidu de mannose.

TABLEAU XVIII

Composition molaire en monosaccharides de la fraction précipitante native et oxydée.*

	Galactose	Mannose	Glucose	Acide aldobio-urique
Fraction native	1.5	1	4.2	+++
Fraction oxydée	0.2	1	1	—

**calculée sur la base de 1 résidu de mannose.*

D'autre part, la chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides libérés par méthanolyse (Figure 28 P.92) permet d'identifier un pic d'erythritol et un composé qui, dans le spectre de masse de l'oligosaccharide (voir ci-après) donne des pics de masse caractéristiques d'un 3,6-

dideoxy-hexose. Enfin le pic d'acide aldobiouronique a totalement disparu.

Après perméthylation (77), la fraction oligosaccharidique fournit par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de Dexil à 1% deux pics qui ont été analysés par couplage GLC-MS (Figure 29 P.93)..

Le composé I a été identifié à la séquence :
Glc $\xrightarrow{1,4}$ Man $\xrightarrow{1,3}$ érythritol à l'aide des pics de masse m/e 219, 187, 155 (série aA), m/e 351, 319, 287 (série bc), les ions de masse m/e 147, 115 correspondant au résidu d'érythritol en position terminale et les ions de la série J : l'ion cba J1 de masse m/e 411 et l'ion cb J1 de masse m/e 207 indiquant que le carbone 3 des deux résidus d'hexoses sont libres (Figure 30 P. 94).

La séquence glucose \rightarrow mannose \rightarrow érythritol ainsi que le point d'attache Glc $\xrightarrow{1,4}$ Man sont déterminés par méthanolyse de l'oligosaccharide perméthylé et identification du perméthyl-glucose et du 2,3,6-tri-O-méthyl-mannose.

Le composé II a été identifié à la séquence :
Glc $\xrightarrow{1,4}$ Man $\xrightarrow{1,4}$ 3,6 dideoxy-hexose à l'aide des pics de masse m/e 219, 187, 155 (série aA), m/e 379, 347, 315 (série bc), de l'ion de masse m/e 175 correspondant au résidu de 3,6-dideoxy-hexose en position terminale et des ions de la série J : ion cba J1 de masse m/e 439 et l'ion cbJ1 de masse m/e 235 (Figure 31 P. 95).

La séquence Glc \rightarrow Man \rightarrow 3,6 dideoxy-hexose ainsi que le point d'attache Glc $\xrightarrow{1,4}$ Man est déterminé par analyse des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse de la fraction oligosaccharidique perméthylée : 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-glucose et 2,3,6-tri-O-méthyl-mannose.

La fraction oligosaccharidique résistant à l'oxydation periodique est constituée de deux composés. Le premier oligosaccharide est le produit logique de l'oxydation (Glc $\xrightarrow{1,4}$ Man $\xrightarrow{1,3}$ Erythritol), par contre nous ne pouvons actuellement expliquer la présence du deuxième oligosaccharide en particulier, le 3,6-dideoxy-hexose.

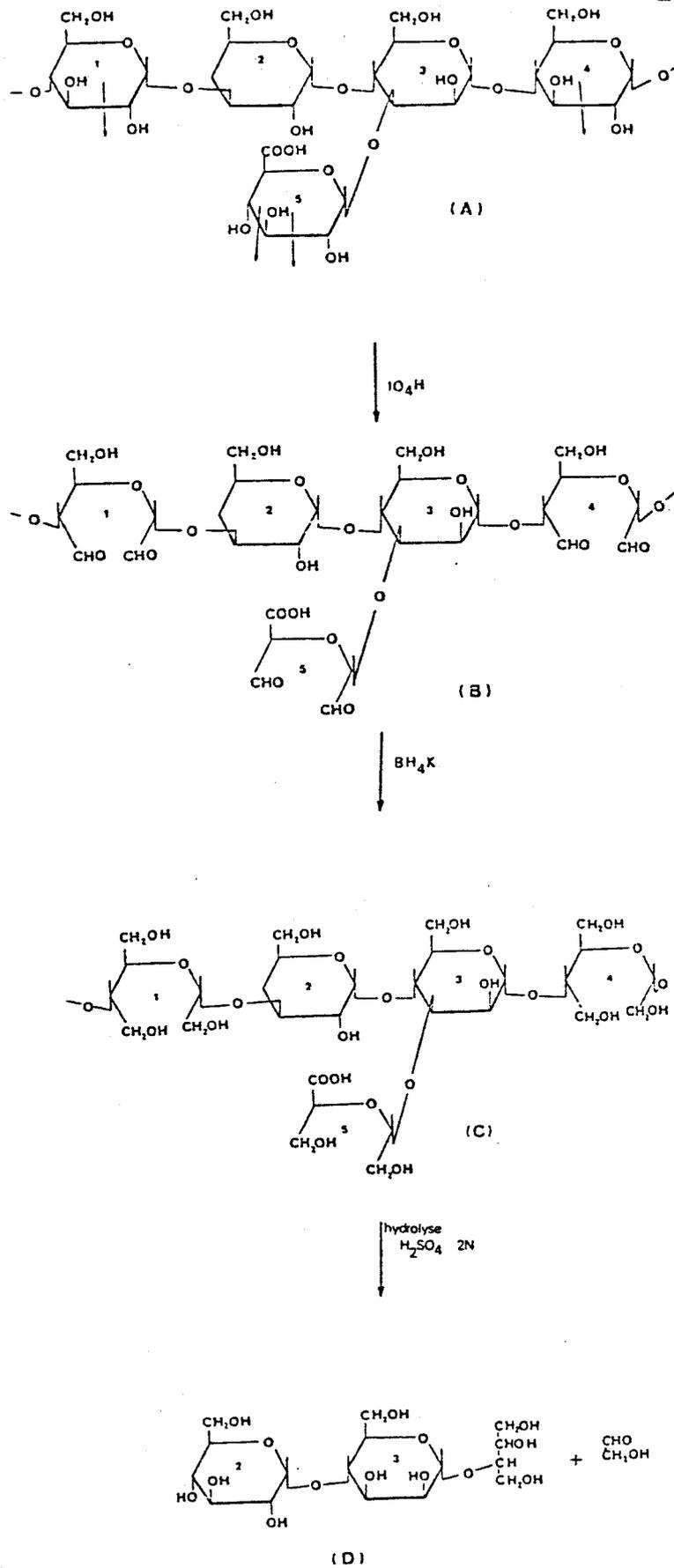


Figure 27 : Mécanisme de l'oxydation periodique, appliquée à la fraction P_1



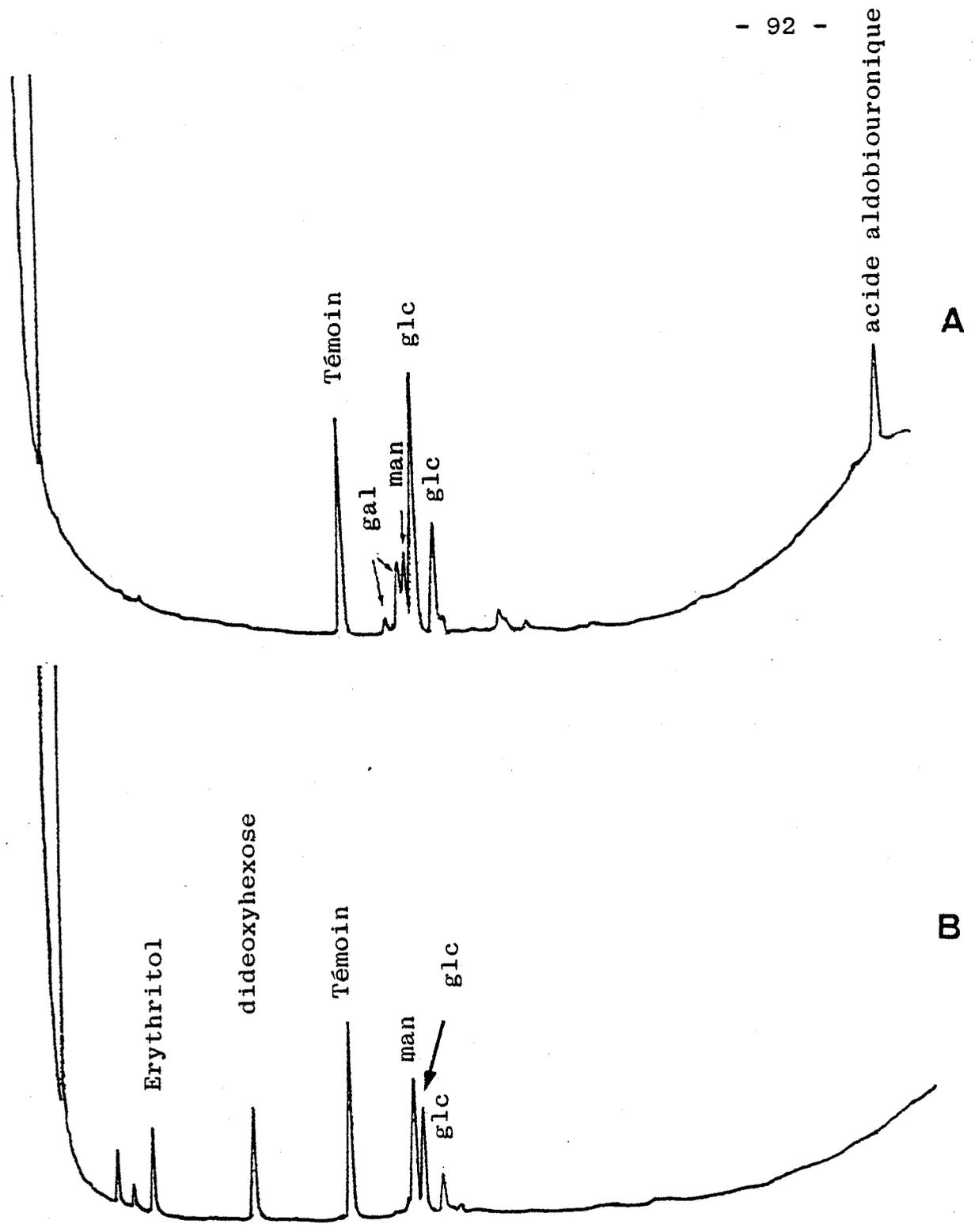
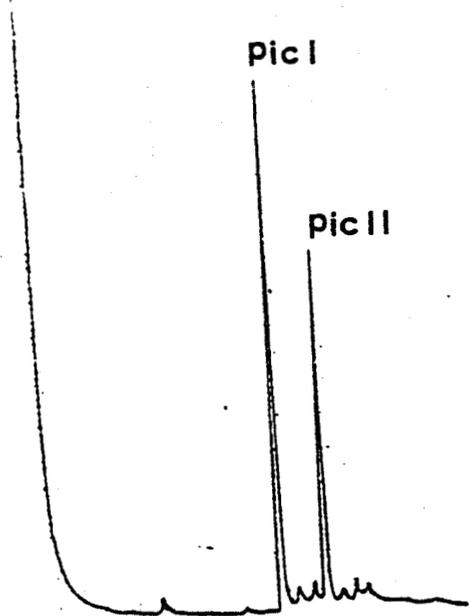
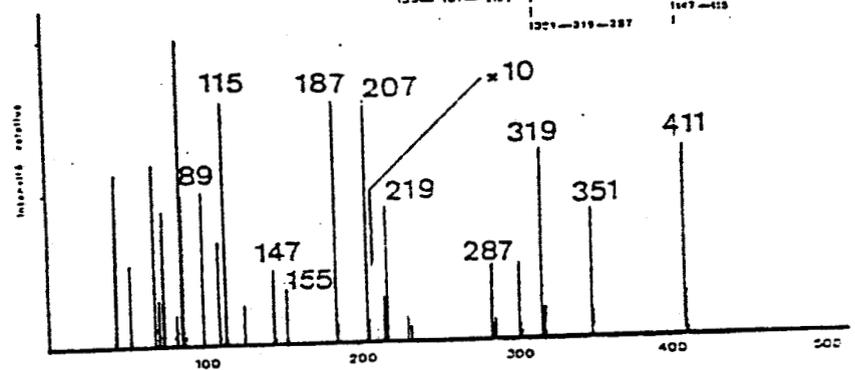
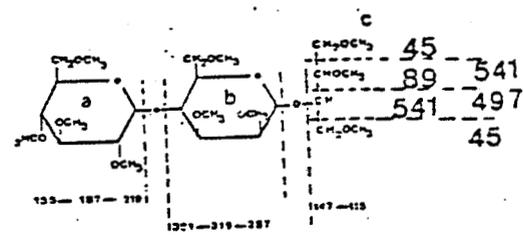


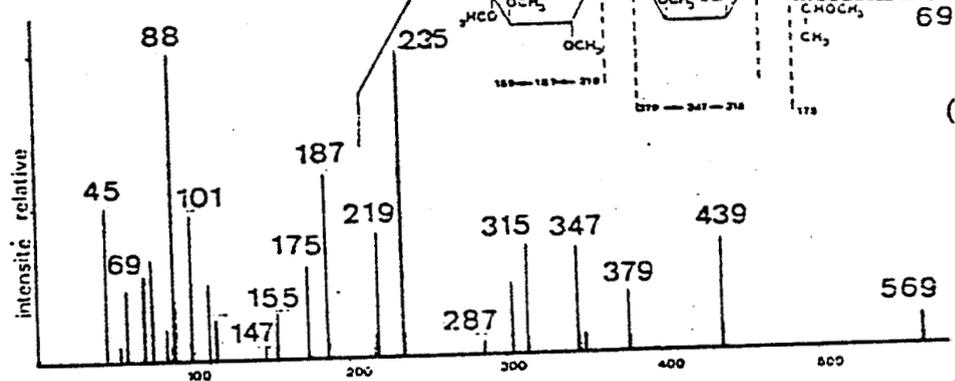
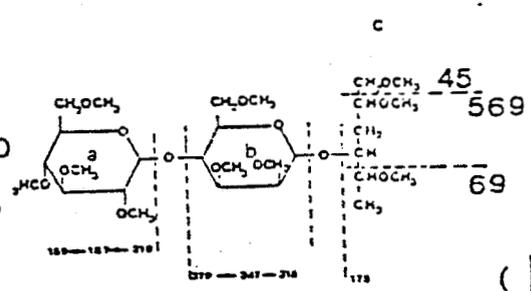
Figure 28 : Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du précipité P₁ natif (A) et du précipité P₁ ayant subi une oxydation periodique (B). (Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5 % sur varaport 30 "mesh" 80-100 ; température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C/mn. sous un débit de gaz vecteur (azote) : 10 ml/mn.



A

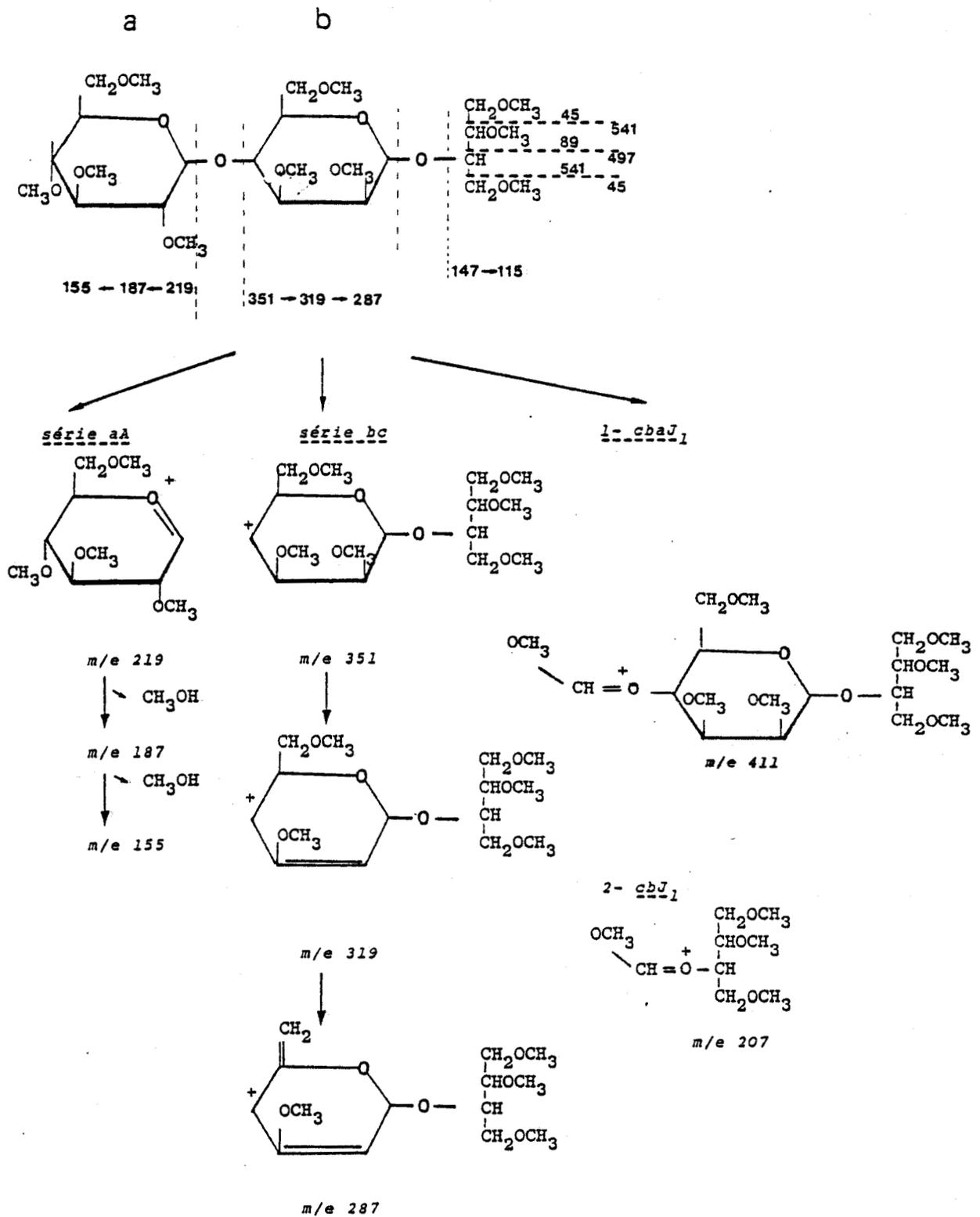


(B₁)



(B₂)

Figure 29 :Chromatographie en phase gazeuse de la fraction précipitant oxydée et perméthylée (A) (sur colonne (0,3 x 200 cm) de 1 % Dexil 300 sur supelcoport "mesh" 100-200, à la température programmée de 150°C à 300°C, 6°C/mn, sous un débit de gaz vecteur (azote) de 20 ml/mn. Analyse par couplage GLC-MS du pic I (B₁) et du pic II (B₂)



BHS
LILLE

Figure 30 : Ions caractéristiques du composé I provenant de l'oligosaccharide résistant à l'oxydation periodique .

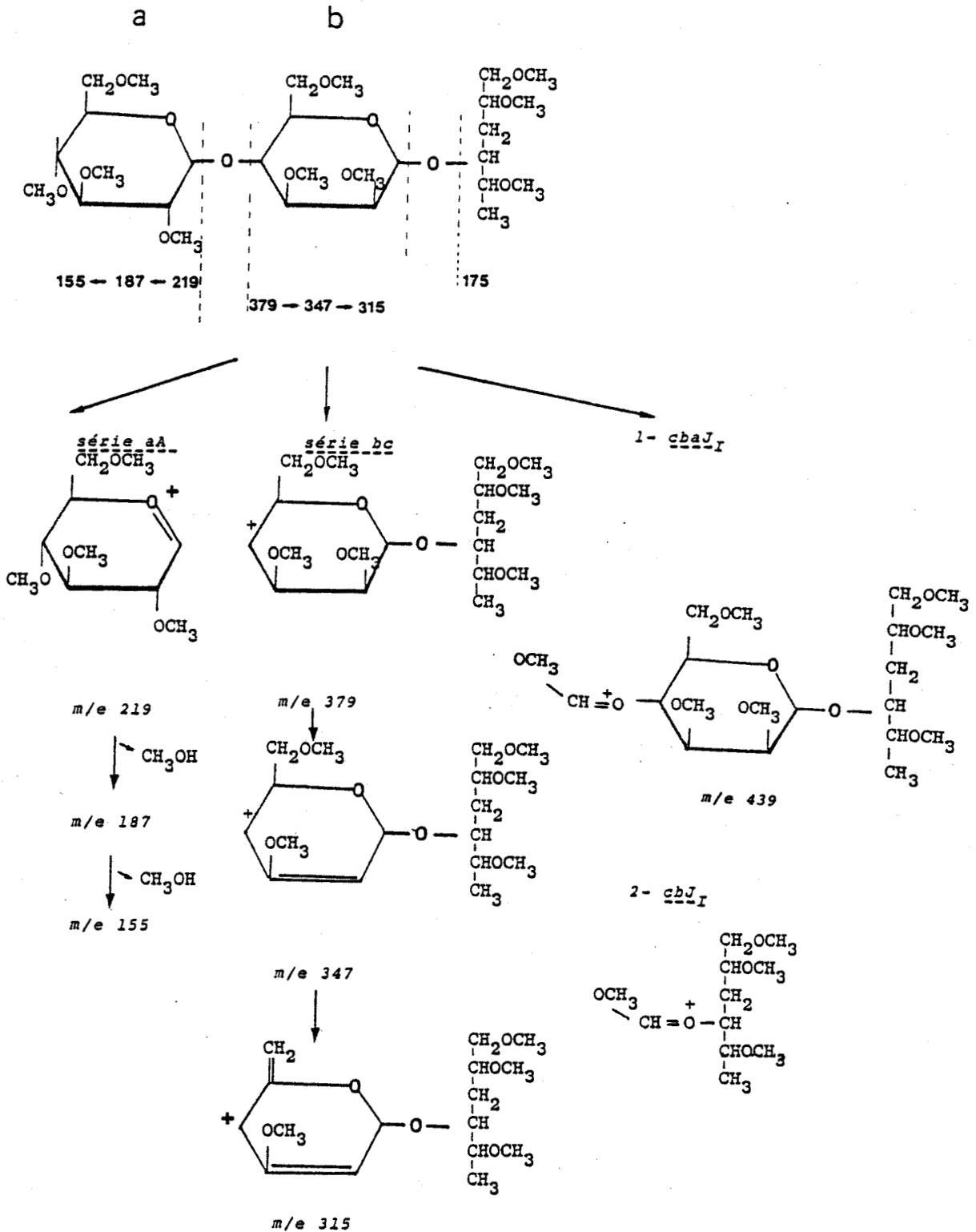


Figure 31 : Ions caractéristiques du composé II provenant de l'oligosaccharide résistant à l'oxydation periodique .

6 - Anomérisation des liaisons après oxydation chromique.

La fraction glucidique de la glycoprotéine P₁ a été oxydée selon la technique d'HOFFMAN et al. (87) (appendice technique page 175).

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

L'oxyde de chrome favorise l'ouverture du cycle pyranique du monosaccharide en liaison β , l'oxydation de la fonction alcool sur le carbone 5 et la transformation de la fonction héli-acétalique du carbone 1 en une fonction ester (Figure 32 P. 97).

La fraction précipitante au cetavlon, réduite par le carbodiimide (84) et peracétylée est traitée avec le trioxyde de chrome. Le polysaccharide dégradé (c) est recueilli après extraction par le chloroforme.

L'étude en chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation (Figure 33 P. 98), fait apparaître une modification des rapports molaires du glucose et du mannose. Nous observons une disparition presque quantitative du mannose alors qu'une partie du glucose est conservée.

TABLEAU XIX

Composition molaire* en monosaccharides de la fraction précipitante réduite et de la fraction précipitante réduite et oxydée.

	Galactose	Mannose	Glucose	Acide aldobiouronique
Précipité réduit	1	0.81	2.25	—
Précipité réduit et oxydé	1	0.25	1.75	—

*calculées sur la base de 1 résidu de galactose.

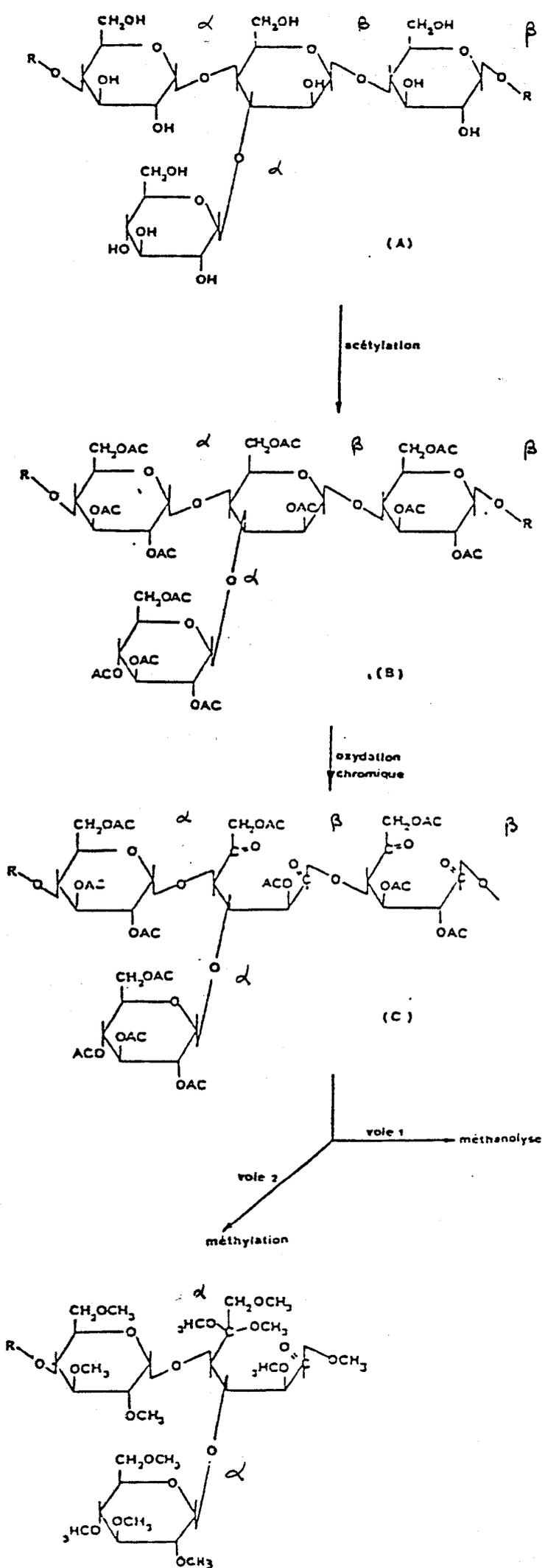


Figure 32 : Mécanisme d'action de l'oxydation chromique (87) appliquée à la fraction précipitante P₁



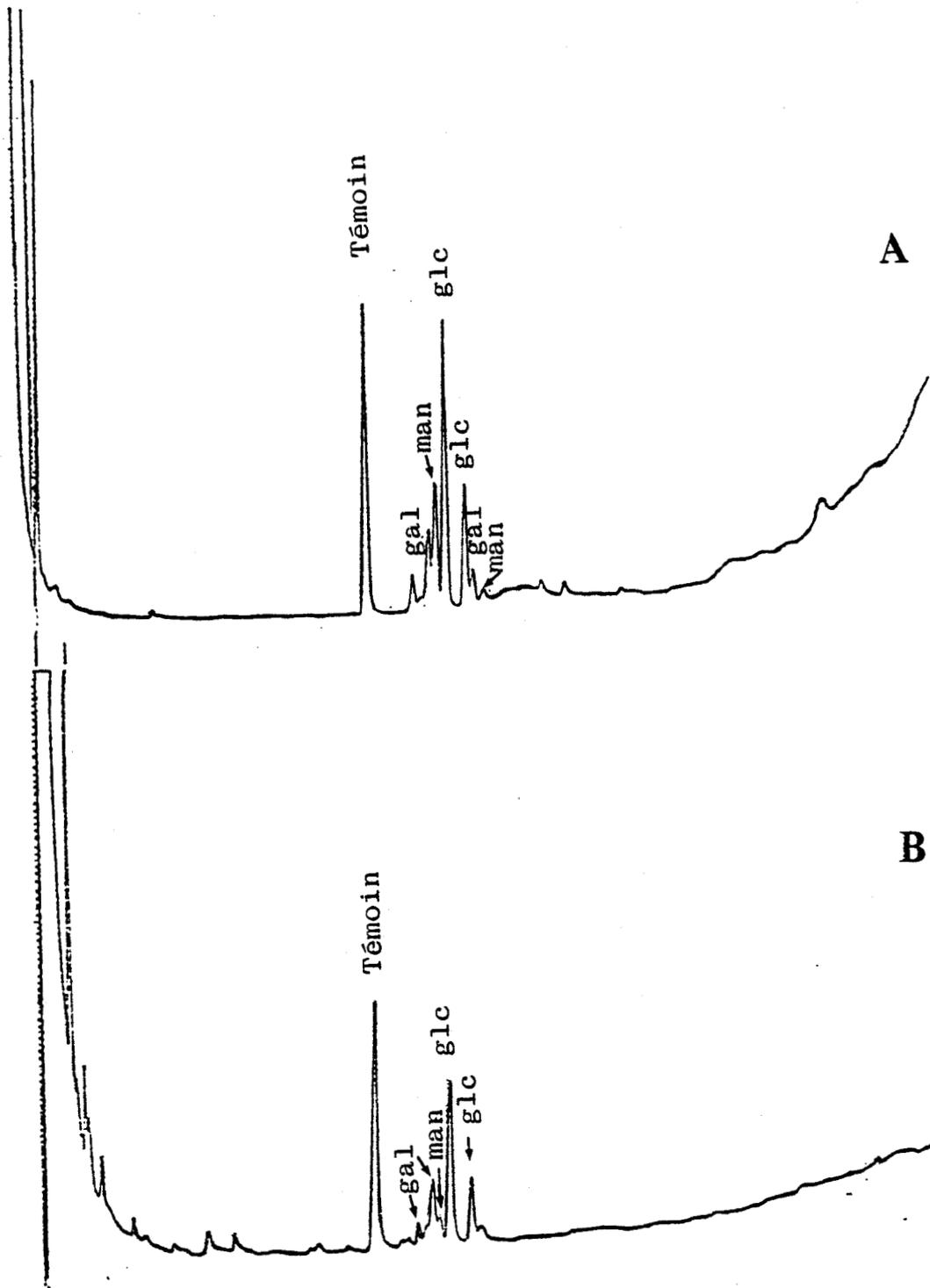


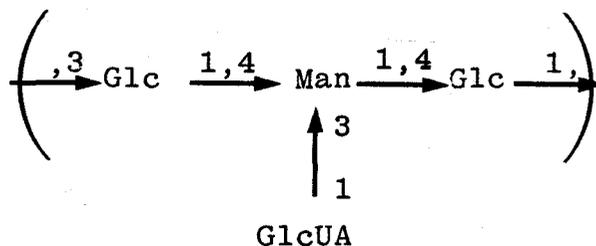
Figure 33 : Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation du précipité P_1 réduit (A) et du précipité P_1 ayant subi une oxydation chromique (B). (Colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5 % sur varaport 30 "mesh" 80-100 ; température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C/mn. sous un débit de gaz vecteur (azote) : 10 ml/mn.

Ce résultat permet de conclure que tous les résidus de mannose sont liés par liaison β glycosidique et que 2 résidus de glucose sur les 3 (fraction précipitante réduite) sont conjugués par des liaisons α glycosidiques.

7 - Conclusion

Les résultats obtenus à l'aide des différentes techniques d'approche de la structure des polysaccharides permettent de conclure :

- 1 - à la présence d'unités de répétition tétrasaccharidiques constituées de deux résidus de glucose, un résidu de mannose et un résidu d'acide glucuronique.
- 2 - à la position externe des résidus d'acide glucuronique, démontrée par réduction et perméthylation (apparition d'un perméthyl-glucose) et par dégradation uronique (disparition uniquement des résidus d'acide glucuronique).
- 3 - à l'enchaînement des monosaccharides dans la chaîne oligosaccharidique démontré par perméthylation et étude des éthers méthyliques avant et après méthanolyse.



- 4 - partiellement à l'anométrie des liaisons glycosidiques déterminée par oxydation chromique : liaison β -1,3 mannosidique d'une part et ambiguïté sur la nature α ou β des deux résidus de glucose et du résidu d'acide glucuronique (disparition d'un résidu de glucose sur les trois que contient le polysaccharide réduit). Toutefois l'absence d'action de la β glucuronidase permet d'affirmer la nature α de la liaison glucuronosidyle.

Cette structure du chaînon répétitif de la glycoprotéine P₁ (Figure 34 P. 101) est en accord avec celle déterminée par GAHAN et al. (88) sur le polysaccharide exocellulaire de *Klebsiella pneumoniae* sérotype 2.

En outre, compte-tenu de la masse moléculaire de la glycoprotéine (95 500), des pourcentages d'hexoses neutres (69%) et d'acides uroniques (18%), nous pouvons conclure à la présence de 120 unités de répétition tétrasaccharidiques attachées sur la protéine .

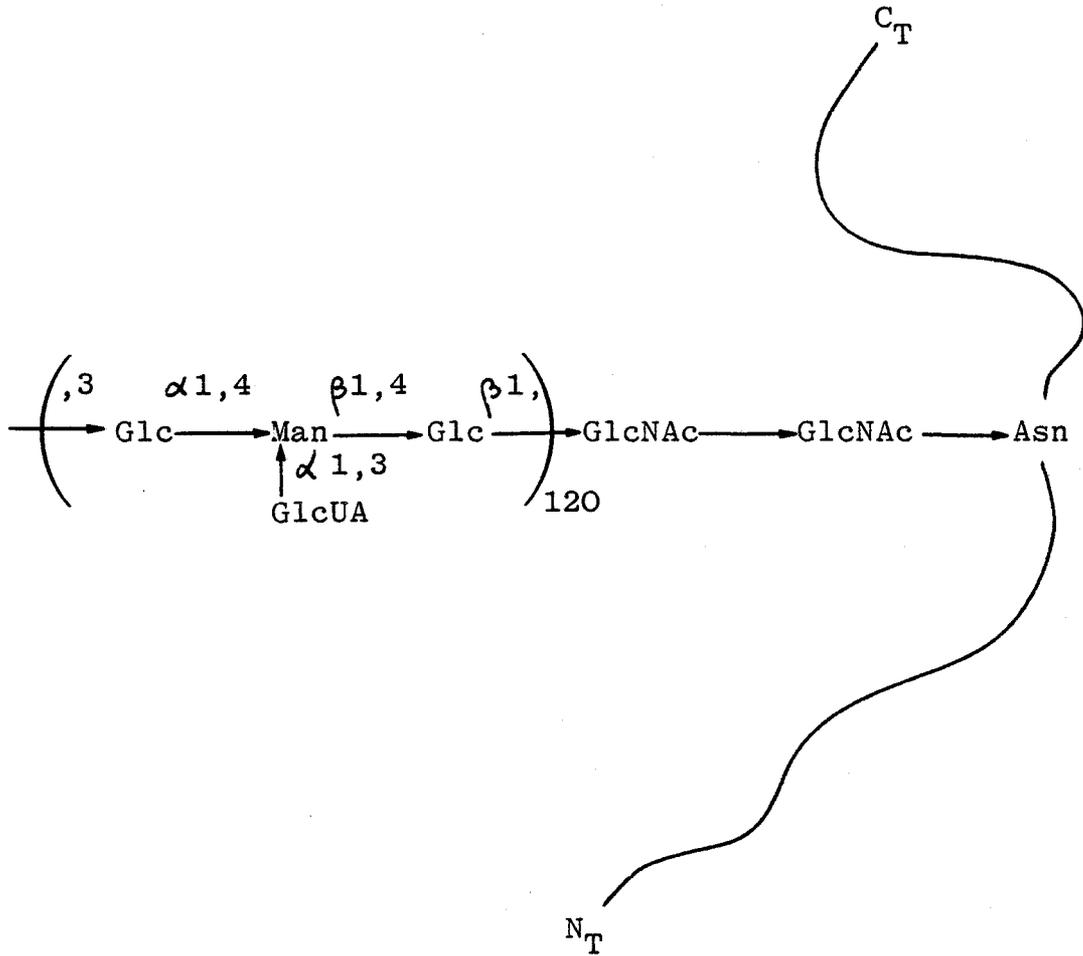


Figure 34 : Structure de la fraction précipitante au cetavlon P_1 .



C - IDENTIFICATION DE LA LIAISON GLYCANNE-PROTEINE

La présence dans la fraction précipitante au cetavlon de 19% de protéines nous a incité à rechercher le type de liaison glycanne-protéine. Cette recherche est d'autant plus importante que jusqu'à ce jour aucune glycoprotéine bactérienne n'a été identifiée, les auteurs travaillent essentiellement sur les polysaccharides exocellulaires. Nous avons donc recherché la présence de liaisons O-glycosidique et N-glycosidique.

1 - Recherche des liaisons O-glycosidiques

Les glycannes liés O-glycosidiquement sur une chaîne protéique peuvent être séparés de cette dernière par un mécanisme de β élimination en milieu alcalin.

Les liaisons O-glycosidiques de la sérine et de la thréonine conjuguée dans les chaînes peptidiques sont rompues par l'action d'alcalis qui transforment la sérine en acide-2-amino-2 propénoïque (ou "dehydro-alanine" ou acide α -amino-acrylique) et la thréonine en acide 2-amino-2-buténoïque qui restent conjugués à la chaîne peptidique (Figure 35 P. 103). Le protocole expérimental suivi est donné dans l'appendice technique page 175.

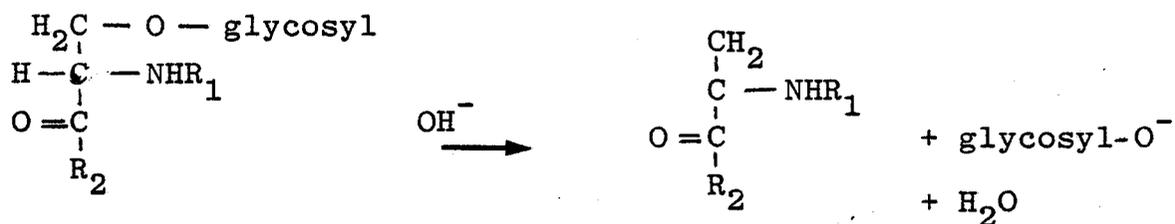
La cinétique de la réaction suivie par lecture au spectrophotomètre à 240 nm n'a pas permis de mettre en évidence une augmentation d'absorbance. Ce résultat prouve l'absence de liaisons O-glycosidiques dans la fraction précipitante P₁.

2 - Recherche des liaisons N-glycosidiques

La présence de N-acétylglucosamine (0.76%) nous a incité à rechercher le chaînon asparaginy-glucosamine constituant le point d'attache de nombreuses glycoprotéines.

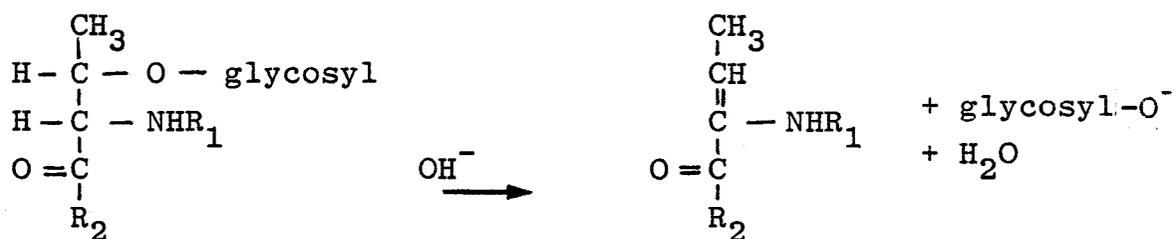
Nous avons tenté d'identifier le chaînon GlcNAc \rightarrow Asn (Figure 36 P.104) par:

* des techniques permettant d'approcher le point d'attache (hydrolyse pronasique et hydrolyse par l'acide fluorhydrique)



O-séryl-glycoside

acide-2-amino-2-propénoïque
conjugué

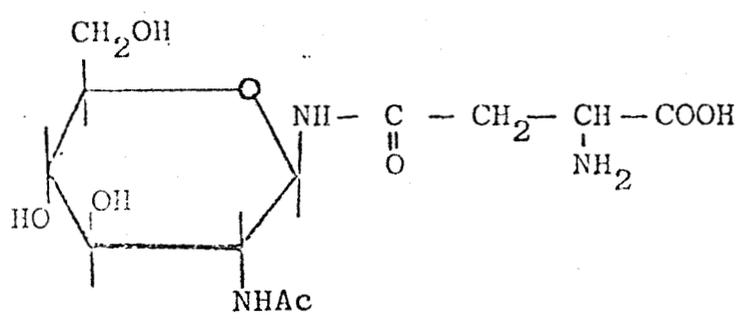


O-thréonyl-glycoside

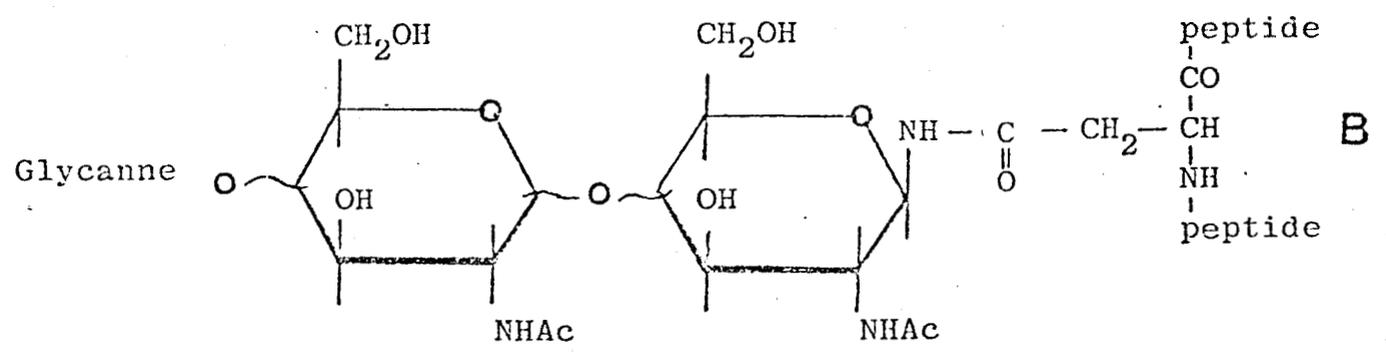
acide-2-amino-2-buténoïque
conjugué

Figure 35 : Rupture par "β-élimination" des liaisons O-séryl et O-thréonyl glycosides d'un glycopeptide .

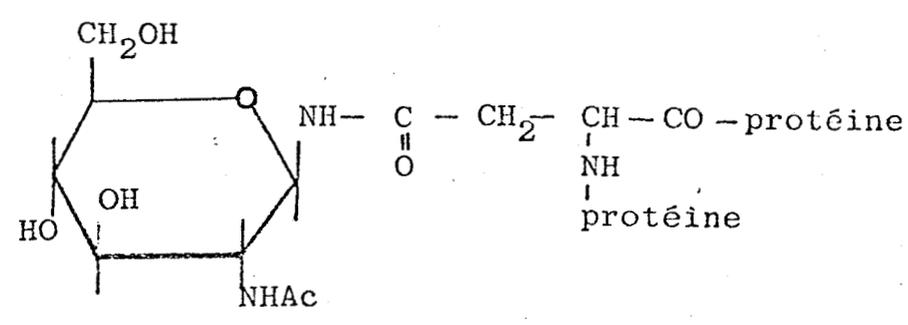




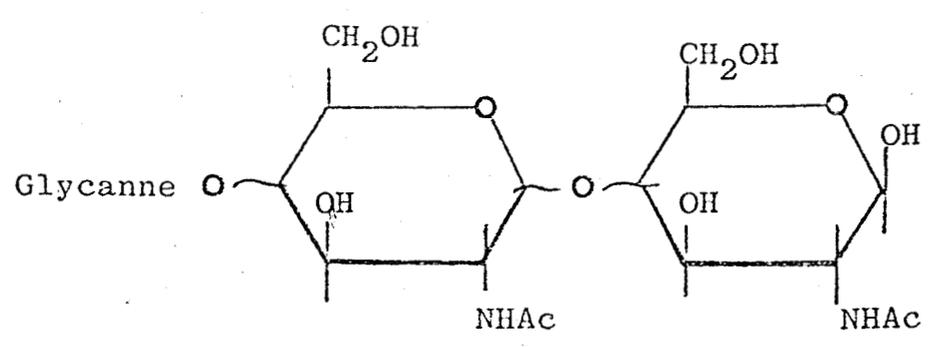
A



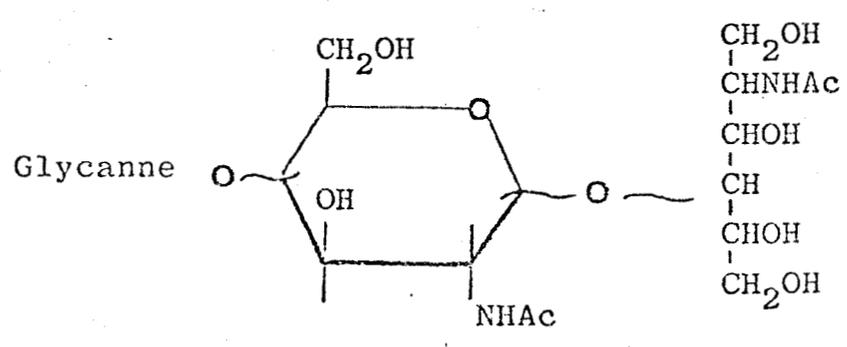
B



C



D



E



Figure 36 : Identification de la liaison glycane-protéine.

- A - chaînon asparaginyll-glucosamine
- B - hydrolyse pronasique
- C - hydrolyse fluorhydrique
- D - hydrazinolyse et N-réacétylation
- E - rupture sodique en milieu réducteur

* des procédés chimiques de rupture de la liaison N-glycosidique (hydrazinolyse et rupture sodique en milieu réducteur).

a - Approche du point d'attache :

α - hydrolyse pronasique :

La présence d'acides uroniques dans la fraction précipitante au cetavlon permet difficilement à l'enzyme "d'accéder" aux liaisons amides de la chaîne protéique. Pour cela, nous avons donc réalisé l'hydrolyse pronasique selon YAMASHINA et al. (89) sur la fraction précipitante réduite par le carbodiimide (84), dont le protocole est décrit dans l'appendice technique page 175. Le glycopeptide recueilli, analysé à l'auto-analyseur Beckman-Multichrom après une hydrolyse chlorhydrique (HCl 5,6N - 100°C-24h.) présente encore 2% d'acides aminés dans lesquels nous retrouvons principalement de l'acide aspartique, de la thréonine, de la sérine, du glycolle, de l'acide glutamique et de l'alanine accompagnant la glucosamine (Figure 37P.106). Le rapport $\frac{Asp}{GlcNAc}$ qui est de 4,4 dans la glycoprotéine native passe à une valeur de 0,86 dans le glycopeptide. Ce résultat est en faveur de la présence de liaisons GlcNAc \rightarrow Asn dans la fraction P₁. Cette liaison glycosylamide sera démontrée par attaque alcaline effectuée sur les glycopeptides.

β -hydrolyse par l'acide fluorhydrique :

L'acide fluorhydrique favorise la libération des liaisons O-glycosidiques tout en préservant les liaisons amides de type peptidique et de type glycosylamide. Sur une glycoprotéine, l'acide fluorhydrique gazeux aura par conséquent pour effet d'éliminer les résidus monosaccharides liés O-glycosidiquement tout en préservant les monosaccharides liés N-glycosidiquement à la protéine (90).

Le protocole expérimental suivi est décrit dans l'appendice technique page 176. La chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides indique la disparition complète des monosaccharides neutres et des acides uroniques. L'hydrolysate chlorhydrique (HCl 5,6N, 100°C, 24 h)

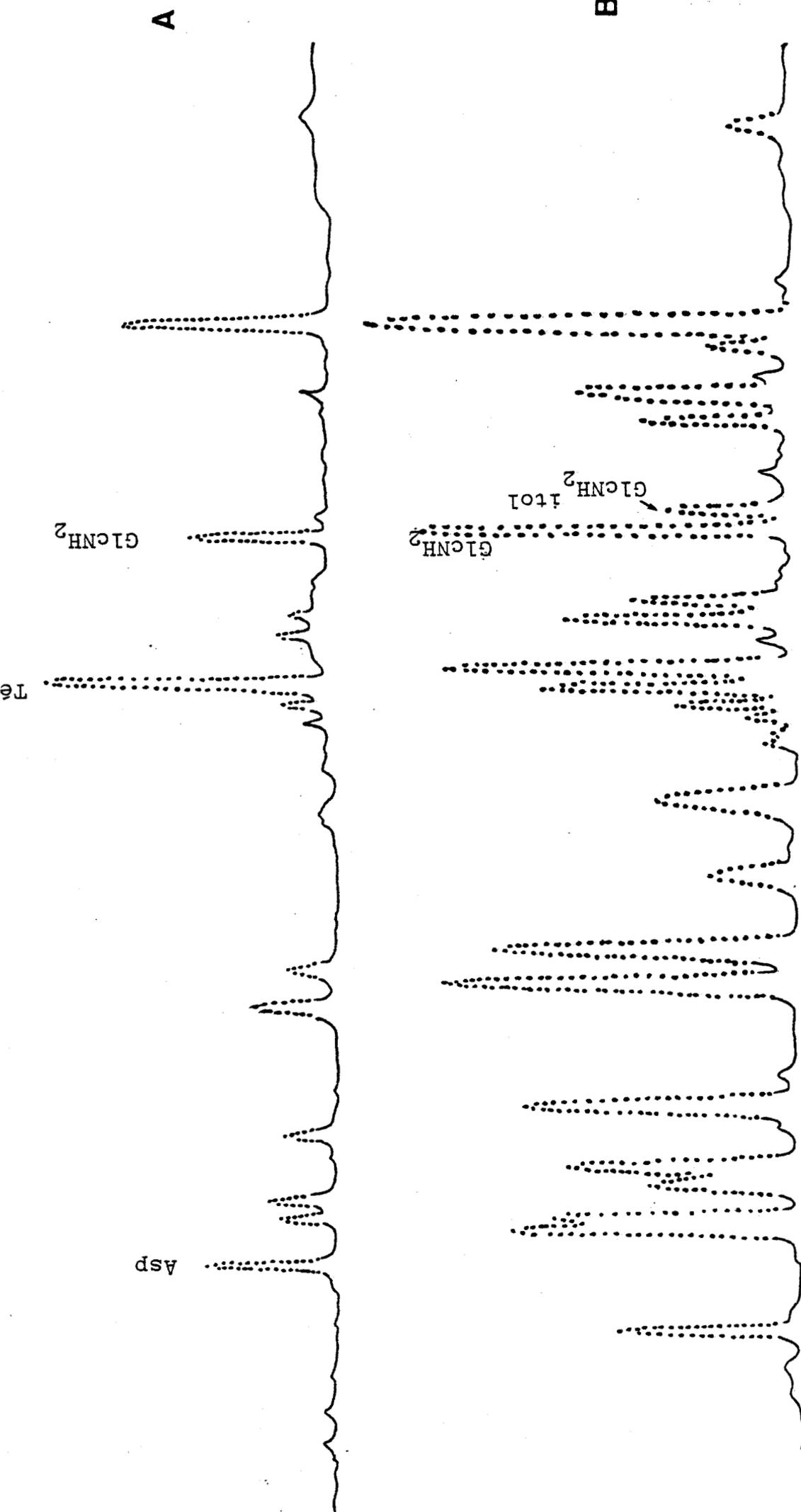


Figure 37 : Analyse à l'autoanalyseur Beckman-multichrom de la fraction précipitante pronasique (A) et de la fraction ayant subi une rupture sodique en milieu réducteur (B).



analysé à l'autoanalyseur d'acides-amino indique encore la présence de glucosamine. Ceci permet d'affirmer sans ambiguïté la présence d'une liaison N-glycosidique dans la glycoprotéine P₁. D'autre part, les différences dans les rapports $\frac{\text{Asp}}{\text{GlcNAc}}$ de la glycoprotéine native (4,4) et de la glycoprotéine déglycosylée (7,1) montrent une baisse de la concentration en glucosamine dans cette dernière, indiquant la présence d'un chaînon $\text{Glc NAc} \rightarrow \text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn}$ dans la fraction précipitante au cetavlon.

b - Rupture de la liaison N-glycosidique

α - hydrazinolyse :

L'hydrazine coupe les liaisons peptidiques d'une protéine en libérant les acides aminés sous forme d'hydrazides ainsi que la liaison asparaginyl-glucosamine. La technique utilisée (91) est décrite dans l'appendice technique page 176.

Après hydrazinolyse, purification sur Sephadex G50 et N-réacétylation, la fraction résiduelle ne renferme plus d'acides aminés et possède par contre de la glucosamine (Figure 38 P.108)

β - rupture sodique en milieu réducteur :

La soude en milieu réducteur et à chaud coupe la liaison asparaginyl-glucosamine qui est réduite en glucosaminitol. Le protocole expérimental de MARSHALL et NEUBERGER (92) est décrit dans l'appendice technique page 177.

L'hydrolyse chlorhydrique du glycopeptide attaqué par la soude en milieu réducteur montre la présence de glucosamine et de glucosaminitol (Figure 3 P.106). Ce résultat indique bien la présence de glucosamine liée N-glycosidiquement à la chaîne protéique. D'autre part, l'ambiguïté de la glucosamine à côté du glucosaminitol est en accord avec les résultats de l'hydrolyse fluorhydrique de la glycoprotéine : présence à côté du résidu de glucosamine liée N-glycosidiquement à la protéine d'un résidu de N-acétylglucosamine dans une séquence que nous n'avons pas pu

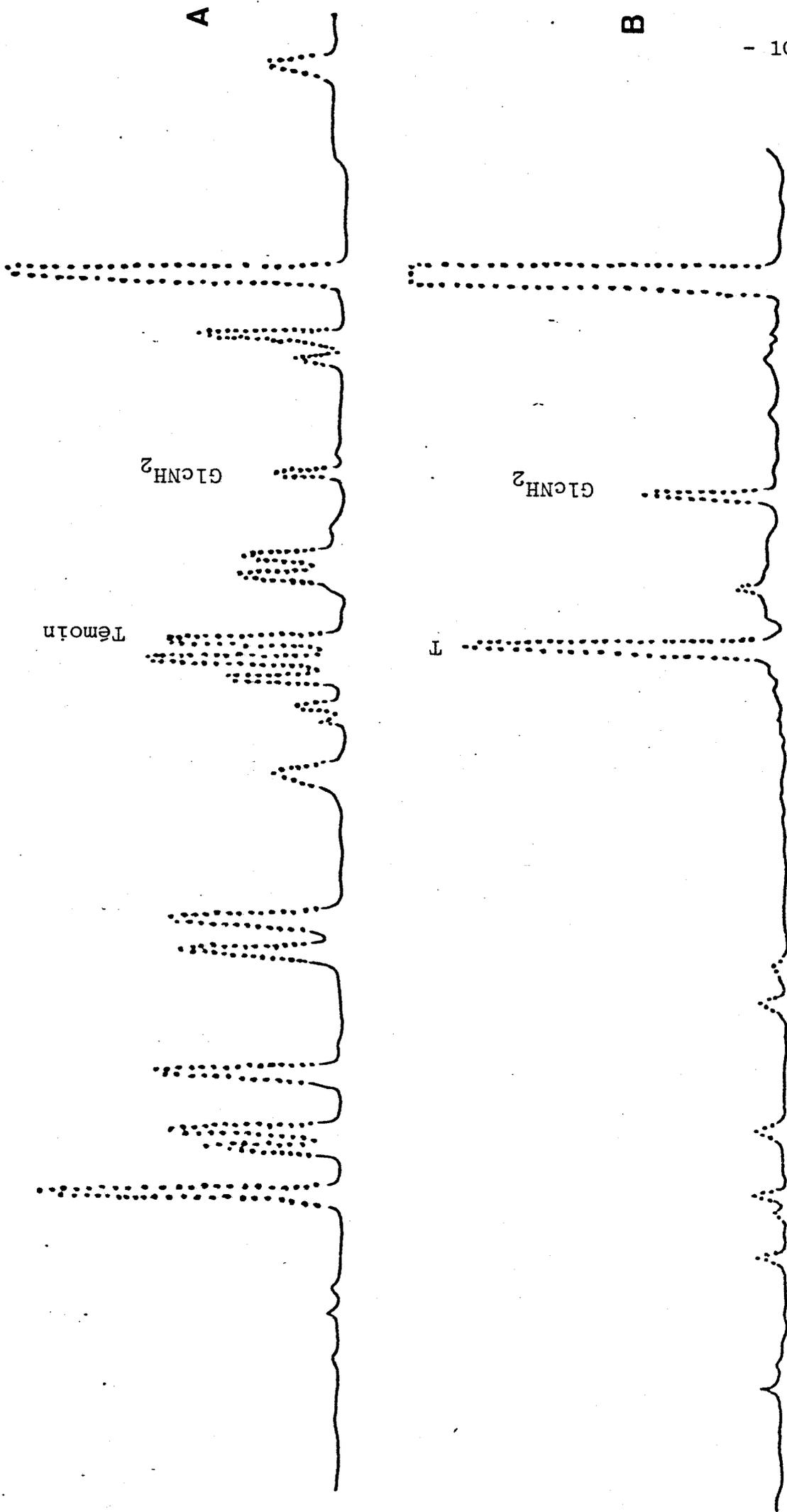


Figure 38 : Analyse à l'autoanalyseur Beckman-multichrom de la fraction précipitante native (A) et de la fraction précipitante hydrazinolysée (B).



identifier mais qui, compte-tenu de nos connaissances de la structure des fractions glucidiques des glycoprotéines devrait être de nature N-acétylchitobiose.

3 - Conclusion

Ces expérimentations d'hydrolyse protéolytique profonde, de rupture sodique, d'hydrolyse fluorhydrique et d'hydrazinolyse nous ont conduit à démontrer sans ambiguïté la nature glycoprotéique de la fraction précipitante au cetavlon, la liaison glycanne-protide étant de nature asparaginy-N-acétylglucosamine. Ceci constitue la preuve de la présence de glycoprotéines chez les procaryotes.

La difficulté d'effectuer un dosage très précis sur des quantités d'osamines aussi petites (nombre de résidus d'osamines compris entre 3 et 4 par molécule), compte-tenu des concentrations très importantes de monosaccharides neutres, ne permet pas de donner avec certitude le nombre de chaînes glucidiques attachées sur la protéine : ce nombre de chaînes glucidiques n'exède pas 2 par molécule de glycoprotéine.

V - ETUDE DE LA FRACTION FI

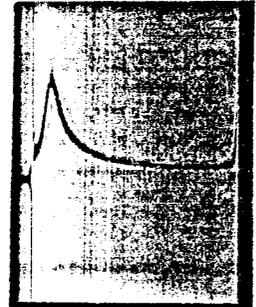
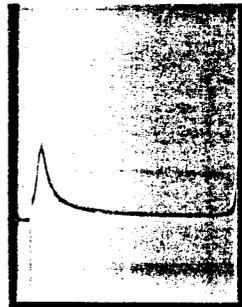
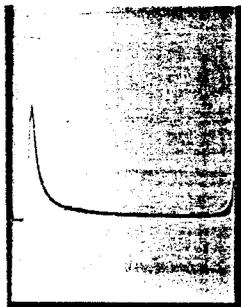
Le fractionnement au cetavlon du principe actif a conduit à l'obtention d'une glycoprotéine précipitante P_1 dont nous venons de décrire la structure glucidique et d'un surnageant hétérogène qui a été de nouveau fractionné par chromatographie de gel filtration sur Ultrogel Aca34 (Figure 17 P. 69) . Cette technique séparative fournit une fraction FI homogène en ultracentrifugation qui a fait l'objet de l'étude qui suit.

Temps
(mn.)

0

8

24



40

56

72

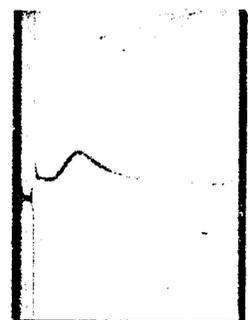
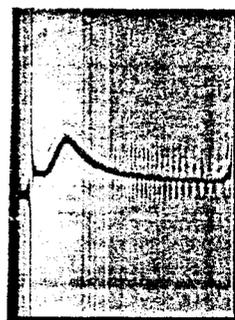
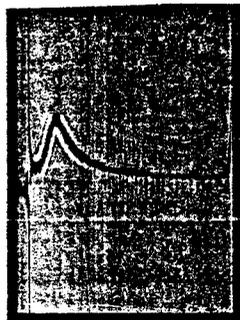


Figure 39 : Diagramme d'ultracentrifugation de la fraction FI (conditions expérimentales d'ultracentrifugation p.170).

A - COMPOSITION DE LA FRACTION FI

1 - Copule protéique :

La fraction FI contient 38% de protéines dosées par la méthode colorimétrique de LOWRY (67). L'analyse des acides aminés après hydrolyse chlorhydrique par HCl 5.6N permet d'identifier tous les acides aminés à l'exception de la cystéine .

2 - Copule glucidique :

La fraction FI renferme 34% d'oses neutres(72) dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique et 3,5% d'osamines estimées par la méthode d'ELSON et MORGAN (70) après hydrolyse, pendant 4 heures à 100°C.

TABLEAU XX

Composition centésimale en monosaccharides de la fraction surnageante S1 et de la fraction FI obtenue après chromatographie sur Ultrogel AcA34.

	Oses neutres %	Acides uroniques %	Osamines %	Protéines %
Fraction surnageante S1	57.8	6.8	1.75	25
Fraction FI	34	—	3.5	38

L'analyse qualitative des monosaccharides et les rapports molaires ont été effectués :

a - par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation.

Les chromatogrammes (Figure 40 P. 112) indiquent la présence d'une part de glucose, galactose, N-acétylglucosamine dans les rapports molaires 1;4;0,3 respectivement et d'autre part de composés (pics A,B et C) qui restent à identifier.

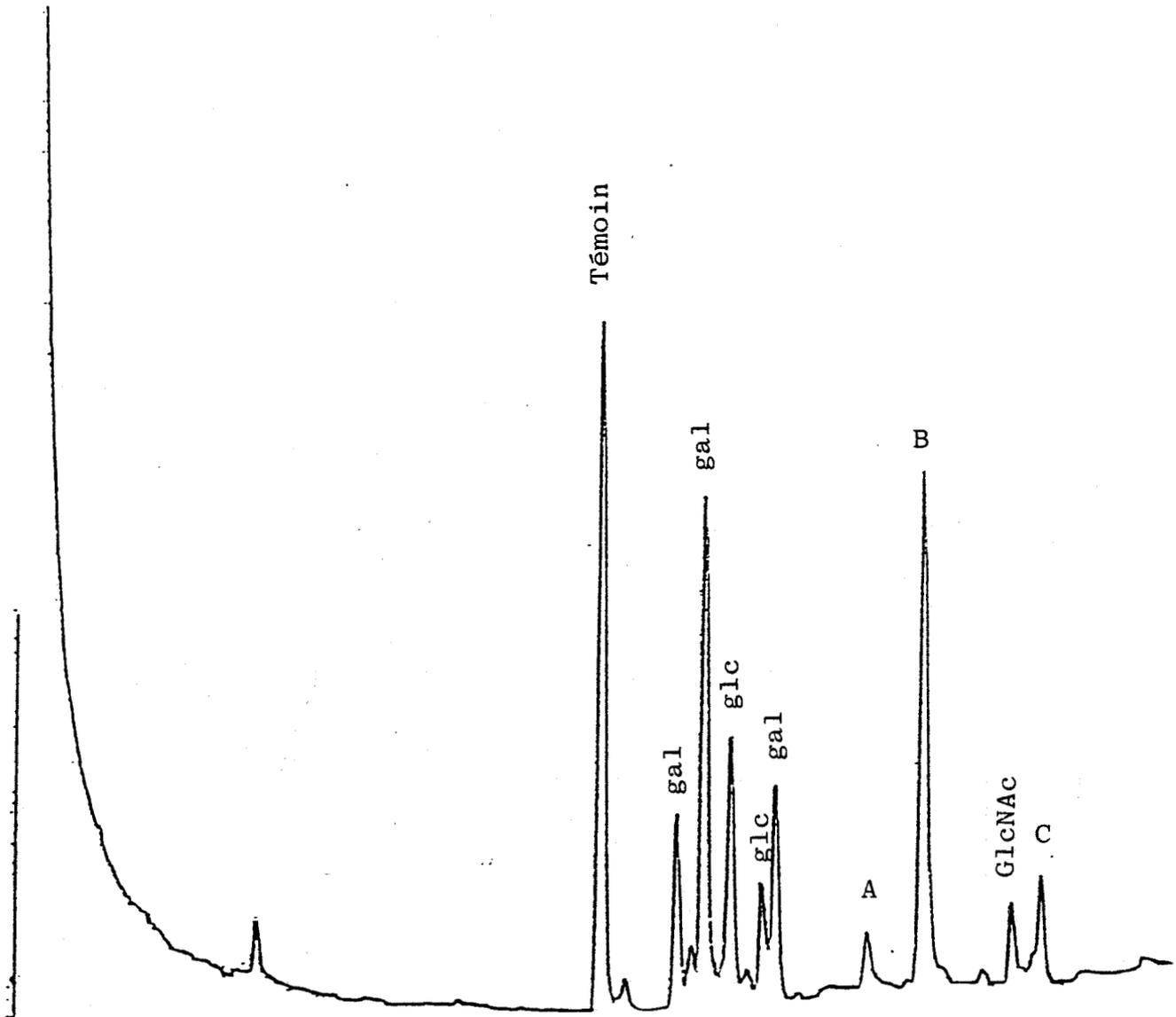


Figure 40 : Chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation de la fraction FI
Colonne de verre (0.3 x 300 cm) remplie de silicone OV 210 à 5% sur varoport 30 "mesh" 80-100 ,
température programmée de 100°C à 230°C à raison de 2°C/mn., sous un débit de gaz vecteur (azote) :
15 ml/mn.



TABLEAU XXI

Composition molaire* en monosaccharides de la fraction surnageante S1 et de la fraction FI.

	Galactose	Mannose	Glucose	Acide aldo-biouronique	Osamin
Fraction surnageante S1	1.87	0.47	1	+	—
Fraction FI	4	—	1	—	0.3

*calculée sur la base de 1 résidu de glucose.

Afin de déterminer la nature des composés A, B et C, deux témoins, un lipopolysaccharide isolé de *Klebsiella pneumoniae* (LPS) et le KDO (acide 3-O-deoxy-D-manno-octulosonique) ont été méthanolysés, trifluoroacétylés et étudiés en chromatographie en phase gazeuse dans les mêmes conditions que la fraction FI. La cochromatographie FI-LPS et FI-KDO a permis de mettre en évidence des composés communs.

FI-KDO (Figure 41 P. 114) : nous constatons que les deux pics A et B de la fraction FI correspondent aux pics de KDO.

FI-LPS (FIGURE 42 P.115) : tous les composés du LPS ont des temps de rétention identiques à ceux de la fraction FI.

b - par chromatographie en phase gazeuse après hydrolyse, réduction et peracétylation (acétate d'alditol) :

Le profil chromatographique des monosaccharides obtenu après hydrolyse, réduction par le borodéutérure de potassium et peracétylation a mis en évidence la présence de galactitol, glucitol et deux autres composés intitulés E et F (Figure 43 P. 116).

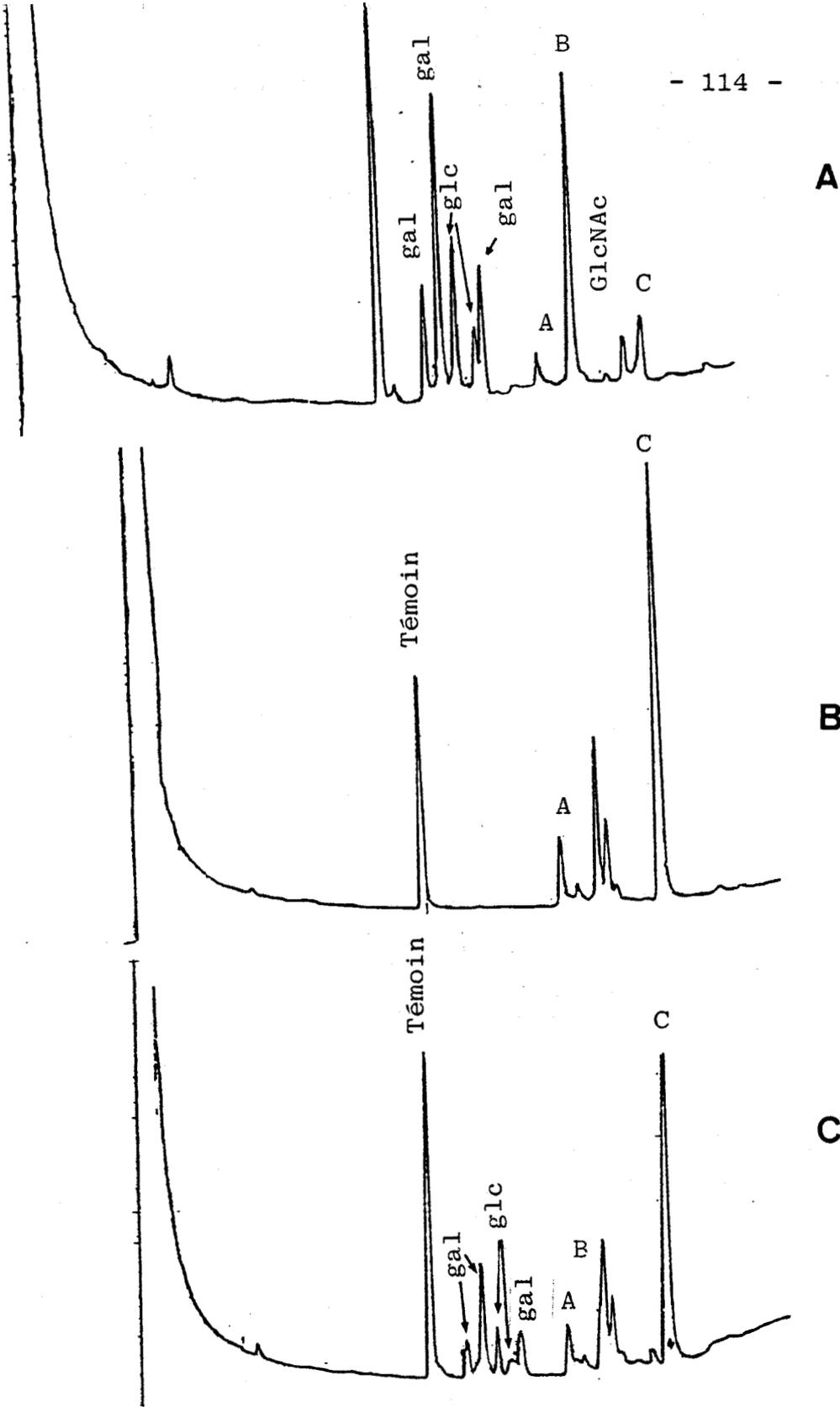


Figure 41 : Chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation de la fraction native (A), de l'acide 3-O-deoxy-octulosonique (B) et du mélange acide 3-deoxy-octulosonique+FI(C) (Colonne de verre (0.3x300cm) remplie de silicone OV 210 à 5% sur varaport 30 "mesh" 80-100, température programmée de 100 à 230°C à raison de 2°C/mn. sous un débit de gaz vecteur (azote) : 15ml/mn.

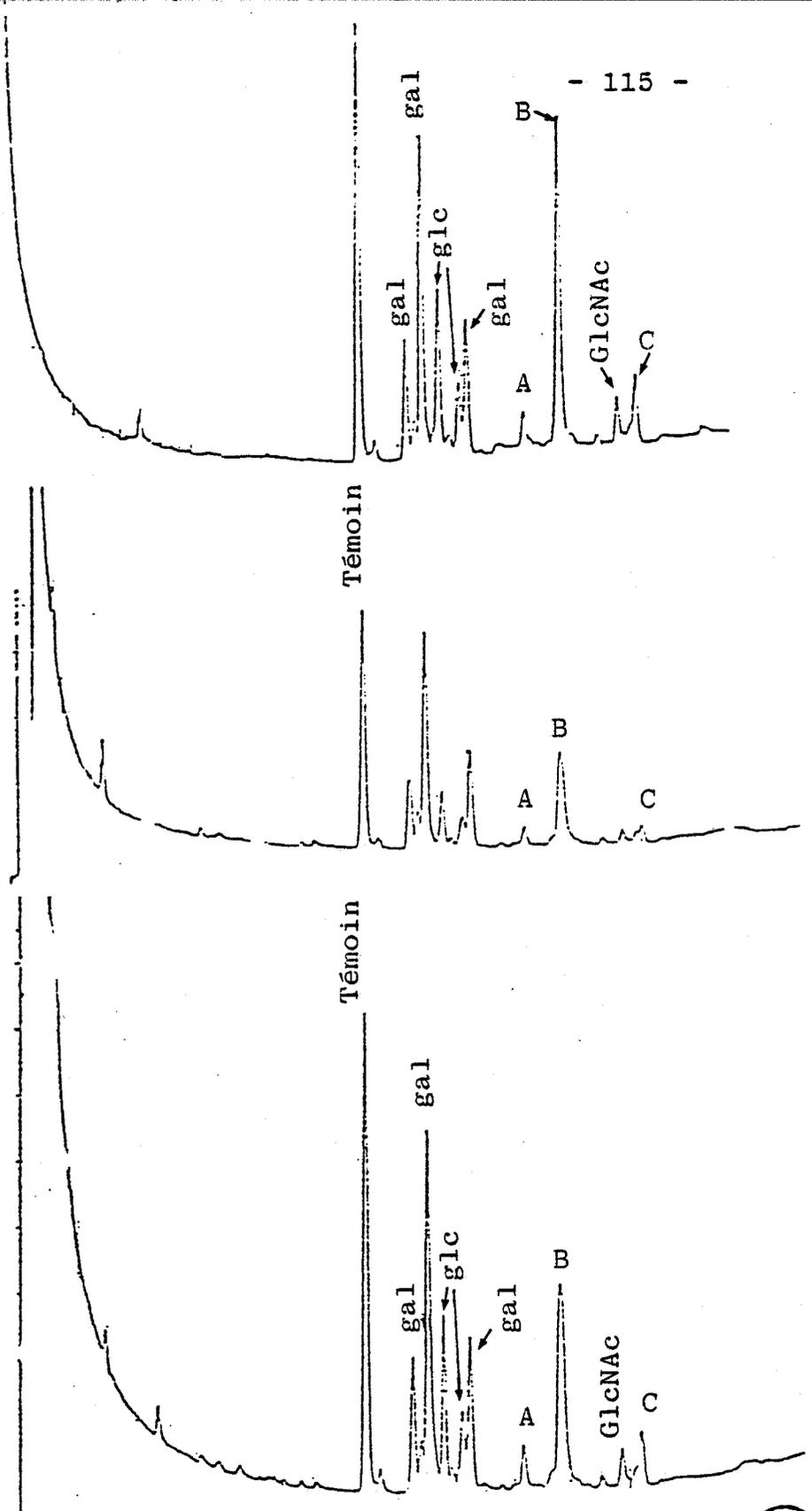


Figure 42

Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoro-acétylés obtenus par méthanolyse et trifluorocétylation de la fraction F_1 native (A), du lipopolysaccharide (B) et du mélange F_1 lipopolysaccharide (C).

Colonne de verre (0.3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5 % sur Varaport 30 "mesh" 80-100 ; température programmée de 100 à 230°C à raison de 2°C/mn, sous un débit de gaz vecteur (azote) : 15 ml/mn.

BUS
LILLE

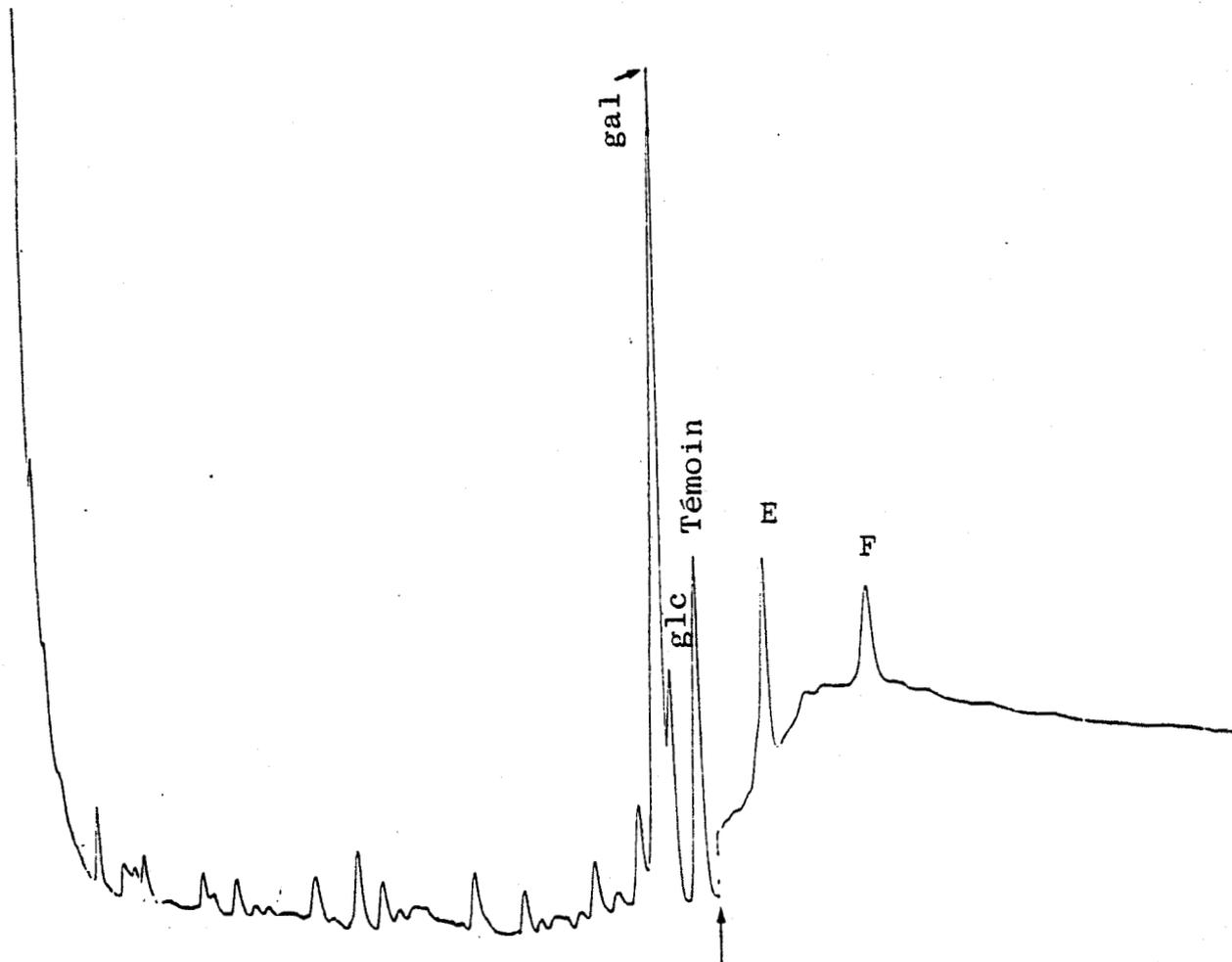


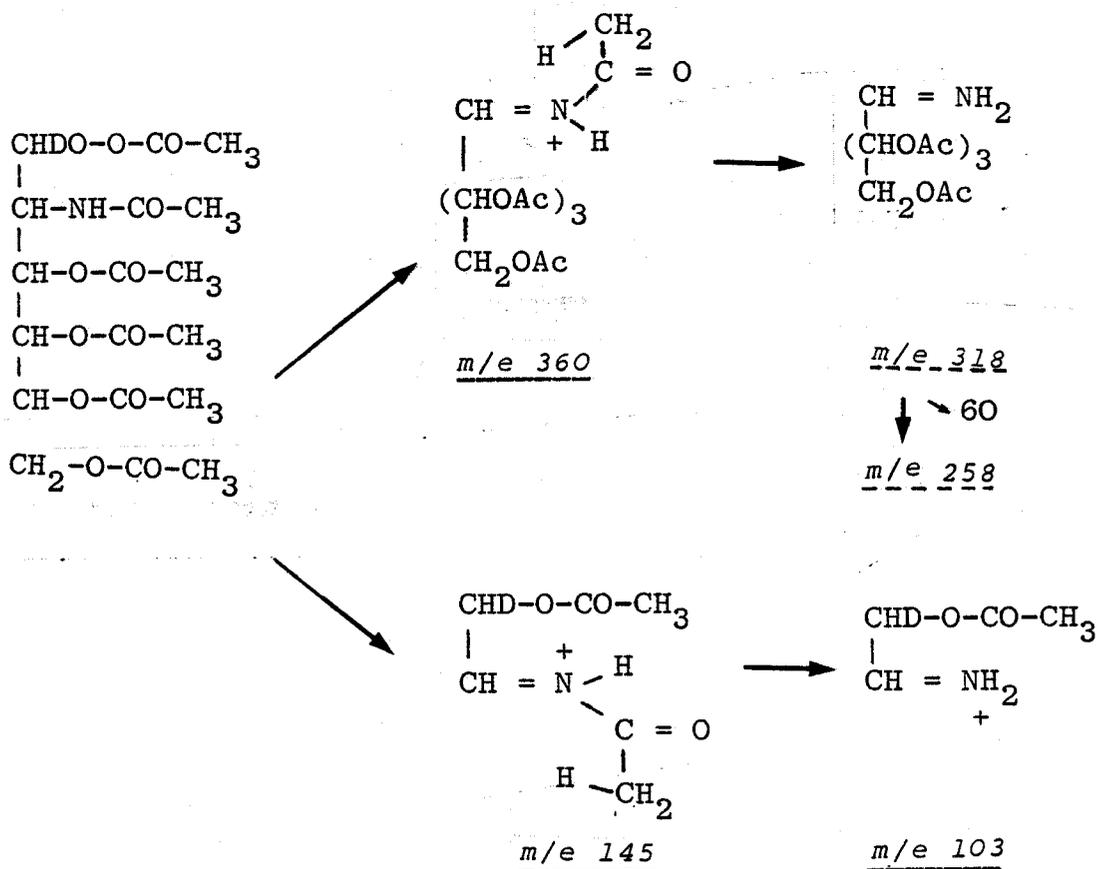
Figure 43 : Chromatographie en phase gazeuse des dérivés d'acétate d'alditol de la fraction FI .
Colonne de verre ECNSSM (0.3 x 150 cm) à température programmée de 150 à 230°C à raison de 2°C/mn. sous un débit de gaz vecteur (azote) : 20ml/mn.

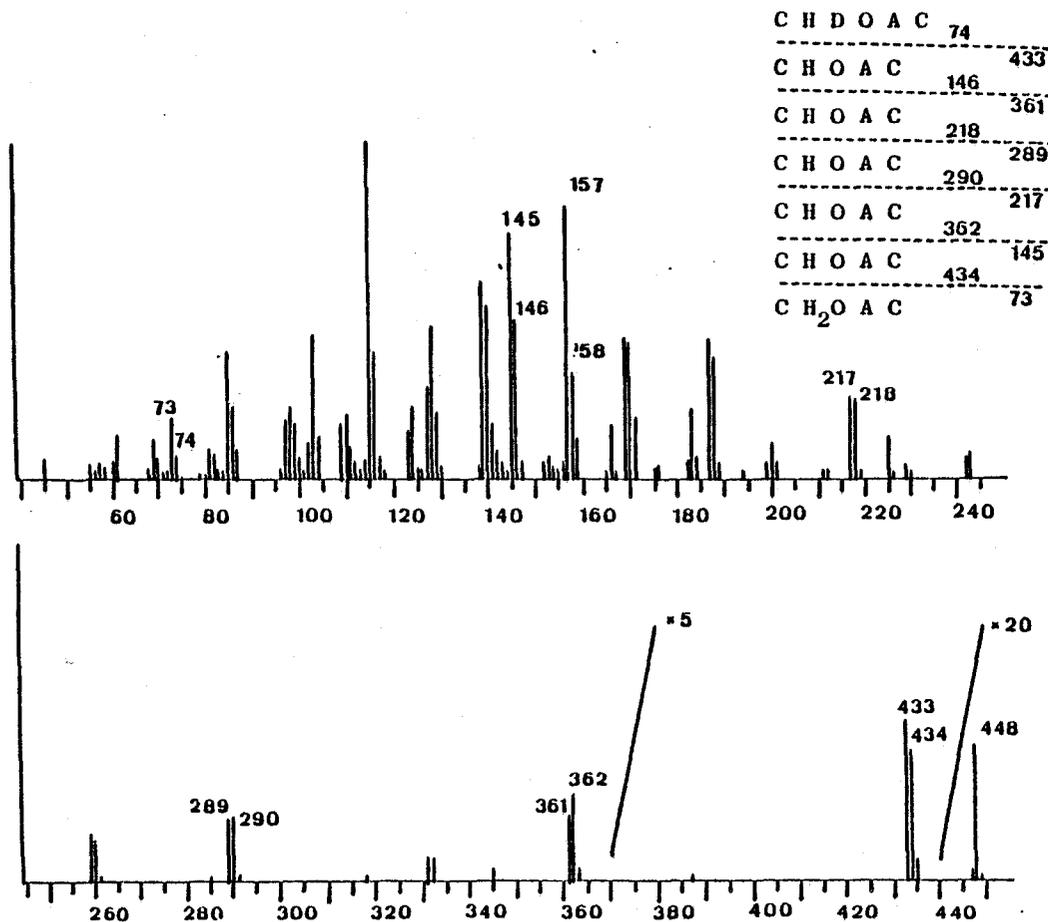
BUS
LILLE

Les composés E et F ont été identifiés en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

- Analysé par Impact Electronique :

- * le pic E est identifié à un heptitol per -O-acétylé sur la base des fragments primaires de masse m/e 433, 434, 361, 362, 289, 290, 217, 218, 145, 146, 73, 74. Le pic de masse m/e 448 correspond à l'ion moléculaire diminué d'un radical $\text{CH}_3\text{COO}^\cdot$ ($507 - 59 = 448$.) Quelques fragments secondaires (fragments primaires diminués d'une molécule d'acide acétique) sont représentés par les pics de masse m/e 85, 86, 157, 158 (Figure 44 P. 118)
- * Le pic F correspond au peracétylglucosaminitol qui est fragmenté comme suit :





BUS
TITLE

Figure 44

Spectre de masse du pic E (per -O- acétylheptitol) obtenu par hydrolyse de la fraction F_I réduction et peracétylation (analyse par couplage GLC-MS sur colonne capillaire OVIOI, température programmée de 90 à 250° C à raison de 15°C/mn et Impact Electronique.

Les fragments secondaires de masse m/e 360, 318, 258, 145 et 103 sont identifiés sur le spectre de masse (Figure 45 P. 120)

Analysés par ionisation chimique (gaz ionisant : ammoniacque)

* Le pic E fournit les ions moléculaires 507+I (508 et 507 + I8 (525) caractéristiques d'un heptitol peracétylé (Figure 46 P. 121)

* Le pic F correspond au peracétyl glucosaminitol sur la base des ions 434 + 1 (435) et 434 + 18 (452). (ion moléculaire : 434)(Figure 47 P. 122)

B.- Structure de la copule glucidique de la fraction F_I

I.- Méthylation de la fraction F_I

La perméthylation de la fraction F_I selon la technique de FINNE (93), suivie de la méthanolyse et analyse en chromatographie en phase gazeuse sur colonne de carbowax 6000, ne met en évidence qu'un seul éther méthylique, le 2,4,6-tri-O-méthyl galactose. Cela signifie que tous les résidus de galactose sont liés sur leur carbone 3. (Figure 48P.124) Nous n'avons pas pu identifier d'éthers méthyliques provenant des résidus de glucose, d'heptose, de KDO et de N-acétylglucosamine. Ce résultat partiel permet de donner la séquence oligosaccharidique de la partie Antigène O de la fraction F_I et encore moins du Core. Cette étude par perméthylation devra en conséquence être reprise sur la fraction Antigène O obtenue par hydrolyse partielle par l'acide acétique 1 % de la fraction F_I.

2.- Oxydation periodique de la fraction F_I

La fraction F_I a été soumise à l'action de l'acide periodique selon la technique de GOLDSTEIN et al. (86) dont le protocole est décrit dans l'appendice technique page 174. L'oligosaccharide résistant à l'oxydation ne renferme que du galactose (Figure 49P.125).

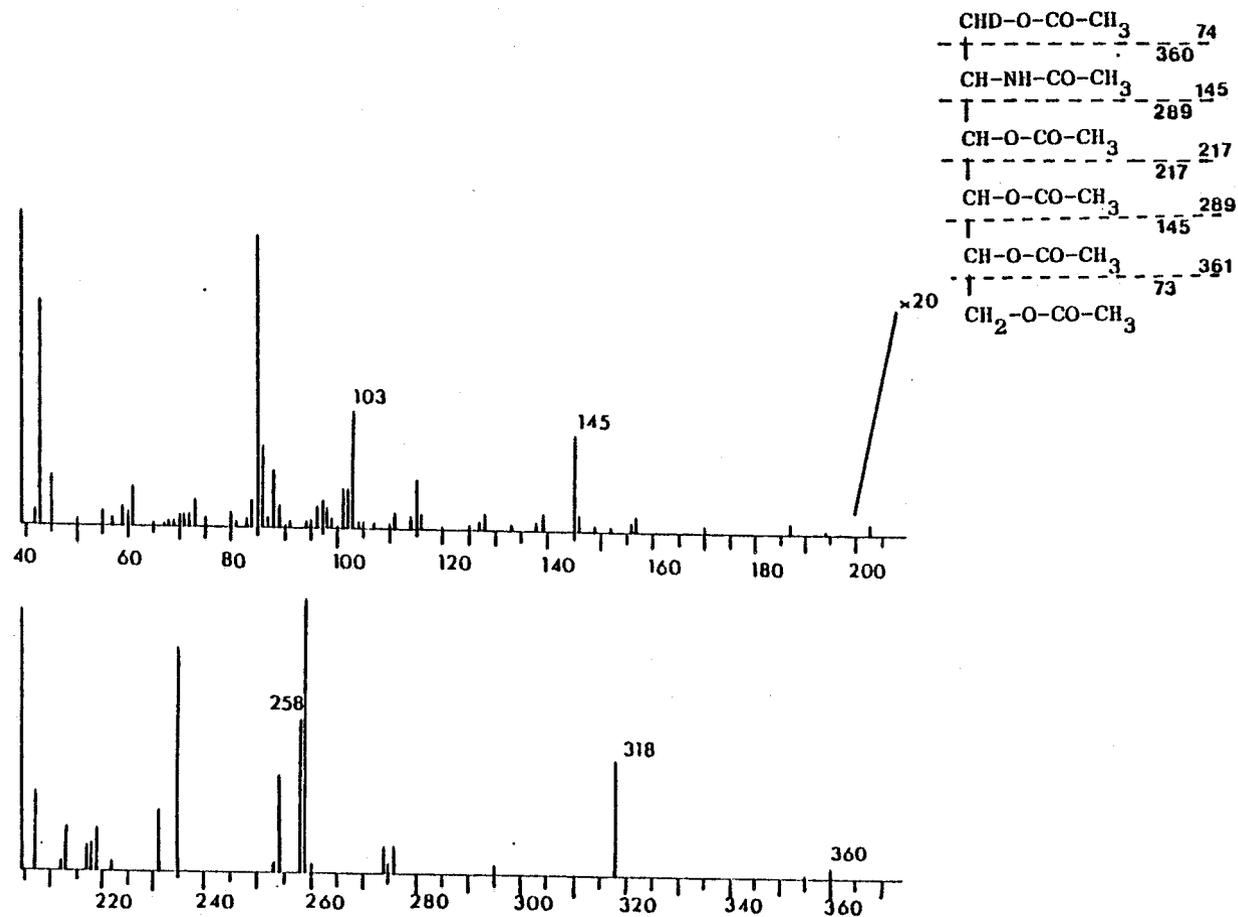
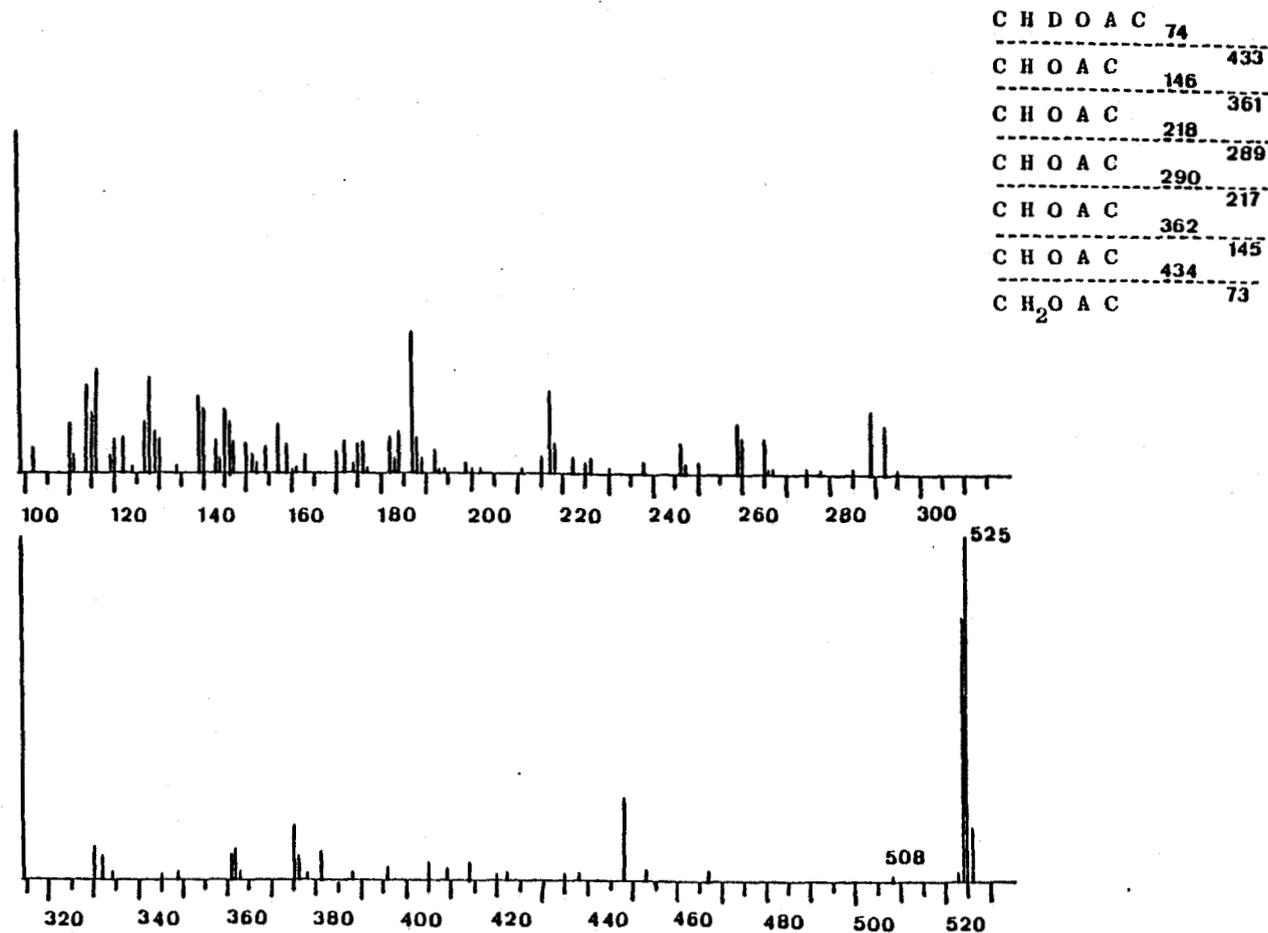


Figure 45

Spectre de masse du pic F (peracétylglucosaminitol) obtenu par hydrolyse de la fraction F_I, réduction et peracétylation.

(Analyse par couplage GLC - MS sur colonne capillaire OV101, température programmée de 90 à 250°C à raison de 15°C/mn et Impact Electronique.)





RUS
LILLE

Figure 46

Spectre de masse du pic E (per -O- acétylheptitol) obtenu par hydrolyse de la fraction F_I, réduction et peracétylation.

(Analyse par couplage GLC-MS sur colonne capillaire OV101, température programmée de 90 à 250°C à raison de 15°C/mn et ionisation chimique par l'ammoniaque.)

CHD-O-CO-CH₃ 74
 --- 360
 CH-NH-CO-CH₃ 145
 --- 289
 CH-O-CO-CH₃ 217
 --- 289
 CH-O-CO-CH₃ 145
 --- 73
 CH-O-CO-CH₃ 361
 CH₂-O-CO-CH₃

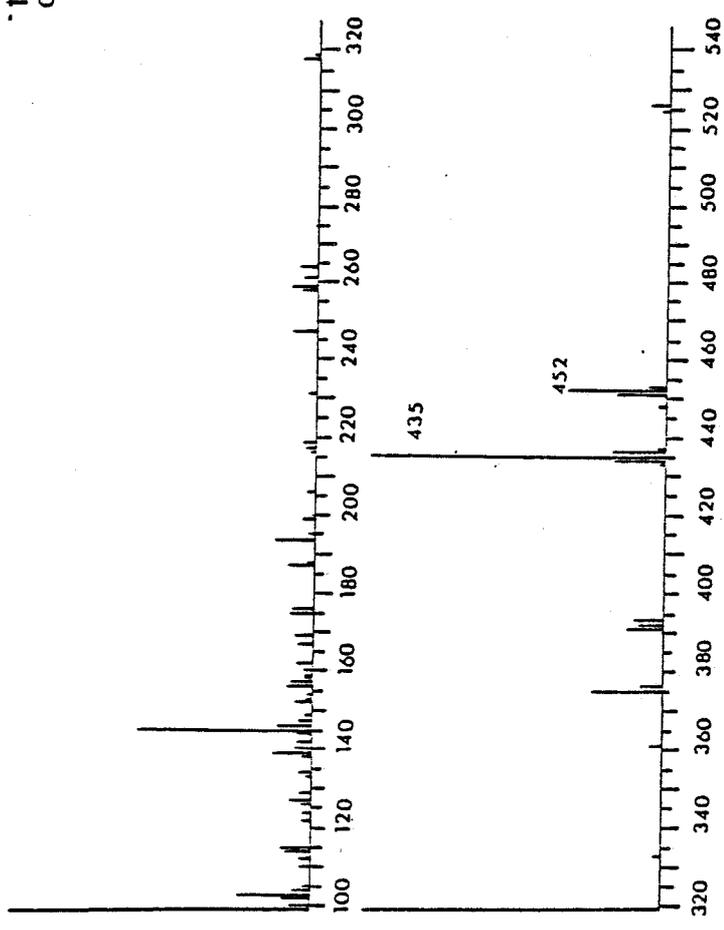


Figure 47



Spectre de masse du pic F (peracétylglucosaminitol) obtenu par hydrolyse de la fraction F_I, réduction et peracétylation. (Analyse par couplage GLC-MS sur colonne capillaire OV101, température programmée de 90 à 250°C/à raison de 15°C/mn et ionisation chimique par l'ammoniaque.

Après perméthylation selon FINNE (93) et méthanolyse, nous identifions par chromatographie en phase gazeuse du 2, 3, 4, 6 - tétra -O- méthylgalactose et du 2, 4, 6 - tri -O- méthylgalactose dans les rapports molaires 1 : 2,8. (Figure 50 P. 126)

L'acide periodique a en conséquence découpé la partie Antigène O de la fraction F_I au niveau des résidus de glucose (disparition totale de ce monosaccharide) et détaché des oligosaccharides constitués de 4 résidus de galactose. Ce résultat est en accord avec celui de la composition molaire en monosaccharides neutres de la fraction F_I qui donne pour 1 résidu de glucose, 3,8 résidus de galactose.

TABLEAU XXII

Composition molaire de la fraction F_I native et de la fraction F_I ayant subi une oxydation periodique

	Galactose	Mannose	Glucose	Osamines
F_I native	3.8	-	1	0.25
F_I oxydée	+++	-	-	-

3.- Oxydation chromique de la fraction F_I

Les anoméries de liaisons glycosidiques ont été étudiées par oxydation chromique selon le protocole expérimental de HOFFMAN et al. (87) (voir appendice technique p. 175). La fraction F_I oxydée a été analysée en chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation (Figure 51 P. 127) . Nous pouvons remarquer que la fraction oxydée a perdu une grande quantité de galactose. En calculant le pourcentage de chaque monosaccharide, nous constatons que les taux de glucose et d'osamines, ne varient pas, par contre celui du galactose passe de 15,7 % dans la fraction native à 2 % dans la fraction oxydée.

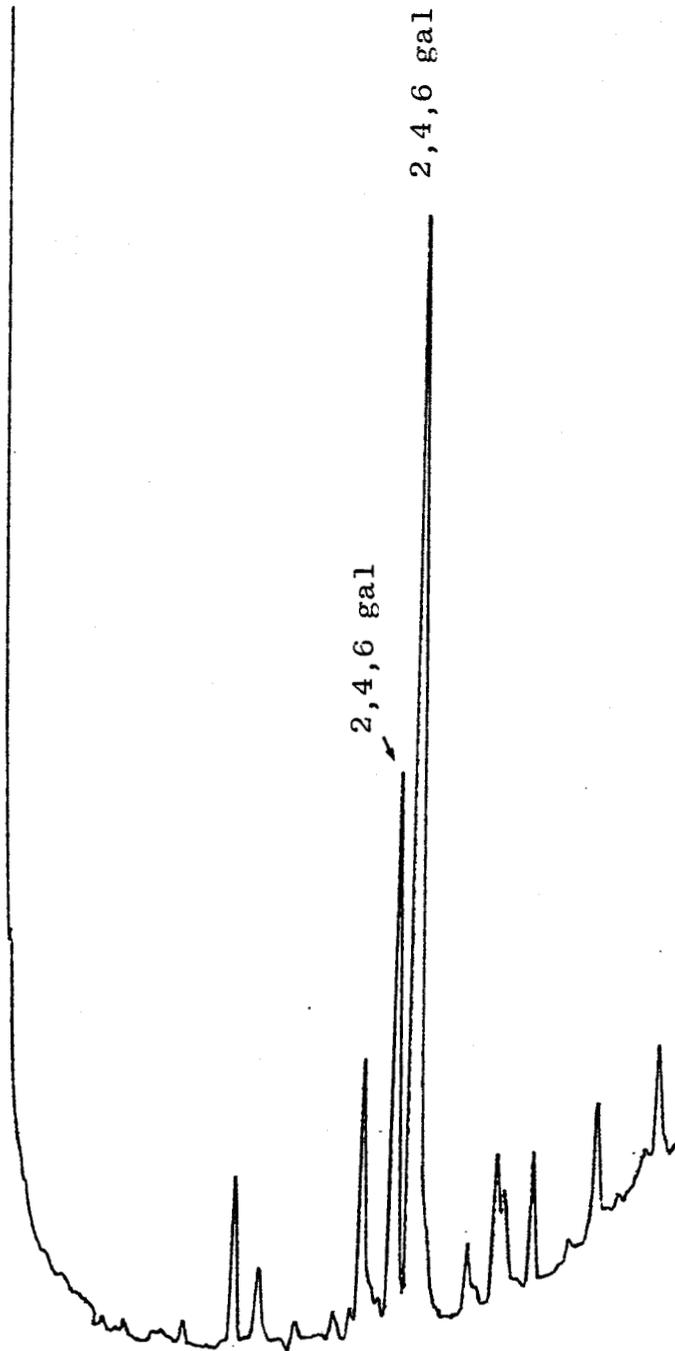


Figure 48 : Chromatographie en phase gazeuse de la fraction FI perméthylée et méthanolysée (colonne de verre (0.3x300cm) de Carbowax 6000 , température programmée de 130 à 220°C à raison de 4°C/mn. , gaz vecteur (azote) : 20 ml/mn.

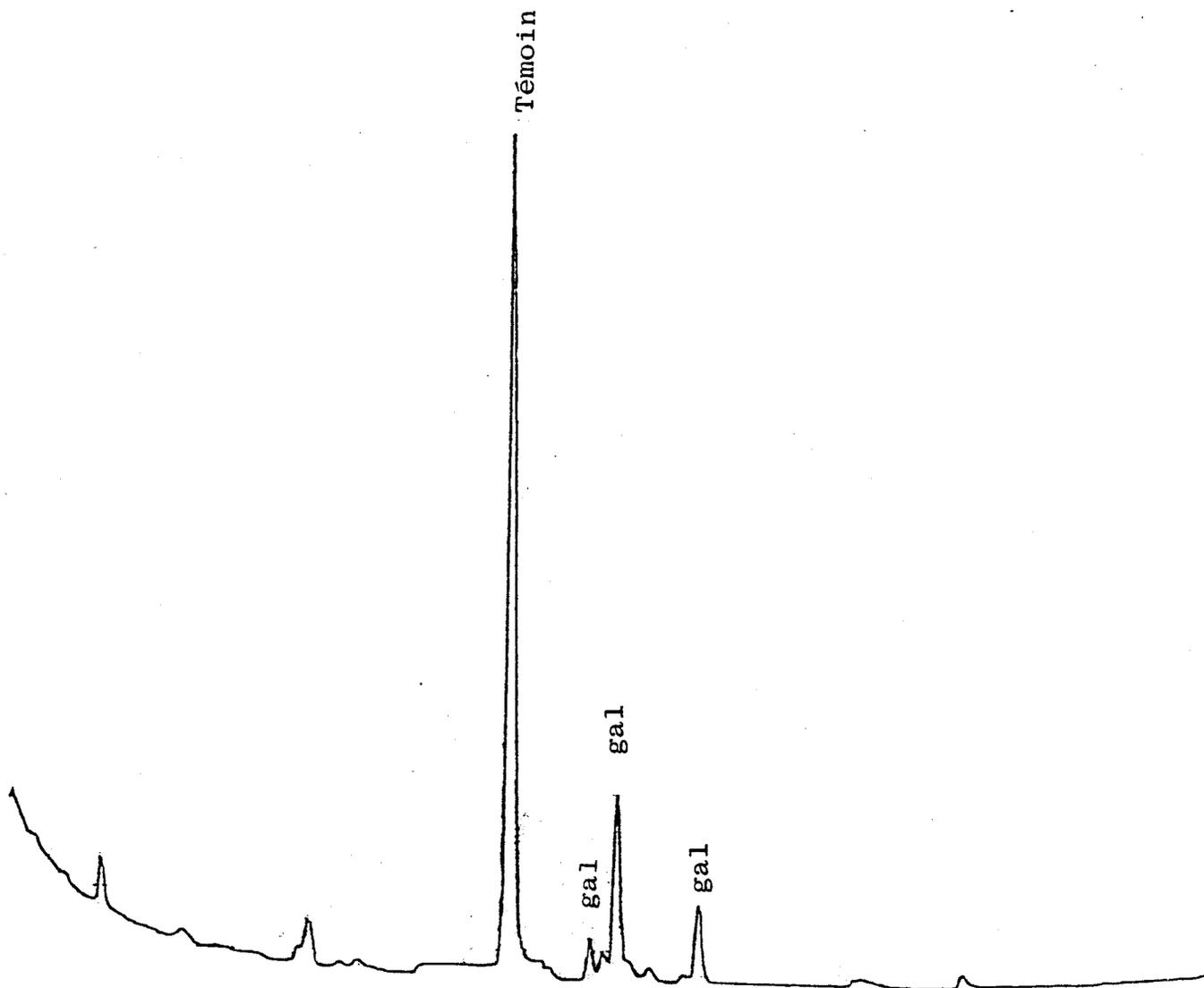


Figure 49

Chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation de la fraction F_I ayant subi une oxydation periodique.

Colonne de verre (0.3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5 % sur varaport 30 "mesh" 80-100, température programmée de 100 à 230°C à raison de 2°C/mn sous un débit de gaz vecteur (azote) 15 ml/mn.

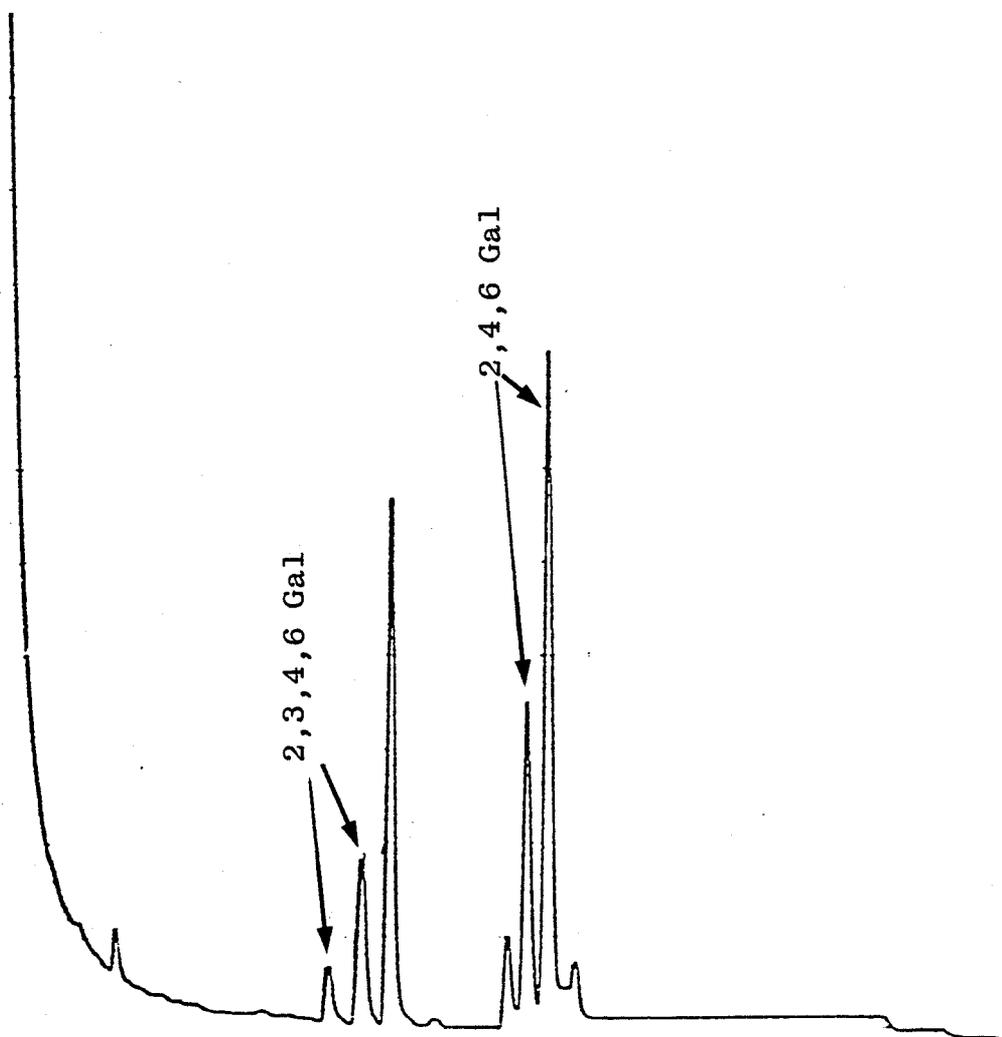


Figure 50

Chromatographie en phase gazeuse de la fraction F_I Oxydée, per-méthylée et méthanolysée sur colonne de Carbowax 6000, température programmée de 120°C à 200°C à raison de 4°C/mn sous un débit de gaz vecteur (azote) : 20 ml/mn.

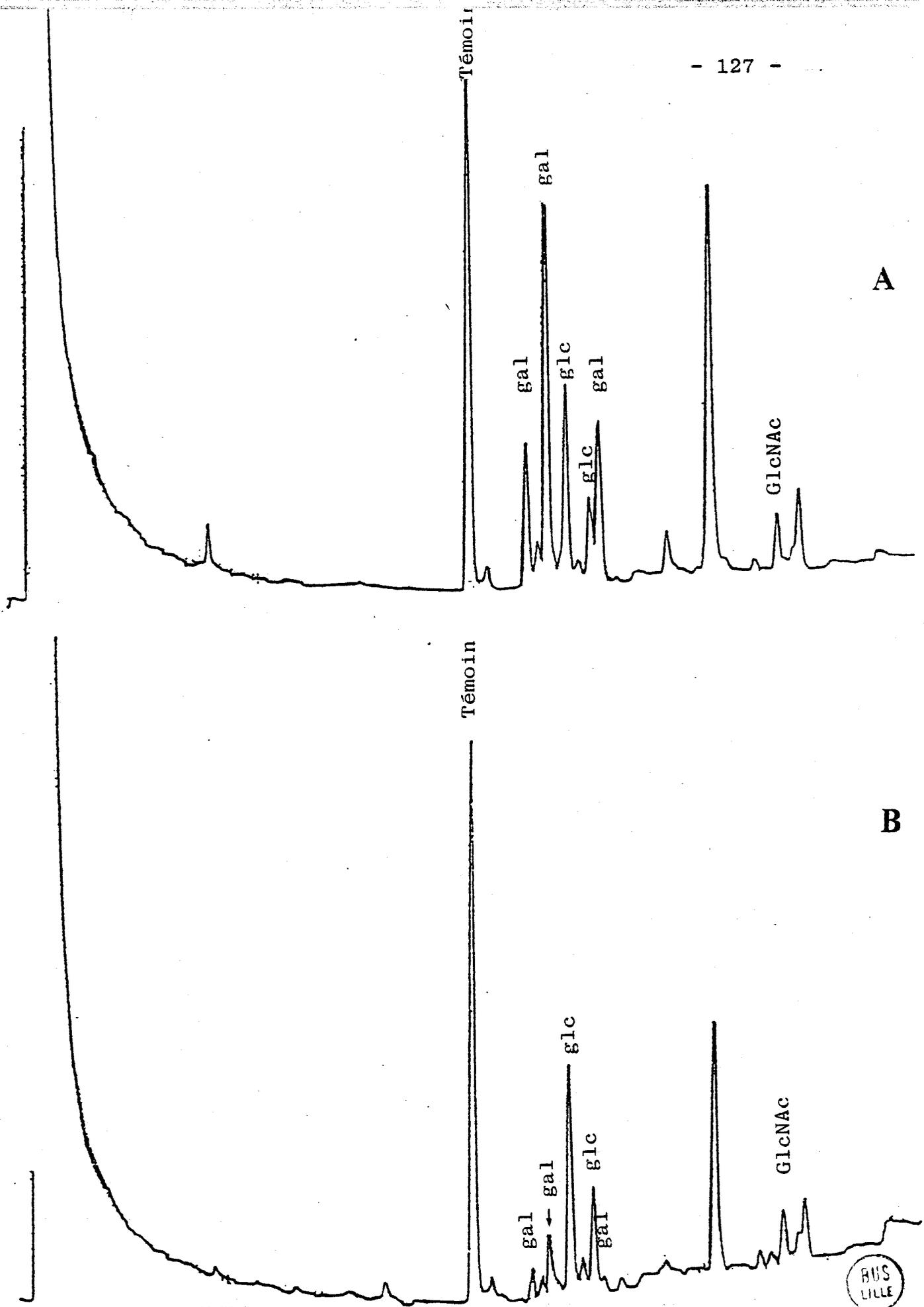


Figure 51 : Chromatographie en phase gazeuse des méthylglycoside trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation de la fraction FI native (A) et de la fraction FI ayant subi une oxydation chromique (B) . Colonne de verre (0.3x300cm) remplie de silicone OV 210 à 5% sur varoport 30 "mesh" 80-100, température programmée de 100 à 230°C à raison de 2°C/mn. sous un débit de gaz vecteur (azote) :15ml/mn.

Le trioxyde de chrome oxydant spécifiquement les monosaccharides conjugués par une liaison glycosidique β , nous pouvons conclure à la présence de résidus B-galactoside. Les résidus de glucose et de N-acétylglucosamine non oxydés par le trioxyde de chrome possèdent donc une configuration type α .

TABLEAU XXIII

Rapport molaire et pourcentage en monosaccharides de la fraction F_I native et de la fraction F_I ayant subi une oxydation chromique.

	Galactose	Mannose	Glucose	Osamines	% Galactose	% Glucose	% Osamines
F_I native	3,1	-	1	0,27	15,7	5,1	1,7
F_I oxydée	0,37	-	1	0,24	2	5,34	1,6

C.- Nature lipopolysaccharidique de la fraction F_I

La présence dans la fraction F_I , d'heptose et de KDO nous fait penser à l'existence d'une fraction lipopolysaccharidique qui posséderait, à côté des unités de répétition de monosaccharides neutres (Antigène O), un "Core" constitué d'heptose, d'osamines et de KDO.

L'hydrolyse par l'acide acétique 1 % (appendice technique page 177) selon WILKINSON (94), qui coupe spécifiquement les chaînes lipopolysaccharidiques au niveau des résidus KDO, a permis d'isoler deux fractions. Après centrifugation ou extraction par le chloroforme, nous avons recueilli une fraction surnageante aqueuse, de nature polysaccharidique et une fraction précipitante ou chloroformique correspondant à la fraction lipidique.

1.- Etude de la fraction polysaccharidique

La phase aqueuse a été chromatographiée sur colonne de Sephadex G 50. La fraction recueillie, repérée par la méthode au phénol sulfurique (95) a été étudiée en chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation. La figure 52 P. 130 montre les chromatogrammes obtenus à partir des fractions F_I native et hydrolysée et d'un témoin KDO (acide 3-O-deoxy-D-manno-octulosonique). Nous constatons la disparition du pic C et de la traînée située près de l'heptose, correspondant tous deux au KDO. Il est à noter que nous avons utilisé une sensibilité plus grande de l'appareil après l'apparition des monosaccharides neutres.

Après dosage doses neutres selon TILLMANN et PHILIPPI (72), la fraction aqueuse renferme 92 % de monosaccharides neutres

2.- Etude de la fraction lipidique

La fraction précipitante, de nature lipidique, a été analysée en chromatographie en phase gazeuse sur colonne de Carbowax 6000 après méthanolyse (Figure 53 P. 131)

Après avoir séché sous azote, le résidu est repris par de l'heptane. Nous avons identifié plusieurs acides gras et en particulier l'acide β -hydroxymyristique, spécifique des bactéries à gram négatif.

Les acides gras identifiés sont :

C_{12}° : acide laurique

C_{14}° : acide myristique

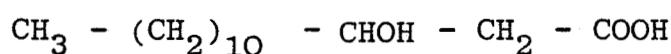
C_{16}° : acide palmitique

C_{16}^1 : acide palmitoléique

C_{18}° : acide stéarique

C_{18}^1 : acide oléique

acide β hydroxymyristique :



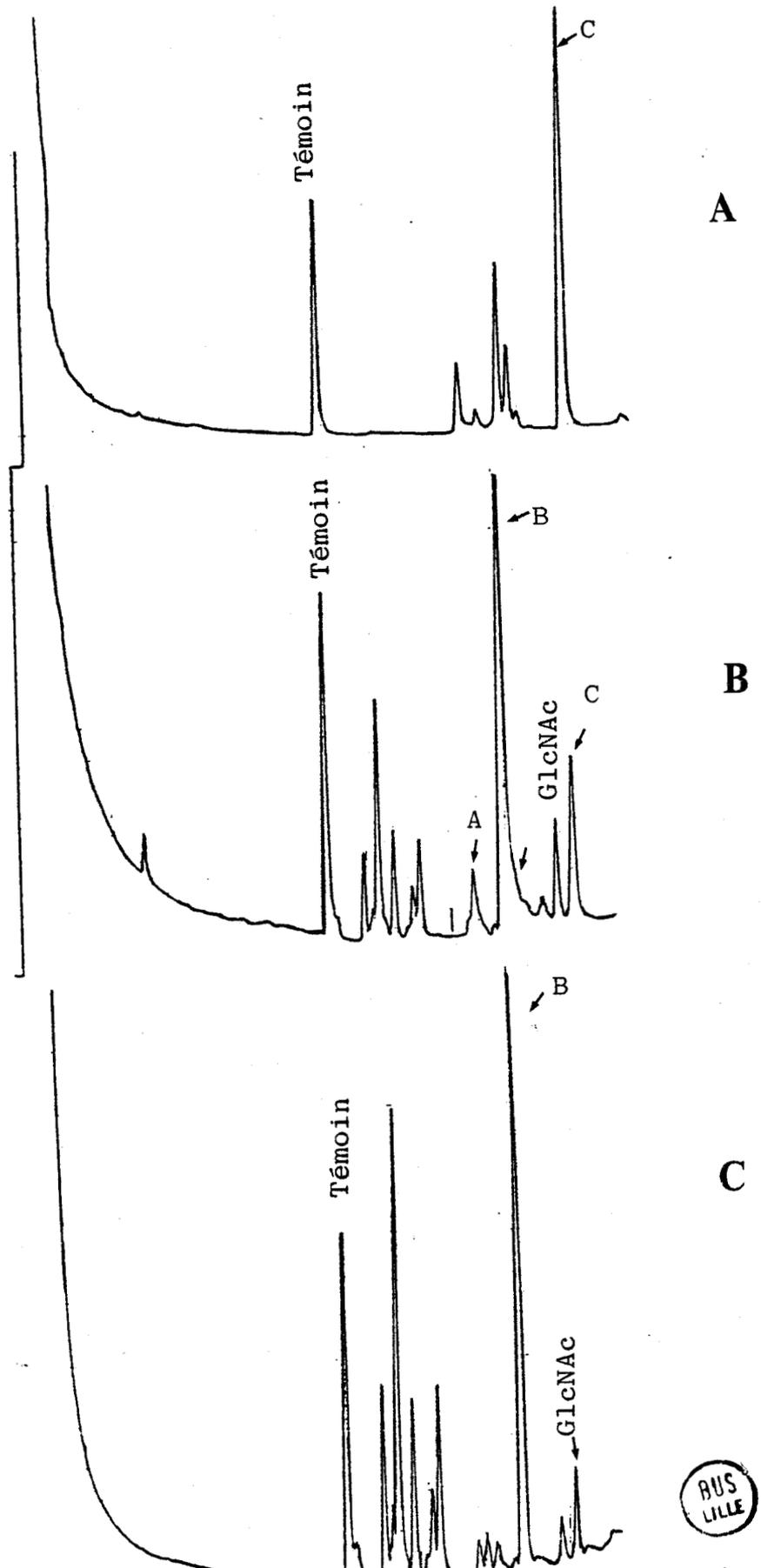


Figure 52 :

Chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycoside trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse ettrifluoroacétylation de l'acide 3-O-deoxy-octulonique (A) de la fraction F I native (B) et de la phase aqueuse isolée après une hydrolyse par l'acide acétique 1 % (C)
Colonne de verre (0.3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5 % sur Varaport 30 " mesh" 80-100 ; température programmée de 100 à 230°C à raison de 2°C/mn, sous un débit de gaz (azote) : 15 ml/mn.

BUS LILLE

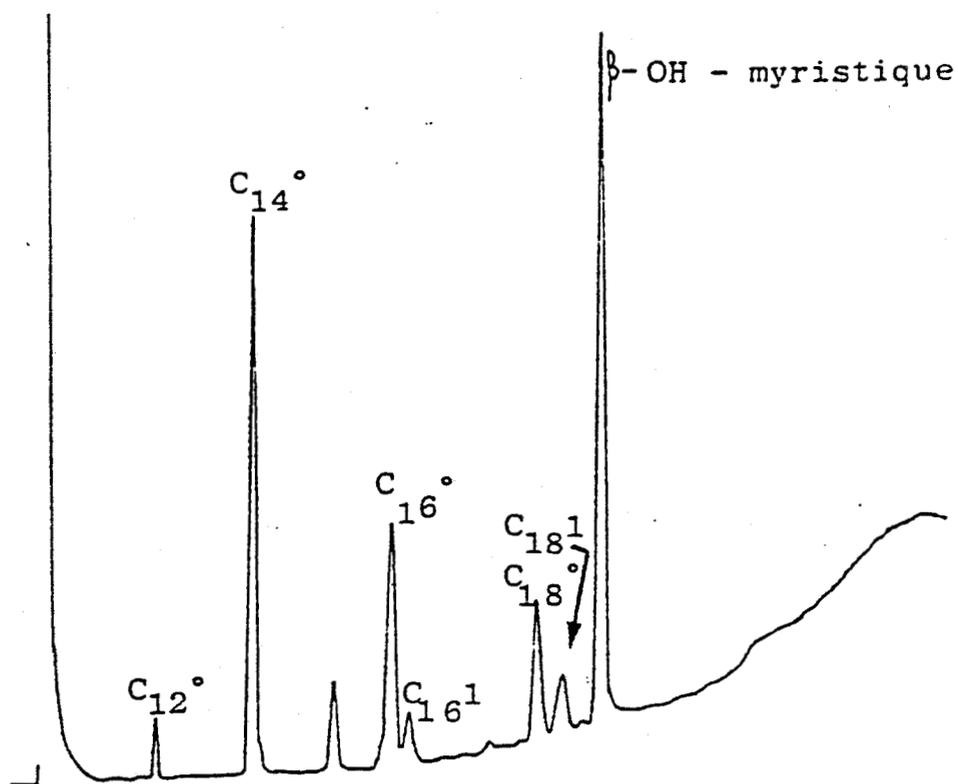


Figure 53

Chromatographie en phase gazeuse de la fraction lipidique méthanolysée, obtenue après hydrolyse par l'acide acétique 1 % de la fraction F_I

Colonne de Carbowax 6000, température programmée de 120°C à 200°C à raison de 4°C/mn sous un débit de gaz vecteur (azote) : 20 ml/mn.

Afin de confirmer, la présence d'acide β hydroxymyristique, la fraction lipidique méthanolysée a été étudiée en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La GLC-MS montre la présence des acides gras cités plus haut (C₁₂[°], C₁₄[°], C₁₆[°], C₁₆^¹, C₁₈[°], C₁₈^¹) plus un pic de temps de rétention identique au témoin β hydroxymyristique analysé dans les mêmes conditions. Le spectre de masse de cet ester méthylique confirme sa nature β hydroxymyristique sur la base du pic de masse m/e 25 correspondant à l'ion moléculaire. L'ion COOCH₃ - CH₂ - $\overset{+}{\underset{||}{\text{C}}}\text{H}$ est représenté par le pic de masse m/e 103 (Figure 54 P. 132) OH

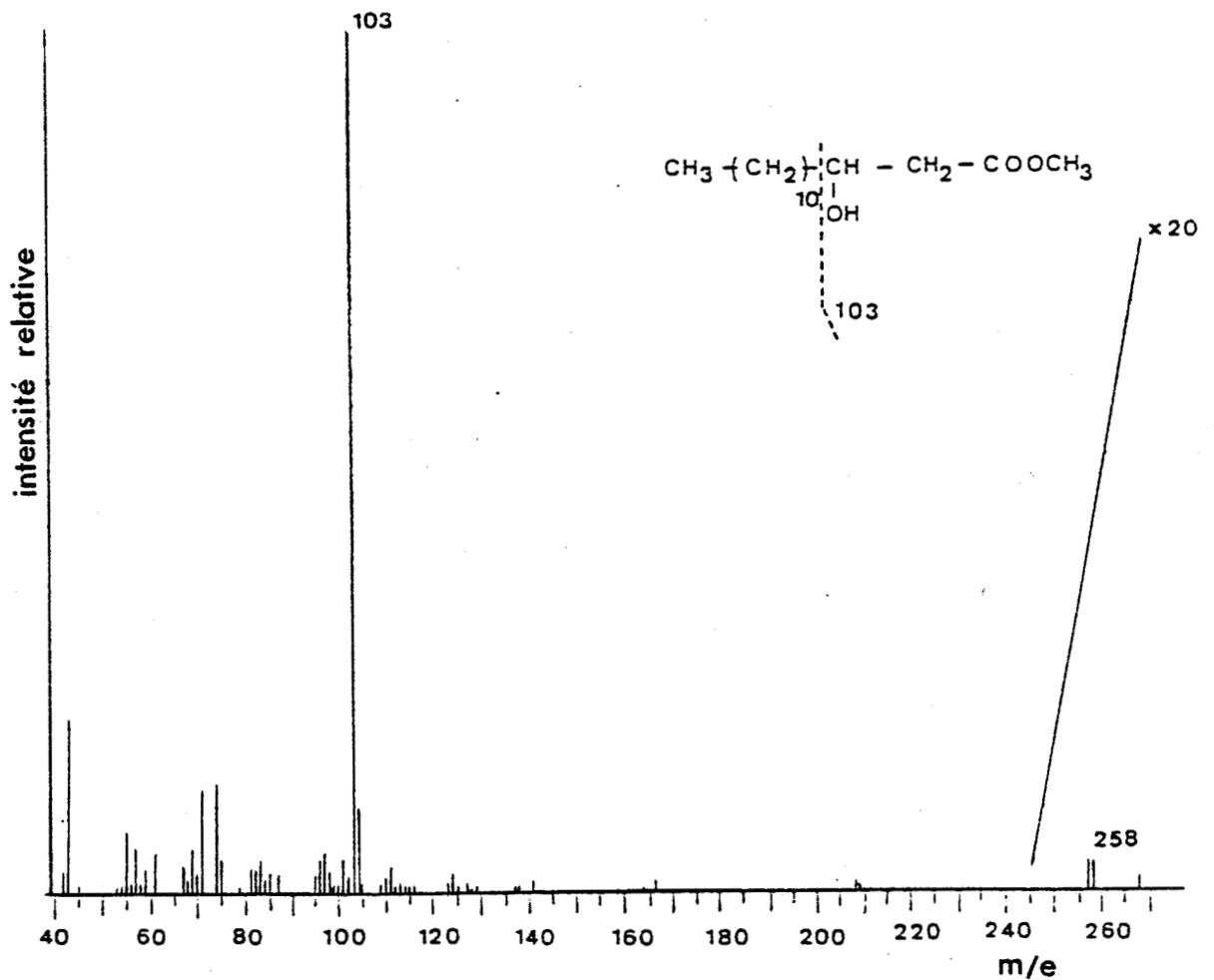


Figure 54

Spectre de masse de l'acide β -hydroxymyristique obtenu après hydrolyse de la fraction F_I par l'acide acétique 1 % et méthanolyse.

(analyse par couplage GLC-MS sur colonne SE 52, température programmée de 130 à 230°C à raison de 5°C/mn.)

BUS
LILLE

D.- Conclusion

La fraction FI , isolée par chromatographie sur Ultrogel AcA34 du surnageant S₁ possède une masse moléculaire apparente de 410 000 et est constituée de 39% de protéines, d'une fraction glucidique renfermant 35% d'oses neutres (galactose , glucose) 3,5% d'osamines, 4% d'heptose et 1% de KDO (acide -2-ceto-3-deoxy-octulosonique). En outre , elle renferme une fraction lipidique caractérisée par la présence d'acide β -hydroxymyristique .

L'application des techniques d'investigation des lipopolysaccharides (hydrolyse partielle) et des séquences glucidiques (méthylation , oxydation periodique , oxydation chromique , spectrométrie de masse , résonance magnétique nucléaire) permet de donner en hypothèse la structure glucidique de la fraction FI , illustrée dans la figure 55P.134.

1°- L'antigène O détaché par hydrolyse par l'acide acétique 1% du FI est constitué d'unités de répétition pentasaccharidiques formées de 4 résidus de galactose pour 1 résidu de glucose . L'étude de la masse moléculaire de ce fragment (10 000) effectuée par gel filtration sur colonne d'Agarose A-0.5M permet de fixer à 12 le nombre d'unités de répétition .

2°- Cette fraction oligosaccharidique est condensée au Core constitué d'heptose et de KDO .

3°- La fraction FI se termine par le lipide A , constitué d'osamines acylées par des résidus d'acides gras parmi lesquels l'acide β -hydroxymyristique . Le lipide A est conjugué à une protéine par une liaison dont la structure devra être identifiée.

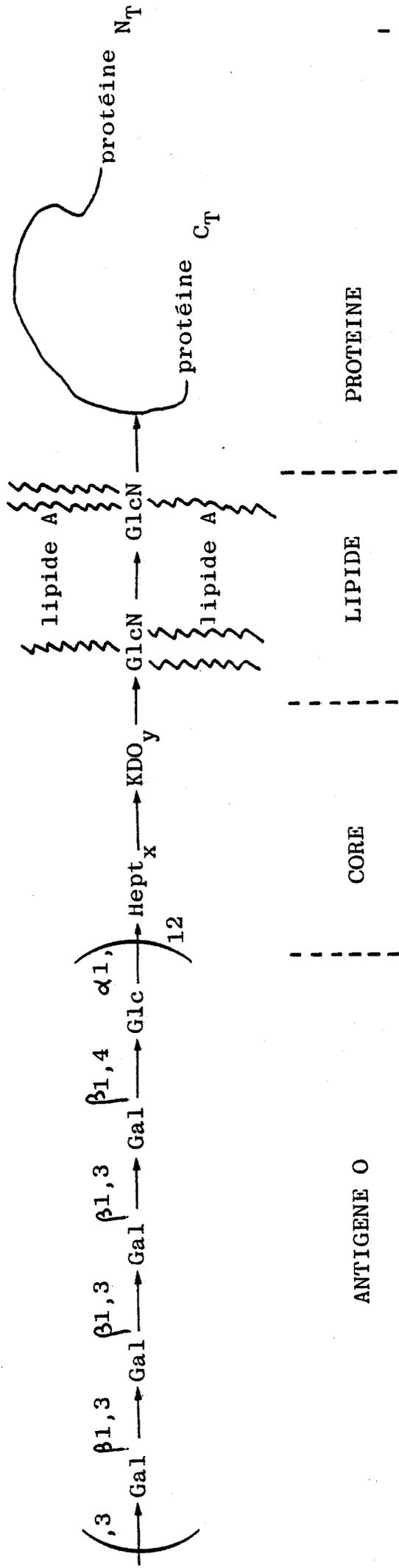


Figure 55 : Hypothèse de structure de la fraction FI .



ETUDES IMMUNOLOGIQUES

Les études immunologiques du principe actif et des deux fractions P₁ et FI ont été réalisées au Centre de Recherches Roussel-Uclaf, Unité d'Immunologie des Laboratoires CASSENNE à Osny.

I.- ETUDE DU PRINCIPE ACTIF

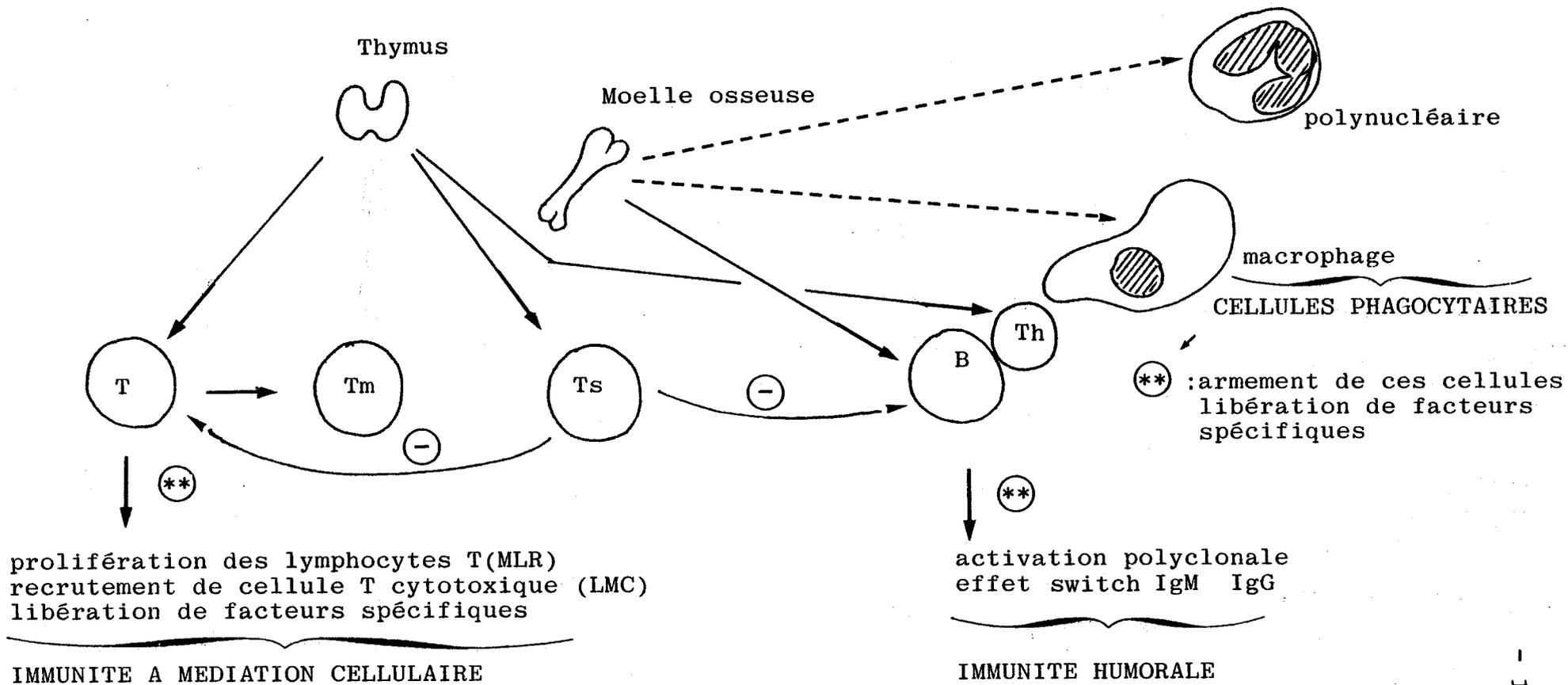
- * Le principe actif est un immunomodulateur aux nombreux points d'impact (Figure 56P.136)
 - Il agit sur la première ligne de défense de l'organisme que forment macrophages et polynucléaires.
 - Il augmente la réponse anticorps spécifiques d'antigène immunisants, par la potentiation des coopérations et recrutement lymphocytaire B et T. En favorisant l'effet switch IgM-IgG, il facilite la réponse secondaire à l'antigène et accentue son intensité.
 - Il augmente l'immunité à médiation cellulaire en terme de réaction lymphocytaire mixte (MLR), de lympholyse à médiation cellulaire (LMC) et de cytotoxicité antitumorale NK (96,97).
 - Il protège les animaux d'expérience contre diverses infections: bactériennes (98) (germes à développement extra et intracellulaire), virales (99) et fongiques (100).

A.- Cellules phagocytaires

La présence d'un élément étranger dans l'organisme fait intervenir plusieurs phénomènes :

1.- le chimiotactisme des phagocytes

Le phagocyte est attiré par les substances chimiotactiques secrétées sous l'influence de bactéries. L'étude de l'effet chimiotactique d'une substance fait en général appel à la technique de la chambre de Boyden. Son principe consiste en une membrane de filtration délimitant deux compartiments dont l'un, supérieur, héberge les polynucléaires tandis que l'autre, inférieur, contient le principe actif dissous dans un milieu de culture approprié.



BUSS
ELLE

Figure 56 : Points d'impact du principe actif .

T:lymphocytes T;Tm:lymphocytes T mémoire;Ts:lymphocytes T supprimeurs;
B:lymphocytes B;Th:lymphocytes T helper; (**):principe actif

In vitro, le principe actif favorise une augmentation significative du passage des polynucléaires à travers les pores de la membrane de filtration et attribue ce phénomène à l'activation de différents facteurs chimiotactiques (101).

Administré *in vivo*, en aérosol pendant cinq jours, il provoque une augmentation significative du nombre de macrophages alvéolaires de souris (102).

2.- La phagocytose du microorganisme

*La particule, inerte ou vivante, pénètre à l'intérieur des phagocytes. Cette ingestion est associée à une invagination de la membrane du phagocyte au sein de laquelle se trouve la particule ingérée. Puis, peu à peu, l'invagination se fait vacuole ou phagosome .

In vitro, l'incorporation de glucosamine marquée au C^{14} , est augmentée par des macrophages de cobaye stimulés par le principe actif (adjonction de principe actif dans le milieu de culture) (96).

L'englobement de microorganismes marqués (Klebsielles marquées au C^{14}) sur des polynucléaires d'un lot de chiens Beagle ayant reçu le principe actif en injection unique sous-cutanée de 5mcg/Kg de poids, a montré une stimulation de l'englobement des Klebsielles marquées (103). Des souris, ayant reçu le principe actif et recevant une suspension colloïdale de carbone par voie intra-veineuse présentent une épuration significative du carbone circulant par rapport au lot témoin. Ceci montre l'activation des cellules du système réticulo-endothélial, en particulier des macrophages vis-à-vis de cellules étrangères (104).

Les activités métaboliques tueuses des phagocytes peuvent être mises en évidence par la génération de métabolites O_2 tels que les ions superoxydes ou le peroxyde d'hydrogène qui sont dosés par chimioluminescence. A l'état normal, les cellules libèrent peu ou pas d'ions superoxydes, lesquels sont toxiques pour la cellule. Lors de la stimulation, *in vitro*, par le principe actif, les cellules phagocytaires (polynucléaires d'un lot de chiens Beagle ou de macrophages péritonéaux de rats) génèrent des ions superoxydes.

La stimulation, *in vivo*, de ces phagocytes a été observée chez le chien, le rat et l'homme.

- a.- stimulation des polynucléaires d'un lot de chiens Beagle traités par voie orale à une dose de 3 mg par jour pendant 7 jours.
- b.- stimulation des cellules phagocytaires broncho-alvéolaires de rats traités par voie orale à une dose de 10 mg/Kg pendant 5 jours.
- c.- stimulation des polynucléaires humains après administration orale de 8 mg/Kg de principe actif pendant 7 jours

B.- Immunité humorale

Un antigène , présent dans un organisme , est capté par les phagocytes , lesquels le présentent aux lymphocytes T. Ces derniers informent les lymphocytes B qui se différencient en plasmocytes secrétant des anticorps. Dans un premier temps, des anticorps de faible affinité envers l'antigène sont synthétisés (IgA-IgM). Dans un second temps, en général à la suite d'une seconde stimulation antigénique (lors d'un rappel), le plasmocyte effectuera le switch ou commutation et secrétera des anticorps IgG d'affinité supérieure envers l'antigène et de durée de vie plus grande.

*Le pockweed mitogen (PWM) , activateur polyclonal entraîne une prolifération lymphoblastique des lymphocytes B (sécrétion d'IgA et IgM) comparable à celle qu'induit un antigène . *In vitro* , l'effet du principe actif sur la prolifération lymphoblastique en présence de PMW entraîne une augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée marqueur de la multiplication lymphoblastique. L'augmentation de l'activité polyclonale des lymphocytes B a été objectivée par une culture de ceux-ci en présence du principe actif seul(97).

*Le principe actif accélère la maturation des lymphocytes en plasmoblastes. *In vitro* , en présence de mannane de *Candida albicans* et de principe actif, il a été montré une maturation plasmocytaire accompagnée d'une synthèse préférentielle de plasmocytes à IgG expliquant ainsi l'effet switch IgM en IgG induit par la substance active.

De même, *in vivo*, chez la souris immunisée par des globules rouges de mouton (GRM), l'effet adjuvant du principe actif a été démontré par le test des plages de lyse. Il augmente significativement la synthèse d'anticorps spécifiques en réponse primaire mais surtout en en réponse secondaire (augmentation des plages à IgG) confirmant l'effet switch *in vivo* (104). L'effet adjuvant sur l'immunité humorale a été démontré pour d'autres antigènes T dépendants (ovalbumine) (96) et pour des antigènes T indépendants (TNPPAA) (106).

C.- Immunité à médiation cellulaire :

- * En présence d'un antigène, les cellules T prolifèrent et se différencient en :
 - lymphocytes T "tueurs" capables de tuer eux-mêmes
 - lymphocytes T mémoire
 - cellules T helpers et cellules T suppressives qui équilibrent la synthèse d'anticorps.
- * *in vitro*, le principe actif augmente significativement la prolifération lymphoblastique de lymphocytes de souris en présence de lymphocytes irradiés (réaction à médiation cellulaire : MLR) (107). Les cellules-filles provenant de la prolifération lymphoblastique de lymphocytes T ont appris à reconnaître la cellule étrangère (cellule irradiée) durant la réaction à médiation cellulaire. L'étape suivante se traduit par une cytotoxicité à l'égard des mêmes cellules étrangères, dans ce cas non irradiées mais marquées au chrome 51 (lympholyse à médiation cellulaire : LMC). Le rechargement du chrome 51, témoin de la lyse de cellules cibles, est beaucoup plus importante chez les cellules stimulées par le principe actif par rapport aux cellules témoins.
- * *in vivo*, le reflet assez fidèle de l'immunité à médiation cellulaire est la réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) (108). Le cobaye est sensibilisé par voie intraplantaire à l'ovalbumine en présence du principe actif sans aucun adjuvant.

4 et 7 semaines plus tard, la révélation par une injection d'ovalbumine par voie sous-cutanée, sur le dos de l'animal, révèle une augmentation très importante de la réponse d'HSR chez les animaux ayant reçu le principe actif (Tableau XXVP.147).

D.- Infections expérimentales

Le traitement préventif de souris par le principe actif à des doses de 0,1 à 50 mg/Kg par voie intrapéritonéale ou intraveineuse s'est révélé efficace contre des infections à germes à développement intracellulaire ou extracellulaire, des virus et des champignons.

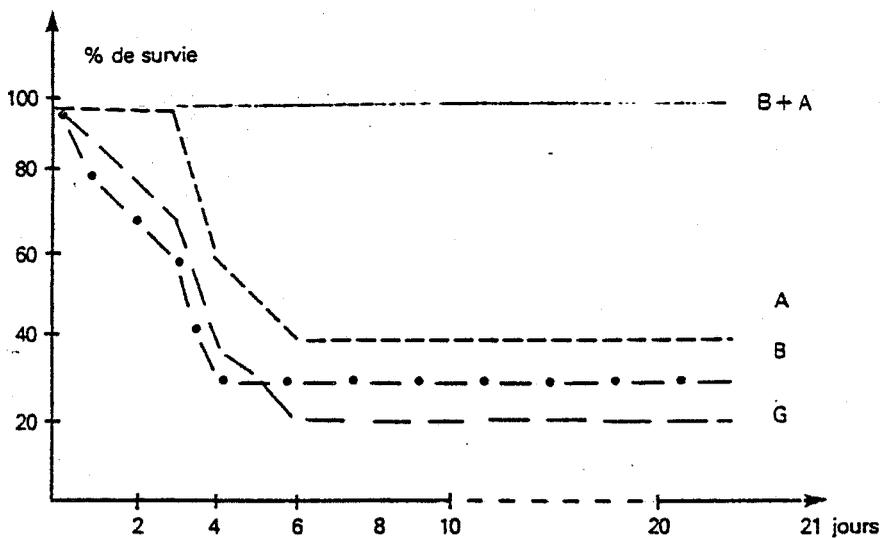
Une protection (30 % de survie) à l'égard de bactérie à développement intracellulaire (*Listeria monocytogenes*) a été mise en évidence lors d'un traitement par voie orale du principe actif à des doses quotidiennes de 150 mg/Kg pendant 5 jours.

Lors d'une infection à *Staphylococcus aureus* (germe à développement extracellulaire), l'administration du principe actif par voie intrapéritonéale de 50 mcg/Kg s'est révélée inefficace.

Dans ces deux modèles, l'association avec l'ampicilline protège mieux les animaux infectés.

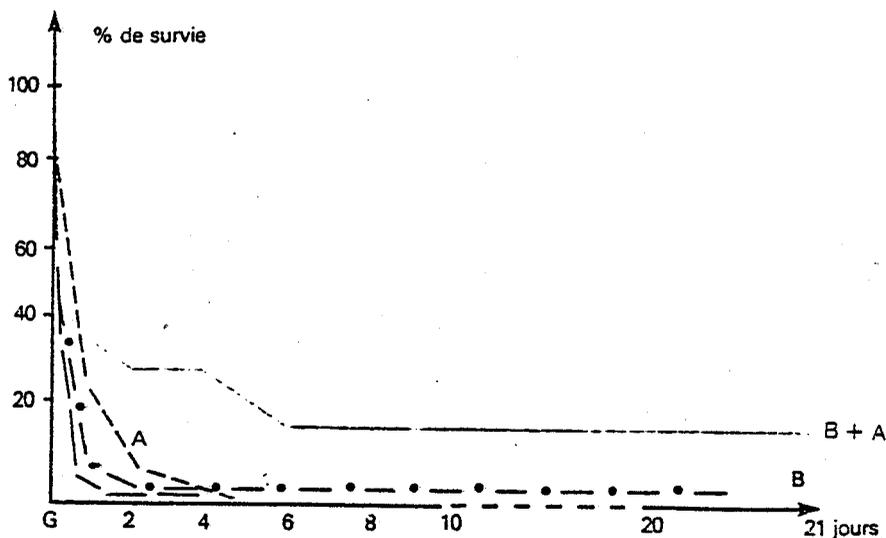
L'association principe actif (150 mg/Kg par voie orale pendant 5 jours) - ampicilline (150 mg per os le 5ème jour) protège à 100 % les animaux infectés par *Listeria monocytogenes* (Figure 57P.141).

L'association aux doses inefficaces de principe actif (50 mcg/Kg par voie intrapéritonéale) et d'ampicilline (3 mg/Kg par voie intrapéritonéale) protège 50% des animaux infectés par *Staphylococcus aureus* (Figure 58P.141). Ces faits expérimentaux démontrés pour d'autres antibiotiques (Streptomycine) et d'autres types d'infection (Streptocoques) montrent qu'il y a un effet synergique de l'immunostimulant et de l'antibiotique (109).



G = *Listeria monocytogenes* Jo
 A = ampicilline per os 150 mg Jo
 B = principe actif per os 150 mg/Kg J₋₄ à Jo
 B + A = principe actif per os + ampicilline per os
 N = 10
 % de survie $p < 0.01$ (χ^2)
 TMS $p < 0.05$ (Mann et withney)

Figure 57 : Effet synergique de l'association du principe actif (per os) et de l'ampicilline per os sur l'infection expérimentale à *Listeria monocytogenes*.



G = *Staphylococcus aureus* Jo
 A = ampicilline IP 3 mg/Kg Jo
 B = principe actif per os 1 mcg/Kg J₋₄ à Jo
 B + A = ampicilline IP + principe actif per os
 N = 30
 % de survie $p = 0.06$ (χ^2)
 TMS $p < 0.01$ (t de Student)



Figure 58 : Effet synergique de l'association du principe actif per os et de l'ampicilline sur l'infection expérimentale à *Staphylocoque aureus*.

Afin de différencier les activités biologiques des fractions P₁ et FI, les modèles suivants ont été choisis :

- 1.- activation des fonctions phagocytaires (génération d'ions superoxydes, production enzymatique).
- 2.- hypersensibilité retardée : reflet de l'activation de l'immunité à médiation cellulaire
- 3.- infection à *Klebsiella pneumoniae*.

II.- ACTIVITE DES FRACTIONS P₁ ET FI

A.- Cellules phagocytaires

Des travaux récents (110) ont permis de mettre en évidence la fraction active dans le test de la phagocytose.

La stimulation, *in vivo*, des phagocytes mononucléaires de souris a été évaluée d'une part après sécrétion enzymatique (β -glucuronidase) et d'autre part après réponse de chimioluminescence exprimant le métabolisme oxydatif.

Dans ce modèle, la fraction P₁ est la moins active. Par contre, l'activité de la fraction FI est supérieure à celle du principe actif (Figures 59 et 60 P.145, 146).

B.- Hypersensibilité retardée à l'ovalbumine

Le protocole est décrit page 140. Après 28 jours, les animaux traités par le principe actif et la fraction FI révèlent la même réponse d'HSR.

Par contre, après 49 jours, les animaux traités par la fraction FI ont une augmentation supérieure de la réponse par rapport aux animaux traités par le principe actif (Tableau XXVP.147). Dans ce test, seuls le principe actif et la fraction FI sont susceptibles de stimuler une immunité à médiation cellulaire en absence de tout autre adjuvant.

C.- Infection à *Klebsiella pneumoniae*

Les capacités protectrices des fractions P₁ et FI ont été explorées dans l'infection à *Klebsiella pneumoniae* (111).

Le produit est administré sous 0,5 ml, par voie intrapéritonéale, à des lots de 10 souris Swiss de 18-20g,, 6 jours et quarante huit heures avant l'infection. Les animaux reçoivent alors une suspension de germes correspondant à un certain nombre de doses léthales cinquante pour cent de *Klebsiella pneumoniae* sérotype 2, par voie intrapéritonéale. L'effet protecteur est défini par le pourcentage d'animaux survivants au sixième jour après l'infection.

Nous constatons une meilleure protection des animaux avec la fraction précipitante P₁ (Tableau XXVIP.148). A la dose de 10 mcg/Kg de principe actif, de fractions P₁ ou FI, 50 %, 86 % et 10 % respectivement des animaux sont protégés.

TABLEAU XXIV

Protection antibactérienne d'une infection à *Klebsiella pneumoniae* à 5000 DL 50

	1 mcg/Kg	10 mcg/Kg
Principe actif	36 %	50 %
Fraction P ₁	56 %	86 %
Fraction FI	10 %	10 %

Il était intéressant de connaître la partie active de la molécule P₁. Pour cela, les résidus d'acides uroniques ont été transformés en leurs hexoses correspondants. La fraction ainsi réduite ne protège plus les animaux contre une infection à *Klebsiella pneumoniae* (Figure 61P.149). Il semblerait donc que les résidus d'acides uroniques sont indispensables à l'activité protectrice.

III.- ORIGINE DES FRACTIONS P₁ ET FI

Les propriétés antigéniques ont été explorées en Ouchterlony (112) à l'aide d'antisérums dirigés contre divers antigènes somatiques et capsulaires de *Klebsiella pneumoniae* (Figure 62P.150).

L'origine des différentes fractions est déterminée après examen des arcs de précipitation. Le principe actif et ses fractions P₁ et FI précipitent avec l'antigène O₁K₂, tandis que O₁K₁₈ ne précipite pas la fraction P₁.

Il semble donc que la fraction P₁ porte les déterminants antigéniques K₂ et que la fraction FI exprime l'antigène somatique O₁.

IV.- CONCLUSION

Des essais comparatifs avec les fractions P₁ et FI ont permis de différencier leurs propres activités.

La fraction P₁ est responsable de l'activité anti-bactérienne spécifique du principe actif. Par contre, la fraction FI active les cellules phagocytaires et stimule l'immunité à médiation cellulaire dans la mesure où elle augmente les réactions d'hypersensibilité retardée à l'ovalbumine.

L'origine de ces deux fractions, démontrée par Ouchterlony a permis de définir la nature capsulaire de la fraction P₁ et la nature somatique de la fraction FI.

Dans ces trois modèles expérimentaux (activation des cellules phagocytaires, hypersensibilité retardée à l'ovalbumine, infection à *Klebsiella pneumoniae*), le principe actif s'est révélé être efficace. Les activités complémentaires des fractions P₁ et FI sont ainsi exprimées dans le principe actif.

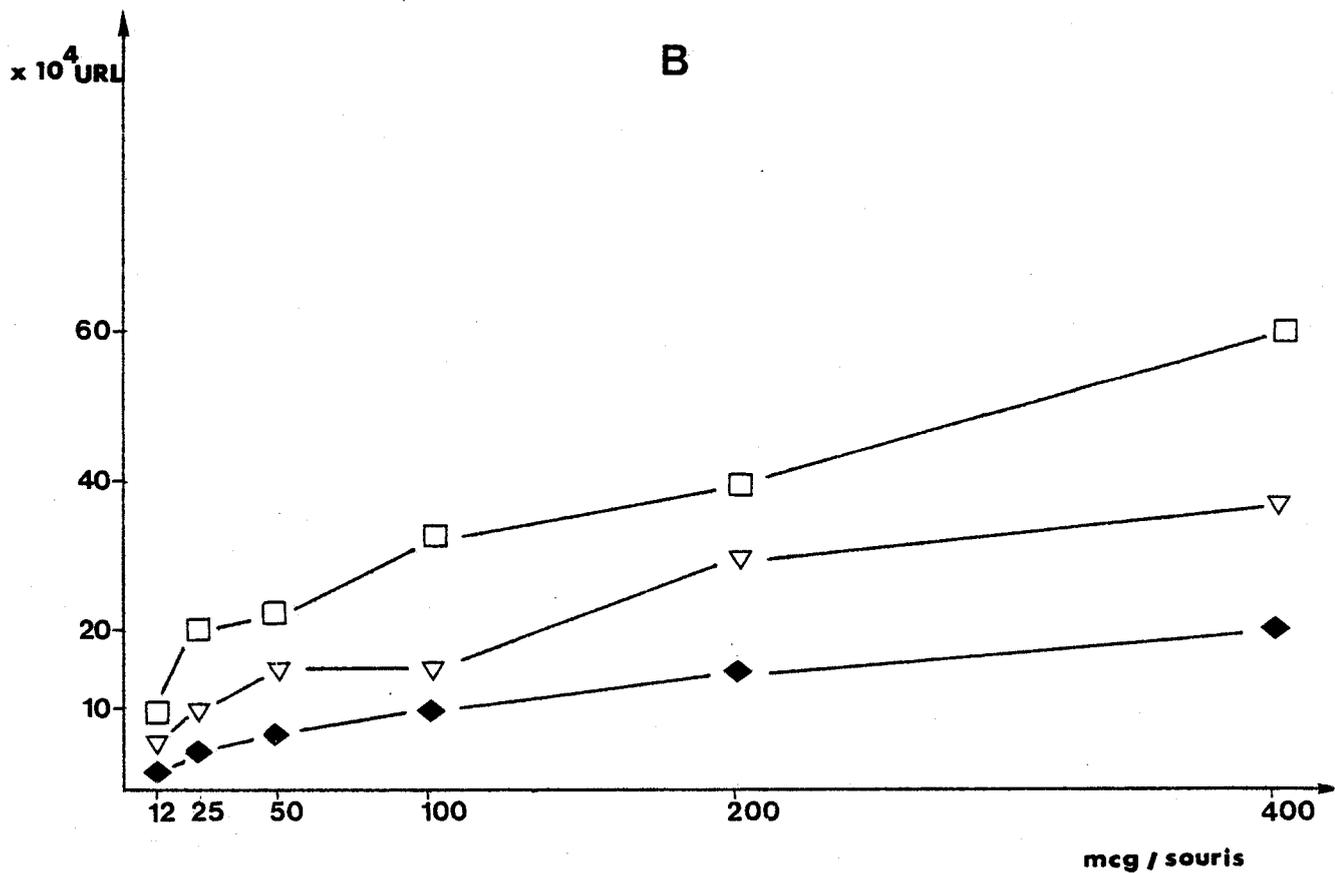
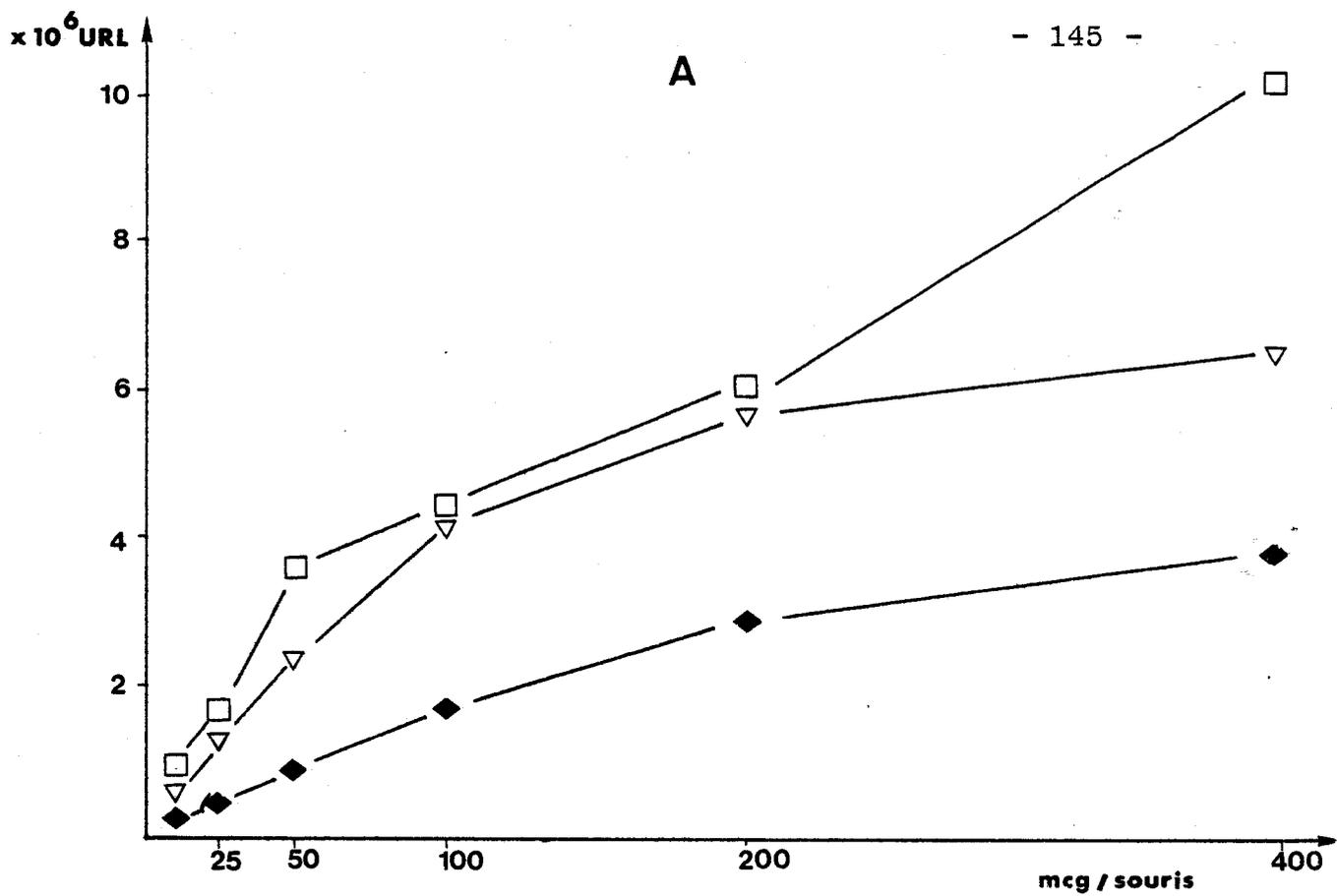


Figure 59 : Réponse de chimioluminescence après stimulation *in vivo* par voies intrapéritonéale (A) et intraveineuse (B), de macrophages de souris.

- Fraction FI
- ▽-▽ Principe actif
- ◆-◆ Fraction P₁

BUS
LILLE

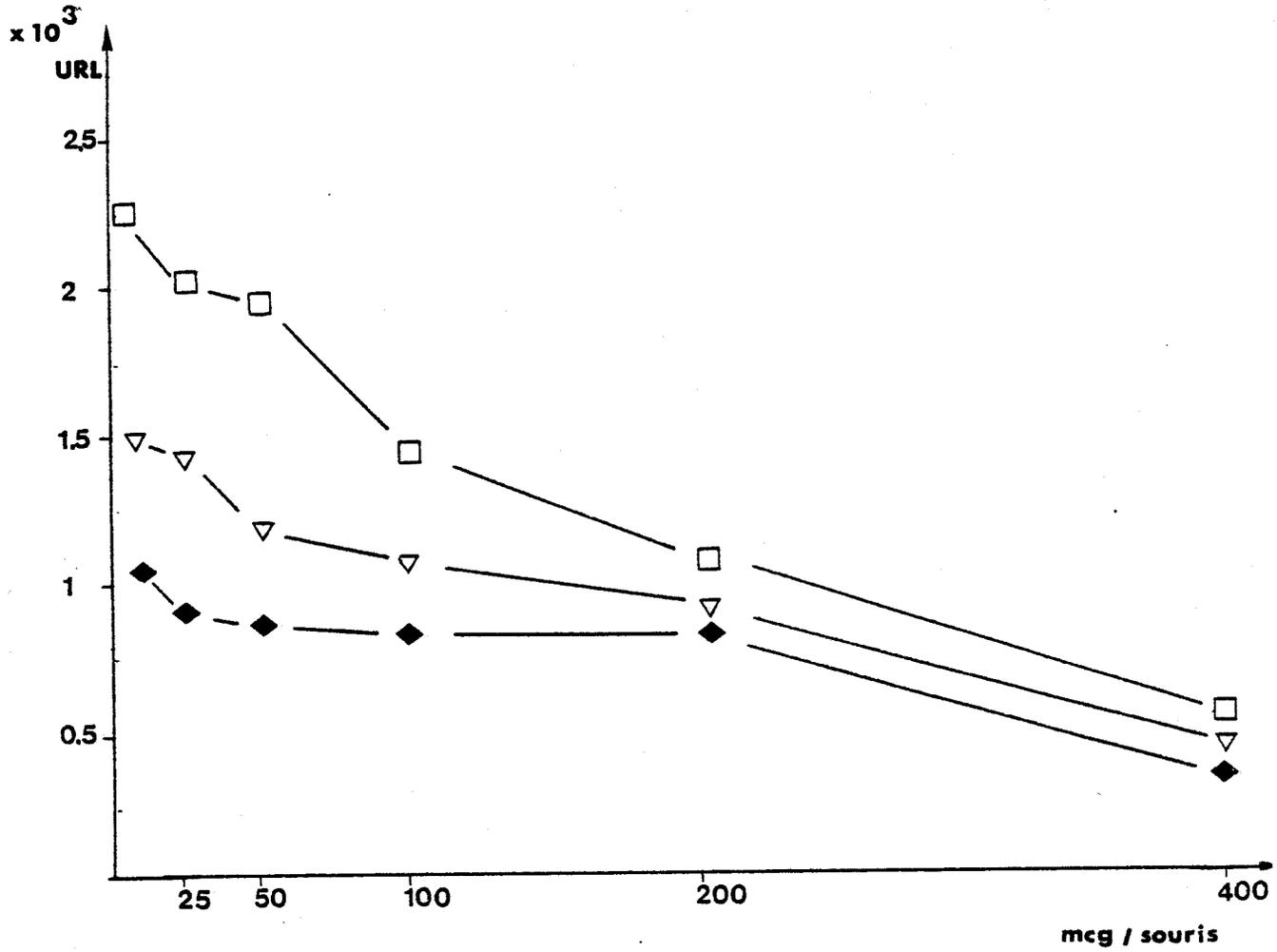


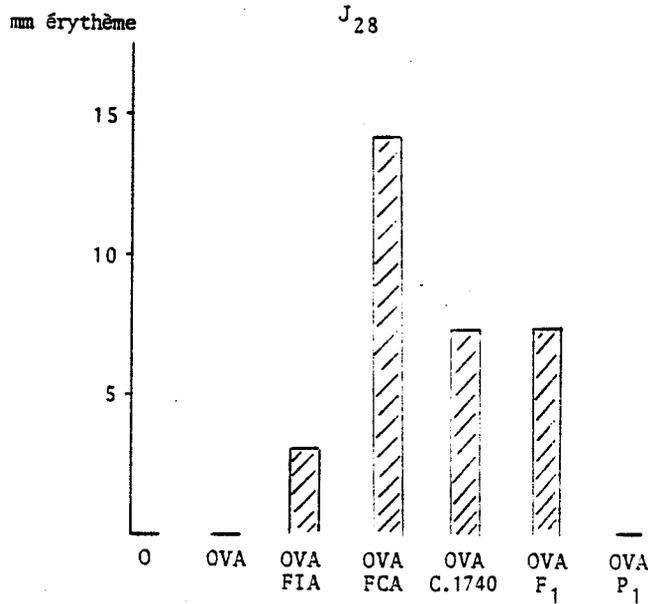
Figure 60 : Secrétion enzymatique lors de la stimulation de phagocytes mononucléaires in vivo par voie intraveineuse (β -glucuronidase).

- ◆-◆ Fraction P₁
- ▽-▽ Principe actif
- Fraction FI



TABLEAU XXV

Hypersensibilité retardée à l'ovalbumine chez le cobaye.



Test de MANN et WHITNEY

Groupes :

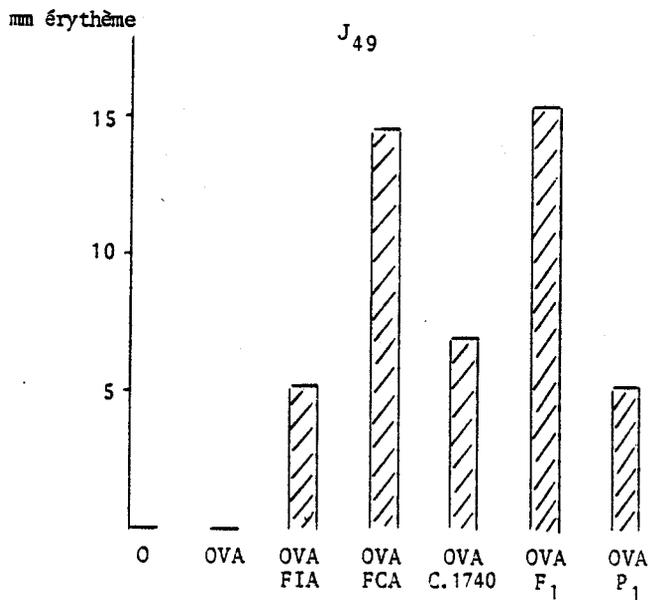
OVA }
OVA + C.1740 } P = 0,03

OVA }
OVA + F₁ } P = 0,03

OVA }
OVA + FCA } P = 0,001

OVA + C.1740 }
OVA + FCA } N.S.

OVA + F₁ }
OVA + FCA } N.S.



Groupes :

OVA }
OVA + C.1740 } P = 0,02

OVA }
OVA + F₁ } P = 0,002

OVA }
OVA + P₁ } N.S.

OVA }
OVA + FCA } P = 0,002

OVA + C.1740 }
OVA + FCA } P = 0,008

OVA + F₁ }
OVA + FCA } N.S.



TABLEAU XXVI

Activité anti-bactérienne du principe actif
et de la fraction P₁

	Souris non traitées	Souris traitées par le principe actif		Souris traitées par la fraction précipitante P ₁			
		1mcg/Kg	10mcg/Kg	100mcg/Kg	1mcg/Kg	10mcg/kg	100mcg/Kg
Nombre de souris mortes	80	45	30	17	26	7	8
Nombre de souris survivantes	0	25	30	23	34	43	32
Total	80	70	60	40	60	50	40
Moyenne du pourcentage de protection	0	36	50	58	56	86	80



$P \leq 0.001$ comparaison avec les témoins
(test du χ^2)

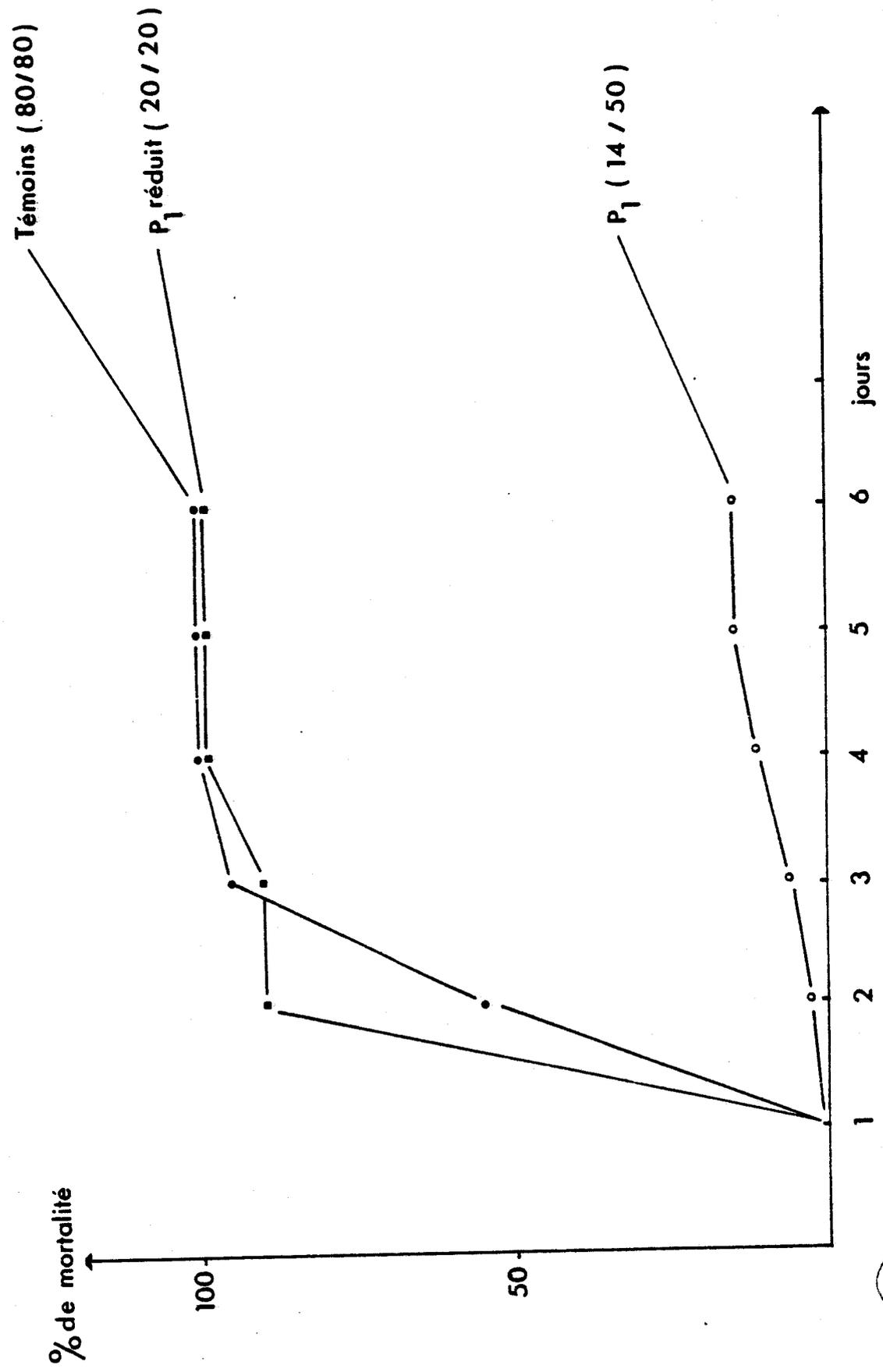
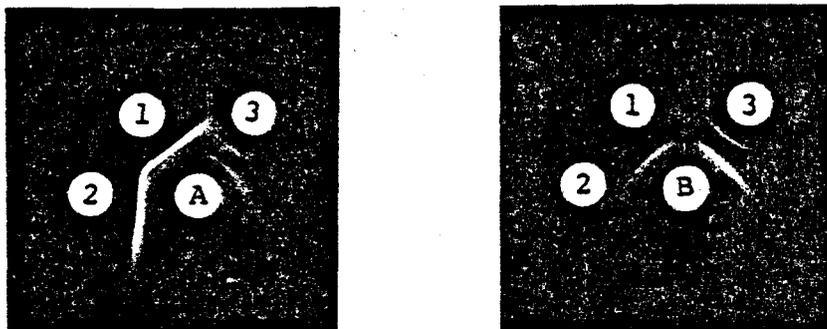
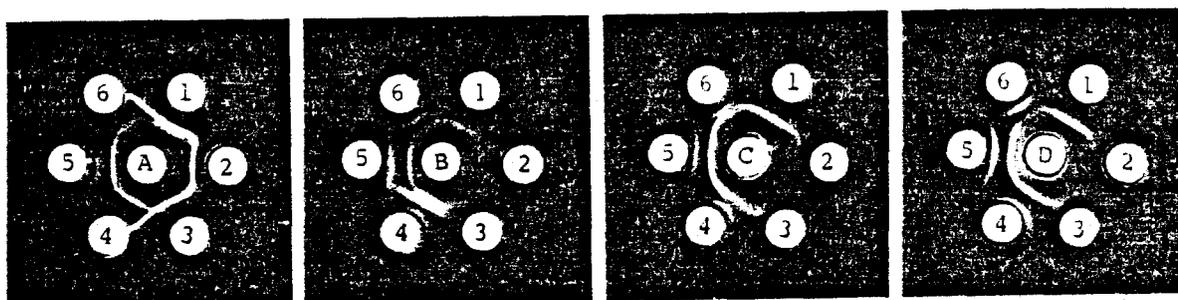


Figure 61 : Relation structure-activité lors de la protection antibactérienne avec la fraction P₁.



A: Anti-Klebsiella K2 strain B5055 (O1:K2) serum
B: Anti-Klebsiella K18 strain 1754/49 (O1:K18) serum
1: C-1740; 2: P1 fraction; 3: F1 fraction



A: Anti-Klebsiella K2 strain B5055 (O1:K2) serum
B: Anti-Klebsiella K1 strain A5054 (O1:K1) serum
C: Anti-Klebsiella K10 strain 919 (O1:K10) serum
D: Anti-Klebsiella K18 strain 1754/49 (O1:K18) serum

- 1: C-1740
- 2: K2 antigen from Klebsiella K2 strain B5055
- 3: P1 fraction
- 4: O1 antigen from Klebsiella K1 strain 121
- 5: F1 fraction
- 6: O1 antigen from the noncapsulated mutant of Klebsiella K2 strain Chedid



Figure 62 : Technique d'Ouchterlony (anti-sérums dirigés contre divers antigènes somatiques et capsulaires de *Klebsiella pneumoniae*).

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'étude d'un extrait bactérien isolé de *Klebsiella pneumoniae* sérotype 2 et doué d'activité immunomodulatrice sont les suivantes :

1 - Nous avons étudié la composition biochimique du principe actif natif . Cet extrait est constitué de 26% de protéines , 50% de monosaccharides neutres répartis en galactose , glucose , mannose dans les rapports molaires 0.5 / 1 / 0.3 , 8,76% d'acides uroniques et 1,23% de N-acétylglucosamine . Cette fraction est hétérogène par ultracentrifugation .

2 - Le principe actif est un immunomodulateur qui :

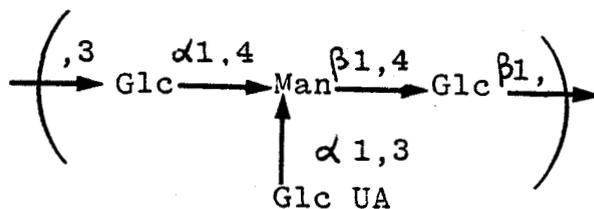
- agit au niveau des macrophages et polynucléaires .
- augmente la réponse d'anticorps spécifiques d'antigènes immunisants . Il favorise l'effet "Switch" IgM → IgG et facilite la réponse secondaire .
- augmente l'immunité à médiation cellulaire
- protège les animaux d'expérience contre diverses infections .

3 - La présence dans l'extrait bactérien total d'une concentration importante d'acide uronique (8,76%) nous a conduit à précipiter sélectivement le polymère acide présent dans le principe actif à l'aide d'ions ammonium quaternaires tels que le "cetavlon" (bromure de cétyle-triméthylammonium) . Cette technique nous a conduit à l'obtention de deux fractions la fraction précipitante P₁ , homogène , douée de l'activité anti-bactérienne et une fraction surnageante , hétérogène , et ayant des propriétés immunostimulantes .

4 - La fraction précipitante P₁ homogène. a été étudiée du point de vue de sa structure et de son activité .

a - Elle est constituée de 19% de protéine riches en acides aminés acides (totalemt dépourvue de cystéine) . de 69% de monosaccharides neutres (glucose et mannose) , de 18,2% d'acide glucuronique ,0,76% de N-acétyl-glucosamine .La fraction glucidique est caractérisée , en outre , par la présence d'acide aldobiouronique dont la structure (GlcUA $\xrightarrow{1,3}$ Man) a pu être déterminée à l'aide de techniques classiques d'investigation des oligosaccharides .

b - L'application des techniques d'étude de la structure des polysaccharides : perméthylation et spectrométrie de masse ,dégradation uronique ,réduction des acides uroniques , oxydation periodique et chromique , nous a permis d'identifier,dans la fraction glucidique du précipité P₁ , une structure tétrasaccharidique de répétition :



Cette structure est identique à celle mise en évidence par GAHAN et al. (88) à partir du polysaccharide capsulaire .

c - La fraction précipitante P₁ se différencie du polysaccharide capsulaire par la présence d'une protéine et par la mise en évidence dans la copule glucidique de résidus de N-acétylglucosamine (0,76%) . Des études de détermination des points d'attache des glycoprotéines (hydrolyse pronasique , hydrolyse fluorhydrique , rupture sodique en milieu réducteur) nous permettent de dire que la fraction polysaccharidique est conjuguée à la protéine par une liaison de type asparaginyglucosamine . Compte tenu , du pourcentage de N-acétylglucosamine (0,76%), de la masse moléculaire de la glycoprotéine (95500), le nombre de résidus de glucosamine est compris entre 3 et 4 . Sur la base de nos connaissances de la structure des glycoconjugués , le nombre de chaînes glucidiques conjuguées à la protéine par l'intermédiaire d'un chaînon di-N-acétylchitobiose serait de 1 à 2 . Dans le premier cas , la fraction glycannique serait constituée de 120 unités de répétition tétrasaccharidiques, dans le second cas, on peut admettre la présence de deux chaînes à 60 unités de répétition tétrasaccharidiques . C'est à notre connaissance la première démonstration de la présence de glycoprotéine chez les procaryotes .

5 - Cette glycoprotéine est d'origine capsulaire . En effet les propriétés antigéniques explorées par la technique d'Ouchterlony à l'aide d'antisérums dirigés contre divers antigènes somatiques et capsulaires de *Klebsiella pneumoniae* ont montré une parfaite identité entre la glycoprotéine P₁ et les antigènes capsulaires de *Klebsiella pneumoniae* sérotype 2 .

6 - La fraction précipitante P₁ est responsable de l'activité antibactérienne (infection à *Klebsiella pneumoniae*) spécifique du principe actif .La glycoprotéine P₁ native , réduite spécifiquement au niveau des résidus d'acides uroniques , la glycoprotéine débarrassée de ses résidus d'acides uroniques (expérience de dégradation uronique et le polysaccharide obtenu par hydrazinolyse de la glycoprotéine , ont été étudiés dans la protection à *Klebsiella pneumoniae* . Seule la glycoprotéine native est douée de cette activité . Les résidus d'acides uroniques de la chaîne glycanique jouent un rôle prépondérant dans l'expression de cette activité . L'activité antibactérienne de la fraction précipitante vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* serait due en grande partie à l'action d'anticorps spécifiques . En effet, GEYER et al. (113) ont montré que le tétrasaccharide , l'octo et le dodecasaccharide isolés de la même bactérie (*Klebsiella pneumoniae* sérotype 2) après hydrolyse à l'aide d'une glycanase , couplée à une protéine (edestine) étaient capables d'induire la formation d'anticorps chez le lapin .De même, ZALISZ (communication personnelle) a mis en évidence, 8 jours après l'injection à l'animal de 100 µg de la fraction précipitante , la présence d'arcs de précipitation dans un test d'Ouchterlony . Il semble donc que l'animal avant de recevoir la dose létale de germes de *Klebsiella pneumoniae* (6 jours après l'injection de la glycoprotéine précipitante) ait eu le temps de synthétiser des anticorps spécifiques .

Cette activité semble très spécifique , en effet des études réalisées sur la protection par le principe actif vis-à-vis d'autres germes (pneumocoques) indique , que pour obtenir le même effet protecteur que celui obtenu contre *Klebsiella pneumoniae* , il est nécessaire d'injecter une dose 10.000 fois supérieure de glycoprotéine précipitante

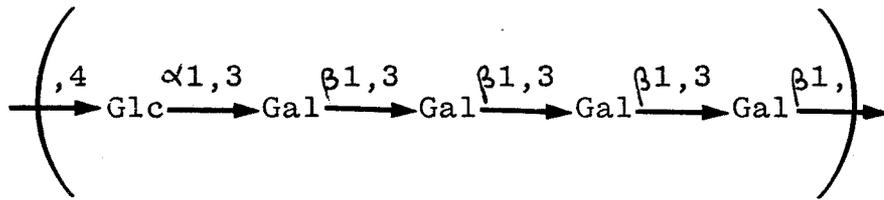
7 - Le fractionnement du principe actif par le cetavlon nous a conduit à l'isolement d'un précipité P_1 dont nous venons de conclure l'activité antibactérienne et d'un surnageant , hétérogène en ultracentrifugation et qui s'est révélé posséder les propriétés immunostimulantes déjà identifiées dans le principe actif total .

8 - Le surnageant S_1 , hétérogène , a pu être chromatographié par gel filtration , Cette purification a permis d'obtenir un constituant homogène , de masse moléculaire 410.000 , appelée FI et un contaminant FII de composition chimique très voisine de la glycoprotéine P_1 (présence d'acides uroniques et de mannose)

a - La fraction FI est constituée de 38% de protéines dont les caractéristiques sont identiques à la fraction protéique de la glycoprotéine P_1 (absence de cystéine , richesse en acides aminés acides) . Elle contient , en outre , des glucides répartis en monosaccharide neutres(34% :glucose et galactose dans les rapports molaires 1/4 respectivement) , en glucosamine (3,5%) , en heptose (4%) et en acide -2-ceto-3-O-deoxyoctulosonique (KDO:1%). Enfin , des acides gras ont pu être identifiés par méthanolys de la fraction organosoluble de l'hydrolysate acétique de la fraction FI . Il s'agit de l'acide laurique C_{12} , de l'acide myristique C_{14} , de l'acide palmitique C_{16} , de l'acide palmitoléique C_{16}^1 , de l'acide stéarique C_{18} et oléique C_{18} . Enfin, de l'acide β -hydroxymyristique , caractéristique des bactéries à gram négatif , a pu être identifié par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse . Ces acides gras , contenus dans la fraction

lipide A , sont liés par liaisons ester et amide aux résidus de glucosamine .

b - Les techniques d'étude de structure des polysaccharides (perméthylation , oxydation periodique , oxydation chromique) ont permis de mettre en évidence dans la fraction polysaccharidique externe (antigène O), obtenue dans la fraction aqueuse de l'hydrolysate acétique , une unité de répétition pentasaccharidique de structure :



Cet antigène O a une masse moléculaire de 13.000.

c - L'antigène O , séparé de la fraction lipide A par hydrolyse acétique partielle , est conjugué à cette dernière par des résidus d'heptose et d'acide-2-ceto-3-O-deoxyoctulosonique (KDO) dont la séquence sera à déterminer .

d - Le lipide A est conjugué à une protéine par une liaison qui reste à élucider . Nos futures investigations devront se tourner vers la recherche de groupements phosphoryls . En effet , les études (114,115, 116) sur la structure des lipides A montrent que le dernier résidu d'osamine possède un groupement phosphoryl qui pourrait intervenir comme le suggère WOBBER et al. (117) pour le lipopolysaccharide de *Serratia marcescens* dans une liaison phosphodiester dans un complexe lipopolysaccharide - protéine et comme l'indique GEYER et al. (118) pour le lipopolysaccharide de *Salmonella minnesota* dans une interaction ionique avec la protéine .

9 - La fraction FI active les cellules phagocytaires dont l'activité est évaluée après sécrétion enzymatique et dosage d'ions superoxydes par chimioluminescence .Elle stimule l'immunité à médiation cellulaire car elle augmente les réactions d'hypersensibilité retardée à l'ovalbumine .

10 - La fraction FI est de nature somatique . En effet , elle provoque des réactions d'identité totale par précipitation avec les antisérums O_1K_2 , O_1K_{18} , O_1K_{10} , O_1K_1 .

APPENDICE TECHNIQUE

I.- DOSAGES COLORIMETRIQUES

A.- Dosage des protéines totales selon la technique employée par LOWRY (67).

1.- Préparation des solutions

* Solution A : $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ 2 % dans NaOH 0,1 N

* Solution B : sulfate de cuivre, 5 H_2O , 0,5 % dans le tartrate de Na, K, 1 %

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

2.- Dosage

A 1 ml de la 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-ciocalteu, préalablement dilué au demi, est additionné. La solution, ainsi préparée, 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 750nm

B.- Dosage des oses neutres par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (72) modifiée par RIMINGTON (120)

1.- Réactifs

- solution d'orcinol

Dissoudre 1,5 g d'orcinol dans une solution aqueuse d'acide sulfurique pur à 30 % (v/v) et compléter à 100 ml. La solution d'orcinol doit être conservée à 0°C et dans des flacons en verre pyrex. Généralement elle laisse déposer des cristaux que l'on redissout au bain-marie

- solution à 60 ml d'acide sulfurique concentré qsp 100 ml d'eau distillée

- solution d'oses pour "témoin interne"
 - * solution-mère contenant 200 mg d'oses totaux pour 100 ml d'eau distillée
 - * solution-mère contenant 181,4 mg de glucuronolactone pour 100 ml d'eau distillée
 - * solution-témoin contenant 200 mcg d'oses totaux par ml, obtenue en diluant au dixième la solution-mère
 - * solution-témoin contenant 200 mcg d'acide glucuronique par ml, obtenue en diluant au dixième la solution-mère

2.- Dosage

Dans des tubes à essais sont introduits 1 ml de la solution à doser renfermant au maximum 400 mcg d'oses totaux, 2 ml de la solution d'orcinol et 15 ml de la solution d'acide sulfurique à 60 %. Les solutions sont mélangées à l'aide d'un agitateur de verre aplati à l'une de ses extrémités. Les tubes sont ensuite maintenus 20 minutes exactement dans un bain marie à 80°C. Les tubes sont refroidis et placés à l'obscurité pendant 45 minutes. L'absorbance de chacune des solutions est déterminée à 510 nm

La coloration reste stable pendant au moins 24 heures à l'obscurité, à la condition de garder les tubes à + 4°C

C.- Dosage des acides uroniques par la méthode au carbazol sulfurique de DISCHE (71)

1.- réactifs

- acide sulfurique concentré
- solution de carbazol : carbazol (Prolabo) 0.1 g
Ethanol absolu qsp 100 ml
la solution est conservée à + 0°C et renouvelée tous les mois
- solution-mère de glucuronolactone
glucuronolactone 90.7 mg
eau distillée qsp 200 ml

- solution-témoin contenant 50 mcg d'acide glucuronique par ml obtenue en diluant au dixième la solution-mère
- solution-témoin contenant 200 mcg d'oses totaux par ml

2.- Dosage

Dans les tubes à essais, on introduit 1 ml de solution doser (contenant au maximum 50 à 100 mcg d'acide glucuronique) et 6 ml d'acide sulfurique concentré. Les tubes sont refroidis dans un bain d'eau glacée. L'acide sulfurique est ajouté lentement et régulièrement le long des parois du tube. Les tubes sont agités avec une tige de verre aplatie à une extrémité et maintenus ensuite pendant 20 minutes très exactement dans un bain-marie bouillant.

Les tubes sont ensuite refroidis très rapidement et 0.2 ml de la solution alcoolique de carbazol est alors ajouté. Le mélange est soigneusement agité.

Une coloration pourpre se développe qui augmente d'intensité à l'obscurité. Après un séjour de 3 heures à l'obscurité, la mesure des absorbances est effectuée à 530 nm. La coloration est stable une heure et la réaction est très sensible puisque 2 mcg d'acide uronique peuvent être dosés .

D.- Dosage des osamines par la méthode modifiée d'ELSON et MORGAN (70)

Les osamines sont au préalable libérées par hydrolyse chlorhydrique (HCl 4N, 4 heures, 100°C). L'hydrolysate est séché dans un exciccateur en présence de soude.

I.- Réactifs

- solution alcaline d'acétyl-acétone :
 - acétyl-acétone 2 ml
 - solution de carbonate de sodium anhydre 1,25 N qsp 50 ml (à préparer extemporanément)
Le carbonate de sodium est desséché au préalable à l'étuve à 100°C
- réactif d'EHRlich :
 - P-diméthylamino-benzaldéhyde 106 g
 - acide chlorhydrique pur concentré qsp 30 ml

La solution doit être jaune pâle. Dans le cas contraire, purifier le P-diméthylamino-benzaldéhyde par recristallisation dans l'éthanol (121)

- solutions titrées d'hexosamines :
- * solution-mère contenant 60 mg de chlorhydrate de glucosamine qsp 100 ml d'eau distillée
- * solution-témoin contenant 50 mcg par ml de glucosamine obtenue en diluant au dixième la solution-mère

2.- Dosage

Dans des tubes à essais sont introduits successivement 1 ml de la solution à doser renfermant au maximum 100 mcg de glucosamine, 1 ml de la solution d'acétyl-acétone et 2 ml d'eau distillée.

Les tubes sont agités, bouchés hermétiquement et placés dans un bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Ils sont ensuite refroidis et additionnés de 5 ml d'éthanol absolu. Après agitation les tubes sont placés de nouveau dans un bain marie réglé à $75^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 5 minutes. 1 ml de réactif d'Ehrlich est alors ajouté. lentement à l' aide d'une burette graduée et les tubes sont maintenus encore 30 minutes à 75°C . Ils sont ensuite refroidis et de nouveau additionnés de 5 ml d'éthanol absolu. Après une agitation soigneuse, ils sont laissés pendant 30 minutes à l'obscurité. Les mesures des absorbances sont effectuées à 520 nm. La coloration est stable pendant 24 heures à l'obscurité.

E.- Dosage des acides sialiques selon la méthode à la diphénylamine de NIAZI et STATES (74) modifiée par WERNER et ODIN (122)

1.- réactifs

- solutions aqueuses d'acide trichloracétique à 7,5g/100ml
- réactif à la diphénylamine : dissoudre 5 g de diphénylamine pure dans un mélange de 450 ml d'acide acétique pur et 50 ml d'acide sulfurique pur. Le réactif se conserve à $+ 4^{\circ}\text{C}$ à l'obscurité. Si des cristaux se forment, on les redissout par chauffage dans un bain-marie tiède.
- solutions titrées d'acide sialique

2.- Dosage

Dans les tubes à essais, on introduit 1 ml de solution et 2 ml d'acide trichloracétique à 7,5 p. 100

Aux 3 ml de solution obtenue, on ajoute 6 ml du réactif à la diphénylamine. Les tubes sont agités et placés dans un bain-marie bouillant pendant 30 minutes. Ils sont ensuite refroidis et maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes. La mesure des absorbances est effectuée à 530 nm. La coloration est stable à l'obscurité pendant 6 heures.

F.- Dosage de sulfates selon TERHO et al. (123)

1.- préparation des solutions

* solution-tampon BaCl₂ :

- acide acétique 2 M : 10 ml
- BaCl₂ : 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-standards de sulfate

- solutions de 2 à 12 mcg pour 0,5 ml d'eau distillée

2.- dosage

La vaisselle est préalablement lavée à l'acide nitrique et rincée à l'eau distillée.

Les échantillons sont 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. A 0,5 ml de solution sont ajoutés 2 ml d'éthanol. S'il y a précipitation, une centrifugation est nécessaire afin d'obtenir une solution claire. 1 ml de solution de BaCl₂ et 1,5 ml de solution de rhodizonate de sodium sont additionnés puis agités. Les tubes sont laissés 10 minutes à l'obscurité. La coloration reste stable pendant 30 minutes. La lecture au spectrophotomètre se fait à 520 nm.

G.- Dosage de phosphore

1.- préparation des solutions

* mélange destructeur

HClO_4 70% 3volumes

H_2SO_4 concentré 2volumes

* solution de molybdate d'ammonium

8,3 g pour 100 ml

* solution de sulfite de sodium

Na_2SO_3 anhydre 20 g pour 100 ml

ou

$\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 g pour 100 ml

* solution d'amidol (préparée extemporanément et filtrée après 1/2 heure de contact à l'obscurité)

1 g pour 100 ml de la solution de sulfite de sodium

* solution-standard de phosphore

solution-mère de phosphore à 1 mg/ml à diluer 50 fois

(KH_2PO_4 4,39 g par litre)

2.- Dosage

1 ml de solution à doser est ajouté à 1 ml de mélange destructeur. Le matras contenant la solution est placé sur une rampe à destruction (100°C) pendant 1 heure.

8 ml d'eau distillée, 1 ml de la solution de molybdate d'ammonium sont ajoutés à la solution puis agités.

1 ml d'amidol est additionné. 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

II.- EXTRAIT SEC

100 mg de principe actif sont pesés, mis dans une étuve sous vide à 50°C pendant 24 heures. Après avoir déshydraté la balance pendant une nuit, le principe actif est de nouveau pesé. Le taux d'humidité est calculé par différence.

III.- ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

A.- Identification et composition molaire en monosaccharides

1.- Après méthanolyse, trifluoroacétylation et analyse en chromatographie en phase gazeuse sur colonne OV210.

a.- méthanolyse et trifluoroacétylation selon la technique employée par ZANETTA et al. (124)
500 mcg de produit sont méthanolysés en présence de 50 mcg de témoin interne (méso-inositol) par 1 ml de méthanol chlorhydrique 0,5 N à 80°C pendant 24 heures. Après séchage sous azote, le résidu est trifluoroacétylé par 400 μ l de mélange dichlorométhane/anhydride trifluoroacétique (volume/volume) dans un bain de sable porté à 150°C pendant 5 minutes. Après refroidissement, le trifluoroacétylat est réchauffé 5 minutes à 150°C .

b.- analyse en chromatographie en phase gazeuse sur colonne OV210

Les méthylglycosides trifluoroacétylés sont analysés en chromatographie en phase gazeuse sur colonne de verre (0.3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5 % sur varaport 30 "mesh" 80-100, température programmée de 100°C à 220°C à raison de 2°C par minute, sous un débit de gaz vecteur (azote) de 10 ml/mn.

2.- Après hydrolyse, réduction, peracétylation et analyse en chromatographie en phase gazeuse sur colonne ECSSM:

a.- préparation des dérivés acétate d'alditol :
La fraction à étudier (1 à 2 mg) est mise en présence d'un témoin interne (ribitol : 50 mcg).

L'hydrolyse est réalisée en présence d'acide trifluoroacétique 4 N - 4 H - 100°C. L'acide est éliminé en présence d'éthanol après plusieurs codistillations. L'hydrolysate est acétylé (200 μ l de pyridine - 200 μ l d'anhydride acétique) 3/4 d'heure à 100°C. La fraction peracétylée séchée sous azote, est reprise par quelques gouttes de méthanol. Le produit peracétylé, est réduit par du borodéutérure de sodium à température ambiante. La réduction est arrêtée par de la Dowex 50.8 (25-50 mesh). La solution est ensuite séchée à l'évaporateur rotatif. L'acide borique est éliminé en présence de méthanol sous forme de méthyl-borate après plusieurs codistillations. la fraction réduite est peracétylée une nuit à température ambiante (200 μ l de pyridine/200 μ l d'anhydride acétique). L'acétylate, séché sous azote, est repris par 100 μ l de méthanol

b.- analyse en chromatographie en phase gazeuse

Les dérivés acétate d'alditol sont analysés :

- . en chromatographie en phase gazeuse sur colonne ECNSSM (0.3 x 150 cm) à température programmée de 150 à 230°C à raison de 2°C/mn sous un débit de gaz vecteur (azote 20 ml/mn
- . en GLC-MS sur colonne capillaire OV101, température programmée de 90°C à 250°C à raison de 15°C/mn

B.- Identification des liaisons O-glycosidiques après perméthylation

1.- Perméthylation

- a.- Perméthylation selon HAKOMORI (77) modifiée par SANDFORD et CONRAD (125) au diméthylsulfure carbanion, iodure de méthyle.

* préparation de la base : méthylsulfinyle carbanion

Dans un flacon à pénicilline de 100 ml sont introduits 3 g d'hydrure de sodium (mélangé à 55 % avec de l'huile minérale). L'hydrure de sodium est lavé par 3 fois sous agitation avec 30 ml de pentane ou d'hexane. Après le troisième lavage, le flacon est scellé. Le solvant est éliminé à l'aide d'une aiguille hypodermique et l'hydrure de sodium est séché par un lent courant d'azote. 30 ml de diméthylsulfoxyde sont introduits dans le flacon. La solution est alors portée dans un bain ultrasonique. Lorsque la production d'hydrogène est arrêtée, le flacon est retiré du bain ultrasonique et placé sous azote. Le méthylsulfinyle carbanion est conservé à l'obscurité à + 4°C

* perméthylation

3 mg de produits sont introduits dans un flacon à pénicilline, puis repris par 1ml de diméthylsulfoxyde. Le flacon est scellé et placé dans un bain ultrasonique. 0,5 ml de base est additionné à l'aide d'une aiguille hypodermique. Le flacon est ensuite placé dans un bain ultrasonique pendant 30 minutes après l'avoir saturé par de l'azote.

La solution est ensuite congelée. 1 ml d'iodure de méthyle est ajouté sur le produit congelé et le flacon est placé 30 minutes au bain-marie ultrasonique. La solution contenant le produit perméthylé est versée dans 10 ml d'eau distillée. Le polysaccharide méthylé est extrait par trois fois 5 ml de chloroforme. Les phases organiques rassemblées sont lavées par trois fois 5 ml d'eau distillée. La phase organique est ensuite séchée par du sulfate de sodium anhydre, filtrée puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le produit ainsi méthylé est purifié sur colonne de Sephadex LH 20 (2 x 50 cm) dans le système solvant chloroforme/éthanol (1/1).

Le repérage des sucres se fait par la méthode au phénol sulfurique de DUBOIS et al. (95) (à 200 l de solution, on additionne 200 l de phénol 5% et 1 ml d'acide sulfurique concentré). Les fractions positives sont rassemblées puis séchées pendant 24 heures sur P_2O_5 .

b. - Perméthylation selon FINNE (93)

L'échantillon lyophilisé est dissous dans le méthyl sulfoxide et gardé 30 minutes dans un bain ultrasonique . Un volume égal de carbanion (tert-butoxide dans le méthyl sulfoxide) est ajouté puis laissé une heure dans le bain. L'iodure de méthyle est ajouté sur la solution congelée . Après une heure au bain ultrasonique, l'échantillon est dilué dans l'eau puis extrait 3 fois par le chloroforme .La phase organique est ensuite concentrée et analysée en chromatographie en phase gazeuse .

2.- analyse des éthers méthyliques en chromatographie en phase gazeuse

* Les éthers méthyliques libérés par méthanolyse (MeOH/HCl 0,5N, 80°C, 24 heures) sont analysés avant et après peracétylation (200 µl de pyridine, 200 µl d'anhydride acétique, une nuit à température ambiante, la fraction peracétylée est séchée sous azote puis repris par 100 µl de méthanol) en chromatographie en phase gazeuse:

- 1 sur colonne remplie de Carbowax 6000 (0.3 x 300 cm) température programmée de 130°C à 220°C à raison de 4°C/mn sous un débit de gaz vecteur (azote) :
20 ml/mn
- 2 sur colonne capillaire de verre de Carbowax 20 M (60 m x 0.4 mm) ; température programmée de 150°C à 225°C à raison de 2°C/mn ; gaz vecteur (azote) :
0,4 bar
- 3 sur colonne de verre (0.3 x 200 cm) de 1 % Dexil 300 sur supelcoport "mesh" 100-200, température programmée de 100°C à 200°C à raison de 2°C/mn, sous un débit de gaz vecteur (azote) de 20 ml/mn.
- 4 sur colonne capillaire (30 m x 0,4 mm) OVIOI, température programmée de 130 à 320°C à raison de 10°C/mn couplée au spectromètre de masse Riber Mag 10-10 (énergie d'ionisation 70 eV)
- 5 sur colonne de SE 30, température programmée de 150 à 280°C à raison de 5°C/mn couplée au spectromètre de masse Riber Mag 10-10.

Lors du couplage GLC-MS, l'échantillon (5 à 10 µl) est soumis à un bombardement électronique. L'ion moléculaire ainsi formé est très instable et se pulvérise en petits fragments M_1 , M_2 qui sont accélérés sous une différence de potentiel de 2000 volts et déviés par un champ magnétique en fonction de leur masse (les plus petits seront les plus déviés). A la sortie de l'appareil, les ions m_1 , m_2 ... sont repérés puis enregistrés.

C.- Identification des lipides

1.- libération des acides gras

La fraction contenant les lipides (500 mcg) est méthanolysée par 1 ml de méthanol chlorhydrique 0,5 N à 80°C pendant 24 heures. Après refroidissement, la solution est séchée sous azote. Le résidu est repris par 100 μ l d'heptane.

2.- analyse de la fraction lipidique

Les lipides sont identifiés en chromatographie en phase gazeuse :

- sur colonne de verre (0.3 x 300 cm) de Carbowax 6000, température programmée de 130 à 210°C à raison de 4°C/mn sous un débit de gaz vecteur (azote) :
20 ml/mn
- sur colonne SE 52 , température programmée de 130°C à 230°C à raison de 5°C/mn, couplée au spectromètre de masse Riber-Mag 10-10 (énergie d'ionisation : 70 eV)

IV.- REDUCTION ET PERACETYLATION

1.- réduction

500 mcg de produit sont dissous dans 1 ml d'eau. 2,5mg de borohydrure de potassium (ou borodeutérure de sodium) sont ajoutés et la solution est laissée 1 nuit à température ambiante. La réduction est arrêtée par de la Dowex 50 x 8 (forme H⁺) jusqu'à PH 5. Le borate est éliminé après plusieurs codistillations avec le méthanol sous forme de méthylborate.

2.- peracétylation

500 mcg de produit sont dissous dans 400 μ l d'un mélange de pyridine, anhydride acétique v/v. L'acétylation peut se faire pendant une nuit à température ambiante et à l'obscurité ou 3/4 heure à 100°C. L'acétylat est séché sous azote puis repris par 100 μ l de méthanol

V.- ETUDE A L'AUTOANALYSEUR BECKMAN-MULTICHROM.

1 mg de produit est hydrolysé par 1 ml d'acide chlorhydrique 5,6 N redistillé, sous vide à 100°C pendant 24 heures. L'hydrolysate est évaporé à siccité en exciccateur en présence de soude.

VI.- FRACTIONNEMENT SELON LA METHODE AU CETAVLON DE SCOTT (81)

- . 333 mg de bromure de cétyl-triméthyl ammonium ont été ajoutés progressivement à 11 ml d'eau en chauffant légèrement vers 30°C pour former une solution de cetavlon à 3 %. Ce mélange a été ajouté lentement à la solution à fractionner (8 mg par ml) sous agitation magnétique douce puis laissé une nuit à + 4°C.
- . Le précipité formé, recueilli par centrifugation, est redissous dans une solution de NaCl 0.2 M (6ml). La solution de sel de sodium du polyanion obtenue est reprécipitée dans 6 volumes d'éthanol. Après une nuit à + 4°C, le précipité formé est recueilli par centrifugation, redissous dans l'eau, dialysé 24 heures contre de l'eau distillée et enfin lyophilisé.
- . La fraction non précipitante au cetavlon (surnageant) est précipitée par 6 volumes d'éthanol. Après une nuit à + 4°C, le précipité est recueilli par centrifugation, redissous dans l'eau, dialysé et lyophilisé.

VII.- ELIMINATION DE GROUPEMENTS PYRUVYLS

La technique employée est celle de LEW et al. (76). Le produit est chauffé pendant 30 minutes à 20°C en présence d'acide sulfurique 5m M, puis dialysé.

VIII.- ETUDE EN ULTRACENTRIFUGATION (ultracentrifugeuse analytique BECKMAN modèle E)

La masse moléculaire est déterminée selon la technique de YPHANTIS (78) modifiée par CHERVENKA (79) et la constante de sédimentation selon SVEDBERG (80).

A.- Etude du principe actif et de la fraction précipitante

P₁

10 mg de principe actif (ou 17,2 mg de fraction P₁) sont dissous dans 1 ml de tampon Tris/HCl 0.1 M à PH 7. 2.

La constante de sédimentation est déterminée après une ultracentrifugation de 4 heures à 56 000 tours/mn à 20°C.

La masse moléculaire est mise en évidence après une étude pendant 15 heures entre 36 et 42 000 tours/mn.

B.- Etude de la fraction FI

- constante de sédimentation :

- 11 mg de la fraction FI sont dissous dans 1 ml de tampon Tris/HCl 0.1 M à PH 7.2, puis soumis à une ultracentrifugation pendant 6 heures à 22 000 tours/minutes à 20°C.

- masse moléculaire

- 10 mg de la fraction FI sont dissous dans 1 ml de milieu guanidine/HCl 6 M tamponnée par le Tris 0.1 M ajusté à PH 7.5 par HCl puis soumis à une centrifugation pendant 6 heures à 20 000 tours/minutes.

IX.- ISOLEMENT D'UN DISACCHARIDE : ACIDE ALDOBIOURONIQUE

(Glc UA $\xrightarrow{1,3}$ Man) selon la méthode de SEAMAN (75).

A.- Hydrolyse :

- 10 mg de produit sont dissous dans H₂SO₄ 72 % en poids, 5 minutes à température ambiante puis amené à normalité, porté à 100°C pendant 6 heures. L'hydrolysatsulfurique est neutralisé par du carbonate de baryum, centrifugé et le précipité de sulfate de baryum ainsi formé est abondamment lavé par de l'eau distillée.

B.- Purification

- . Le surnageant et les eaux de rinçage sont purifiés sur résines échangeuses de cations (Dowex 50.8"mesh" 25-50, forme H⁺ (20 x 2 cm) et d'anions Duolite A 102 D "mesh" 25-50, forme HCOO⁻ (20 x 2 cm)
- .L'éluat obtenu, constitue la fraction neutre qui est chromatographiée sur papier Whatman N° 3 dans le système solvant :acétate d'éthyle/pyridine/eau(8/2/1)
- .L'élution de la résine échangeuse d'anions(Duolite A 102 D) par l'acide formique 10% fournit une fraction acide qui est chromatographiée sur papier Whatman n° 3 dans le système solvant :

- acétate d'éthyle/acide acétique/acide formique/
eau : 18/3/1/4.

Les oligosaccharides contenus dans la fraction acide ont été chromatographiés sur colonne de Sephadex G₁₀ (96 x 2 cm) éluée par de l'eau distillée sous un débit de 6 ml/heure. Le repérage des fractions est effectué par le réactif au phénol sulfurique de DUBOIS et al. (95) et par le réactif au carbazol de DISCHE (71).

. Les fractions phénol et carbazol positives ont été chromatographiées sur papier Whatman n° 3 dans le système solvant :

- acétate d'éthyle/acide acétique/acide formique/
eau 18/3/1/4 pendant 24 heures.

. L'oligosaccharide majeur est ainsi purifié par chromatographie préparative dans le même système solvant pendant 48 heures.

X.- CHROMATOGRAPHIE SUR ULTROGEL Aca34

100 mg de produit sont dissous dans 10 ml de bicarbonate d'ammonium 0.1 M puis chromatographiés sur une colonne d'Ultrogel Aca34 (1.25 m x 3,5 cm) sous un débit de 18ml/heure. Les fractions sont repérées par le réactif au phénol sulfurique de DUBOIS et al. (95).

XI.- IDENTIFICATION DE L'ACIDE AMINÉ N-TERMINAL selon la technique de dansylation selon GROS et al. (82) modifiée par PERCY et al. (83).

Une quantité de 5nM de peptides est dissous dans 500 μ l d'urée 8 M, la solution est tamponnée par 150 μ l de bicarbonate de sodium 0.2M PH9.2 puis 200 μ l de diméthylformamide et 5 mg de chlorure de dansyl dissous dans 100 μ l d'acétonitrile sont ajoutés. La réaction se poursuit pendant 1 heure à 37°C. La protéine dansylée est ensuite précipitée par l'ATCA à 10 % à 4°C, puis lavée par de l'acétone pour éliminer l'excès de chlorure de dansyl. Le précipité est enfin hydrolysé par de l'acide chlorhydrique 5,6N pendant 8 à 18 heures à 105°C.

L'hydrolysate est séché sous vide contre de la soude et chromatographié sur des plaques de micropolyamide suivant le procédé de WOODS et al. (126). Les acides dansylés sont extraits par de l'acétate d'éthyle saturé en eau, à l'exception de DNS Arg, α DNS Lys, ξ DNS Lys, DNS Hist, qui sont repris dans un mélange acide acétique-acétone dans les rapports 3 : 2.

XII.- IDENTIFICATION DE L'ACIDE AMINE C - TERMINAL

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

100 nM de protéines sont dissoutes dans 1 ml de bicarbonate de potassium 0.1 M. 50 nM de Norleucine sont ajoutée au mélange. L'hydrolyse enzymatique est effectuée à 37°C par 3 μ l d'une solution enzymatique à 370 unités/ml pendant des temps différents : 3H, 5 mn. , 1 mn et étudiée à l'autoanalyseur.

XIII.- REDUCTION DES ACIDES URONIQUES selon TAYLOR et CONRAD (84)

10 mg de produit ont été mis à dissoudre la nuit dans 3 ml d'eau pour obtenir une solution bien homogène. 9 mg de N - cyclohexyl - N' - (β' -(N - méthyl-morpholino) éthyl)- carbodiimide -p- toluène sulfonate ont ensuite été ajoutés par petites quantités . Le PH est maintenu à 4,75 par addition d'acide chlorhydrique 0,1N. La solution est laissée 1 heure sous agitation à température ambiante à PH 4,75 puis réduit par addition d'une solution de borohydrure de potassium 2 M (5 ml). Le PH est maintenu à 7,0 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 4N. Quelques gouttes d'octanol sont ajoutés à la solution pour éliminer les mousses. Après une heure sous agitation, à température ambiante, à PH 7.0, le mélange est dialysé contre de l'eau distillée pendant 2 jours et lyophilisé.

XIV.- DEGRADATION DES ACIDES URONIQUES selon LINDBERG
et al. (85)

L'échantillon peracétylé (formamide : 5 ml, mélange pyridine-anhydride acétique (1 : 1) : 3,2 ml, 15 heures à température ambiante, dialyse et lyophilisation) est dissous dans l'anhydride acétique (10 ml) et portée au bain ultrasonique pendant 30 minutes. La β -élimination est effectuée en ajoutant de la triéthylamine (8,6 ml), la solution étant maintenue au bain-marie bouillant pendant 2,5 heures puis concentrée. Les résidus d'acides uroniques sont éliminés sélectivement par hydrolyse (acide acétique 90 % : 6,4 ml, 2 heures, 100°C). Après dialyse et lyophilisation, le mélange est désacétylé par la soude 0,4 M (2,5 ml) dans le diméthylsulfoxyde (7,2 ml) une nuit à température ambiante. Le mélange est dialysé, lyophilisé et purifié sur biogel P₂ (2,5 cm x 55 cm) dans l'eau. La fraction dégradée est repérée par la méthode au phénol sulfurique .

XV.- OXYDATION PERIODIQUE selon GOLDSTEIN et al. (86)

Une solution de 50 mg de produit dans 12,5 ml d'eau est additionnée de 25,5 ml de métaperiodate de sodium 0,05 M. Le mélange est maintenu à + 4°C 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 d'eau 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 neutralisée par de l'hydroxyde de baryum et le précipité de sulfate de baryum est abondamment lavé par de l'eau distillée. Le surnageant et les eaux de lavage sont lyophilisés.

L'oligosaccharide résistant à l'oxydation est isolé par chromatographie sur Biogel P₂ éluée par de l'eau distillée

XVI.- OXYDATION CHROMIQUE selon HOFFMAN et al. (87).

25 mg de produit dans la formamide (5 ml) sont traités avec 2 ml d'anhydride acétique et 2,5 ml de pyridine pendant 20 heures à température ambiante. La solution peracétylée est purifiée par dialyse.

6 mg de produit acétylé sont traités par du trioxyde de chrome (50 mg) dans l'acide acétique (1 ml) à 50°C pendant 2 heures au bain ultrasonique. Après addition d'eau dans le mélange, le polysaccharide peracétylé et modifié est extrait par le chloroforme (3 x 5 ml). Les phases chloroformiques, séchées par du sulfate de sodium anhydre sont évaporées à l'évaporateur rotatif.

XVII.- RECHERCHE DE LIAISON -O- GLYCOSIDIQUE

1 mg de produit est dissous dans 3 ml de NaOH 0.1N. La cinétique de réaction est suivie par lecture au spectrophotomètre 240 nm. L'augmentation d'absorbance du milieu réactionnel à cette longueur d'onde est due à la formation des deshydroaminoacides formés au cours de la β élimination.

XVIII.- RECHERCHE DE LIAISON N- GLYCOSIDIQUE

A.- Hydrolyse pronasique selon YAMASHINA et al. (89)
A une solution de 1 g de produit dans 100 ml d'acétate de calcium 0,01 M, 20 mg de pronase (calbiochem) sont ajoutés. L'hydrolyse est effectuée à PH 8 à 40°C, sous agitation, pendant 48 heures en présence de toluène. Le PH est maintenu constant par addition de soude 0.1 N contrôlée par un titrateur automatique et la consommation de soude est régulièrement déterminée. L'hydrolysate est ensuite ajusté à PH 4,5 avec de l'acide acétique glacial, puis concentré à 20 ml environ et traité par 10 volumes d'éthanol absolu.

Le mélange est maintenu pendant deux heures à température ambiante, puis à + 4°C pendant 18 heures. Le précipité formé est recueilli par centrifugation, dissous dans 100 ml d'acétate de calcium 0,01 M et soumis à une nouvelle hydrolyse pronasique dans les conditions décrites ci-dessus. Le protocole est répété deux fois. Le précipité recueilli, redissous dans l'eau est purifié par chromatographie de gel filtration.

B.-Hydrolyse par l'acide fluorhydrique selon MORT et LAMPORT (90)

Cette hydrolyse demande un appareil spécial et l'utilisation de récipient Kel-F.

20 ml d'acide fluorhydrique sont introduits très lentement dans un réservoir, refroidi à l'aide d'azote liquide et contenant du trifluorure de cobalt (agent desséchant).

L'acide fluorhydrique est ensuite distillé dans une chambre à réaction renfermant l'échantillon à hydrolyser dissous dans l'anisol (20 mg/ml).

La solution est laissée 3 heures sous agitation à 23°C.

Quand la réaction est terminée, l'acide fluorhydrique est détruit en présence de potasse (disparition de fumée blanchâtre). L'échantillon hydrolysé, en solution dans l'anisol est extrait par 2 x 2 ml d'eau. Les phases inférieures sont rassemblées puis chromatographiées immédiatement sur colonne de Sephadex G 50 (46 x 2,2 cm) éluée par de l'eau distillée à raison de 12 ml/heure.

La fraction glycanique est repérée au phénol sulfurique (95) et la chaîne peptidique par absorbance à 280 nm.

C.-Hydrazinolyse selon BAYARD et al. (91)

50 mg de produit sont dissous dans 5 ml d'hydrazine (MERCK) pendant 30 heures à 100°C. L'hydrazinolysat est séché sous azote puis en exciccateur en présence d'acide sulfurique. Séché et dissous dans 3 ml d'eau, le produit hydrazinolysé est purifié sur colonne de Sephadex G 50 éluée par de l'eau à raison de 8 ml/heure. Un premier repérage est réalisé en présence de phénol sulfurique (200 µl de solution, 200 µl de phénol 5 %, 1 ml d'acide sulfurique concentré) afin d'identifier la fraction glucidique désacétylée puis un second repérage à la ninhydrine identifiant les acides aminés sous forme d'hydrazide .

- La fraction glucidique désacétylée est N- réacétylée suivant la méthode de SPIRO (97). Les oligosaccharides sont dissous dans une solution d'acétate de sodium 4,5 M à raison de 3 μ M/ml. L'anhydride acétique est ajouté 25 fois en excès par rapport aux fonctions amines et alcools, libres, à température ambiante, en 5 aliquotes égales en une heure. La réaction est terminée en diluant l'échantillon avec 20 volumes d'eau et en chauffant 10 minutes au bain-marie à 100°C. La solution est chromatographiée sur colonne de Dowex 50 x 8 (4 fois en excès) afin d'éliminer le sodium. L'éluat et les eaux de rinçage sont concentrés puis chromatographiés sur colonne de Sephadex G 50 éluee par de l'eau distillée. Le repérage des monosaccharides est réalisé selon DUBOIS et al. (95).

La fraction hydrazinolysée est ensuite étudiée à l'auto-analyseur après une hydrolyse chlorhydrique 5,6 N redistillée, sous vide à 100°C pendant 24 heures.

D-. Rupture sodique en milieu réducteur selon MARSHALL et NEUBERGER (92).

Cette hydrolyse s'effectue sur une fraction ayant subi une hydrolyse pronasique. Une solution de glycopeptide (3 mg dans 1 ml de NaOH 0.2M contenant BH_4K M) est chauffée dans un bain-marie à 100°C pendant 10 heures en ajoutant à intervalles réguliers (toutes les heures) 200 μ l de la solution de NaOH/ BH_4K . La solution refroidie est hydrolysée par HCl 5.6N, 24 heures, 100°C.

L'hydrolysate est séché puis analysé à l'auto-analyseur Beckman multichrom.

XIX.-Hydrolyse par l'acide acétique 1% selon WILKINSON et al. (94)

10 mg de produit sont hydrolysés par 1 ml d'acide acétique 1% à 100°C pendant 1,5 heure . Après centrifugation ou extraction par le chloroforme , nous recueillons une fraction aqueuse , de nature polysaccharidique et une fraction précipitante ou chloroformique, de nature lipidique .

BIBLIOGRAPHIE

<u>Ref.</u>	<u>Page</u>
121- ADAMS R., COLEMAN G.H. . Org.Synth.,1948, <u>1</u> ,214.	161
44- AOKI T., MIYAKOSHI H., HORIKAWA Y., USUDA Y. Augmenting Agents in Cancer therapy editors:E.M. MERSH, M.A. CHIRIGOS and M. MASTRANGELO, Raven Press, New-York, 1981, 101.	43
17- ASSELINEAU J., ASSELINEAU C. Prog.Chem.Fats other Lipids,1978, <u>16</u> ,59-99.	36
14- AZUMA I., SUGIMURA K., YAMAWAKI M., UEMIYA M., KUSUMOTO S., OKADA S., SHIBA T., YAMAMURA Y. Infect.Imm.,1978, <u>20</u> ,600.	35
65- BACH J.F., BACH M.A., BLANOT D., BRICAS E., CHARREIRE J., DARDENNE M., FOURNIER C., PLEAU J.M. Bull.Inst.Past.,1978, <u>76</u> ,325.	49
53- BARRIER J., ROSSARD A., FUMOLEAU P., STADLER J.F., LAROUSSE C., GROLLEAU J.Y. Cah.Med.,1980, <u>6</u> ,n°10,633-640.	46
10- BAST R.C., ZBAR B., BORSOS T., RAPP H.J. N.Engl.J.Med.,1974, <u>290</u> ,1413.	34
91- BAYARD B., MONTREUIL J. Actes du colloque international CNRS,n°221, ed.Paris,1974,209-218.	107 146 176
110- BEHRING - Communication personnelle -	142

- 55- BICKER U., ZIEGLER A.E., HEBOLD G. - 179 -
 J.Infect.Dis., 1979, 139, n° 4, 389-395. 46
- 6- BIOZZI G., STIFFEL C., MOUTON D.,
 BOUTHILLIER Y., DECREUSEFOND C.
 Ann.Immunol. (Inst.Pasteur), 1974, 125C, 107-142. 31
- 109- BROSSARD C.
 Théorie et Pratique thérapeutique, Décembre 1982. 140
- 66- CASSENNE Laboratoires,
 Brevet Fr 72 05016. 55
- 69- CHARET P., TETAERT D., HAN K.K., MONTREUIL J.
 C.R.Acad.Sci., 1973, 276, 1629. 58
- 111- CHEDID L., PARANT M., PARANT F., LEFRANCIER P.,
 CHOAY J., LEDERER E. 142
 Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1977, 4, 2089.
- 79- CHERVENKA C.H.
 Anal.Biochem., 1970, 34, 24-29. 63, 17C
- 42- CHICHARA G., MAEDA Y.Y., HAMURO J., SASAKI T., FUKUOKA F.
 Nature, 1969, 222, 687-688. 43
- 13- CUTTENER J., GLIDEWELL O., HOLLAND J.F. 34
 Immunotherapy of Cancer: present status of trials
 in man ed.TERRY W.D., WINDHORST D., New-York, 1977,
- 38- DI LUZIO N.R., WILLIAMS D.L.
 Infect.Imm., 1978, 20, 804-810. 42
- 71- DISCHE Z. 59
 J.Biol.Chem., 1947, 167, 189. 75
 159
 172
- 95- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., 129
 SMITH F. 167
 Nature, 1951, 168, 167. 172
 Anal.Chem., 1956, 28, 350. 177

- 28- ELINOV N.P., VITOVSKAYA G.A., MARIKHIN V.A.,
MARJUKHTA Y.B., KOZLOVA T.V.
Carbohyd.Res., 1979, 75, 185. 39
- 70- ELSON L.A., MORGAN W.T.J. 59
Biochem.J., 1933, 27, 1824. 111
160
- 93- FINNE J. 119
Carbohyd.Res., 1980, 80, 336. 123
167
187
- 9- FISCHER B., RUBIN H., SARTIANO G., ENNIS L.,
WOLMARK N.
Cancer, 1976, 38, 119. 34
- 59- FLOC'H F., BOUCHAUDON J., ZERIAL A., FIZAMES C.,
LAVELLE F., WERNER G.H. 48
Abstracts of the second International Conference
on Immunopharmacology, Washington, Juillet 1982, 285.
- 1- FREUND J.
Adv.Tuberc.Res., 1956, 7, 130-148. 1
- 88- GAHAN L.C., SANDFORD P.A., CONRAD H.E.
Biochemistry, 1967, 6, 9, 2755-2766. 153
- 118- GEYER R., GALANOS C., WESTPHAL O., GOLECK R.
Eur.J.Biochem., 1979, 98, 23-38. 156
- 113- GEYER H. STIRM S. HIMMELSPACH K.
Med.Microbiol.Immunol., 1979, 165, 271-288. 154
- 5- GIDLAND M., ORN A., WIGZELL H., SENIK A., GRESSER I.
Nature, 1978, 273, 759-761 12
- 86- GOLDSTEIN I.J., HAY G.W., LEWIS B.A., SMITH F. 89
Methods Carbohyd.Chem., 1965, 5, 361-370. 119
174

- 64- GOLDSTEIN A.L., LOW T.L.K., MAC ADOO M., Mc CLURE J.,
THURMAN G.B., ROSSIO J.L., LAI C.Y., CHANG G., WANG S.S.,
HARVEY C., RAMEL A.H., MEIENHOFER J.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 725. 49
- 11- GOODNIGHT J.E., MORTON D.C.
Ann. Rev. Med., 1978, 29, 231. 34
- 107- GRISCELLI C.
Communication personnelle. 139
- 101- GRISCELLI C.
Etude de l'action du C1740 sur la prolifération
lymphoblastique et sur le chimiotactisme des
polynucléaires humains-Dossier AMM- 137
- 103- GRISCELLI C.
Etude de pharmacologie clinique(15-03-1979)
Communication personnelle. 137
- 97- GRISCELLI C., GROSPIERRE B., MONTREUIL J., FOURNET B.,
BRUVIER C., LANG J.M., MARCHIANI C., ZALISZ R.,
EDELSTEIN R.
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds" Proceedings of an International
Symposium, Osaka, Juillet 1981, Excerpta Medica,
Series 563, 261-265. 135
138
- 82- GROS C., LABOUESSE B. 73
Eur. J. Biochem., 1969, 7, 4, 463. 172
- 106- GUENOUNOU M., SALLES M.F., ZINBI H., SMETS P.,
AGNERAY J.
5th International Congress of Immunology, in Press,
Kyoto, Août 1983. 139

- 2- HALPERN B., BIOZZI G., STIFFEL C., MOUTON D.
Compt.Rend.Soc.Biol., Paris, 1959, 153, 919-923. 2
- 77- HAKOMORI S.I. 63, 75
J.Biochem.(Tokyo), 1964, 55, 205. 84, 90
165
- 115- HASE S., RIETSCHER E.T. 156
Eur.J.Biochem., 1976, 63, 101-107
- 87- HOFFMAN J., LINDBERG B., SVENSSON S. 96, 97
Acta.Chem.Scand., 1972, 26, 661-666. 123, 175
- 8- ISRAEL L.
International Conference on Immunotherapy of Cancer
Southan C.M., Friedman H.(eds)
Ann.of the New York, the New York Acad.Sci., 1976,
277, 241-251. 34
- 47- IZUMI T., KIKUCHI M., MITANI M., MATSUO T.,
YAMASHITA T., TSUBURA E.
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds". Proceedings of an International
Symposium, Osaka, Juillet 1981, Excerpta Medica,
Series 563, 407-410. 43
- 56- JAROSLOW B., TALIAFERRO W.
J.Infect.Dis., 1956, 98, 75-81. 47
- 33- JARSTRAND C., BLOMGREN H.
J.Clin.Lab.Immunol., 1982, 7, 115-118. 40
- 37- JORDAN G.W., MERIGAN T.C.
Ann.Rev.Pharmacol., 1975, 15, 157-175. 42
- 24- KATO N., NAKASHIMA I., OHTA M.
Infect.Imm., 1975, 12, n° 1, 1-6. 37

- 57- LACOUR J., LACOUR F., SPIRA A., MICHELSON M., PETIT J.Y.
DELAGE G., SARRAZIN D., CONTESSO G., VIGUIER J.
The lancet, 1980, 26 July, 161-164. 47
- 62- LAWRENCE H.S.
J. Clin. Invest., 1955, 34, 219-224. 49
- 18- LEDERER E.
Chem. Phys. Lipids, 1976, 16, 91-106. 36
- 76- LEW J.Y., HEIDELBERGER M. 63
Carbohyd. Res., 1976, 52, 255-258. 170
- 85- LINDBERG B., LINDH F., LÖNNGREN J. 79, 82
Carbohyd. Res., 1978, 60, 81-87. 174
- 67- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. 58, 73
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-273. 111, 158
- 43- MAEDA Y.Y., CHICHARA G. 43
Int. J. Cancer, 1973, 11, 153.
- 92- MARSHALL R.D., NEUBERGER A. 107, 177
Meth. in Carbohyd. Chem., 1976, VII, 212-219.
- 41- MAYER P., DREWS J. 42
Infection, 1980, 8, n°1, 13-21.
- 61- MERIGAN T.C. 48
N. Engl. J. Med., 1979, 300, 43.
- 60- MERIGAN T.C., RAND K.H., POLLARD R.B. 48
N. Engl. J. Med., 1978, 298, 981.

- 58- MIGLIORE-SAMOUR D., BOUCHAUDON J., FLOC'H F.,
ZERIAL A., NINET L., WERNER G.H., JOLLES P.
C.R.Acad.Sc.Paris, série D, 19 , 289, 473. 48
- 48- MITANI M., ARIKA T., KIKUCHI M.
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds" Proceedings of an International
Symposium, Osaka, Juillet 1981, Excerpta Medica,
Series 563, 411-414. 44
- 54- MIWA H., ONO F., KOBAYASHI T., ONO M., NOGAMI H.,
ORITA K.
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds" Proceedings of an International
Symposium, Osaka, Juillet 1981, Excerpta Medica,
Series 563, 476-479. 46
- 45- MIYAKOSHI H., SHIMUZU T., USUDA Y., MIZUKOSHI M.,
ABE S., AOKI T.
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds" Proceedings of an International
Symposium, Osaka, juillet 1981, Excerpta Medica,
Series 563, 472-475. 43
- 73- MONTREUIL J., SPIK G.
Microdosage des glucides, méthodes colorimétriques
de dosage des glucides totaux, 1963, 1, 31. 59

- 27- MORIYASU F., MIWA H., ORITA K.
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds" Proceedings of an International
Symposium, Osaka, Juillet 1981, Excerpta Medica,
Series 563, 442-445. 39
- 90- MORT A.J., LAMPORT D.T.A. 105
Anal. Biochem., 1977, 82, 289-309. 176
- 32- MÜLLER W.E.G., SCHUSTER D.K., ZAHN R.K., MAIDHOF A.,
LEYHAUSEN G., FALKE D., KOREN R., UMEZAWA H.
Int. J. Immunopharmac., 1982, 4, n° 5, 393-400. 40
- 21- NAKASHIMA I.
J. Immunol., 1972, 108, 1009-1016. 37
- 23- NAKASHIMA I., KATO N.
Immunology, 1974, 27, 179. 37
- 20- NAKASHIMA I., KATO N.
Japan J. Microbiol., 1973, 17, n° 6, 461-471. 37
- 22- NAKASHIMA I., OHTA F., KOBAYASHI T., KATO O.,
KATO N.
Japan J. Microbiol., 1973, 17, n° 1, 35-43. 37
- 74- NIAZI S., STATE D.
Cancer Research, 1948, 8, 653. 59, 161
- 16- NOLL E., BLOCH H., ASSELINEAU J., LEDERER E.
Bioch. Biophys. Acta., 1956, 20, 299. 36
- 34- NOMA T., YATA J.
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds" Proceedings of an International
Symposium, Osaka, Juillet 1981, Excerpta Medica,
Series 563, 480-484. 40

- 40- NOMOTO K., YOSHIKUMI C., MATSUNAGA K., FUGII T.,
TAKEYA K.
Gann, 1975, 66, 365-374. 42
- 12- O'CONNELL M.J., RITTS R.E., MOERTEL C.G.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 1976, 17, 214. 34
- 3- OLD J., CLARK D.A., BENACERRAF B.
Nature, 1959, 184, 291-292. 2, 34
- 112- OUCHTERLONY O.
Diffusion in gel methods for immunological analysis
Prog. Allergy, 1962, 6, 30. 144
- 19- PARANT M., AUDIBERT F., PARANT F., CHEDID L., SOLER E.,
POLONSKY J., LEDERER E.
Infect. Imm., 1978, 20, n° 1, 12-19. 36
- 83- PERCY M.E., BUCHWALD B.M.
Anal. Biochem., 1972, 45, 6067. 73, 172
- 4- PREVOT A.R., LEVADITI J., NAZIMON O., THOUVENOT H.
Ann. Inst. Pasteur, 1958, 94, 405-418. 2, 33
- 52- RENOUX G., RENOUX M.
C.R. Acad. Sci., Paris, 1971, 272, 349-350. 44
- 36- RIGGI S.J., DI LUZIO N.R.
Am. J. Physiol., 1961, 200, 297-300. 42
- 114- RIETSCHEL E.T., GALANOS C., LÜDERITZ O., WESTPHAL O.
In Immunopharmacology, Webb D. (eds), 1982, 183-229. 156
- 116- RIETSCHEL E.T., WOLLENWEBER H.W., ZHRINGER U., LÜDERITZ O.
Klin. Wochenschr., 1982, 60, 705-709. 156
- 120- RIMINGTON C.
Biochem. J., 1931, 25, 1062. 158
- 102- RUDENT A.
Activité antibactérienne et antivirale des
glycoprotéines extraites de *Klebsiella pneumoniae*
(Thèse de 3è cycle)-Université Paris-Sud, 1981. 137

- 99- RUDENT A., ZALISZ R., QUERO A.M., SMETS P.
Abstracts of the second International Conference 135
on Immunopharmacology, Washington, Juillet 1982, 257
- 98- RUDENT A., ZALISZ R., SALLES M.F., QUERO A.M., SMETS P.,
ROMMAIN M.
Abstracts of the second International Conference 135
on Immunopharmacology, Washington, Juillet 1982, 256.
- 100- SALLES M.F., ZALISZ R., CORNEGLIO D., SMETS P.
Communication personnelle , Tours , Mai 1982 . 135
- 125- SANDFORD P.A., CONRAD H.E.
Biochemistry, 1966, 5, 1508. 165
- 81- SCOTT J.E.
Methods in Carbohyd. Chem., 1965, V, 38. 65, 66
170
- 75- SEAMAN J.S., MOORE W.E., MITCHELL R.L., MILLER M.A.
Tappi, 1954, 37, 336. 61, 171
- 104- SIOU
Expertise de pharmacologie(15-10-1975)-Dossier AMM- 137
139
- 68- SPACKMAN D.H., STEIN W.A., MOORE S.
Anal. Chem., 1958, 30, 1190. 58
- 30- SPECTER S., BUTLER R.C., FRIEDMAN H.
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds" Proceedings of an International
Symposium, Osaka, Juillet 1981, Excerpta Medica,
Series 563, 303-306. 39
- 97- SPIRO R.G. 146
Meth. Enzymol., 1972, XXVIII, 3. 177

- 63- SPITLER L.E.
Adv.in Immunopharmaco., editors:Hadden J.,Muller P.,
Spreafico F.,Pergamon Press,1981,149-156. 49
- 49- SUZUKI I.,YADOMAE T.,YONEKUBO H.,KUMAZAMA Y.,MIYAZAKI T.
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds" Proceedings of an International
Symposium,Osaka,Juillet 1981,Excerpta Medica,
Series 563,347-350. 44
- 80- SVEDBERG T.,PEDERSON K.O.
Die"Ultracentrifuge",Steinkopff,Dresden and 63
Leipzig,1940. 170
- 46- TAGUCHI T.,FURUE H.,HATTORI T.,KONDO T.,KIMURA T.,
ITOH I.,OGAWA N.
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds" Proceedings of an International
Symposium,Osaka,Juillet 1981,Excerpta Medica,
Series 563,467-471. 43
- 96- TAKADA H.,TSUJIMOTO M.,OGAWA T.,ISHIHARA Y.,
KAWASAKI A.,KOTANI S.,TANAKA A.,NAGAO S.,
KUSHIMA K.,FUJIKI T.,KATO A.
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds" Proceedings of an International
Symposium,Osaka,Juillet 1981,Excerpta Medica,
Series 563,266-269. 139 ,150, 152
- 35- TANAKA H.,GOTO T.,KOHSAKA M.,AOKI H.,IMANAKA M.,
HASHIMOTO M.,KITAURA Y.,NAKAGUCHI O.,HEMMI K.,
TAKENO H.,OKADA S.,MORI J.,SENOH H.,MINE Y.,
NISHIDA N.
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds" Proceedings of an International
Symposium,Osaka,Juillet 1981,Excerpta Medica,
Series 563,171-174. 40

- 84- TAYLOR R.L., CONRAD H.E. 78,96
Biochemistry, 1972, 11, 1383. 105, 173
- 123- TERHO T.T., HARTIALA K. 162
Anal. Biochem., 1971, 41, 471-476.
- 51- THIENPONT D., VANPARIJS O.F.J., RAEYMAEKERS A.H.M.,
VANDENBERK J., DEMOEN P.J.A., ALLEWIJN F.T.N.,
MARSBOOM R.P.H., NIEMEGEERS C.J.E., SCHELLEKENS K.H.,
JANSSEN P.A.J. 44
Nature (London), 1966, 209, 1084-1085.
- 72- TILLMANS J., PHILIPPI K. 59, 111
Biochem. Z., 1929, 215, 36. 129, 158
- 39- TSUKAGOSHI S., OHASHI F. 42
Gann, 1974, 65, 557-558.
- 31- UMEZAWA H., AOYAGI T., SUDA H., HAMADA M.,
TAKEUCHI T. 40
J. Antibodies, 1976, 29, 97-99.
- 15- UEMIYA M., SUGIMURA K., KUSUMA T., SAIKI I.,
YAMAWAKI M., AZUMA I., YAMAMURA Y. 35
Infect. Imm., 1979, 24, 83.
- 29- VOICULESCU C.L., NEDELICU C., MICSISH F., CHITA O.,
ROGOZ S., STANCIU L. 39
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds" Proceedings of an International
Symposium, Osaka, Juillet 1981, Excerpta Medica,
Series 563, 285-290.
- 122- WERNER I., ODIN L. 161
Acta. Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230.

- 108- WHITE R.G., BERSTOCK L., JOHNS R.G.S., LEDERER E.
Immunology, 1958, 1, 54. 139
- 94- WILKINSON S.G.
Surface carbohydrates of the prokaryotic cell,
edited by I.W.Sutherland, Academic Press, 128
1977, 97-175. 177
- 117- WOBER W., ALAUPOVIC P.,
Eur.J.Biochem., 1971, 357-367. 156
- 126- WOODS K.S., WANG K.T.
Biochim.Biophys.Acta, 1967, 133, 369-370. 173
- 50- YADOMAE T., SUZUKI I., KUMAZAMA Y., MIYAZAKI T.
Microbiol.Immunol., 1979, 23, 997. 44
- 89- YAMASHINA I., MAKINO M. 105
J.Biochem., 1962, 51, 359. 175
- 26- YAMASHITA A.
"Immunomodulation by microbial products and related
synthetic compounds" Proceedings of an International
Symposium, Osaka, Juillet 1981, Excerpta Medica,
Series 563, 319-322. 37
- 25- YAMASHITA A., HATTORI Y., FUKUMOTO T.
Transplantation, 1980, 30, 122. 37
- 78- YPHANTIS D.A. 63
Biochemistry, 1964, 3, 297. 170

124- ZANETTA J.P., BRECKENBRIDGE W.C., VINCENDON G.
J.Chromato., 1972, 69, 291.

164

