

N° d'ordre : 1081

50376  
1983  
243

50376  
1983  
243

# MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE 3<sup>ème</sup> CYCLE EN BIOCHIMIE**

par

Ioannis KARAMANOS

**ETUDE D'UN LIPOPOLYSACCHARIDE POSSEDANT  
UNE ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE EXTRAIT  
D'UN LYSAT D'*Enterobacter agglomerans*.**



Présenté le 27 Septembre 1983 devant la Commission d'Examen

Président :

J. MONTREUIL

Rapporteur :

B. FOURNET

Examineurs :

G. SPIK

P. SMETS

à Marie-Christine

à Alexandre

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille (laboratoire associé au CNRS n°217, Directeur Professeur Jean MONTREUIL) sous la direction du Professeur Bernard FOURNET.

Je tiens à adresser tous mes remerciements:

à MR BURET et à MR SMETS des Laboratoires CASSENNE, pour m'avoir confié la réalisation de ce travail et pour l'aide matérielle apportée.

à MR le Professeur Bernard FOURNET, pour avoir dirigé ce travail en me guidant et conseillant dans la bonne humeur.

à MR STRECKER, maître de recherches au CNRS, pour son amitié et ces précieux conseils pour la réalisation de ce travail.

à Mlle le Professeur Geneviève SPIK, pour avoir accepté de juger ce mémoire.

à MR le Professeur Jean MONTREUIL, pour m'avoir permis de vivre durant ces trois dernières années l'ambiance chaleureuse du C<sub>9</sub>.

à Yves LEROY et Guy RICART, pour leur collaboration pour les analyses en spectrométrie de masse.

à Myriam CONIEZ pour l'ultracentrifugation analytique.

Enfin, à tous les amis du C<sub>9</sub>, qui, chacun de sa manière, participent à la vie du Laboratoire de Chimie Biologique.

Je remercie également le Centre Communal d'Action Sociale d'Henin-Beaumont pour les facilités accordées pour la réalisation dactylographique de ce mémoire.

# T A B L E   D E S   M A T I E R E S

## INTRODUCTION

I.Généralités sur les lipopolysaccharides	1
A.Définition	1
B.Localisation	3
C.Extraction	4
D.Propriétés physiques	4
II.structure des lipopolysaccharides	8
A.Le lipide A	8
B.Le noyau oligosaccharidique ("CORE")	12
C.La chaîne polysaccharidique ("SIDE-CHAIN")	22
III.Biosynthèse et détermination génétique des LPS	33
A.Biosynthèse	33
B.Détermination génétique	41
IV.Fonctions des LPS	45

## TRAVAUX PERSONNELS

I.Préparation de l'extrait brut ( RC1292)	49
II.Etude de l'extrait brut	51
A.Matériel et méthodes	51
1.Partie protéique	51
2.Partie glucidique	51
3.Elementes minéraux	52
B.Résultats	52
C.Conclusions	55
III.Fractionnement de l'extrait brut-recherche de la fraction active	58
1.Précipitation au cétavlon	58
A.Matériel et méthodes	58
B.Résultats	58

2. Fractionnement du $S_1$	61
A. Matériel et méthodes	61
B. Résultats	61
3. Conclusions	61
IV. Etudes de la structure de la fraction active ( $F_I$ )	65
1. Isolement des monosaccharides constituant le $F_I$	65
A. Matériel et méthodes	65
B. Résultats	65
2. Configuration des monosaccharides du $F_I$	65
A. Matériel et méthodes	65
B. Résultats	69
3. Identification de l'osamine particulière	69
A. Matériel et méthodes	69
B. Résultats	72
C. Conclusions	72
4. Etude de la séquence glucidique	73
A. Matériel et méthodes	73
1. Hydrolyse pronasique	73
2. Méthanolyse-hydrolyse	75
3. Méthylation	76
4. Oxydation périodique	78
5. Oxydation chromique	78
6. Acétolyse partielle	79
B. Résultats	79
1. Hydrolyse pronasique	79
2. Composition molaire	80
3. Méthylation	80
4. Oxydation périodique	84
5. Oxydation chromique	88
6. Acétolyse partielle	88
C. Conclusions	93

5. Recherche de la nature lipopolysaccharidique	
de la fraction active $F_I$	96
A. Matériel et méthodes	96
1. Isolement de la fraction lipide A du $F_I$	96
2. Identification des acides gras du lipide A	97
3. Dosage des acides gras du $F_I$ natif	97
B. Résultats	97
C. Conclusions	99
6. Evaluation du poids moléculaire du $F_I$ et de ces	
produits de dégradation	101
 CONCLUSIONS GENERALES	 104
 BIBLIOGRAPHIE	 107

Des activités anti-inflammatoires ont été décrites dans les produits de lyse des bactéries ( GOLOVTCHENKO ( 1 ) ). Cette voie de recherche de nouveaux médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens garde toute son importance quand on connaît les nombreux effets secondaires que ces molécules peuvent présenter.

Les laboratoires CASSENNE nous ont donné la possibilité de continuer des travaux commencés il y a quatre ans concernant l'isolement d'une molécule possédant cette propriété biologique à partir d'un lysat bactérien d'Entérobacter agglomerans.

Notre travail a donc consisté à poursuivre les études entamées par J.M.LAMERAND ( 2 ) sur l'isolement, la purification et la structure de la molécule responsable de cette activité pour déterminer dans un second temps les relations structure - activité.

Nos travaux nous ayant conduit à la mise en évidence d'une molécule de nature lipopolysaccharidique, nous avons fait précéder nos travaux personnels d'un chapitre d'introduction sur la structure la biosynthèse et le rôle des lipopolysaccharides bactériens.



## INTRODUCTION

### I. GENERALITES SUR LES LIPOPOLYSACCHARIDES

#### A. Définition

Les lipopolysaccharides ( LPS ) des bactéries gram-négatives sont des complexes macromoléculaires qui portent les déterminants antigéniques " somatiques " des bactéries et qui sont capables de provoquer de nombreux effets biologiques aux animaux ( SHANDS ( 3 )).

Les lipopolysaccharides sont composés d'un hétéropolysaccharide complexe et d'un lipide appelé lipide A ( WESTPHAL ( 4 )).

Le polysaccharide complexe ( hydrophile ) couplé au lipide ( hydrophobe ) aboutit à des agrégats macromoléculaires ayant des propriétés amphipolaires ce qui influence beaucoup la structure de ces molécules.

La molécule de lipopolysaccharide est composée de trois segments covalentiellement liés ( Voir fig. 1 p. 2 ) ( LUDERITZ ( 5 ) ) :

- \* La chaîne polysaccharidique ou "SIDE-CHAIN"
- \* Le noyau oligosaccharidique ou "CORE"
- \* Le lipide A

Chacun de ces segments a sa propre composition, sa propre biosynthèse et peut-être son propre rôle biologique.

Nous allons décrire succinctement ces trois segments :

#### 1. La chaîne polysaccharidique ( SIDE-CHAIN ).

C'est la partie immunodominante de la molécule, responsable de la spécificité antigénique "O". Elle est constituée d'unités de répétition oligosaccharidiques caractérisées par la présence de sucres particuliers ( abéquose, tyvélose, paratose etc ). Elle caractérise les lipopolysaccharides de type S ( Smooth ). Cette région est absente des lipopolysaccharides de type R isolés des souches "Rough".

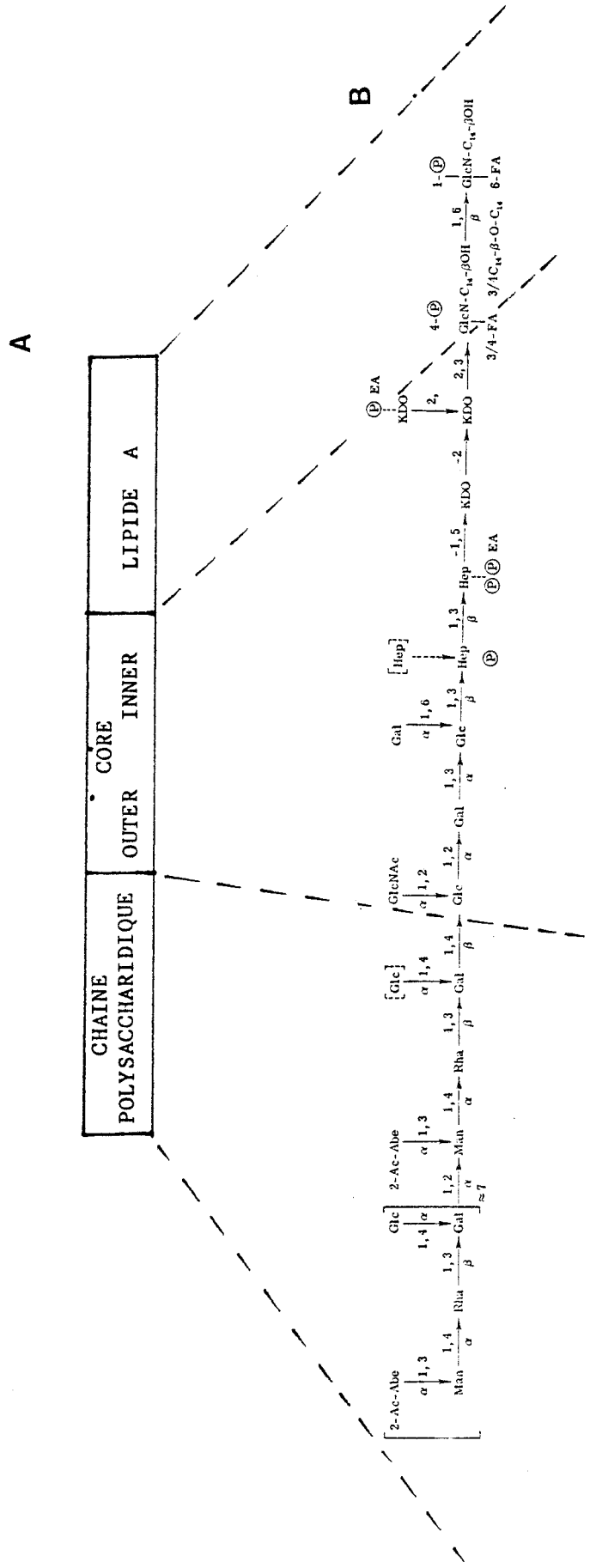


Figure 1

Modèle général d'un lipopolysaccharide ( A )  
 Structure du lipopolysaccharide de Salmonella ( B ).



## 2. Le noyau oligosaccharidique ( CORE ).

La région "CORE" ,peut être subdivisée en deux parties:

Une partie externe ( outer core ) sur laquelle se fixe la "SIDE-CHAIN"  
et une partie interne ( inner core ) sur laquelle se fixe le lipide A.

## 3. Le lipide A

Le lipide A est constitué de deux résidus de glucosamine et de plusieurs acides gras dont des acides 3-OH-alcanoïques qui caractérisent la fraction lipidique de ces lipopolysaccharides.

Les régions CORE et lipide A sont constantes dans tous les lipopolysaccharides de type S ( Smooth ) et sont caractérisées par la présence

- \* d'acide 2-céto-3-deoxy octulosonique ( KDO )
- \* de L-glycéro-D-mannoheptose
- \* de glucosamine
- \* et d'acides 3-OH-alcanoïques ( acide  $\beta$ -OH-myristique ).

Certains auteurs (GEYER,GALANOS (6) ont identifié la présence de protéines à côté des constituants des lipopolysaccharides que nous venons de décrire. Ces travaux n'ont pu conclure à la présence de liaisons covalentes entre une fraction du lipopolysaccharide et la protéine; des interactions ioniques entre la protéine et les groupements phosphate ou pyrophosphate seraient responsables de ces associations.

## B. Localisation

Les lipopolysaccharides font partie de l'enveloppe cellulaire des bactéries gram-négatives.

La membrane externe ( outer membrane ) en plus des lipopolysaccharides contient de nombreux lipides (surtout des phospholipides), des protéines particulières (HINDENNACH (7), une lipoprotéine spécifique qui forme la liaison entre la membrane externe et la mureïne sous-jacente (R-layer).

Le modèle général admis pour la paroi cellulaire des bactéries

gram-négatives est présenté à la figure 2, p. 5 .

Des modèles basés sur le concept de la "mosaïque fluide" ont été suggérés. Les molécules de LPS sont intercalées dans le feuillet externe de la membrane de manière à ce que les chaînes polysaccharidiques soient projetées en dehors de la surface cellulaire.

Cette situation rend compte des propriétés biologiques des LPS comme antigènes d'une part et récepteurs des phages d'autre part (JANN( 8)).

### C. Extraction

Bien que faisant partie d'un complexe insoluble, les LPS peuvent être obtenus sous une forme "solubilisée" dans l'eau à l'aide de plusieurs techniques:

- 1°. Phénol/eau 45p100 ,65-68°C (WESTPHAL (9)).
- 2°. Phénol/chloroforme/éther de pétrole (PCP) (GALANOS (10)).
- 3°. Acide trichloracétique 0.25 M à +4°C (STAUB (11)).
- 4°. Butanol saturé en eau ( LEIVE (12)).
- 5°. Diméthyl sulfoxide (DMSO) ( ADAMS (13)).

La première technique d'extraction par le mélange phénol/eau 45p100 est plus couramment utilisée pour l'extraction des LPS de type S.

Pour les LPS de type R les meilleurs rendements ont été obtenus par la technique au Phénol/chloroforme/éther de pétrole.

### D. Propriétés physiques

Les lipopolysaccharides forment des "solutions" aqueuses opalescentes contenant des agrégats en dispersion. Des études de sédimentation et de gel filtration confirment la présence de molécules de très haut poids moléculaire

Un des plus grands problèmes de l'étude des LPS a été la polydispersité des résultats très marquée, trouvée dans les différentes préparations.

La variation de la taille des particules des LPS peut être énorme comme cela a été démontré par ultracentrifugation analytique (OLINS (14)).

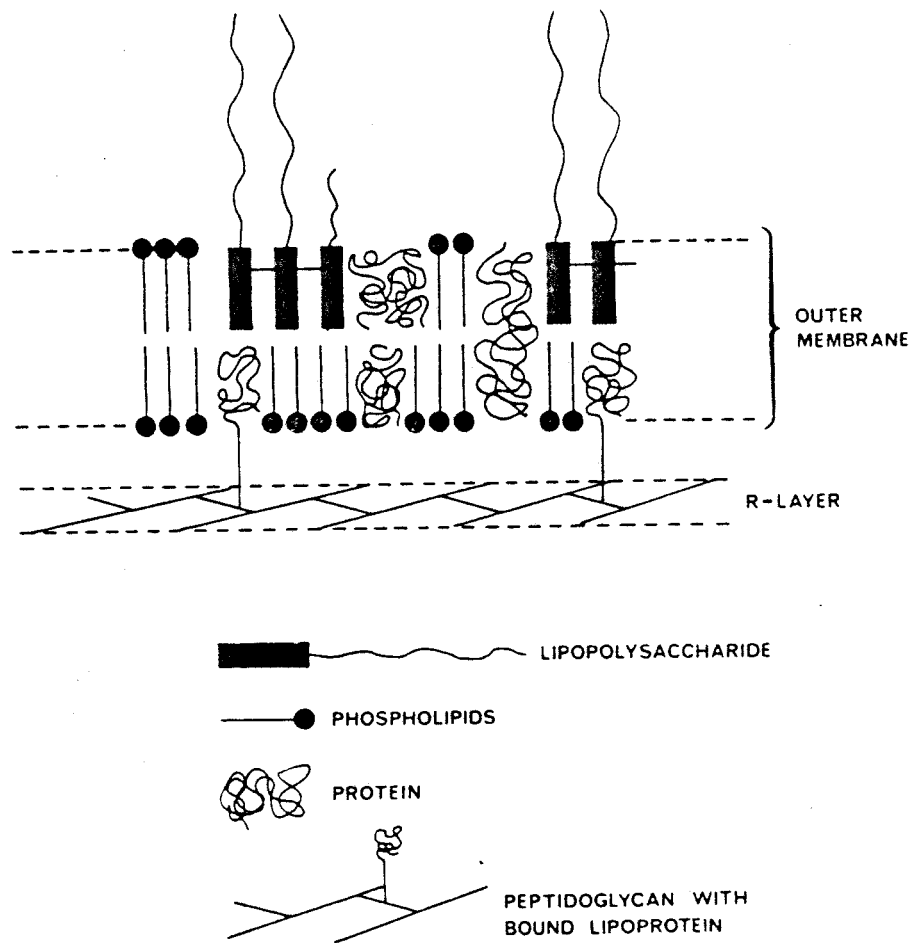


Figure 2

Structure de la paroi des bactéries gram-négatives



Les estimations du poids moléculaire des LPS indiquent une variation de 1 à  $20 \cdot 10^6$  daltons. Cette polydispersité est particulièrement caractéristique des extraits obtenus par la technique au Phénol/eau ( WESTPHAL ( 15)).

Plusieurs procédures ont été utilisées pour obtenir des molécules faciles à étudier:

- \* addition de solvants organiques tel que pyridine ( LUDERITZ (16)).
- \* addition de détergents, suivi de dialyse ( RIBI (17)).
- \* dialyse contre des agents chélateurs ( OLINS (18)).
- \* sonication ( SHANDS (19)).

La chromatographie d'échange d'ions a été essayée dans le but de sélectionner des populations de particules, ainsi que la centrifugation en gradient de saccharose.

La taille des particules a été estimée en utilisant la sédimentation, diffusion, viscosité intrinsèque et le volume spécifique partiel. Des agrégats ont été mis en évidence avec des dimensions suivantes: 28-39 A x 1160-1225 A ( RIBI (20) ), 39 A x 1200 A ( OLINS ( 21) ), pour un poids moléculaire de  $5 \cdot 10^5$  à  $1 \cdot 10^6$  daltons.

Deux modèles proposés tiennent compte des propriétés biochimiques et morphologiques des lipopolysaccharides. Selon MILNER ( 23) la morphologie des LPS est déterminée par l'agrégation des molécules de polysaccharide sous forme de micelles. Selon ROTHFIELD ( 24) les LPS forment un feuillet bimoléculaire rappelant une structure "phospholipide" avec une double couche lipidique et le polysaccharide à l'extérieur.

Si l'analogie avec le modèle phospholipidique est valable, théoriquement la liaison de deux feuillets est réalisée avec des interactions hydrophobes.

Les études physicochimiques indiquent que les forces hydrophobes doivent jouer un rôle majeur dans l'assemblage des ces macromolécules. Les LPS sont "cassés" en petits fragments par l'addition de détergents anioniques tel que dodecyle sulfate de sodium ou désoxy-

cholate de sodium.

L'addition de désoxycholate de sodium au LPS d'E.coli réduit le coefficient de sédimentation de 73 à 0.94 S pour un poids moléculaire estimé de 9 à 20000 daltons. Mc INTIRE ( 25 ) a trouvé un poids moléculaire de 400 000 pour un LPS d'E.coli traité au SDS alors que OLINS ( 26 ) décrit pour Azotobacter un poids moléculaire de 96 200 daltons.

Nous ne savons pas si ces disparités de résultats reflètent la différence de préparation des LPS ou les incertitudes des méthodes physicochimiques utilisées.

De toute façon, il y a aucun doute que les polymères de LPS sont "cassés" en petites sous-unités par l'addition de détergents et que, après élimination du détergent, ils sont réagréés en macromolécules.

Ainsi un traitement qui ne provoque pas la rupture des liaisons covalentes, prouve qu'il s'agit bien des forces hydrophobes qui agrègent les sous-unités des macromolécules.

Ceci permet de reconnaître que le lipide A est responsable de ce comportement, puisque les polysaccharides privés de leur partie lipidique ne se comportent plus de cette manière.

Des cations bivalents ont été trouvés dans le lipide A d'E.coli (BURTON ( 27 )) ainsi que chez Pseudomonas aeruginosa. Les LPS sont libérés dans le milieu lors de traitements aux agents chélateurs (p.e. EDTA). Les cations influencent la structure physique de ces molécules. L'addition d'EDTA dans une solution de LPS de A.vinelandii ( OLINS ( 28 )) réduit la taille des LPS à 134 000, alors que l'addition d'ions  $Ca^{++}$  donne un agrégat de 873 000 daltons.

La combinaison des forces hydrophobes et des interactions ioniques est responsable de la structure des sous-unités. Nous ne connaissons pas où les ions  $Ca^{++}$  sont attachés à la molécule, mais il est probable que les groupements phosphate sont impliqués dans ces interactions.

## II. S T R U C T U R E   D E S   L I P O P O L Y S A C C H A R I D E S

La composition et la structure des lipopolysaccharides ont été établies à l'aide d'études chimiques, immunochimiques, bactériologiques ainsi que des études de biosynthèse et de génétique.

Nous allons décrire successivement la structure du lipide A, du noyau oligosaccharidique ( "CORE") et de la chaîne polysaccharidique ("SIDE-CHAIN"), en se limitant aux Entérobactériaceae.

### A. Le lipide A

Le lipide A peut être facilement obtenu par hydrolyse acide ménagée (acide acétique 1p100; BOIVIN (29) qui coupe spécifiquement au niveau des liaisons labiles KDO-KDO (acide 2-céto-3-deoxy octulosonique) et KDO-GlcNH<sub>2</sub> (glucosamine). La fraction organosoluble obtenue par extraction au chloroforme de l'hydrolysât partiel contient de la D-glucosamine, des acides gras, des résidus phosphate et de l'éthanolamine à des proportions variées.

Le lipide A se caractérise dans tous les cas par une structure de base constituée de deux résidus de D-glucosamine en liaison 1,6 (GMEINER (30)), la liaison 1,4 a été décrite pour le lipide A d'E. coli O<sub>86</sub> et de Shigella flexneri (ADAMS (31), (fig. 3, P. 9).

Les acides gras constituant le lipide A sont liés aux deux résidus de glucosamine par liaison amide ou liaison ester. L'acide gras lié par liaison amide sur l'atome d'azote des résidus de glucosamine est d'une façon générale un acide 3-OH-alcanoïque, dans les Entérobactériaceae on identifie spécifiquement l'acide β-OH-myristique. La fonction -OH de l'acide 3-OH-alcanoïque est elle-même estérifiée par un acide gras; c'est ainsi que dans le cas de Salmonella (RIETSCHER (32) et de Shigella sonnei (LUGOWSKI (33)), c'est l'acide myristique (14:0) qui estérifie l'acide β-OH-myristique.



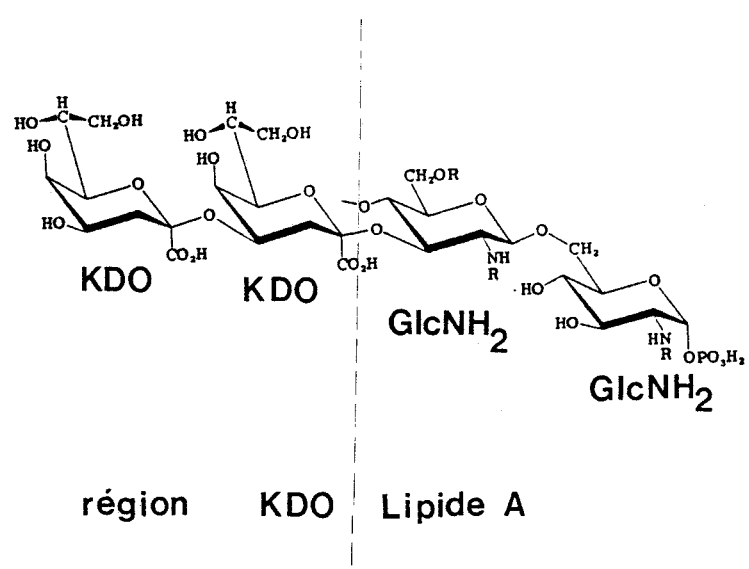
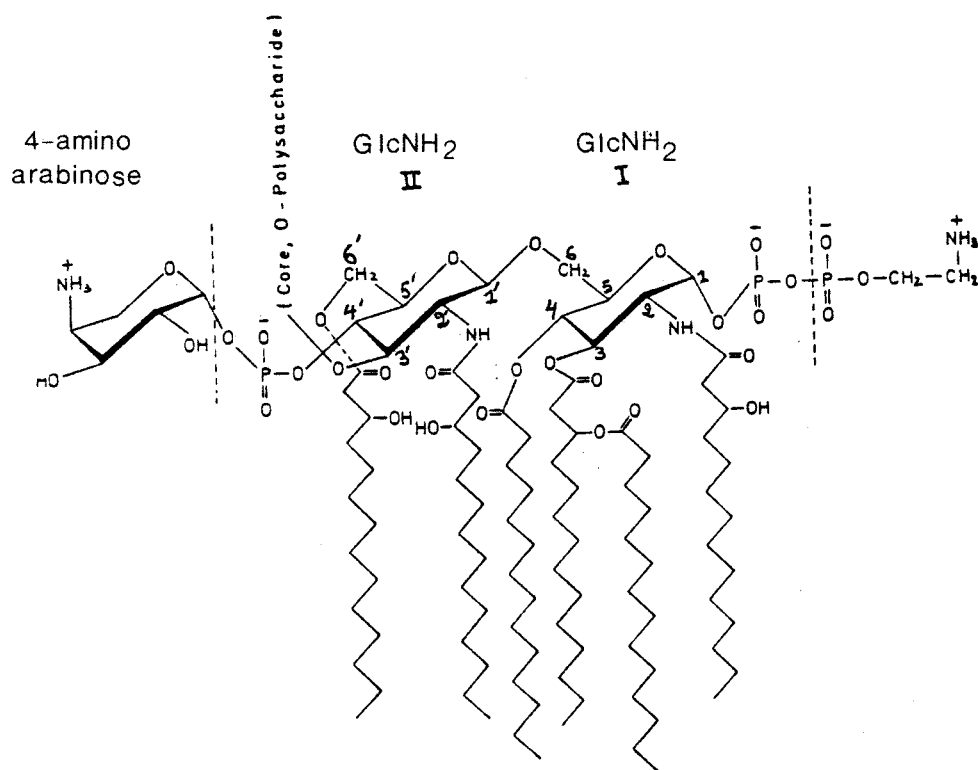


Figure 3

Structure du lipide A de Salmonella( ) (A) et structure du point d'attache CORE-lipide A (B)



Les fonctions alcool des osamines sont estérifiées généralement par les acides laurique ( 12:0 ), myristique ( 14;0 ) et palmitique ( 16:0 ).

Le tableau I, P.11 ,résume la composition en acides gras des lipides A des lipopolysaccharides d'Entérobactériaceae.

Des acides gras mineurs ont pu être identifiés dans les hydrolysats partiels de lipopolysaccharides;il s'agit en fait de produits de dégradation de l'acide  $\beta$ -OH-myristique, tel que l'acide trans-2-tétradécenoïque (ROONEY ( 34)).

De la phosphoryl-éthanolamine a été identifiée comme constituant du lipide A. Cette molécule est généralement liée au carbone 1 de la première glucosamine par l'intermédiaire d'un groupement pyrophosphate (MUHLRADT ( 35)).

Un résidu de 4-amino-L-arabinose a été également identifié,lié à la deuxième glucosamine en position 4' par une liaison phosphodiester (fig. 3 ,p. 9 ).

Afin d'expliquer la masse moléculaire importante de ces molécules LUDERITZ et al.( 36) ont proposé en 1973 que l'unité oligosaccharidique  $\text{GlcNH}_2\text{-GlcNH}_2$  peut être conjuguée à l'aide de liaisons phosphodiester ou pyrophosphate sous forme de trimères.Par RMN du  $P_{31}$  MUHLRADT et al. ( 37) éliminent cette hypothèse et expliquent la masse moléculaire élevée de ces molécules par l'agrégation des lipopolysaccharides par interactions ioniques et hydrophobes.

Enfin l'hydroxyle 3' de la deuxième glucosamine servira dans le point d'attache

"noyau oligosaccharidique - lipide A"

par l'intermédiaire d'une liaison

KDO -  $\text{GlcNH}_2$

( acide 2-céto-3-deoxy octulosonique 2,3' glucosamine ).

T A B L E A U I  
 LES ACIDES GRAS MAJEURS DES ENTEROBACTERIACEAE \*

ORGANISME	ACIDES 3-OH-ALCANOÏQUES	ACIDES Non hydroxy
Salmonella	3-OH-14:0	12:0, 14:0; 16:0
E. Coli	idem	12:0, 14:0, 16:0
Shigella	idem	12:0, 14:0, 16:0
Klebsiella	idem	12:0, 14:0, 15:1, 16:0
Entero.aerogenes	idem	12:0, 15:0, 18:0
Serratia	idem + 3-OH-12:0	12:0, 14:0, 16:0
Proteus	idem	14:0, 16:0
Yersinia	idem	14:0, 16:0

\* d'après WILKINSON ( 22 ).

B. Le noyau oligosaccharidique ( "CORE" ).

Le noyau oligosaccharidique est constitué d'hexoses neutres ( galactose, glucose ), hexosamines ( glucosamine N-acétyl ), d'heptoses ( L-glycéro-D-mannoheptose ) et de l'acide 2-céto-3-deoxy octulosonique ( KDO ).

Cette unité oligosaccharidique peut être étudiée en trois parties:

\* La fraction proche du point d'attache CORE - lipide A  
( REGION KDO )

\* La fraction intermédiaire riche en heptose  
( REGION HEPTOSE )

\* La fraction terminale constituée de glucose , galactose,  
et glucosamine, constituant la charnière avec la chaîne  
polysaccharidique  
( REGION OUTER CORE ).

1. LA REGION KDO

La région KDO du noyau oligosaccharidique des Salmonella a été étudiée par DROGE et al. ( 38 ) pour aboutir aux observations suivantes ( voir fig. 4 , p. 13 ):

a) Cette région est constituée de trois résidus de KDO dont un résidu est en position latérale.

b) Un des trois résidus de KDO est estérifié en position 7 par de la phosphoryl éthanolamine.

c) Le dernier résidu de KDO est condensé à un résidu d'heptose par une liaison

heptose ( 1-5 ) KDO.

Il est à noter qu'aucune information n'est donnée sur la nature des liaisons KDO - KDO.

Les LPS d'E.coli ont été étudiés par PREHM et al. ( 39 ) à partir de plusieurs mutants.

Comme pour Salmonella ( DROGE ( 40 ) ces auteurs ont pu mettre en

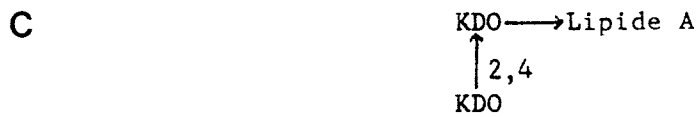
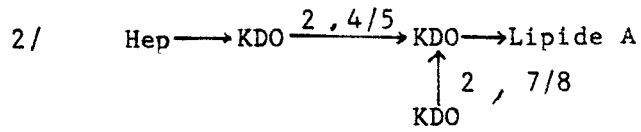
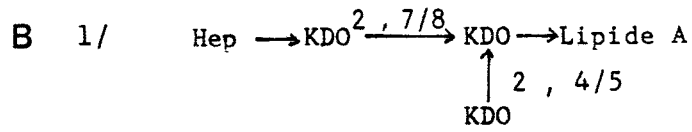
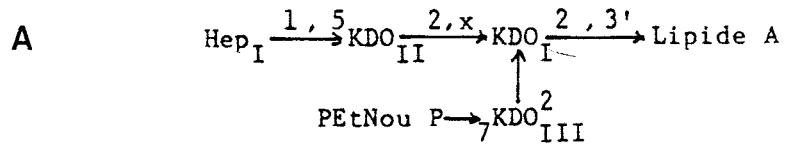
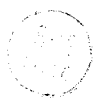


Figure 4

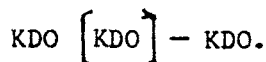
Structure de la "région KDO" des Salmonella ( A ).

Hypothèses de structure de la région KDO ( PREHM(41) ) ( B ).

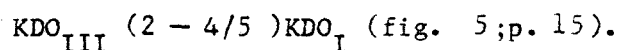
Région KDO du lipopolysaccharide d'E.coli BB<sub>12</sub> ( C ).



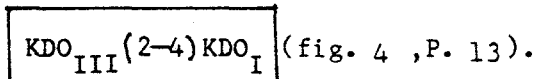
évidence pour la région KDO du "CORE", la présence d'un trisaccharide branché



En prenant comme hypothèse que les deux résidus de KDO ( $\text{KDO}_{\text{II}}$  et  $\text{KDO}_{\text{III}}$ ) ne peuvent être conjugués sur le KDO central ( $\text{KDO}_{\text{I}}$ ) sur deux carbones adjacents ( carbone 4 et 5 ou carbone 7 et 8 ), ces auteurs à l'aide des techniques classiques d'investigation des séquences oligosaccharidiques (dégradation de Smith, perméthylation ), concluent que le KDO latéral ( $\text{KDO}_{\text{III}}$ ) est lié sur le  $\text{KDO}_{\text{I}}$  par une liaison



Cette ambiguïté a été levée par ces mêmes auteurs qui montrent par méthylation du LPS d'E.coli BB<sub>12</sub> ne contenant que deux résidus de KDO ( $\text{KDO}_{\text{I}}$  et  $\text{KDO}_{\text{III}}$  ), que ces résidus monosaccharidiques sont conjugués par une liaison



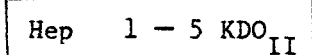
Ce résultat a été confirmé par les travaux d'OSBORN ( 42) sur l'étude de la biosynthèse de la région "CORE".

La structure complète de la région KDO du "CORE" ainsi que les liaisons avec le lipide A et la région heptose est présentée dans la figure 6, p. 16.

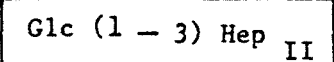
## 2. LA REGION HEPTOSE

Elle est généralement constituée de trois résidus d'heptose (L-glycéro-D-mannoheptose ). La présence de ces trois résidus d'heptose a été démontrée pour les LPS d'E.coli sur lesquels l'étude de la région heptose a été la plus complète.

L'heptose I est conjugué à la région KDO par une liaison



(fig. 7 , p. 17). L'heptose II constitue le point d'attache avec la troisième région du CORE ou OUTER CORE par une liaison



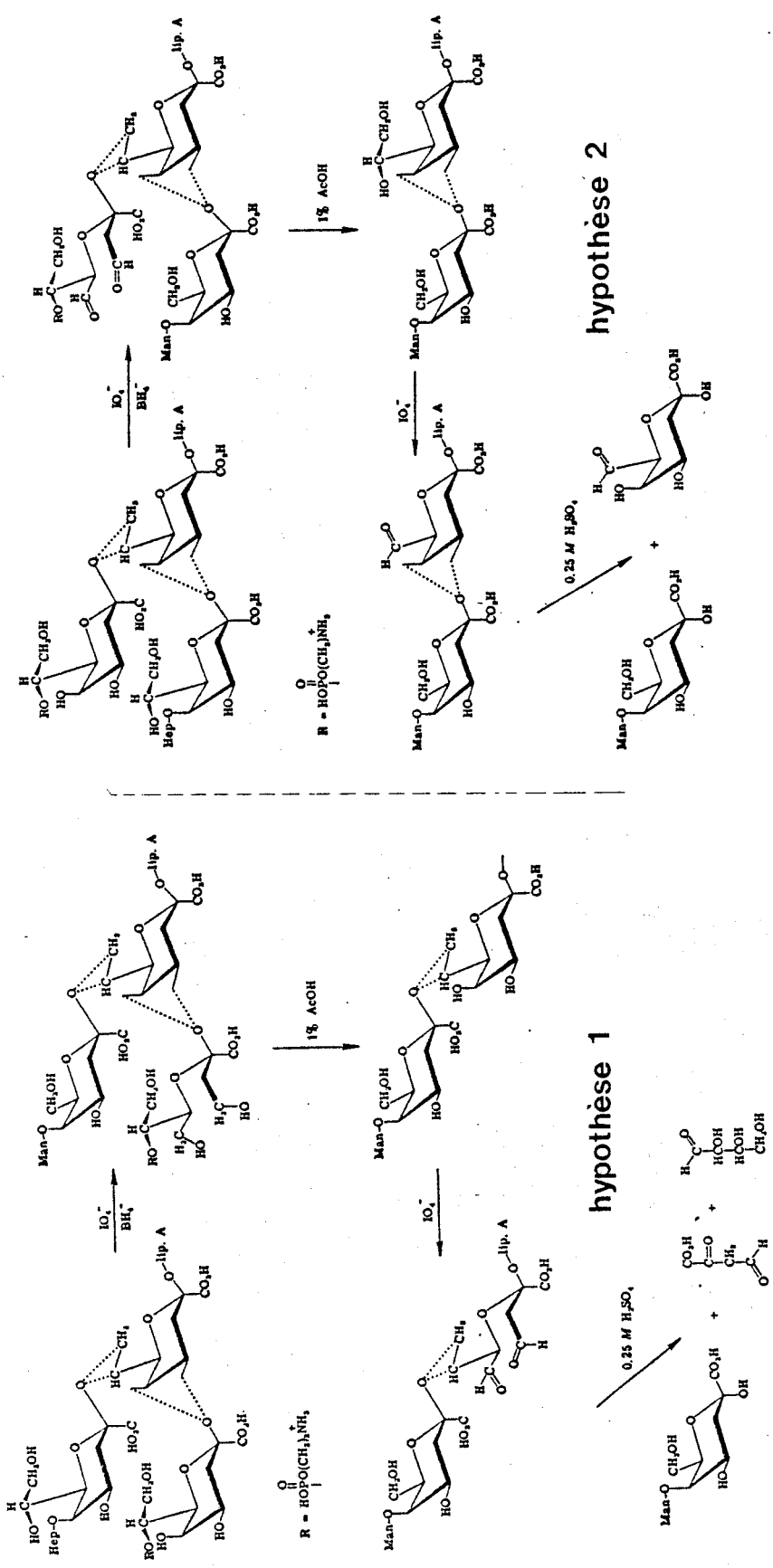


Figure 5

Suite des réactions permettant la vérification d'une des deux hypothèses de PREHM (43).



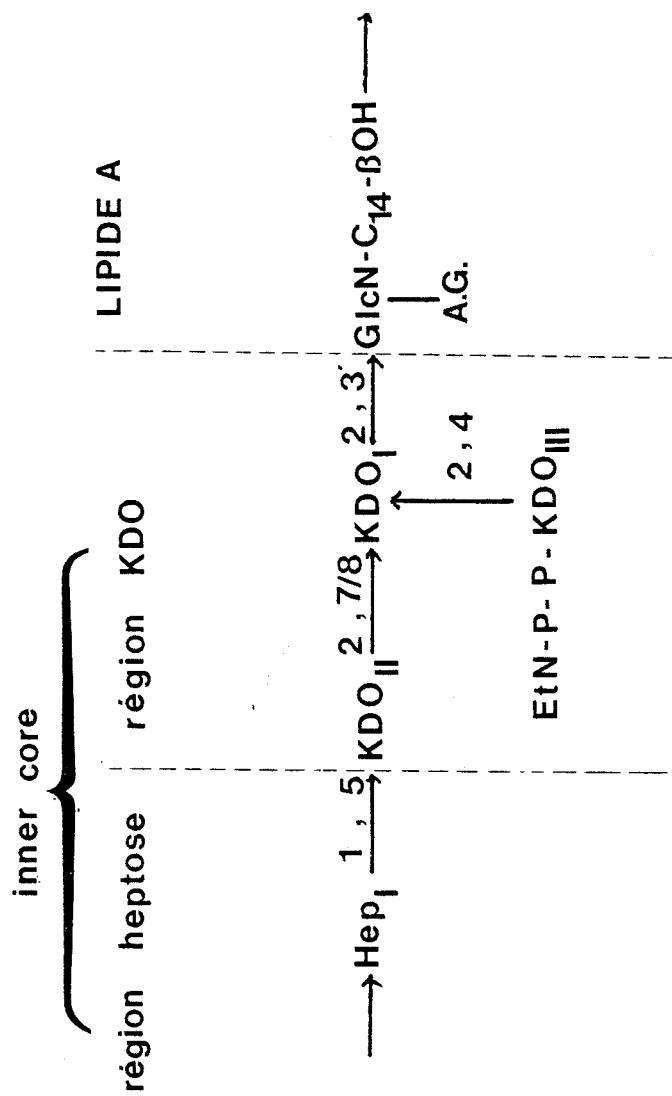


Figure 6

Structure de la région KDO du LPS de Salmonella et d'E. coli





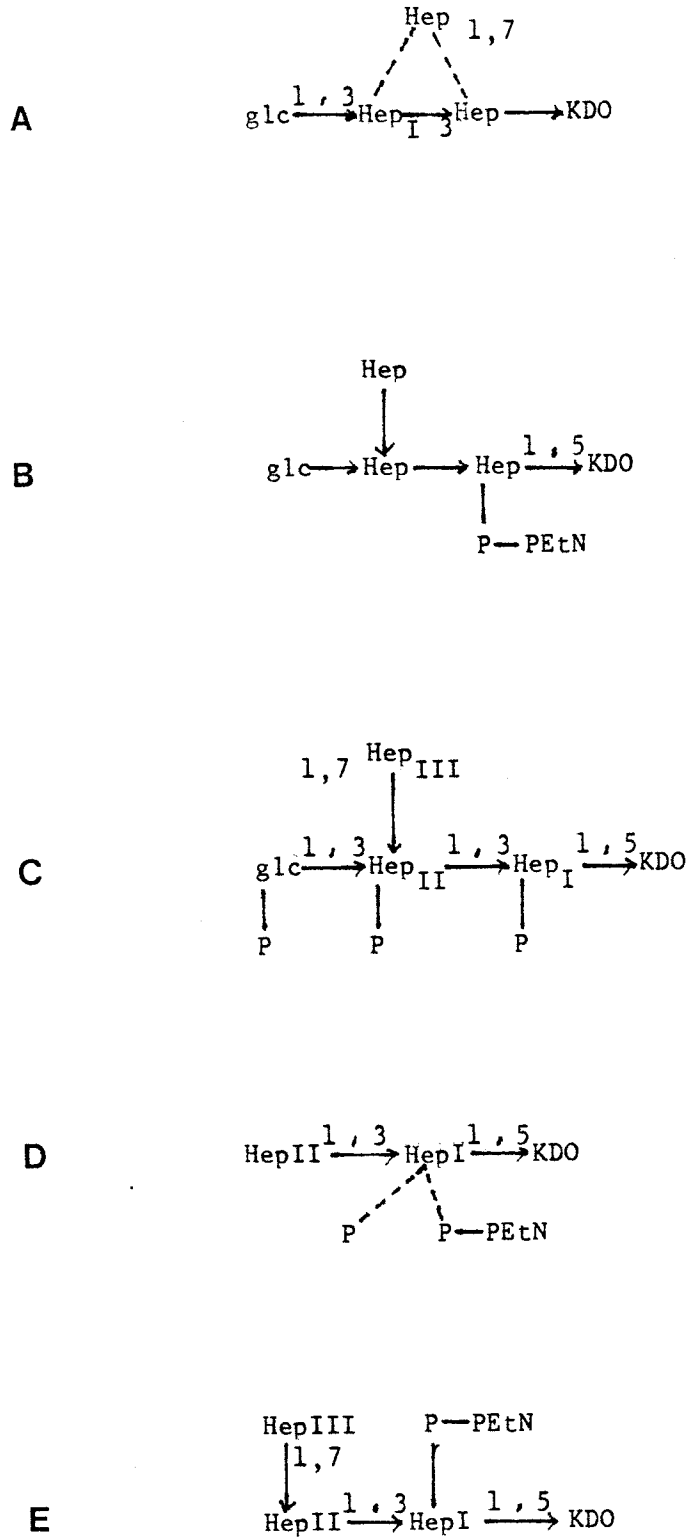


Figure 7

Structure de la région heptose d'E.coli<sub>100</sub> ( A ), B ( B ), K<sub>12</sub> ( C ) et de Salmonella ( D,E ).



L'heptose latéral ( Hep <sub>III</sub> ) est lié soit par une liaison 1,6 (PREHM ( 44) soit par une liaison 1,7 (BLACHE ( 45) sur l'heptose II.

Les heptoses de la chaîne principale sont généralement substitués par des groupements phosphate ou phosphoéthanolamine( LEHMANN ( 46).

Les mêmes résultats ont été obtenus pour les LPS de Salmonella (LEHMANN ( 47); présence de deux résidus d'heptose sur la chaîne principale et d'un résidu d'heptose latéral, des groupements phosphate et phosphoryléthanolamine ont également été identifiés.

La structure complète de la région heptose ainsi que les liaisons avec la région KDO et la région outer core est présentée dans la figure 8 , p.19 .

### 3.LA REGION OUTER CORE

A la différence des deux premières régions, l'outer core est beaucoup plus hétérogène. Elle est classiquement constituée de glucose, galactose et de N-acétyl glucosamine dans des rapports molaires très variés.

La figure 9, p. 20, illustre les structures de la partie " outer-core" de LPS d'E.coli et de Salmonella.

Dans la figure 10, p. 21 est donnée la structure complète d'un "CORE" de Salmonella ( mutant Ra de Salmonella). Cette structure a pu être déterminée à partir de plusieurs mutants; le mutant Rb déficient en UDP-N-acétyl glucosamine transférase, le mutant Rc incapable de transférer les résidus de galactose, le mutant Rd<sub>1</sub> qui ne possédant pas l'UDP-glucose pyrophosphorylase est incapable de fixer le résidu de glucose sur l'heptose ( hep <sub>II</sub> ), le mutant Rd<sub>2</sub> uniquement constitué du résidu d'heptose I et enfin le mutant Re qui est uniquement constitué de la région KDO-lipide A.

Les structures de ces mutants sont réunies dans la figure 10, p. 21 .

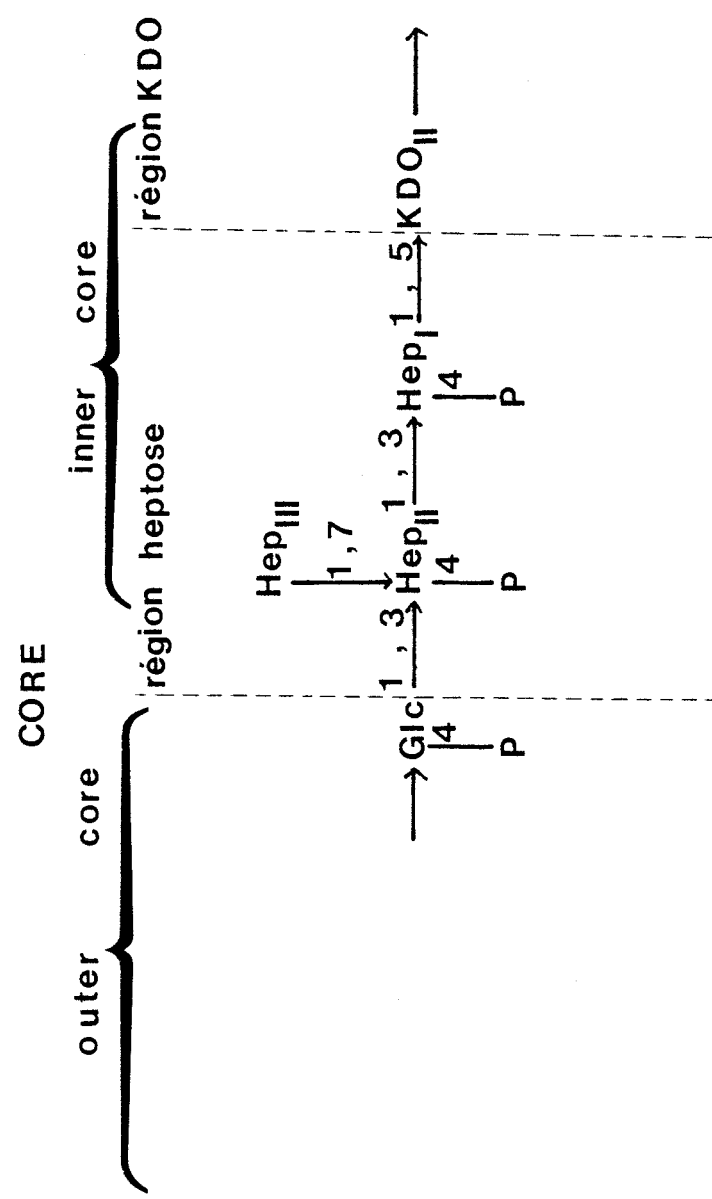


Figure 8

Structure complète de la région heptose.



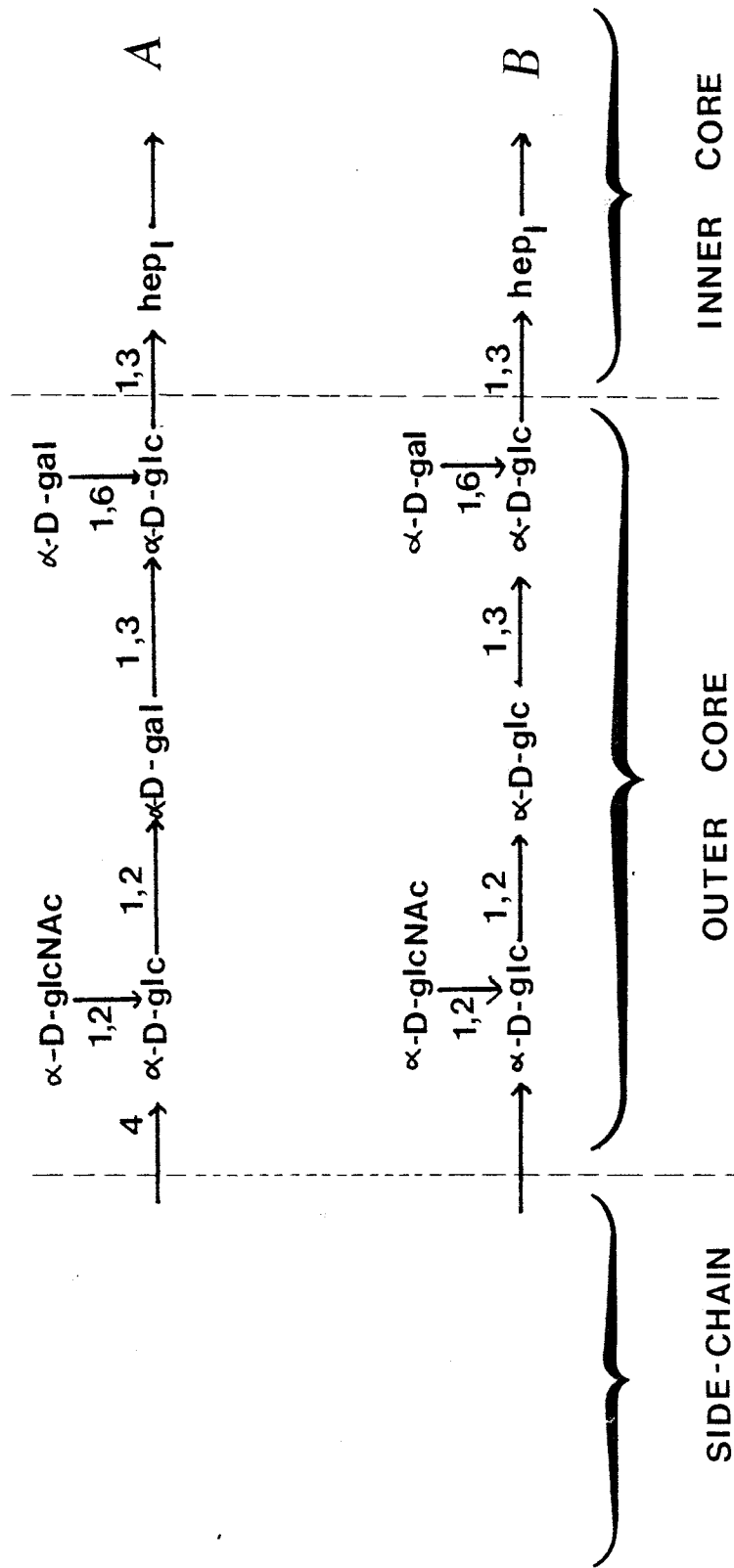


Figure 9

Structures de la partie OUTER CORE des LPS d' *E. coli* ( A ) et de *Salmonella* ( B ).

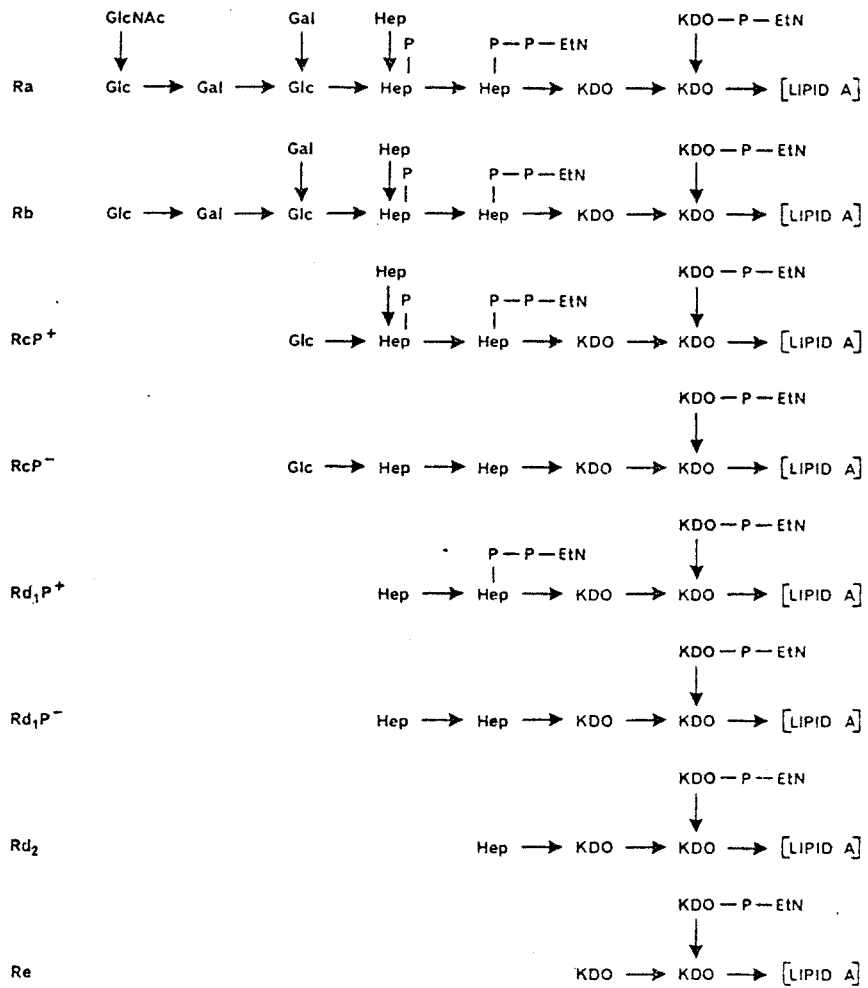


Figure 10

Structure complète de la région CORE de Salmonella ( Ra )

Structure des différents mutants R ( Rb à Re ).



### C. La chaîne polysaccharidique ( SIDE-CHAIN ).

Cette fraction polysaccharidique des LPS caractérisée par une très grande hétérogénéité de composition et de structure est responsable des activités immunologiques de chaque molécule.

#### 1. Composition en monosaccharides.

Plus de 20 monosaccharides constitutifs ont été trouvés dans les chaînes polysaccharidiques des bactéries gram-négatives.

#### LES HEXOSES

Le galactose et le glucose sont les monosaccharides neutres le plus couramment rencontrés avec dans certains cas le mannose. Tous ces monosaccharides sont de configuration D.

Dans le LPS de pseudomonas , du gulose a été identifié (BARBER (48)).

#### LES 6-DEOXY HEXOSES

Le L-fucose et le L-rhamnose ont été trouvés dans les Salmonella. Le 6-deoxy-L-talose a été identifié chez E.coli O<sub>45</sub> (LUDERITZ (49)). Dans d'autres sérotypes d'E.coli le 6-deoxy-D-talose a pu être identifié (LUDERITZ (50)).

#### LES 3,6 DIDEOXY HEXOSES

Cinq représentants de cette classe ont été trouvés chez les Entérobactériaceae ( tableau II, p. 23 ). Les 3,6 dideoxy hexoses constituent le plus souvent les déterminants antigéniques des lipopolysaccharides.

#### LES HEXOSAMINES

La glucosamine qui est un composant constant des fractions lipide A et "CORE" des lipopolysaccharides peut aussi faire partie de la chaîne polysaccharidique ( SIDE-CHAIN ) des LPS. A côté de cette hexosamine il a été souvent identifié de la galactosamine. Les résidus d'hexosamines sont dans tous les cas N-acétylés.

TABLEAU II  
 LES 3,6 DIDEOXY HEXOSES DES ENTEROBACTERIACEAE \*

3,6 dideoxy hexose	NOM COMMUN	FORMULE	Enterobactériaceae
-D-xylohexose	Abequose		Citrobacter 4,5 . P.pseudotuberculosis II Salmonella B, C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub>
-L-xylohexose	Colitose		Salmonella 35, 50 . E.coli O <sub>111</sub> , O <sub>55</sub> Arizona 9, 20
-L-arabinohexose	Ascarylose		P;pseudotuberculosis V
-D-ribohexose	Paratose		Salmonella A, P.pseudotuberculosis I, III

\* Tableau constitué d'après LUDERITZ et al. ( 51 ).



Des hexosamines particulières ont été enfin identifiées; il s'agit de deoxyhexosamines. Nous avons rassemblé dans le tableau III, p. 25, le nom et la provenance de ces résidus monosaccharidiques.

### LES PENTOSE

Le D-ribose souvent rapporté comme constituant des LPS, doit être considéré comme un contaminant apporté par des acides nucléiques (KAUFFMANN (52)).

Enfin le xylose a été trouvé dans Citrobacter freundii O<sub>8</sub> de même que dans Salmonella.

La composition qualitative des LPS isolés de plusieurs Entérobacteriaceae a été présentée dans le tableau IV, page 26. Les cercles pleins indiquent les monosaccharides appelés "monosaccharides de base" (LUDERITZ (53)), (heptose, KDO, glucosamine, glucose et galactose). Ces monosaccharides représentent le chémotype I. Les autres chémotypes étant définis par l'addition d'un ou de plusieurs "monosaccharides spéciaux". Dans le même tableau nous pouvons voir les différents sérotypes des bactéries correspondant à chaque chémotype.

### 2. Structure des chaînes polysaccharidiques

Les analyses structurales des chaînes polysaccharidiques qui représentent les antigènes "O" ont été menées principalement sur les LPS des Salmonella. La composition en monosaccharides et le mode de liaison au sein des unités de répétition distinguent les différents antigènes "O" des Salmonella reflétant ainsi leurs spécificités sérologiques.

A partir des résultats des méthodes classiques de l'étude des polysaccharides et surtout de l'analyse des oligosaccharides obtenus par hydrolyse partielle, les unités de répétition peuvent être reconstituées (Tab. V, p. 27). Il y a de très grandes ressemblances entre les unités de répétition élaborées par Salmonella B, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub> et E<sub>4</sub>.



TABLEAU III

## LES HEXOSAMINES PARTICULIERES DES ENTEROBACTERIACEAE \*

Hexosamine particulière	nom commun	Entérobacteriaceae ou autre origine
2-amino-2-deoxy mannose	Mannosamine	Salmonella, E.coli
2-amino-2,6-dideoxy glucose	Quinovosamine	Salmonella, Proteus, Shigella
2-amino-2,6-dideoxy galactose	Fucosamine	Salmonella, Citrobacter, E.coli, Pseudomonas
2-amino-2,6-dideoxy-L-mannose	Rhamnosamine	E.coli
3-amino-3,6-dideoxy glucose		E.coli, Salmonella, Citrobacter
3-amino-3,6-dideoxy galactose		E.coli, Xanthomonas
4-amino-4,6-dideoxy glucose	Viosamine	C.violaceum, E.coli
4-amino-4,6-dideoxy galactose	Thomosamine	E.coli
4-amino-4,6-dideoxy mannose	Perosamine	V.cholerae

\* tableau arrangé d'après LUDERITZ et al. (54)

TABLEAU IV

COMPOSITION QUALITATIVE DES LPS ISOLES DE PLUSIEURS Entérobacteriaceae

Chemotype	4-Amino-4,6-dideoxyglucose	4-Amino-4,6-dideoxygalactose	3-Amino-3,6-dideoxyglucose	3-Amino-3,6-dideoxygalactose	2-Amino-2,6-dideoxymannose	2-Amino-2,6-dideoxyglucose	2-Amino-2,6-dideoxygalactose	Mannosamine	Galactosamine	Glucosamine	Ketodixyotonic acid	1-Clycero-D-mannohexptose	Galactose	Glucose	Mannose	Fucose	Rhamnose	6-Deoxytalose	Ribose	Galitose	Abequose	Paratose	Tyvelose	Found in serotypes or serogroups
I									●	●	●	●	●											<i>Salmonella</i> V, X, Y <i>E. coli</i> 14, 24, 28, 30, 42, 56, 64, 82, 83, 85, 118, 141 <i>Citrobacter</i> 5396/58 Arizona 8, 19, 26, 29 <i>Shigella sonnei</i> I, II, <i>S. boydii</i> 3, 7, 8, 15 <i>Salmonella</i> L, P, 51 <i>E. coli</i> 21, 22, 23, 27, 33, 37, 46, 61, 76, 81, 87 Arizona 16; <i>S. boydii</i> 16
II									○	●	●	●	●	●										<i>Salmonella</i> C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , H <i>E. coli</i> 8, 9, 40, 58, 73, 78, 93 Arizona 30 <i>Salmonella</i> K, R; <i>E. coli</i> 6 <i>Salmonella</i> W; <i>E. coli</i> 41, 52 <i>Salmonella</i> G, N, U <i>E. coli</i> 80, 86, 90, 127, 128 Arizona 21, 25
III										●	●	●	●	●										<i>Salmonella</i> 59; <i>E. coli</i> 1, 13, 18, 19, 31, 35, 39, 50, 53, 54, 60, 69, 99, 100, 102, 119, 129 Arizona 6; <i>S. flexneri</i> 1a-5a, 6 <i>S. boydii</i> 1, 2, 4, 9, 10, 11, 14 <i>Salmonella</i> 53, 57 <i>E. coli</i> 48, 49, 51, 117
IV									○	●	●	●	●	●										<i>Salmonella</i> 56 <i>Salmonella</i> O; <i>E. coli</i> O111 Arizona 9, 20 <i>Salmonella</i> Z; <i>E. coli</i> 55 <i>Salmonella</i> I; <i>E. coli</i> 11, 43, 125 <i>Salmonella</i> E, F, 54; <i>E. coli</i> 34, 68, 75, 79 Arizona 17; <i>S. boydii</i> 5, 12 <i>Salmonella</i> B, C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> ; <i>Citrobacter</i> 139 <i>Salmonella</i> A <i>Salmonella</i> D <sub>1</sub> , D <sub>2</sub> <i>E. coli</i> 44, 59, 77 <i>E. coli</i> 126 <i>E. coli</i> 17 <i>E. coli</i> 12, 15, 29, 57 <i>E. coli</i> 4, 16, 25, 26 <i>E. coli</i> 45 <i>E. coli</i> 3 <i>E. coli</i> 36 <i>Salmonella</i> 52; Arizona 15 <i>E. coli</i> 66, 68 <i>E. coli</i> 84 <i>E. coli</i> 74 <i>E. coli</i> 2 <i>E. coli</i> 5, 65 <i>E. coli</i> 70
V									○	●	●	●	●	●										<i>Salmonella</i> M (28, 28) <i>E. coli</i> 71; <i>Citrobacter</i> 896 <i>E. coli</i> 114 <i>Salmonella</i> J <i>Salmonella</i> T <i>Salmonella</i> 58; Arizona 1, 33 <i>Salmonella</i> 5 <i>Salmonella</i> 55; Arizona 24 <i>Salmonella</i> M (28 <sub>1</sub> , 28 <sub>2</sub> ) <i>Salmonella</i> Q <i>E. coli</i> 10 <i>E. coli</i> 7
VI									○	●	●	●	●	●										
VII										●	●	●	●	●										
VIII									○	●	●	●	●	●										
IX									○	●	●	●	●	●										
X									○	●	●	●	●	●										
XI									○	●	●	●	●	●										
XII									○	●	●	●	●	●										
XIII									○	●	●	●	●	●										
XIV									○	●	●	●	●	●										
XV									○	●	●	●	●	●										
XVI									○	●	●	●	●	●										
XVII									○	●	●	●	●	●										
XVIII									○	●	●	●	●	●										
XIX									○	●	●	●	●	●										
XX									○	●	●	●	●	●										
XXI									○	●	●	●	●	●										
XXII									○	●	●	●	●	●										
XXIII									○	●	●	●	●	●										
XXIV									○	●	●	●	●	●										
XXV									○	●	●	●	●	●										
XXVI									○	●	●	●	●	●										
XXVII									○	●	●	●	●	●										
XXVIII									○	●	●	●	●	●										
XXIX									○	●	●	●	●	●										
XXX									○	●	●	●	●	●										
XXXI									○	●	●	●	●	●										
XXXII									○	●	●	●	●	●										
XXXIII									○	●	●	●	●	●										
XXXIV									○	●	●	●	●	●										
XXXV									○	●	●	●	●	●										
XXXVI									○	●	●	●	●	●										
XXXVII									○	●	●	●	●	●										
XXXVIII									○	●	●	●	●	●										
XXXIX									○	●	●	●	●	●										
XL									○	●	●	●	●	●										
XLI									○	●	●	●	●	●										
XLII									○	●	●	●	●	●										

\*d'après JANN et WESTPHAL ( 55).



TABLEAU V

STRUCTURES DES CHAINES POLYSACCHARIDIQUES ( SIDE-CHAIN ) DE Salmonella

OBTENUES PAR METHODE CHIMIQUE

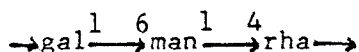
OBTENUES PAR METHODE IMMUNOLOGIQUE

E <sub>1</sub>	3,10	→ α-Ac-GAL-(1 → 6)-α-MAN-(1 → 4)-RHA-(1 → 3) →
E <sub>2</sub>	3,15	→ β-GAL-(1 → 6)-α-MAN-(1 → 4)-RHA-(1 → 3) →
		α-Glc ↓ <sub>4</sub> <sup>1</sup>
E <sub>3</sub>	(3), (15), 34	→ β-GAL-(1 → 6)-α-MAN-(1 → 4)-RHA →
		α-Glc ↓ <sub>6</sub> <sup>1</sup>
E <sub>4</sub>	1, 3, 19	→ α-GAL-(1 → 6)-α-MAN-(1 → 4)-RHA →
		α-Tyv ↓
D <sub>2</sub>	3, (9), 46	→ GAL-(1 → 6)-α-MAN-(1 → 4)-RHA →
		α-Abc ↓ <sub>3</sub> <sup>1</sup>
B	4 <sub>1</sub> , 12 <sub>1</sub> , 27, 27B	→ α-GAL-(1 → 6)-β-MAN-(1 → 4)-RHA →
		α-Abc ↓ <sub>3</sub> <sup>1</sup>
B	4 <sub>1</sub> , 4 <sub>2</sub> , 12 <sub>1</sub>	→ α-GAL-(1 → 4)-β-MAN-(1 → 4)-RHA →
		α-Glc      α-Abc ↓ <sub>4</sub> <sup>1</sup> ↓ <sub>3</sub> <sup>1</sup>
B	4 <sub>1</sub> , 4 <sub>2</sub> , 5, 12 <sub>1</sub> , 12 <sub>2</sub>	→ α-Ac-GAL-(1 → 4)-β-MAN-(1 → 4)-RHA →
		α-Tyv ↓
D <sub>1</sub>	9, 12 <sub>1</sub> , 12 <sub>3</sub>	→ GAL ———→ MAN-(1 → x)-RHA →
		α-Glc      α-Tyv ↓ <sub>4</sub> <sup>1</sup> ↓
D <sub>1</sub>	9, 12 <sub>1</sub> , 12 <sub>2</sub> , 12 <sub>3</sub>	→ α-GAL ———→ MAN-(1 → x)-RHA →
G	13, 22	→ [ Glc-(1 → ?)- β-Gal-(1 → 3)-GalNAc-(1 → 3)-GalNAc-Fuc →

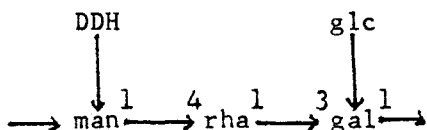
		α-Abc ↓ <sub>3</sub> <sup>1</sup>
B	4 <sub>1</sub>	→ β-Man-(1 → 4)-Rha → <sup>a</sup>
		α-Abc ↓ <sub>3</sub> <sup>1</sup>
B	4 <sub>2</sub>	→ β-Man-(1 → 4)-Rha → Gal-(1 → 4)-β-Man → <sup>a</sup>
		α-Abc ↓ <sub>3</sub> <sup>1</sup>
B	27 <sub>B</sub>	→ β-Man-(1 → 4)-Rha → Gal → (1 → 6)-β-Man → <sup>a</sup>
B	5	Ac-Gal → (Man, Rha, Gal, Man) → Rha →
B, E <sub>4</sub> , G	1	α-Glc-(1 → 6)-α-Gal →
B	1 <sub>12</sub>	α-Glc-(1 → 6)-α-Gal-(1 → 4)-β-Man-(1 → 4)-(Rha) <sup>b</sup> →
E <sub>4</sub>	19	α-Glc-(1 → 6)-α-Gal-(1 → 6)-α-Man-(1 → 4)-(Rha) <sup>b</sup> →
G	37	α-Glc-(1 → 6)-Gal → X <sup>c</sup> →
E <sub>1</sub>	3	→ α-Man-(1 → 4)-Rha-(1 → 3)-α-Ac-Gal →
E <sub>2</sub>	3	→ α-Man-(1 → 4)-Rha-(1 → 3)-β-Gal →
		α-Glc ↓ <sub>4</sub> <sup>1</sup>
E <sub>3</sub>	3	→ α-Man-(1 → 4)-Rha-(1 → 3)-β-Gal →
		α-Glc ↓ <sub>6</sub> <sup>1</sup>
E <sub>4</sub>	3	→ α-Man-(1 → 4)-Rha → α-Gal →
E <sub>1</sub>	10	α-Ac-Gal-(1 → 6)-α-Man-(1 → 4)-Rha →
E <sub>2</sub>	15	β-Gal-(1 → 6)-α-Man-(1 → 4)-(Rha) <sup>b</sup> →
E <sub>3</sub>	34	α-Glc-(1 → 4)-β-Gal-(1 → 6)-α-Man →
D	12 <sub>2</sub>	α-Glc-(1 → 4)-α-Gal ———→ Man → (Rha) <sup>b</sup> →



Leurs structures se construisent autour du motif :



et répondent à la formule générale suivante:



Dans cette structure partielle de l'unité de répétition des "SIDE-CHAIN" des LPS de Salmonella, DDH représente un 3,6 dideoxy hexose; pour le sérotype A le paratose, le sérotype B l'abéquose et pour le sérotype D<sub>1</sub> le tyvélose (LUDERITZ (56)).

Les chaînes polysaccharidiques sont suffisamment différentes pour expliquer leur spécificité sérologique.

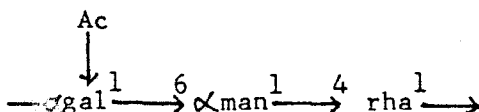
Ainsi la différence entre le groupe E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub> est que le galactose est acétylé, la différence entre E<sub>3</sub> et E<sub>4</sub> est que la liaison du résidu de glucose est de type 1,4 au lieu d' 1,6. ( tableau V, p. 27 ).

Le nombre des "SIDE-CHAIN" attachées sur le "CORE" et la longueur de ces chaînes ne sont pas connus. Le poids moléculaire des polysaccharides a été évalué de 30 000 à 40 000 daltons alors que le "CORE" représente 7000 .

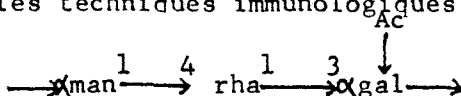
Sur cette base il y aurait 40 unités tétrasaccharidiques arrangées en une seule chaîne ou bien 5 chaînes de 8 unités de répétition.

Les unités obtenues par des méthodes chimiques sont différentes de celles obtenues par des techniques d'inhibition de la précipitation antigène-anticorps (tableau V, p. 27).

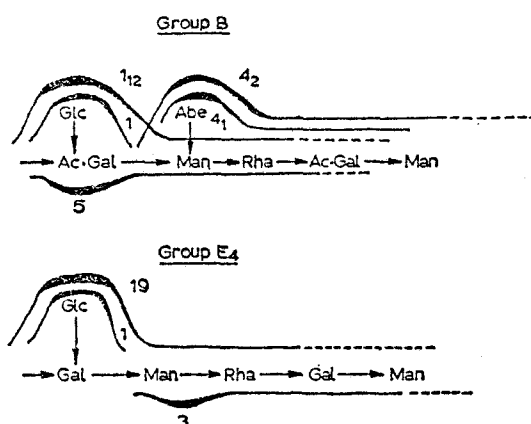
Ainsi le groupe E<sub>1</sub> par méthode chimique donne le trisaccharide:



alors que les techniques immunologiques aboutissent au trisaccharide:

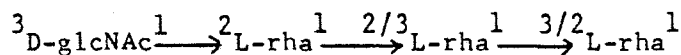


Le monosaccharide ( terminal ou autre ) qui possède la plus grande affinité pour l'anticorps correspondant ( déterminé par les tests d'inhibition ) est défini comme le monosaccharide immunodominant. Ainsi pour le groupe B nous déterminons les facteurs  $1_{12}, 4_2, 5$  et  $4_1$  alors que pour le groupe  $E_4$  les facteurs 1,3,19:

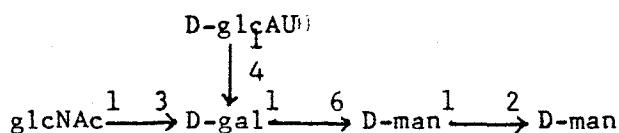


Malgré le grand nombre de LPS d'E.coli qui ont été analysés, peu d'études portent sur la chaîne polysaccharidique et montrent une très grande variabilité. Nous ne pouvons donc déterminer un motif de répétition de base autour duquel les structures des différents sérotypes se construisent (voir tableau, VI p.30 ).

Pour Shigella flexneri LINDBERG ( 57 ) a proposé l'unité de répétition constituée de 4 monosaccharides:



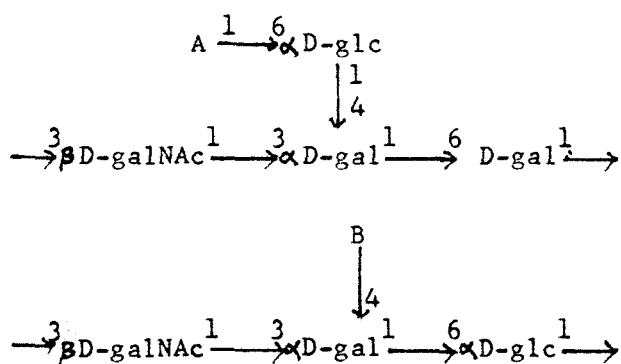
Shigella boydii aurait l'unité de répétition suivante: (DIMITRIEV ( 58 ))



alors que Shigella dysenteriae est un cas particulier car l'oligosaccharide contient des composés acides non identifiés:

TABLEAU VI  
STRUCTURES DES UNITES DE REPETITION DES "SIDE-CHAIN"

<u>A. D'E.coli</u>	
sérotyp	STRUCTURE
O <sub>111</sub>	$\begin{array}{c} \text{Colp } \alpha 1 \\   \\ 6 \\ \text{D-GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2 \text{ D-Glcp } \alpha 1 \rightarrow ? \text{ D-Gal} \\   \\ \text{L-Fucp } \alpha 1 \\   \\ ? \end{array}$
O <sub>86</sub>	$\text{D-Galp } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ D-Galp } \beta 1 \rightarrow 3 + \text{ GalNAc}$
O <sub>8</sub>	$\rightarrow 3 \text{ D-Manp } \alpha 1 \rightarrow 2 \text{ D-Manp } \alpha 1 \rightarrow 2 \text{ D-Manp } \alpha 1 \rightarrow$
O <sub>100</sub>	$\begin{array}{c} \text{P-Glyl} \\   \\ \rightarrow \text{GlcNAc} \rightarrow \text{Gal} \rightarrow \text{Rha} \rightarrow \text{Rha} \rightarrow \\   \\ \text{D-Glcp } \beta 1 \\   \\ + \end{array}$
O <sub>32</sub>	$\begin{array}{c} \rightarrow 4 \text{ D-GlcAp } \beta 1 \rightarrow 3 \text{ L-FucNAc } \beta 1 \rightarrow 3 \text{ D-GlcNAcp } \beta 1 \rightarrow 6 \text{ D-Galp } \beta 1 \rightarrow \\   \\ \text{D-Manp } \beta 1 \\   \\ + \end{array}$
O <sub>75</sub>	$\begin{array}{c} \rightarrow 3 \text{ D-GlcNAcp } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ D-Galp } \alpha 1 \rightarrow 4 \text{ L-Rhap } \alpha 1 \rightarrow \\   \\ + \end{array}$
<u>B. De Klebsiella</u>	
sérotyp	STRUCTURE
O <sub>1</sub>	$\rightarrow 3 \text{ D-Galp } \alpha 1 \rightarrow$
O <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} \rightarrow 2 \text{ D-Manp } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ D-Manp } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ D-Manp } \alpha 1 \\ \rightarrow 2 \text{ D-Manp } \alpha 1 \rightarrow 2 \text{ D-Manp } \alpha 1 \rightarrow \end{array}$
O <sub>4</sub>	$\rightarrow 4 \text{ D-Galp } \alpha 1 \rightarrow 2 \text{ D-Ribf } \beta 1 \rightarrow$
O <sub>5</sub>	$\begin{array}{c} \rightarrow 3 \text{ D-Manp } \alpha 1 \rightarrow 2 \text{ D-Manp } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ D-Manp } \alpha 1 \\ \rightarrow 2 \text{ D-Manp } \alpha 1 \rightarrow 2 \text{ D-Manp } \alpha 1 \rightarrow \end{array}$
O <sub>7</sub>	$\rightarrow 2 \text{ L-Rhap } \alpha 1 \rightarrow 2 \text{ D-Ribf } \beta 1 \rightarrow 3 \text{ L-Rhap } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ L-Rhap } \alpha 1 \rightarrow$
O <sub>8</sub>	$\begin{array}{c} \text{OAc} \quad \text{OAc} \quad \text{OAc} \\   \quad   \quad   \\ 2,6 \quad 2 \quad 2,6 \\ \rightarrow 3 \text{ D-Galp } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ D-Galp } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ D-Galp } \alpha 1 \rightarrow \end{array}$
O <sub>90</sub>	$\begin{array}{c} \text{OAc} \quad \text{OAc} \quad \text{OAc} \quad \text{OAc} \\   \quad   \quad   \quad   \\ 2,6 \quad 6 \quad 2,6 \quad 6 \\ \rightarrow 3 \text{ D-Galp } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ D-Galp } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ D-Galp } \alpha 1 \rightarrow 2 \text{ D-Galp } \alpha 1 \rightarrow \\   \quad   \\ 3 \quad 6 \end{array}$
O <sub>10</sub>	$\rightarrow 3 \text{ L-Rhap } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ D-Ribf } \beta 1 \rightarrow 4 \text{ L-Rhap } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ D-Ribf } \beta 1 \rightarrow 4 \text{ L-Rhap } \alpha 1 \rightarrow$



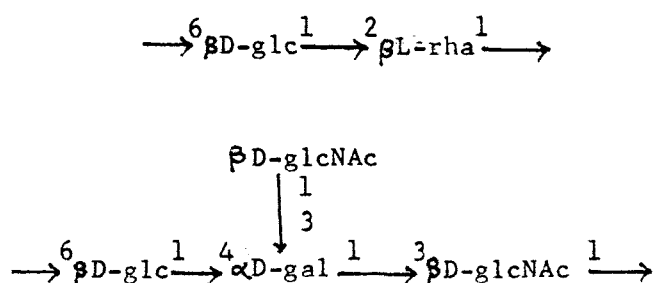
A et B étant les composés non identifiés.

Les chaînes polysaccharidiques des Klebsiella sont exceptionnelles pour leur simplicité et pour la présence très fréquente de résidus sous forme furanosique. Les galactanes (sérogroupes 1,2,(6),8,9) et les mannans (sérogroupes 3,5) reflètent cette simplicité. Les polysaccharides des sérogroupes 5 et 10 se terminent par des résidus de 3-O-méthyl mannose et 3-O-méthyl rhamnose respectivement (NIMICH (59)), (tableau VI, p. 30).

Pour Aerobacter aerogenes (Entérobacter) souche A3(S<sub>1</sub>) KOELTZOW (60) montre la présence d'un galactane branché en liaison 1,4; pour la souche NCTC 243 il trouve un lipopolysaccharide hétérogène.

L'importance relative des polysaccharides capsulaires de Serratia et d'ailleurs des Klebsiella a retardé les études des LPS de ces genres.

Pour Serratia deux structures ont été proposées (WANG (61) TARCSAY(62))



Dans les LPS de Yersinia nous retrouvons les 3,6 dideoxy hexoses. Pour les sérogroupes I A, II A, IV B nous rencontrons le 6 deoxy mannoheptose (dHep). Le tableau VII, p. 32, résume les structures des chaînes polysaccharidiques (unités de répétition) des espèces de Yersinia. (SAMUELSSON (63)).

TABLEAU VII  
 STRUCTURES DES UNITES DE REPETITION DES SIDE-CHAIN DES LPS  
 DE Yersinia pseudotuberculosis \*

SEROGROUPE	dideoxy hexose ( DDH )	STRUCTURE
I A	paratose	$\rightarrow \alpha \text{DDH} \xrightarrow{1} \xrightarrow{3} \alpha \text{dHep} \xrightarrow{1} \xrightarrow{4} \text{D-gal} \rightarrow$ <div style="text-align: right; margin-right: 20px;"> <math>\downarrow 3</math>  <math>\updownarrow</math> </div>
II A	abéquose	
IV B	tyvélose	
I B	paratose	$\alpha \text{DDH}$ <div style="text-align: center;"> <math>\downarrow 1</math>  <math>\downarrow 3</math> </div> $\rightarrow \alpha \text{D-man} \xrightarrow{2} \xrightarrow{1} \xrightarrow{3} \alpha \text{L-fuc} \xrightarrow{1} \rightarrow$
II B	abéquose	
III	paratose	$\text{DDH}$ <div style="text-align: center;"> <math>\downarrow 1</math>  <math>\downarrow 4</math> </div> $\rightarrow \alpha \text{D-man} \xrightarrow{2} \xrightarrow{1} \xrightarrow{3} \alpha \text{L-fuc} \xrightarrow{1} \rightarrow$
IV A	tyvélose	
V A	ascarylose	$\text{DDH}$ <div style="text-align: center;"> <math>\downarrow 1</math>  <math>\downarrow 3</math> </div> $\rightarrow \text{D-man} \xrightarrow{1} \xrightarrow{4} \text{L-fuc} \xrightarrow{1} \rightarrow$
V B	-----	

\* dHep représente le 6-deoxy mannoheptose.





### III. BIOSYNTHESE ET DETERMINATION GENETIQUE DES LIPOPOLYSACCHARIDES

#### A. Biosynthèse des lipopolysaccharides

##### 1. Biosynthèse du lipide A

Très peu de choses sont connues sur la biosynthèse de cette partie des LPS. Comme les acides 3-OH-alcanoïques sont spécifiques du lipide A, plusieurs auteurs se sont attachés à démontrer comment ce type d'acides gras est incorporé sur les deux résidus de glucosamine.

HUMPHREYS et al. ( 64) ont montré pour Pseudomonas l'incorporation de résidus 3-OH-dodécanoyl sur un accepteur endogène nécessitant la présence de dodécanoyl CoA. Cet accepteur serait le lipide A.

##### 2. Biosynthèse du noyau oligosaccharidique ( "CORE" ).

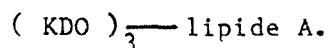
La première étape, particulièrement étudiée par le groupe d'OSBORN ( 65 ), est le transfert de l'acide 2-céto-3-deoxy octulosonique ( KDO ) sur l'accepteur lipide A. Cet accepteur serait constitué par les deux résidus de glucosamine qui ont leur groupement  $-NH_2$  substitué par des résidus d'acide  $\beta$ -OH-myristique; le transfert de KDO a lieu avant la O-acylation.

La biosynthèse débute par la synthèse du nucléotide de transfert du KDO ( CMP-KDO ) permettant le transfert de ce monosaccharide sur le lipide A et plus précisément sur la fonction hydroxyle de la deuxième acyl glucosamine ( fig. 3 p. 9 ).

Simultanément une deuxième molécule de KDO est transférée sur la première en position 4. La configuration anomérique du KDO qui est de nature  $\alpha$  dans le CMP-KDO, passe sous forme  $\beta$  ( configuration équatoriale ) lors de la réaction de transfert. Cette situation est inversée dans la réaction de transfert des résidus d'acide N-acétyl neuraminique dans la synthèse des sialyl-glycoprotéines ( HAVERKAMP (66)).

Cette première étape permet la synthèse du composé:  $(KDO)_3$  lipide A.

La deuxième étape est le transfert d'heptose sur l'accepteur:



Le nucléotide diphosphate du L-glycéro-D-mannoheptose n'a pas été isolé; il a été montré qu'une transketolase est nécessaire pour la synthèse de cet heptose. Le sédoheptulose-7-phosphate semble être le précurseur.

En effet la mise en culture des bactéries en présence du sédoheptulose-7-phosphate marqué au carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ), aboutit à des molécules de LPS marquées spécifiquement sur ses résidus d'heptose (EIDELS (67)).

Dans les molécules de LPS les résidus d'heptose sont phosphorylés. Certaines étapes de la phosphorylation sont connues grâce aux travaux de MUHLRADT (68) (69). Un enzyme "soluble" a été isolé qui catalyse le transfert de  $\gamma$ -phosphate de l'ATP sur le LPS. Le phosphate est transféré sur l'heptose I en position 4 et ce transfert est facilité quand le premier résidu de glucose est déjà lié sur la molécule:  $( \text{hep} )_2 ( \text{KDO} )_3 \text{ lipide A.}$  (fig. 7 p; 17).

Après cette étape il est vraisemblable que des résidus de phosphoryléthanolamine sont transférés sur le phosphate venant d'être conjugué.

Le transfert de galactose, glucose et glucosamine est effectué par une série de réactions en cascade à partir des précurseurs UDP-gal, UDP-glc et UDP-glcNAc. Les étapes de biosynthèse du noyau oligosaccharidique ("CORE") sont réunies dans la figure 11 p. 35.

L'étude de la synthèse de "l'outer core" des LPS a pu être effectuée grâce à l'utilisation de mutants ne possédant pas tel ou tel enzyme de transfert ou de synthèse de précurseur.

Des mutants incapables de synthétiser l'UDP-galactose (absence d'UDP-glucose-4-épimérase) produisent un "CORE" qui ne contient que de l'heptose, du KDO et du glucose (FUKASAWA (70)). Ces mutants peuvent produire des LPS "normaux" quand il y a un apport exogène de galactose (FUKASAWA (71)). Des résultats similaires sont obtenus avec des mutants déficients en phosphoglucoisomérase ou UDP-glucose-pyrophosphorylase et qui donnent la structure

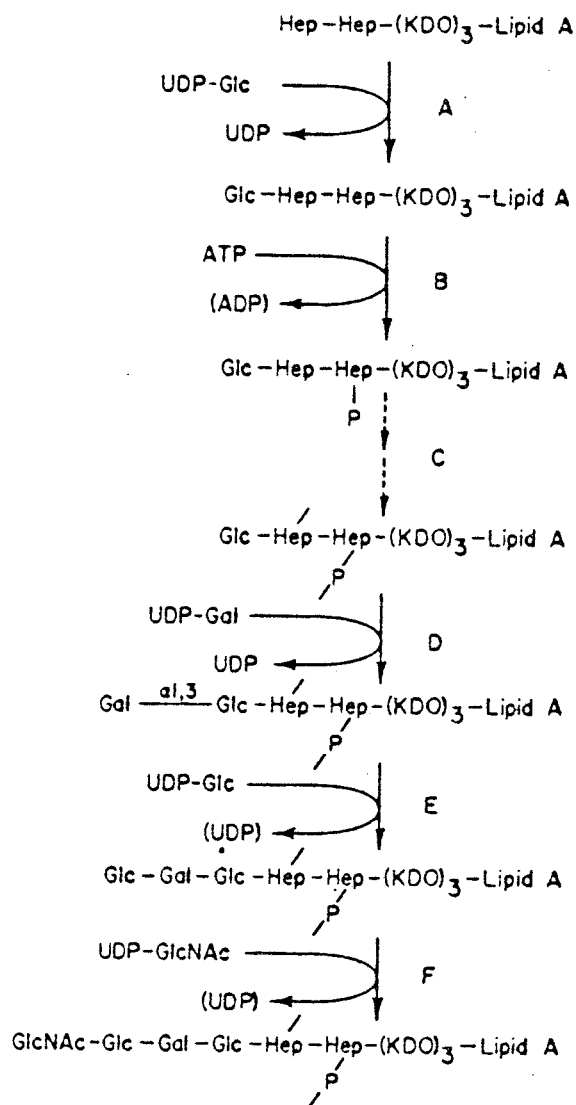


Figure 11

Biosynthèse du noyau oligosaccharidique ( "CORE" ).



du type  $Rd_1$  (fig. 10p. 21).

En conclusion, le produit d'incorporation est un LPS et non pas un oligosaccharide libre puisque nous ne retrouvons pas dans le milieu l'oligosaccharide libre. La synthèse procède par une série des réactions de transfert, à partir de nucléotides de transfert, sur l'accepteur lipide A.

### 3. Biosynthèse de la chaîne polysaccharidique ("SIDE-CHAIN").

La chaîne polysaccharidique ("SIDE-CHAIN") est constituée d'unités oligosaccharidiques répétitives. Nous pouvons distinguer pour la biosynthèse de cette partie des LPS deux étapes.

La première consiste en la synthèse des unités de répétition.

La seconde est la polymérisation des unités de répétition.

#### a. La biosynthèse des unités de répétition

La conclusion que la SIDE-CHAIN est constituée par des unités de répétition, est basée sur l'observation suivante;

Par hydrolyse acide ménagée du LPS de *S. typhimurium*, nous obtenons un trisaccharide galactosyl-mannosyl-rhamnose comme produit principal, les résidus d'abéquose étant clivés durant ce traitement. L'oxydation périodique montre que l'abéquose fait partie de l'unité de répétition, lié sur le résidu du mannose.

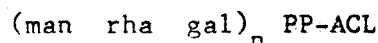
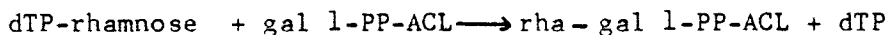
L'identification dans les produits d'hydrolyse d'un nombre restreint d'oligosaccharides ( trisaccharide gal man rha ,principalement ) a conduit les auteurs à poser en hypothèse l'existence d'une unité de répétition se polymérisant dans la chaîne polysaccharidique des LPS.

C'est ainsi qu'il a été démontré que la séquence d'incorporation des monosaccharides était la suivante:

Galactose ( UDP-gal), rhamnose (dTDP-rha), mannose (GDP-man) et enfin abéquose ( CDP-abe).

Cette unité tétrasaccharidique est synthétisée sur un intermédiaire

lipidique ( P-ACL : Antigen Carrier Lipid ) selon la séquence suivante:  
(WRIGHT (72)).



#### b. Polymérisation des unités de répétition

La polymérisation s'effectue sur le P-ACL avant le transfert du polysaccharide complet sur la partie "CORE" du LPS.

Il est possible que les enzymes catalysant les étapes successives de la synthèse de l'unité de répétition et la polymérase soient organisés en un complexe enzymatique sur lequel les intermédiaires lipidiques sont séquentiellement transférés d'un enzyme au suivant.

Cette hypothèse admet que seulement les intermédiaires -PP-ACL endogènes interagissent avec la polymérase.

Si les intermédiaires lipidiques sont mobiles dans la partie interne (hydrophobe) de la membrane, la polymérase est capable d'interagir avec les intermédiaires lipidiques endogènes et exogènes.

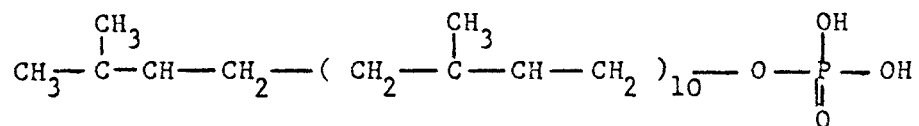
Les résultats de KANEGASAKI et WRIGHT ( 73) vont dans le sens de la deuxième possibilité.

BRAY et ROBBINS ( 74) ont démontré que l'élongation de la "SIDE-CHAIN" procède par transfert de la chaîne sur les monomères -PP-ACL. Ainsi la "SIDE-CHAIN" venant d'être polymérisée reste attachée sur le -PP-ACL jusqu'au transfert sur le noyau oligosaccharidique (CORE). Ceci explique que dans le cas des mutants rfa, la chaîne polysaccharidique est présente mais non liée au "CORE" puisque ces mutants ne peuvent pas transférer la "SIDE-CHAIN"-PP-ACL sur le "CORE". Le traitement au phénol/eau ou ATCA lors

des extractions, serait à l'origine du clivage de la liaison pyrophosphate et l'élimination de l'accepteur lipidique ( P-ACL).

La figure 12, p. 39, résume le cycle lipidique de la biosynthèse des chaînes polysaccharidiques de Salmonella typhimurium.

L'accepteur lipidique a été identifié comme un undecaprénol polymérique phosphorylé au niveau de l'hydroxyle primaire, répondant à la formule:



### c. Modifications de la chaîne polysaccharidique

La structure des chaînes polysaccharidiques ( "SIDE-CHAIN") montre une très grande variation d'un sérotype à un autre. Des "options" peuvent être acquises ou perdues par mutation et ainsi les différentes souches ont une possibilité d'altérer leur surface cellulaire (NIKAIDO ( 75)).

Ces modifications n'affectent pas la synthèse de la structure de base de la chaîne polysaccharidique.

#### 1. LA GLUCOSYLATION

Certaines souches de Salmonella produisent des LPS contenant des résidus de glucose branchés sur la SIDE-CHAIN. Le mécanisme probable de la glucosylation est présenté dans la figure 13, p. 40. Le glucosyl-P-ACL, synthétisé à partir de l'UDP-glucose et du P-ACL sur la face interne de la membrane cytoplasmique est transporté sur la face externe où les "SIDE-CHAIN" sont en élongation. Dans ce mécanisme, la polymérase catalyse toujours la réaction de transfert d'une unité de répétition non glucosylée sur la chaîne naissante. Celle-ci se termine par une unité tétrasaccharidique qui est elle-même non glucosylée. Enfin la glucosylation s'accomplit sur l'avant dernière unité de répétition.

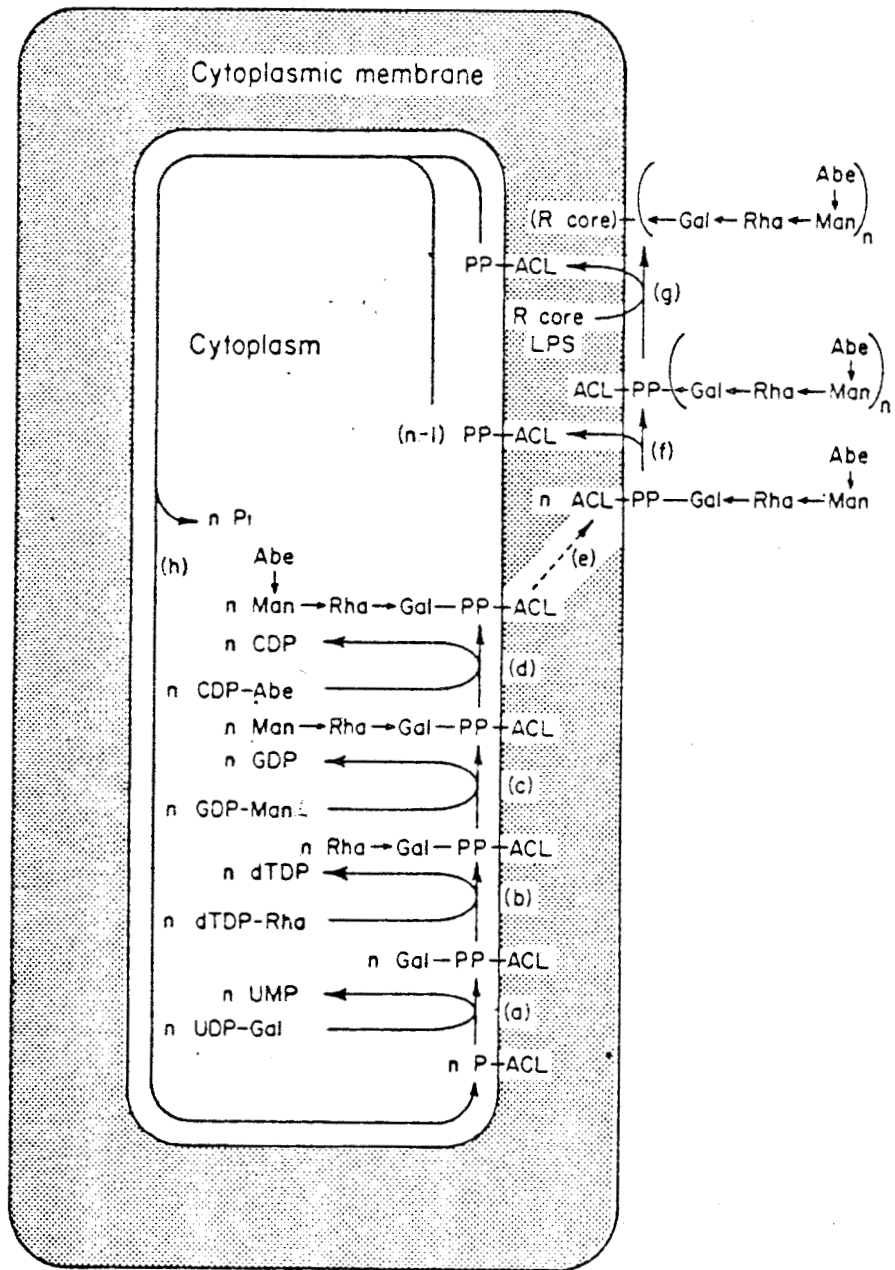


Figure 12

Cycle lipidique de la biosynthèse de la chaîne polysaccharidique  
( "SIDE-CHAIN" ) de Salmonella typhimurium.



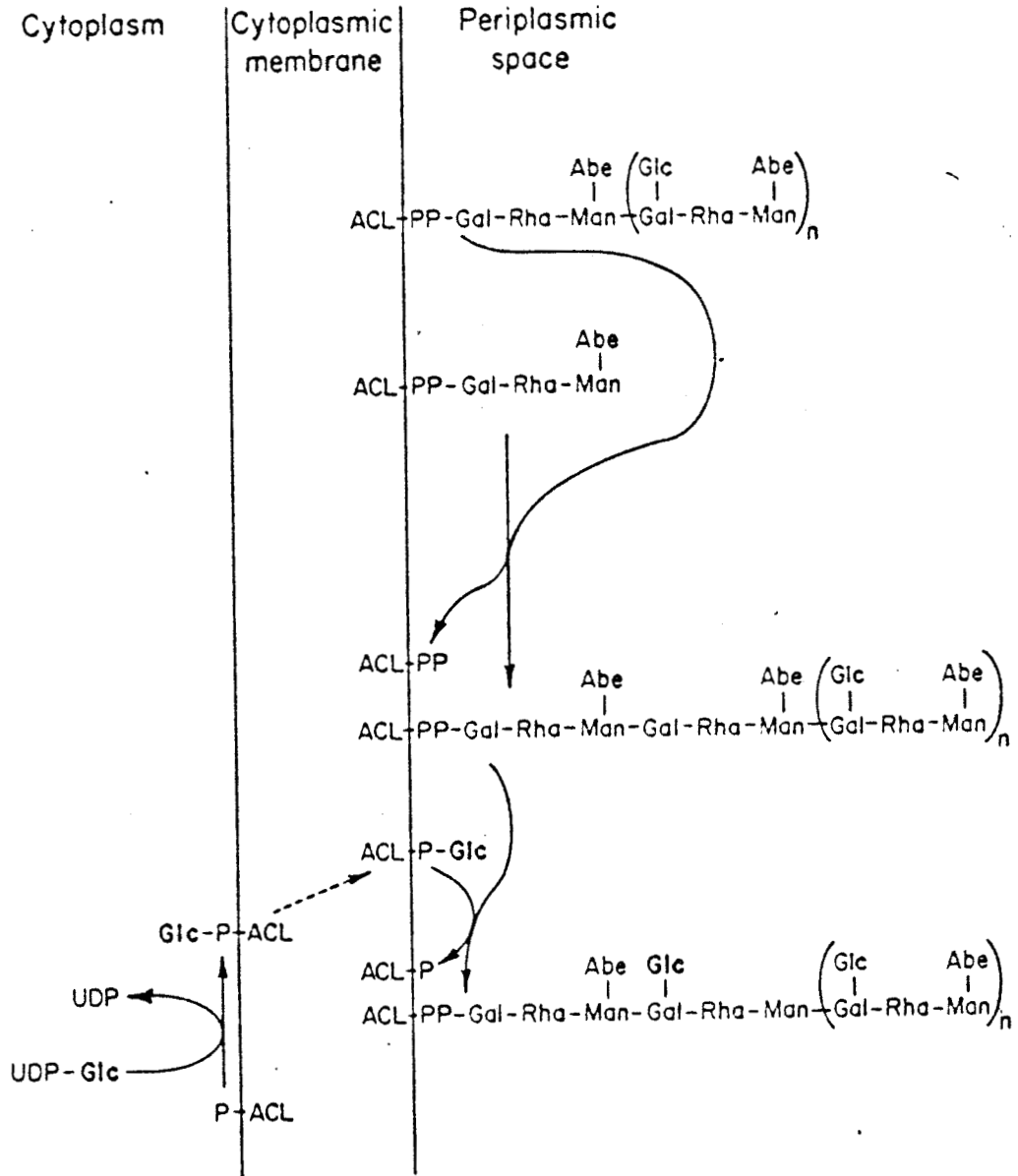


Figure 13

Mécanisme probable de la glucosylation de la chaîne polysaccharidique des Salmonella (WRIGHT (76), NIKAIDO (77)).



## 2. L'ACÉTYLATION

Beaucoup de SIDE-CHAIN portent des groupements acétyl (NIKAIDO (78)). Les résidus abéquose sont acétylés dans Salmonella B (antigène 5) ainsi que les résidus galactose de Salmonella E<sub>1</sub> (antigène 10).

La réaction d'acétylation du galactose de l'antigène 10 a été examinée par ROBBINS (79). L'enzyme responsable a été trouvé dans les enveloppes cellulaires, le substrat est l'acétyl coenzyme A.

L'étape d'intervention de l'acétylation dans la biosynthèse de la chaîne polysaccharidique n'est pas connue.

### B. Détermination génétique des lipopolysaccharides.

#### 1. Détermination génétique du noyau oligosaccharidique ("CORE").

Le concept de transfert séquentiel des monosaccharides est supporté par les études de structure des LPS produits par des mutants.

Les mutants déficients en UDP-glucose ou UDP-galactose, synthétisent le CORE normalement jusqu'au point où ces nucléotides interviennent.

Les mutations, pgi:phosphoglucoisomérase, gal U:UDP-glucose pyrophosphorylase, gal E:UDP-glucose-4-epimérase, ont été localisées sur le chromosome bactérien (fig.14, p. 42).

En plus de ces mutants déficients en nucléotides-monosaccharides, il existe toute une série de mutants déficients en glycosyl transférases nécessaires à la synthèse du CORE des LPS.

Un critère très utile est basé sur l'observation de BECKMANN et al. (80) que la phase aqueuse après extraction phénol/eau contient les chaînes polysaccharidiques qui ne sont pas liées sur le CORE (bactéries déficientes en ligase). Un autre critère est fondé sur l'utilisation des phages qui reconnaissent des structures de LPS à différentes étapes de biosynthèse.

Ainsi a été établie la carte génétique et a été prouvé que toutes les mutations impliquées dans la biosynthèse du "CORE" sont localisées

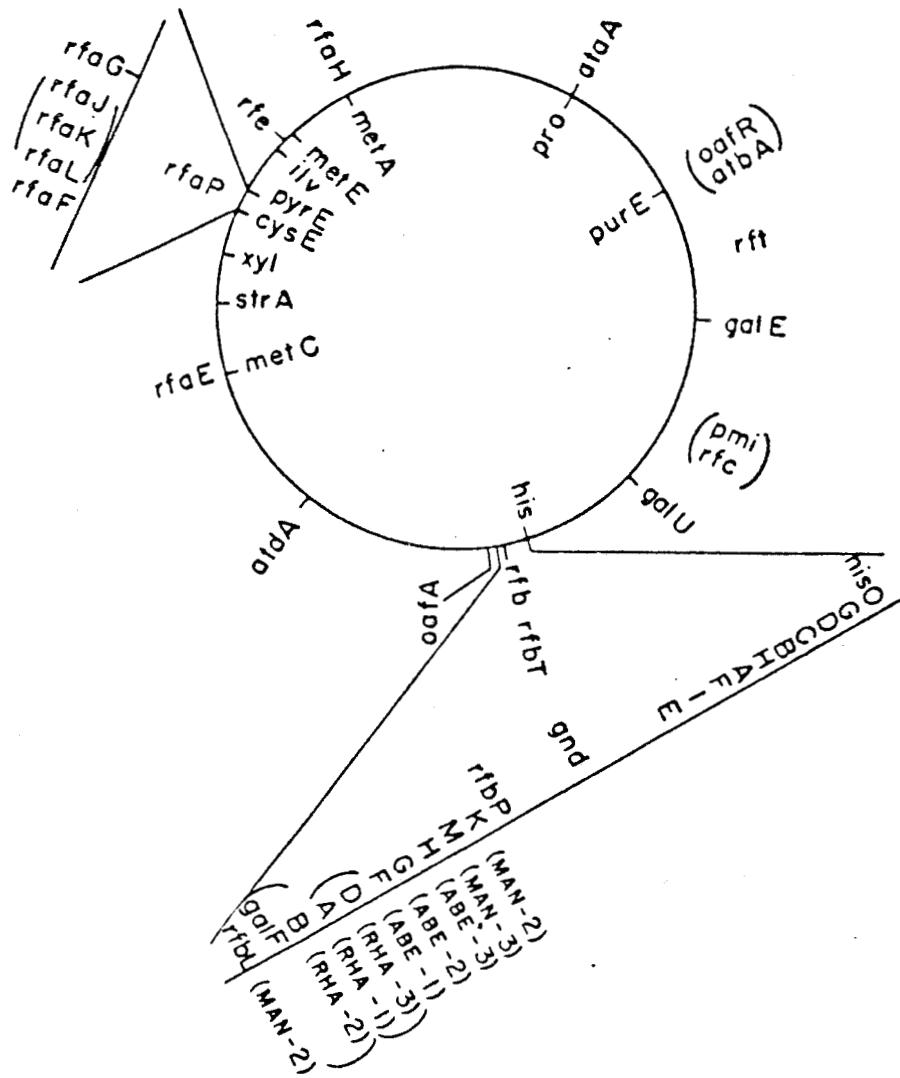


Figure 14

Localisation sur le chromosome bactérien des gènes impliqués dans la biosynthèse des LPS (à l'extérieur du cercle). A l'intérieur du cercle sont présentés les gènes de référence.

dans la région xyl -ilv. Ces mutants ont été appelés rfa ("rough A"). En se basant sur le phénotype, il existe actuellement 7 classes de mutants (rfaF, rfaG, rfaJ, rfaK, rfaL, rfaE, rfaH). L'analyse des mutants a montré que chaque gène rfa détermine une glycosyl transférase spécifique de la synthèse du "CORE". Dans le tableau VIII, P.44, sont réunis les différents mutants R de Salmonella, le gène responsable et la fonction probable du gène.

La perte d'activité enzymatique n'a été démontrée que pour les mutants rfaH et rfaG.

Une dernière classe de mutant est connue (rfaP), rencontrée seulement chez S. minnesota, concernant la phosphorylation de l'heptose. La classe rfaL, qui produit le "CORE" normal n'est pas un mutant de la synthèse du "CORE", mais reflète l'absence de la ligase nécessaire pour la liaison "SIDE-CHAIN" - "CORE".

## 2. Détermination génétique de la "SIDE-CHAIN"

a. Le locus rfb a été localisé entre les opérons met G et his. Ces mutants sont déficients de la synthèse des chaînes polysaccharidiques.

Dans le cas de Salmonella typhimurium, ils synthétisent tous un "CORE" normal, un seul mutant produit la chaîne polysaccharidique libre qui n'est pas transférée sur le "CORE". Un des mutants est incapable de produire la SIDE-CHAIN par l'absence de dTDP-rhamnose synthétase.

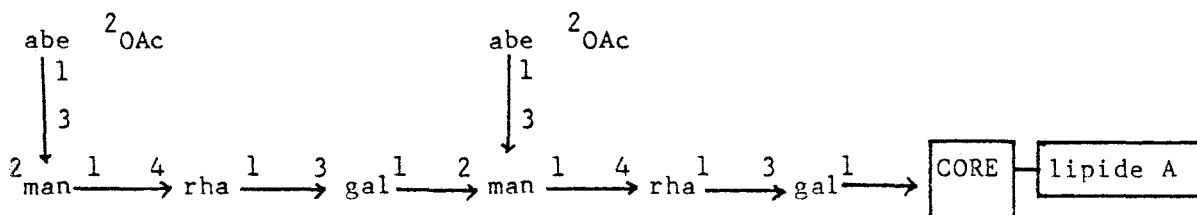
b. Le locus rfc. Il s'agit d'un gène structural de la polymérase qui unit les unités de répétition formant la chaîne polysaccharidique. Les recombinants du type SR, sont déficients en polymérase et présentent une seule unité de répétition liée sur le "CORE". Cette déficience peut être réparée par l'introduction de la région manquante entre l'opéron gal et l'opéron trp dans le chromosome bactérien. (BAGDIAN (81)).

Dans le cas de Salmonella B la polymérase détermine la liaison entre le galactose et le mannose:  $\text{gal} \xrightarrow{1} \text{man} \xrightarrow{2}$ , dans la structure:

TABLEAU VIII

CLASSIFICATION DES MUTANTS R DE Salmonella (NIKAIDO (82)).

CHEMOTYPE	COMPOSITION MOLLAIRE					GENOTYPE	FONCTION PROBABLE DU GENE
	KDO	Hep	Glc	Gal	GlcNAC		
Ra	3	2	2	2	1	<u>r<b>f</b>b</u> <u>r<b>f</b>bT</u> <u>r<b>f</b>aL</u>	synthèse des unités de répétition transfert de la SIDE-CHAIN sur le CORE
Rb Rb <sub>1</sub> Rb <sub>2</sub> Rb <sub>3</sub>	3	2	2	2	0	<u>r<b>f</b>aK</u> <u>r<b>f</b>aJ</u> <u>r<b>f</b>aH</u>	GlcNAC transférase Glc <sub>II</sub> transférase Gal <sub>I</sub> tranférase
Rc	3	2	1	0	0	<u>g<b>a</b>lE</u>	UDP-glc 4-epimérase
Rd Rd <sub>1</sub> Rd <sub>2</sub>	3	2	0	0	0	<u>r<b>f</b>aG</u> <u>g<b>a</b>lU</u> <u>p<b>g</b>i</u> <u>r<b>f</b>aF</u>	Glc <sub>I</sub> transférase UDP-glc pyrophosphorylase phosphoglucoisomérase Hep <sub>II</sub> transférase ?
Re	3	0	0	0	0	<u>r<b>f</b>aE</u>	Hep <sub>I</sub> tranférase ?



### 3. Détermination génétique des modifications de la "SIDE-CHAIN"

Le gène responsable de la réaction d'acétylation ( oafA ) a été localisé à l'extérieur du locus rfb (JOHNSON ( 83)). oafR est le gène responsable de la réaction de glucosylation et a été localisé près du locus pro ( MAKELA ( 84)).

## IV. LE ROLE DES LIPOPOLYSACCHARIDES

### A. Fonctions de la membrane externe et du lipopolysaccharide

Il est très rare de trouver des mutants sans chaîne polysaccharidique dans la nature. La fréquence d'apparition de tels mutants est plus grande pour les souches utilisées en laboratoire; ce fait est illustré par le grand nombre de souches R d'E. coli (  $K_{12}$ , B et C) répertoriées par les biochimistes et les biologistes. Les "SIDE-CHAIN" des bactéries pathogènes permettent d'éviter la phagocytose et peut-être "tuent" le complexe anticorps-complément de l'hôte. Les "SIDES-CHAIN" et les portions externes du "CORE" agissent comme récepteurs pour plusieurs phages.

Les mutants  $Rd_1$ ,  $Rd_2$  sont plus sensibles à la bacitracine, vancomycine, érythromycine, polymyxine et novobiocine que les mutants  $Ra$ ,  $Rb$ . Les mutants  $Rc$  sont sensibles à la polymyxine et la novobiocine (ROANTREE ( 85)). Comme toute membrane biologique, la membrane externe des bactéries agit comme une

barrière de diffusion; les changements intervenant dans la structure des LPS ont comme résultat l'altération des propriétés de la membrane et donc les antibiotiques accèdent plus facilement à leur site d'action.

Des mutants plus étendus que les Re ("heptose-less") n'ont pas été isolés. Il semble que la présence d'au moins ce type de glycolipide est essentielle pour la survie de la cellule. Il est possible que les LPS soient nécessaires pour l'assemblage de la membrane externe. La membrane externe est riche en phosphatidyléthanolamine et déficiente en glycérophospholipides acides (OSBORN (86)). En conséquence la région (KDO)<sub>3</sub> lipide A chargée négativement doit avoir un rôle dans l'assemblage de la membrane, rôle similaire à celui des glycérophospholipides des membranes d'autres types.

#### B. Relation de la structure des LPS et la virulence des bactéries

La virulence d'une bactérie et donc son degré de pathogénicité dépend de beaucoup de variables provenant de la bactérie, mais aussi de l'environnement de l'hôte. C'est ainsi que le comportement d'espèces ou sérotypes très proches est très différent d'un hôte à l'autre.

La comparaison de la pathogénicité de trois genres: Escherichia, Salmonella et Shigella et la structure de leurs lipopolysaccharides a abouti à une relation de la pathogénicité des bactéries et des LPS.

La manière dont les monosaccharides sont arrangés dans les unités de répétition est importante; la structure peut compter pour différencier le degré de pathogénicité d'une espèce, ce qui est logique connaissant que les unités de répétition portent la diversité chimique et antigénique détectée dans ces bactéries. (NIKAIDO (87)).

Des études de microscopie électronique sont en accord avec les études biochimiques que les Entérobactériaceae possèdent une mince couche de peptidoglycane à l'extérieur de leur membrane plasmique. Autour du peptidoglycane une membrane externe est constituée de phospholipides, LPS et

protéines.

Les activités endotoxine et O-antigène sont associées à cette structure ( BLADEN ( 88),SHANDS ( 89)).

Les seules différences entre des espèces différentes d'un même genre sont dues à la constitution antigénique. Elles semblent être corrélées avec la faculté de provoquer des infections systémiques. Ainsi les chémotypes les plus complexes contenant des dideoxy hexoses sont très souvent associés avec à la fois diarrhée et infection systémique. Il ya bien sûr des exceptions, comme par exemple les Salmonella C<sub>1</sub> qui n'ont pas de dideoxy hexose et peuvent causer des infections systémiques ainsi que les groupes C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> qui possèdent l'abéquose, avec des unités de répétition différentes du groupe B et qui ne se multiplient pas dans les tissus des mammifères.

Les sérogroupes o et z contenant du colitose (comme E.coli O<sub>111</sub> et O<sub>55</sub>) sont associés avec des entérocolites et non avec des infections systémiques.

La relation manifeste entre la pathogénicité d'une bactérie et les LPS n'est sûrement pas la seule explication de la virulence d'une espèce.

### C. Modifications chimiques de l'endotoxine et inactivation de ces propriétés biologiques

Les premières études des méthodes hydrolytiques utilisées pour le traitement des endotoxines extraites des bactéries, ont été reportées par BOIVIN et al. ( 90) qui ont utilisé de l'acide acétique dilué pour couper l'endotoxine avec une perte de toxicité, sans perte de la spécificité sérologique du polysaccharide dégradé.

TAL et GOEBEL ( 91) ont confirmé pour le bacille de la dysenterie, que l'acide acétique 1p100 à 100°C réduisait l'activité létale pour les souris de 4 fois au bout de 60 minutes d'hydrolyse.

RIBI et al. ( 92) ont démontré que le taux de détoxification décroît en parallèle avec le degré de polymérisation et que la toxicité résiduelle est due à l'endotoxine restante sous forme polymérique.

Cette technique n'est pas efficace pour l'étude des relations structure-fonction de la molécule très complexe qu'est le LPS. Par contre l'hydrolyse alcaline a été un outil très utile pour les études de la relation structure-activité.

Les endotoxines de différents genres ne sont pas détoxifiées de la même manière. La létalité et la pyrogénicité peuvent être séparées de l'activité antigénique ( *in vivo* et *in vitro*). Plusieurs auteurs ont démontré que la taille des particules et la létalité ne sont pas en relation ( NIWA ( 93 )). Plus récemment il a été suggéré que la conformation dans l'espace des macromolécules peut être un facteur critique pour l'activité biologique (TRIPODI ( 94 )). RIBI et al. ( 95) démontrent que les protéines ne sont pas nécessaires pour les effets endotoxine des LPS. Cependant d'autres études (WATSON ( 96 )), remettent en question le rôle fonctionnel des protéines.

A côté de la toxicité primaire, il y a une toxicité secondaire, due à une hypersensibilité retardée obtenue durant l'exposition naturelle de l'hôte aux bactéries gram-négatives de la flore intestinale. Cette hypersensibilité retardée serait due aux déterminants polypeptidiques du complexe "natif" de l'endotoxine.

A part le fait que l'antigénicité est due aux chaînes polysaccharidiques des LPS, rien n'est connu sur les groupements chimiques responsables de la toxicité ou les modifications pharmacologiques de l'hôte. Les groupements fonctionnels et leur conformation dans l'espace sont essentiels pour l'expression des propriétés de réponse de l'hôte. Malheureusement les techniques utilisées ne peuvent pas donner plus de détails.

La découverte la plus importante est que les multiples propriétés biologiques de l'endotoxine peuvent être dissociées. Par exemple la fièvre la létalité, la stimulation d'une résistance non spécifique et l'activité sérologique sont sans relation. Le fait que ces propriétés peuvent être séparées montre l'existence de plusieurs groupements structuraux avec des fonctions biologiques différentes.



## TRAVAUX PERSONNELS

### I. PREPARATION DE L'EXTRAIT BRUT D'Entérobacter agglomerans \*

Pour cette préparation de l'extrait brut RC1292, nous allons voir successivement les principaux stades :

#### Stade A : Culture

Le milieu de culture répond à la formule suivante:

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

Il est ajusté à pH 7.4-7.6, puis stérilisé à 120°C pendant 40 minutes.

Les solutions de glucose et de peptone papaïnique de soja, après stérilisation, sont introduites dans le milieu de culture au moment de l'ensemencement.

La souche Entérobacter agglomerans (souche Institut Pasteur n°5549) cultivée sur milieu gélosé, est diluée dans 50 ml de milieu additionné de billes de verre. Cette solution servant d'inoculum est introduite dans le reste du bouillon de culture, le volume total étant de 40 litres.

Placé à 37°C, le milieu est maintenu à pH 7.4-7.6 à l'aide d'un titrateur automatique. Le débit d'air est de 4 l/min et la vitesse d'agitation

---

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

fixée à 450 tours/minute.

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

Après complet développement, soit environ 7 heures, le milieu renferme 100 milliards de germes par ml.

#### Stade B : Lyse

Une solution aqueuse de chlorhydrate de lysozyme (stérilisée sur membrane millipore 0.22 ) est additionnée au milieu de culture obtenu au stade A, dans la proportion de 80 µg de chlorhydrate de lysozyme par ml de milieu de culture. La lyse est poursuivie dans des conditions stériles pendant 41 jours à 37°C en présence de:

- 0.25 g d'EDTA par litre
- 34.5 ml/litre de mercurothiolate sodique à 2.5p100
- 103 ml de Tween 80 ( 33p100 ).

Le lysat, homogénéisé par agitation est lyophilisé pour obtenir une poudre brun-jaune ( 2926 g ).

#### Stade C : Extractions

##### a) Par l'acétone

La totalité de la poudre obtenue au stade B est mise en suspension dans 20 litres d'acétone, puis agitée vigoureusement pendant 4 heures à 1500 tours par minute.

La suspension obtenue est décantée, la plus grande partie du surnageant est soutirée par siphonnage, le restant de la suspension est filtré sur verre fritté. La poudre est remise en suspension dans 10 litres d'acétone pour procéder à une deuxième extraction.

L'insoluble est séché à température ambiante sous vide pendant 24 heures, pour obtenir 1760 g d'une poudre beige clair.

b) Par le méthanol

Après deux extractions au méthanol, utilisant le même schéma que pour l'extraction à l'acétone, l'insoluble est séché à température ambiante, puis à 40°C à l'étuve sous vide pendant 10 jours pour obtenir 674 g d'une poudre beige clair.

Stade-D : Diafiltration

358 g de poudre obtenue au stade C est mise en suspension dans 20 litre d'eau distillée contenant 1 g/l de merthiolate et placée 60 heures à +4°C.

Après centrifugation une solution limpide de couleur marron est obtenue ( 19 litres ). Elle est diafiltrée dans un appareil équipé d'une membrane poreuse de type XM300 (ROMICON; ANTHOUARD). Après circulation de 800 litres d'eau distillée, la solution diafiltrée est centrifugée à 90000 g pour obtenir 19 litres d'une solution opalescente, qui est lyophilisée.

II. ETUDE DE L'EXTRAIT BRUT D'Entérobacter agglomerans

L'extrait brut a été plus particulièrement étudié par J.M. LAMERAND( 97 ).

A. MATERIEL ET METHODES

1. Partie protéique

La composition en protéines a été effectuée selon deux techniques :

a) La technique colorimétrique de LOWRY ( 98 ) pour le dosage des protéines totales.

b) La technique de dosage des acides aminés après hydrolyse chlorhydrique ( HCl 5.6N, 18 h, 100°C ) de l'extrait bactérien à l'aide d'un autoanalyseur BECKMAN-MULTICHROM.

2. Partie glucidique

Les oses neutres sont dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (99 ) modifiée par RIMINGTON ( 100 ).

Les acides uroniques par la méthode au carbazol sulfurique de DISCHE (101).

Les acides sialiques par la méthode à la diphénylamine de NIAZI et STATE (102) modifiée par WERNER et ODIN (103).

Les osamines dosées selon ELSON et MORGAN (104).

L'identification et la composition molaire des monosaccharides ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse (G.L.C.) des méthyl glycosides trifluoroacétylés selon la technique de ZANETTA et al. (105).

### 3; Eléments minéraux-extrait sec

Les éléments minéraux: sulfates, phosphates, ainsi que l'extrait sec ont été dosés par les méthodes décrites dans le mémoire de thèse de J.M.LAMERAND p.70 (106).

## B. RESULTATS

### 1. Composition centésimale et molaire des glucides, protides et éléments minéraux.

Nous avons rassemblé les résultats dans les tableaux IX, X page 53.

### 2. Identification de monosaccharides particuliers

#### a) Identification d'une osamine particulière.

Un composé a pu être identifié après hydrolyse par l'acide trifluoroacétique 4 N, 4 heures à 100°C, peracétylation, réduction et peracétylation.

Le polyol acétate obtenu a été analysé par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. Son spectre correspond à un 2-acétamido-2,6-dideoxy-hexitol.

Ce composé a pu être isolé par électrophorèse et chromatographie préparatives sur papier et analysé en G.L.C. sous forme méthyl glycoside trifluoroacétylé. Un de ces deux anomères a le même temps de rétention que le méthyl- -D-glucopyranoside, le deuxième ayant le même temps de rétention que le méthyl- -D-galactopyranoside.

#### b) Identification d'un heptose

Le deuxième composé a été analysé sous forme méthyl glycoside

TABLEAU IX

COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES , PROTIDES ET ELEMENTS MINERAUX DU PRINCIPE ACTIF \*

OSÉS NEUTRES	ACIDES URONIQUES	OSAMINES	ACIDES NUCLEIQUES	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	HUMIDITE	PROTEINES	TOTAL
31.9	5	9.9	2.2	0.35	0.13	8	LOWRY 33.8 AUTO- 25.11 ANALYSEUR	82.5-91.2

TABLEAU X

COMPOSITION MOLLAIRE EN MONOSACCHARIDES DU PRINCIPE ACTIF \*\*

RHA	ARA	FUC	HEPT	GAL	MAN	GLC	GLCNAC	FUCNAC	KDO
0.77	0.3	1.03	0.3	1	0.77	2.47	0.89	1.81	traces

\* Thèse J/M/LAMERAND p.75 (107).

\*\* sur la base de 1 résidu de galactose par molécule.



trifluoroacétylé. Les spectres de masse obtenus par ionisation chimique (ammoniaque, isobutane) (fig. 15, page 56) montrent un pic de masse  $m/e$  673 ( $M-31$ )<sup>+</sup> correspondant à l'ion  $A_1$ .

D'autre part, le spectre de masse obtenu par ionisation par impact électronique (fig. 15, page 56) confirme la nature heptose de cette molécule par les pics de masse  $m/e$  445 (ion  $A_3$ ) et l'ion  $c_2^1$  de masse  $m/e$  531.

Ce monosaccharide possède en G.L.C. sur colonne OV 210 et sous forme méthyl glycoside trifluoroacétylé le même temps de rétention que le L-glycéro-D-mannoheptose obtenu par méthanolyse du lipopolysaccharide d'E.coli  $E_{111}$ \*. (voir figure 16, page 57).

#### c) Identification du KDO.

Des traces d'acide 2-céto-3-deoxy octulosonique (KDO) ont été également identifiées par cochromatographie de l'extrait brut méthanolysé et trifluoroacétylé et du témoin KDO ayant subi le même traitement.

#### C. CONCLUSION

En conclusion, la fraction glucidique de l'extrait brut RC 1292 (47p100) contient un pentose: l'arabinose, trois hexoses: le glucose, le galactose et le mannose, deux méthyl pentoses: le fucose et le rhamnose, un heptose, du même temps de rétention en G.L.C. que le D-mannoheptose, des traces d'acides 2-céto-3-deoxy octulosonique (KDO) ainsi que deux osamines: la glucosamine et la fucosamine.

La fraction protidique (33p100) se caractérise par la présence d'une proportion importante d'acide aspartique et d'acide glutamique.

L'hétérogénéité de cet extrait brut constatée par ultracentrifugation analytique nous a amené à fractionner le mélange afin de déterminer la molécule portant l'activité anti-inflammatoire et étudier sa structure.

---

\* Nous remercions vivement le Professeur G. SPIK pour nous avoir fourni du lipopolysaccharide d'E.coli  $E_{111}$ .

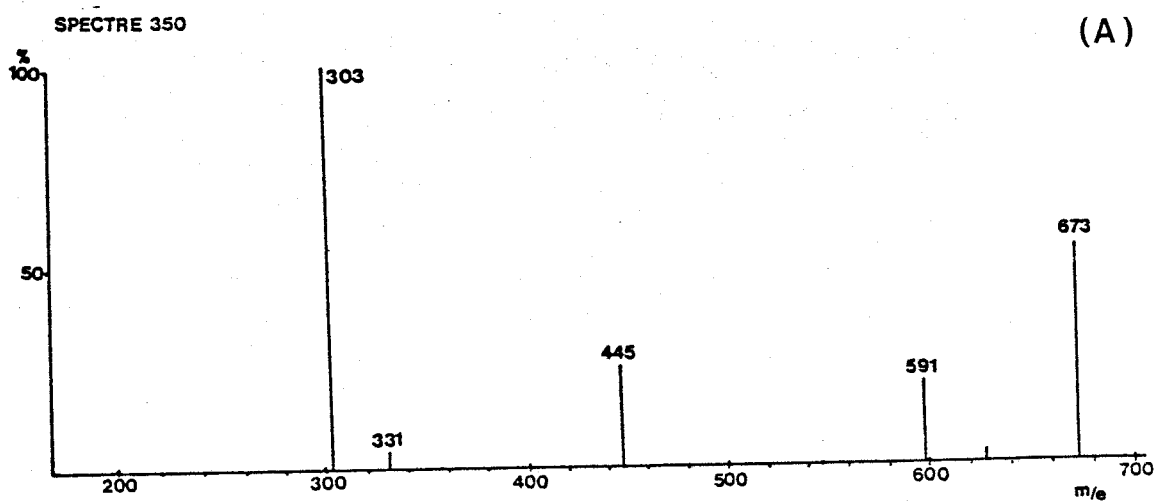
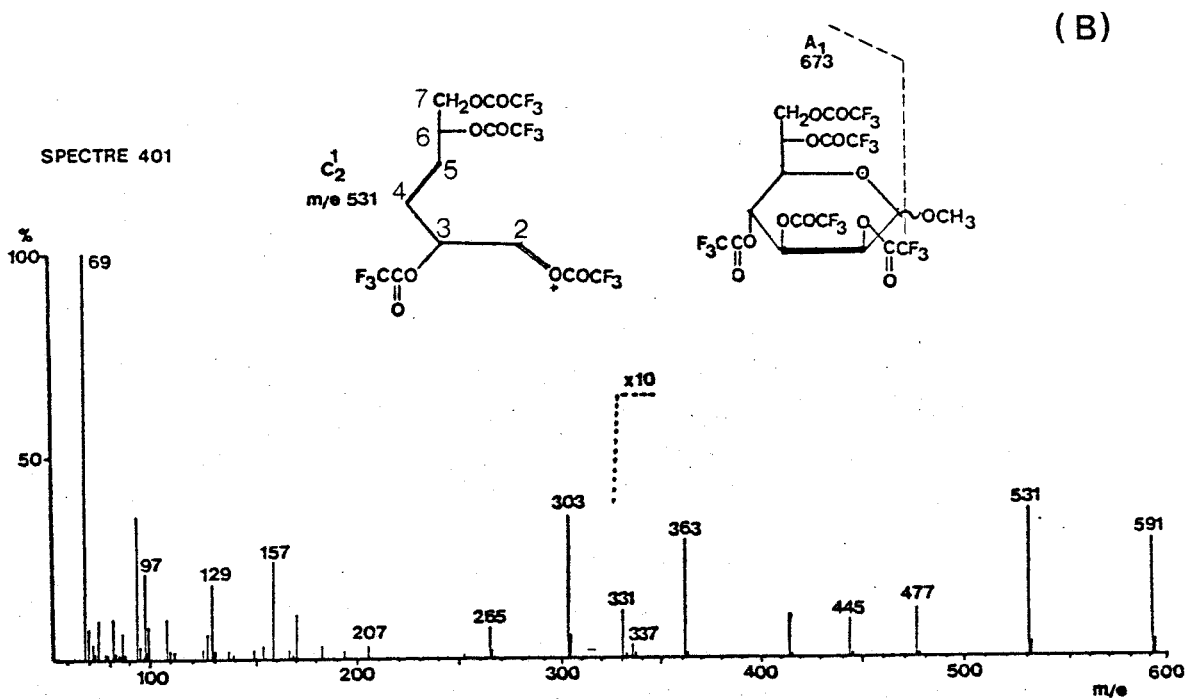


Figure 15

Spectre de masse obtenu pour le composé identifié comme étant

un heptose A/Par ionisation chimique

B/Par ionisation par impact électronique.



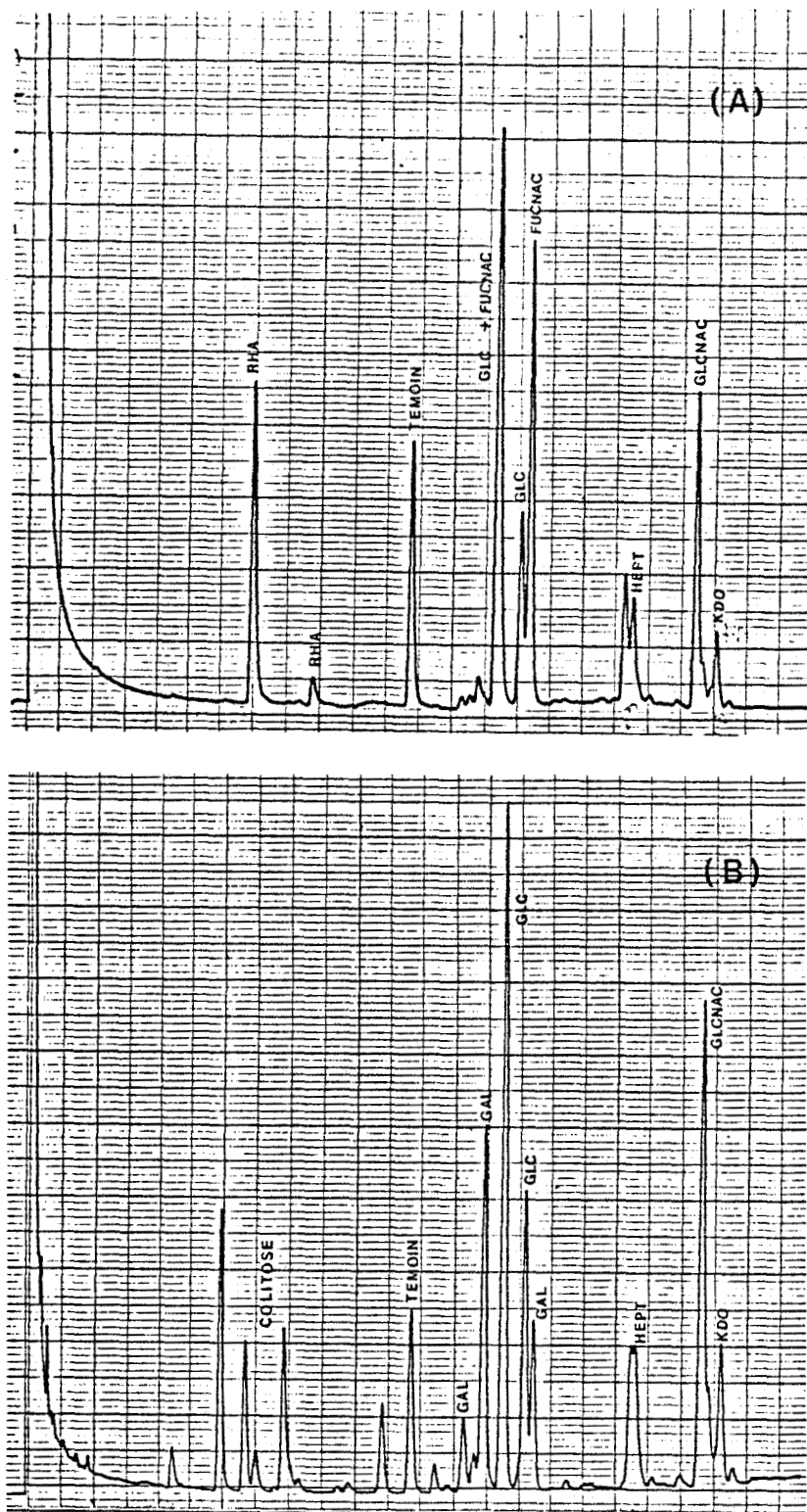


Figure 16

Chromatographie en phase gazeuse sous forme de méthyl glycosides trifluoroacétylés A/del'extract brut B/du lipopolysaccharide de E.coli E<sub>111</sub>. Conditions chromatographiques décrites à la page 75 .

BUS  
LILLE



### III. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT BRUT D'Entérobacter agglomerans.

#### RECHERCHE DE LA FRACTION ACTIVE

##### 1. Précipitation au cétavlon

###### A. Matériel et méthodes

Le principe actif a été fractionné selon la méthode de Cétavlon de SCOTT (108).

3.33 g de bromure de cetyl-triméthyl-ammonium (cétavlon) ont été ajoutés progressivement à 110 ml d'eau pour former une solution de cétavlon à 3p100.

Ce mélange a été ajouté à la solution de l'extrait brut (1 g dans 125 ml d'eau distillée), sous agitation douce. La solution est placée une nuit à +4°C.

Le précipité est recueilli par centrifugation, redissous dans une solution de NaCl 0.1 M et précipité à l'éthanol (6 volumes).

Le surnageant est précipité par 6 volumes d'éthanol. Les solutions sont portées une nuit à +4°C.

Les précipités sont recueillis par centrifugation, redissous dans de l'eau distillée, dialysés et lyophilisés.

Le schéma de fractionnement est présenté à la figure 17, page 59.

###### B. Résultats

Les rendements du fractionnement sont présentés dans le tableau XI, page 60.

Nous pouvons remarquer que le fait de travailler avec des grandes quantités améliore le rendement de la préparation.

L'activité anti-inflammatoire des fractions a été mesurée aux Laboratoires CASSENNE par un test de régression d'un oedème podal obtenu par injection dans la patte du rat d'une solution de carraghenine à 1p100.

Sur le tableau XII, page 60, nous pouvons remarquer que l'activité anti-inflammatoire est plus grande dans la fraction S<sub>1</sub>. En conséquence nous nous sommes attachés à étudier la fraction S<sub>1</sub> qui rassemble une

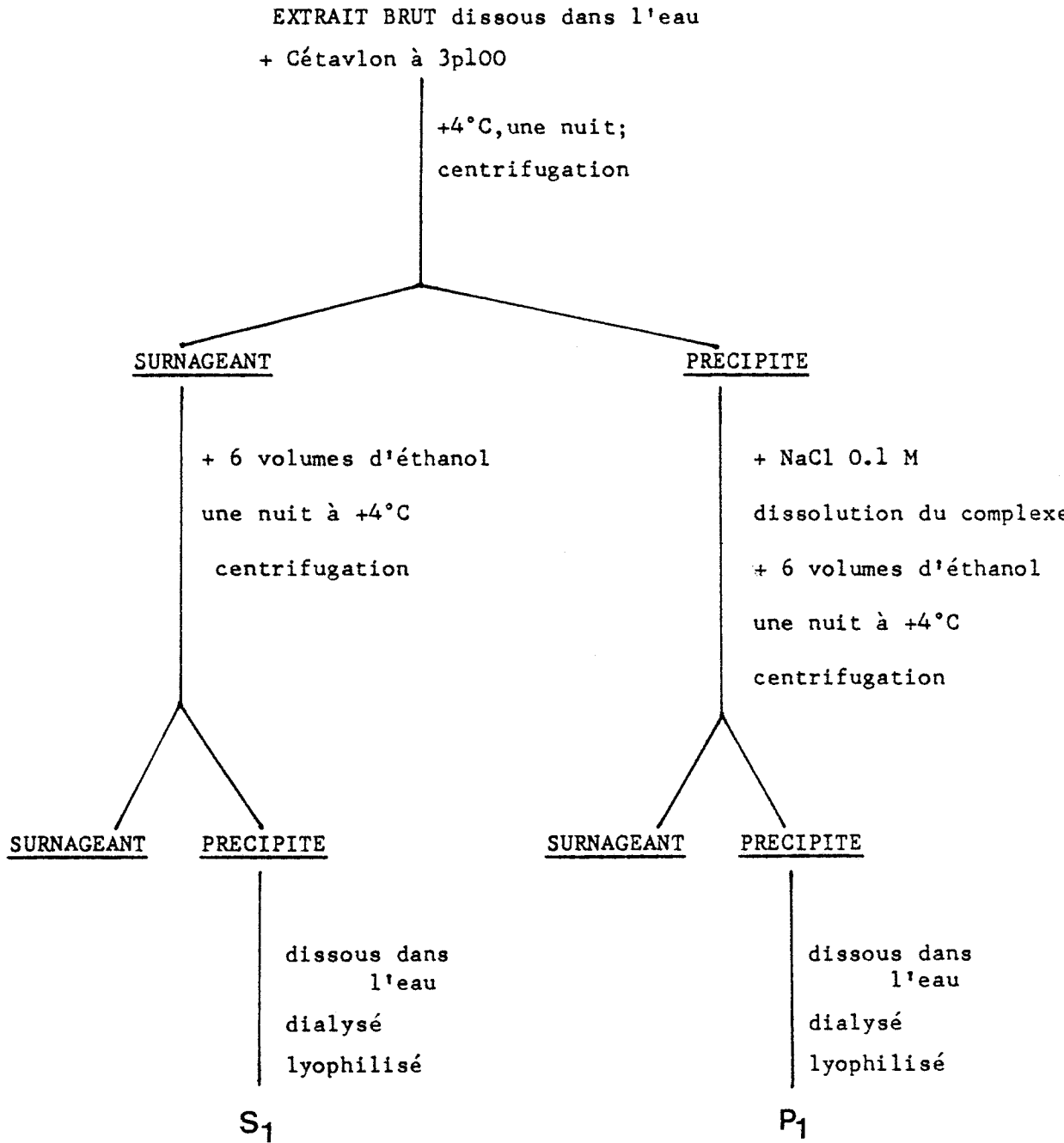


Figure 17

Schéma de fractionnement de l'extrait brut selon la méthode de SCOTT (109) au cétavlon( Bromure de cétyle-triméthyle-ammonium).



TABLEAU XI

RENDEMENTS DU FRACTIONNEMENT AU CETAVLON SELON SCOTT  
DE L'EXTRAIT BRUT

	POUR 100 mg d'extrait brut	POUR 10 g d'extrait brut
S <sub>1</sub>	34.1	44
P <sub>1</sub>	35	45
TOTAL	69.1p100	89p100

TABLEAU XII

TEST D'ACTIVITE DES DIFFERENTES  
FRACTIONS DE L'EXTRAIT BRUT \*

	% de régression de l' oedème (l /Kg)
RC1292	44
S <sub>1</sub>	<u>36</u>
P <sub>1</sub>	29

\* Thèse J.M.LAMERAND p.90( 119).



partie non négligeable de l'activité anti-inflammatoire du principe actif total.

## 2. Fractionnement du S<sub>1</sub>.

Dans son mémoire de thèse (p.91 )J.M.LAMERAND (111) décrit deux techniques de purification du S<sub>1</sub> par chromatographie d'adsorption sur gel d'Hydroxyapatite d'une part et d'autre part par chromatographie de gel filtration sur Ultrogel AcA 34.

Ces deux types de chromatographie ont permis d'isoler pour chacune une fraction possédant l'activité anti-inflammatoire.

Pour notre part, sur la base des résultats obtenus aux Laboratoires CASSENNE par chromatographie de polysaccharides bactériens isolés de Klebsiella Pneumoniae sur Sephacryl S300, nous avons repris ce support qui possède l'avantage de permettre des éluions très rapides.

### A. Matériel et méthodes

Nous avons utilisé une colonne de Sephacryl S300 (PHARMACIA) (3.5 X 115 cm), du bicarbonate d'ammonium 0.1 M comme éluant avec un débit de 40 ml/heure. Le repérage des glucides est effectué au réactif au phénol sulfurique de DUBOIS (112), les protéines repérées par lecture au spectrophotomètre à 280 nm.

### B. Résultats

La chromatographie sur Sephacryl S300 nous permet d'obtenir trois fractions (F<sub>I</sub>, F<sub>II</sub>, F<sub>III</sub> ; fig. 18 , p. 62). La composition molaire en monosaccharides de ces trois fractions est donnée dans le tableau XIII, p. 63 .

La fraction F<sub>I</sub> est comparable aux fractions F<sub>I</sub> obtenues sur Ultrogel AcA34 et Hydroxyapatite, comme en témoignent les résultats de leur composition en monosaccharides (tableau XIV, p. 64 ).

Nous avons donc choisi le gel de Sephacryl S300 pour préparer la fraction possédant l'activité anti-inflammatoire.

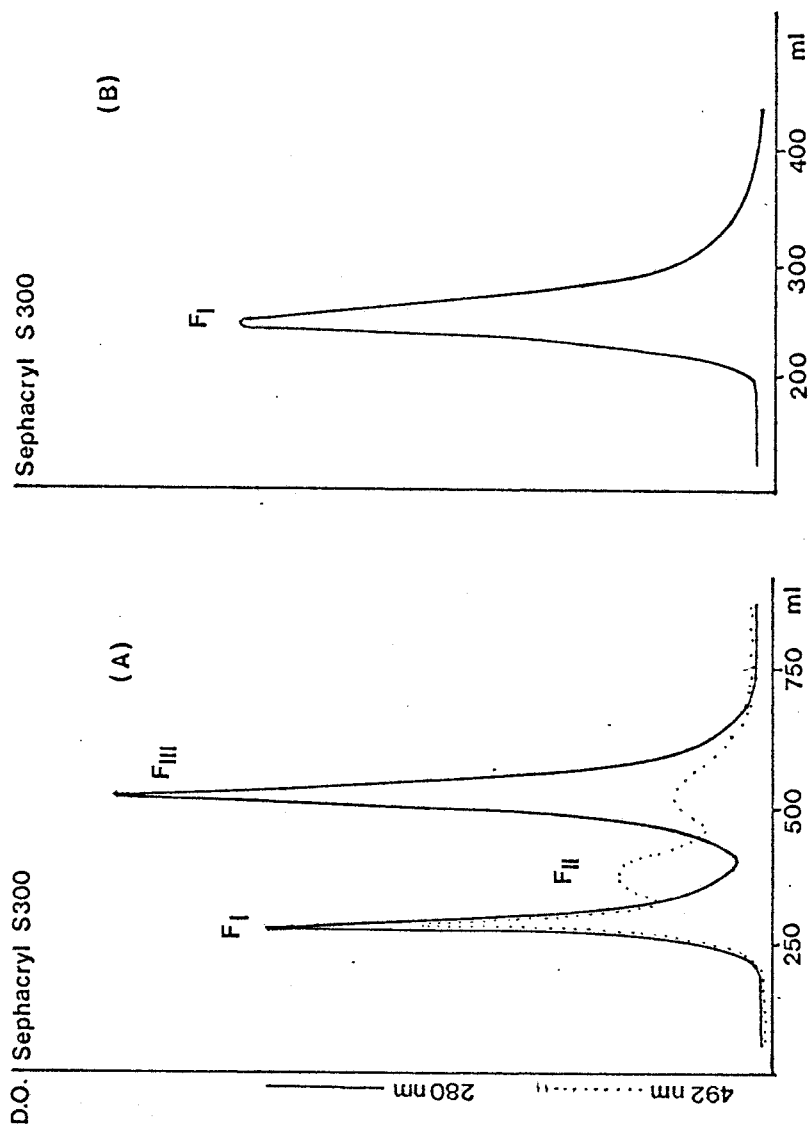


Figure 18

Chromatographie de gel filtration sur Sephadryl S300 de l'extrait brut (A)  
refiltration de la fraction  $F_I$  (B).

Conditions chromatographiques décrites à la page 61 .



TABLEAU XIII  
 COMPOSITION MOLLAIRE EN MONOSACCHARIDES DES FRACTIONS OBTENUES A PARTIR DU S<sub>1</sub>\*

	RHA	ARA	FUC	GAL	MAN	GLC	GLCNAC	FUCNAC	HEP
F <sub>I</sub>	0.92	---	---	0.18	0.2	2	1.17	2.2	0.3
F <sub>II</sub>	0.66	2.91	---	4.19	12.76	2	0.56	0.8	---
F <sub>III</sub>	---	0.91	0.77	2.58	5.13	2	0.57	1	---

\* sur la base de deux résidus de glucose par molécule.



TABLEAU XIV  
 COMPOSITION MOLAIRES EN MONOSACCHARIDES DES FRACTIONS F<sub>I</sub> OBTENUES  
 PAR LES DIFFERENTES METHODES DE FRACTIONNEMENT.\*

	RHA	ARA	FUC	GAL	MAN	GLC	GLCNAC	FUCNAC	HEP
F <sub>I</sub> AcA34	1	0.06	0.12	0.4	0.08	2	1.4	1.6	+
F <sub>I</sub> HA	1.2	---	---	0.2	---	2	1.6	2.8	+
F <sub>I</sub> S300	0.92	---	---	0.18	---	2	1.17	2.2	+
F <sub>I</sub> Refiltré sur S300	1	---	---	0.18	---	2	1.3	2.56	+

\* sur la base de deux résidus de glucose par molécule.



#### IV. ETUDE DE LA FRACTION ACTIVE (FRACTION $F_I$ ).

##### 1. Isolement des monosaccharides constituant le $F_I$ .

###### A. Matériel et méthodes

Les monosaccharides constituant le  $F_I$  sont libérés quantitativement par hydrolyse par l'acide trifluoroacétique 4 N pendant 4 heures.

Après évaporation sous vide et plusieurs codistillations avec du méthanol, le résidu sec est repris par de l'eau distillée et déposé sur une colonne de Dowex 50X2;200-400 mesh( procédé de GARDELL (113)).

Après élution des oses neutres par de l'eau, les osamines sont déplacées par une solution d'acide chlorhydrique 0.55 N.

###### B. Résultats

Le diagramme d'élution de la Dowex est présenté à la figure 19, p. 66.

L'élution à l'eau fournit deux fractions appelées FnI et FnII.

Le passage de l'acide chlorhydrique 0.55 N conduit à l'obtention de deux fractions appelées FbI et FbII.

La fraction neutre FnI est enrichie en heptose et en acide 2-céto-3-deoxy octulosonique (fig. 20 , p. 67 ), alors que la fraction neutre FnII ne renferme que le glucose et le rhamnose.

La fraction basique FbI contient la glucosamine et la fraction FbII la fucosamine.

Afin de déterminer la configuration D ou L des monosaccharides obtenus, le mélange rhamnose, glucose (FnII) a été répurifié par H.P.L.C. préparative sur colonne micropak AX10(solvant acétonitrile:eau, 75:25), (fig. 21 , p. 68 ). La glucosamine et la fucosamine après N-réacétylation ont été repurifiées dans les mêmes conditions.

L'état de pureté des monosaccharides a été étudié par G.L.C. des méthyl glycosides trifluoroacétylés.

##### 2. Configuration des monosaccharides constituant le $F_I$ ;

###### A. Matériel et méthodes

La configuration D ou L des monosaccharides a été étudiée par mesure



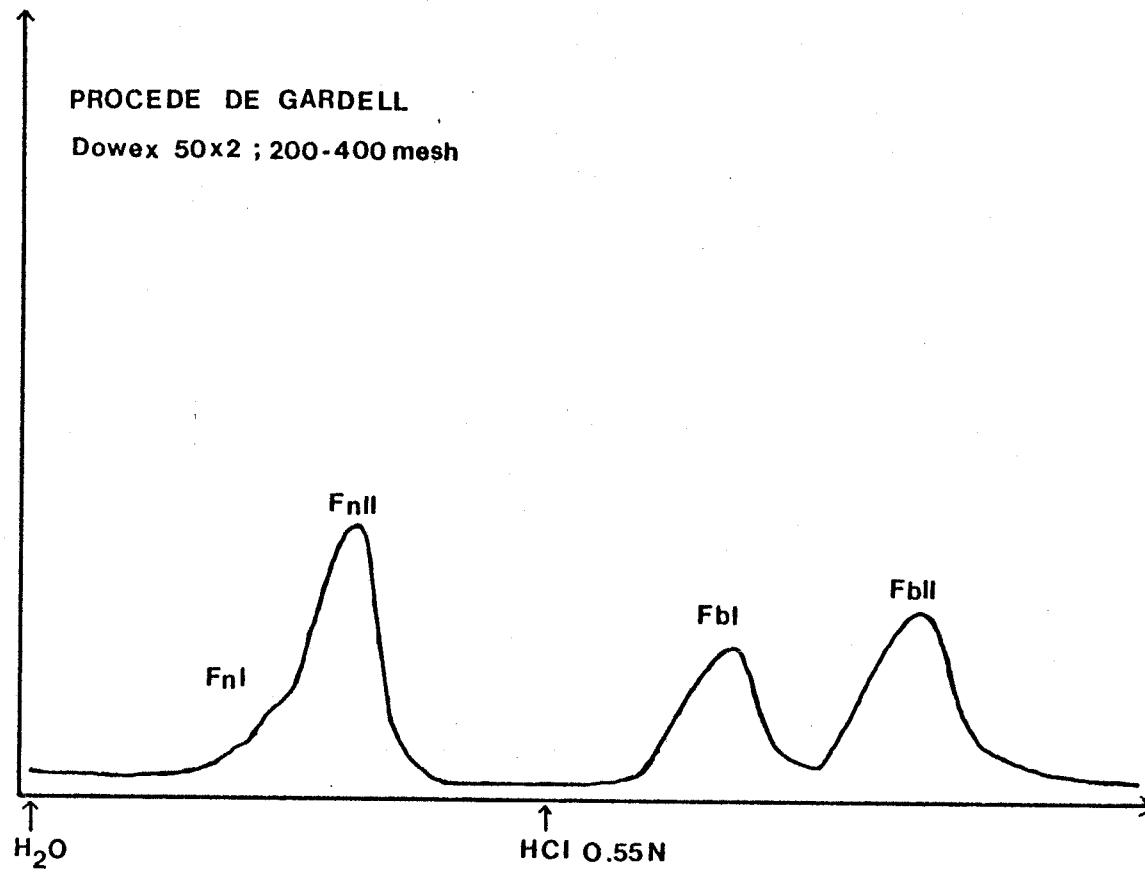


Figure 19

Isolement des monosaccharides constituant le  $F_I$  selon le procédé de GARDELL

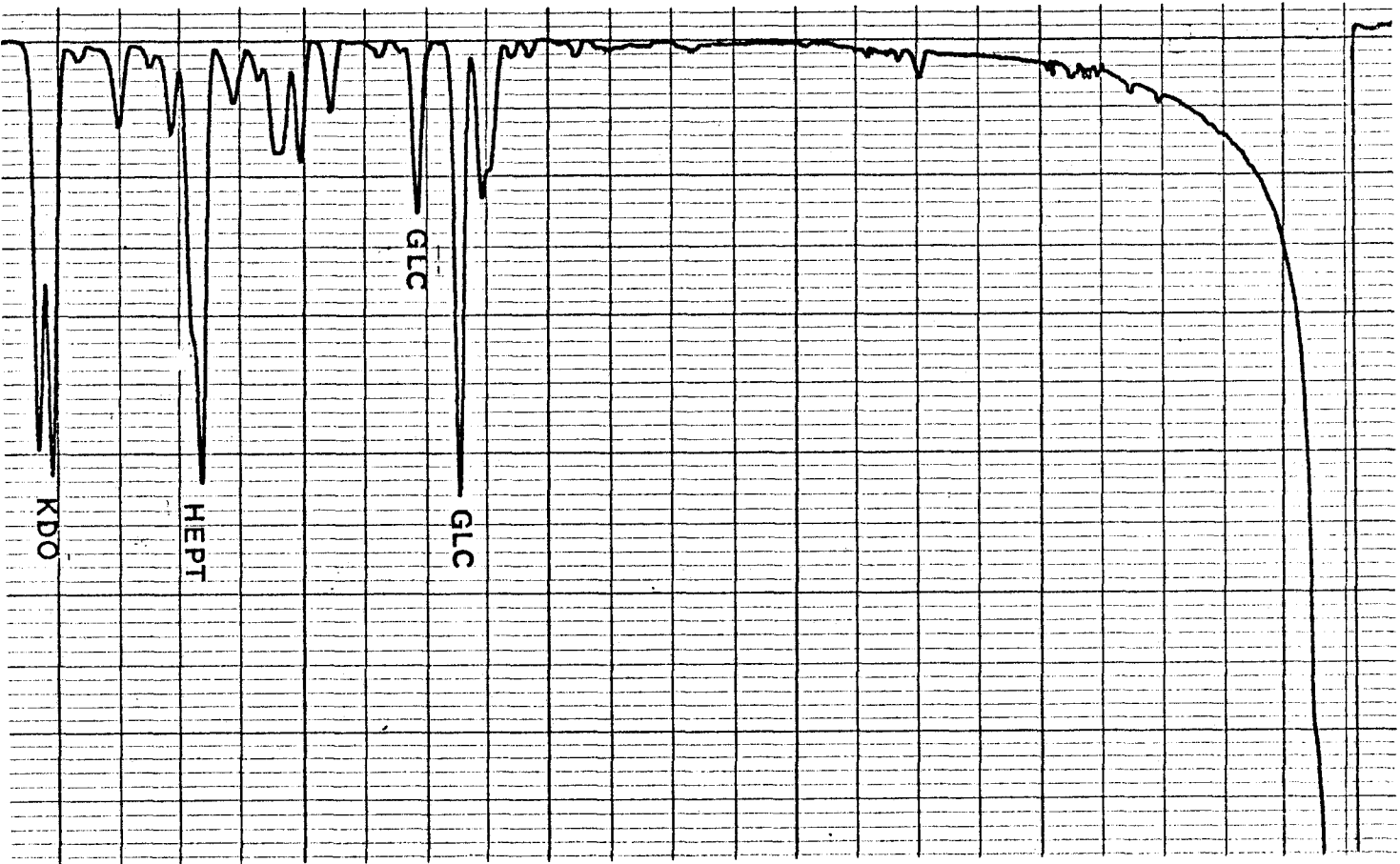
Diagramme d'élution de la Dowex 50X2.





Chromatographie en phase gazeuse de la fraction Fnl du fractionnement de GARDELL.  
Les conditions chromatographiques sont décrites à la page 75.

Figure 20



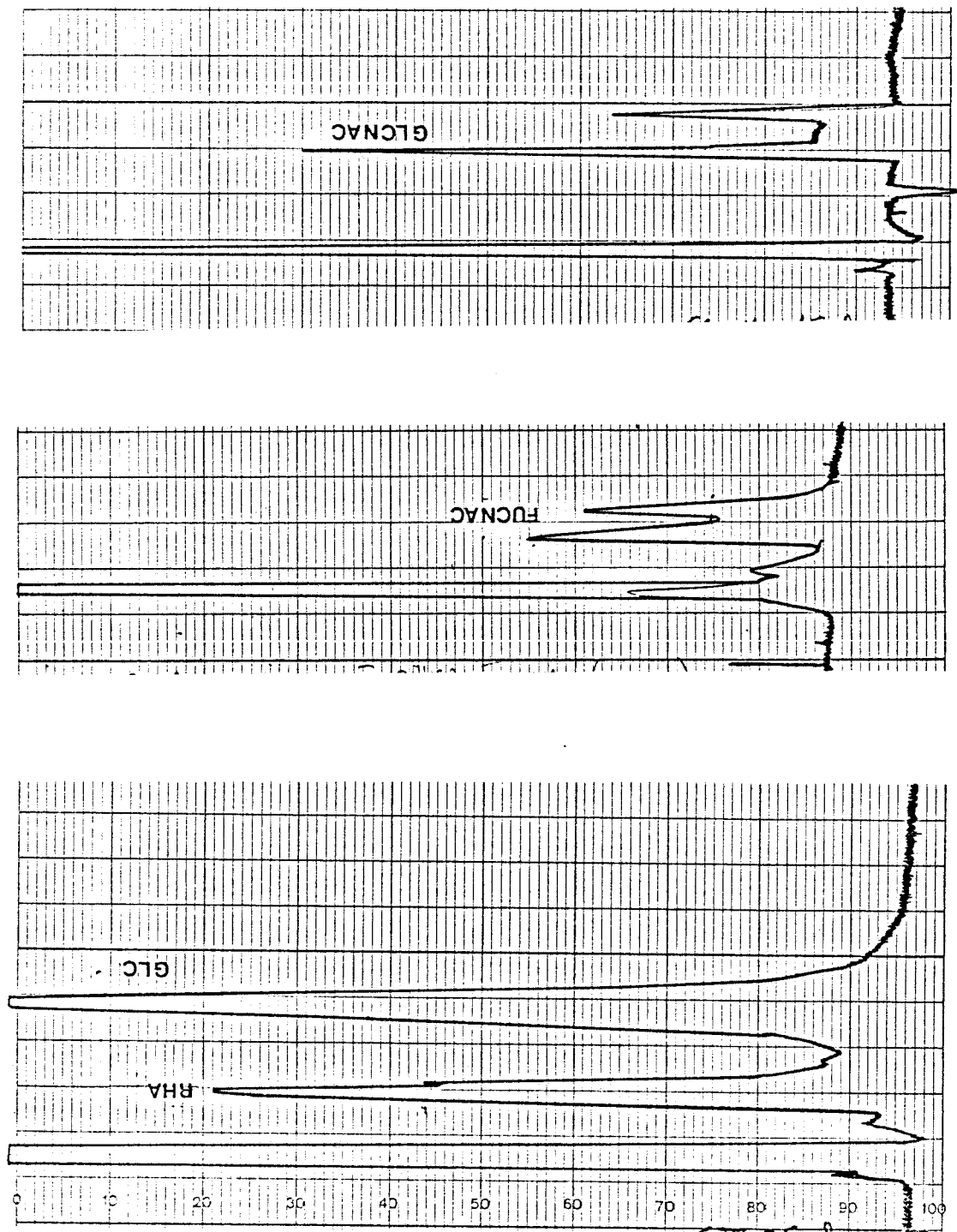


Figure 21

Purification des monosaccharides par H.P.L.C.préparative sur micropak AX10.

Conditions opératoires décrites à la page 65.



du pouvoir rotatoire au micropolarimètre ZEISS LEP A<sub>2</sub>.

### B. Résultats

Le pouvoir rotatoire spécifique de chaque monosaccharide a été calculé. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XV, p. 70 dans lequel nous portons les valeurs annoncées dans la littérature. Nous constatons à la lecture de ce tableau que les valeurs du pouvoir rotatoire du rhamnose, glucose et N-acétyl-glucosamine concordent avec celles de la littérature.

Si on peut affirmer que la fucosamine est de nature L, on constate toutefois qu'elle est souillée par la présence d'un composé dextrogyre.

### 3. Identification de l'osamine particulière.

L'étude de l'osazone obtenue à partir de la fraction FbII a permis d'exclure la possibilité que cette osamine soit la rhamnosamine et la quinovosamine (mémoire de thèse de J.M. LAMERAND p.62 (114)). Il restait par conséquent à rechercher la nature :  
-allose, altrose  
-idose, gulose  
ou -galactose, talose.

Nous avons démontré par désamination oxydative sa nature galactose-talose.

### A. Matériel et méthodes

Nous avons rassemblé dans la fig. 22, p. 71, les différentes étapes conduisant aux divers monosaccharides.

#### 1. Désamination oxydative de l'osamine (GARDELL (115)).

A 5 mg d'osamine nous rajoutons 0.5 ml de pyridine et 30 mg de ninhydrine et nous portons dans un tube scellé 30min à 105°C.

Le 5-deoxy hexose obtenu est purifié par passage sur une colonne de Dowex 50X8 et Dowex LX8.

#### 2. Préparation du témoin 5-deoxy-L-lyxose.

Ce témoin est obtenu par oxydation bromique du L-fucose qui fournit de l'acide L-fuconique, qui est ensuite dégradé par décarboxylation selon

TABLEAU XV

POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE DES MONOSACCHARIDES CONSTITUANT LE F<sub>I</sub><sup>\*</sup>

Monosaccharide	Pouvoir rotatoire spécifique	valeur littérature	référence bibliographique	configuration
Rhamnose	+5.22°	+8.2°	ISELL (116)	L (+)
Glucose	+49.1°	+51.2	BATES (117)	D (+)
Glucosamine	+71°	+72.6°	PREISS (118)	D (+)
Fucosamine	-31.1°	-79°	BARKER (119)	L (-)

\* mesures effectuées dans l'eau distillée.



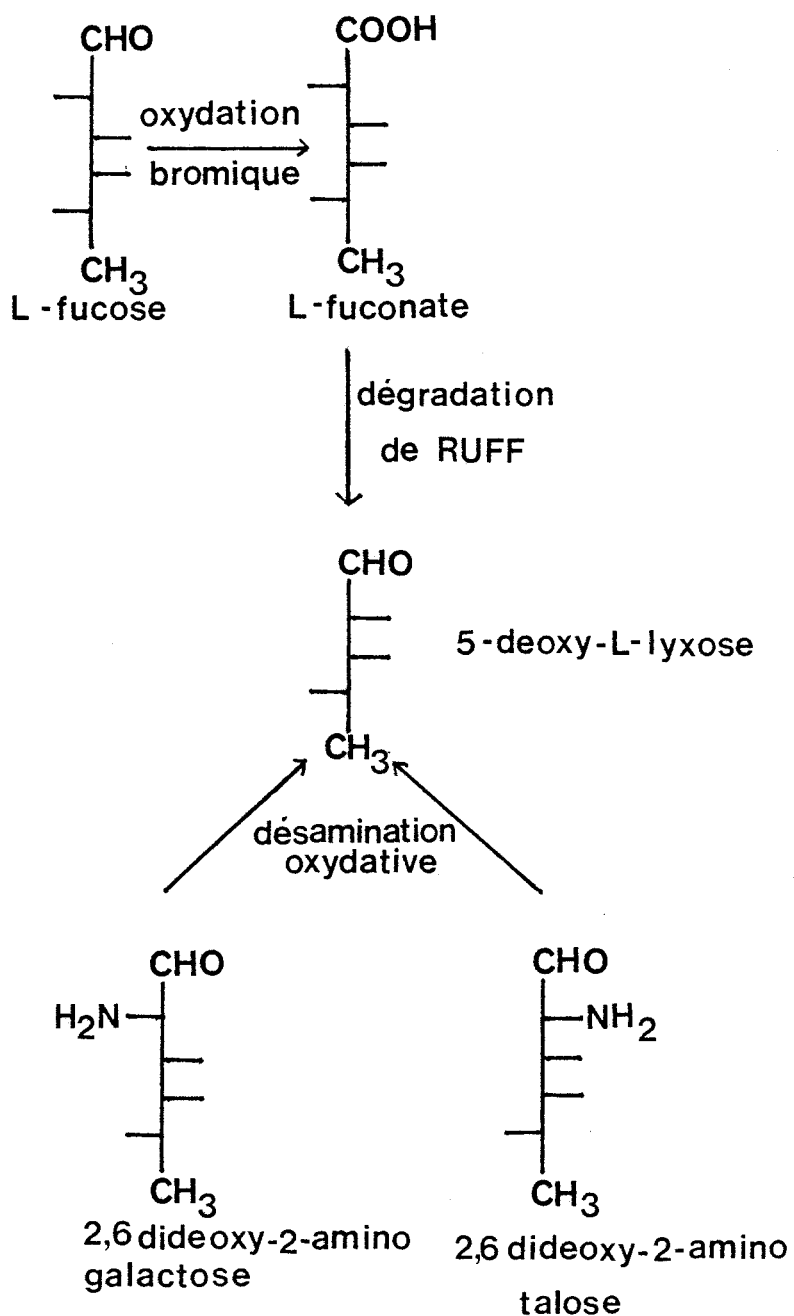


Figure 22

Les différentes étapes des réactions conduisant à l'identification de la fucosamine.



la méthode de RUFF en 5-deoxy-L-lyxose.

a) oxydation bromique (HUDSON (120)).

A 50 mg de fucose et 80 mg de  $\text{CaCO}_3$  nous ajoutons 1 ml d'eau distillée et 35  $\mu\text{l}$  de  $\text{Br}_2$  et nous laissons sous agitation pendant 40 min. L'excès de  $\text{Br}_2$  est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif et le  $\text{CaCO}_3$  en excès est éliminé par filtration sur papier Whatman n° 1. Les ions  $\text{Br}^-$  sont précipités par de l'  $\text{AgNO}_3$  et le surnageant est filtré puis lyophilisé.

b) Dégradation de RUFF (121).

L'acide fuconique est transformé en fuconate de calcium par traitement avec une solution saturée en  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Dans une solution de fuconate de calcium (50 mg dans 5 ml) nous ajoutons 5 mg d'acétate de baryum monohydrate et 2.5 mg de sulfate de fer ferrique. Nous portons à ébullition puis laissons refroidir à  $40^\circ\text{C}$  avant d'ajouter 300  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30p100.

Le développement d'une coloration bleu très foncée marque la fin de la réaction. On refroidit alors la solution et on la filtre sur charbon.

L'éluat est chromatographié sur deux colonnes couplées de Dowex 50X8 et Dowex 1X8. Après évaporation, le produit est lyophilisé.

### B. Résultats

Par désamination oxydative de l'osamine nous obtenons un 5-deoxy-pentose, identifié au 5-deoxy-lyxose par G.L.C. des méthyl glycosides trifluoroacétylés.

### C. Conclusions

Cette technique ne nous permet pas de conclure qu'il s'agit de la fucosamine (2,6 dideoxy-2-acétamido galactose), car son isomère, le 2,6 dideoxy-2-acétamido talose conduit également par désamination oxydative au 5-deoxy-lyxose.

L'ambiguïté a été levée par comparaison des diagrammes de G.L.C.,

du méthyl glycoside trifluoroacétylé du 2,6 dideoxy-2-acétamido hexose pur (Fraction F<sub>II</sub>) et des produits de la méthanolyse et de trifluoroacétylation obtenus à partir de polysaccharides de pneumocoques de type IV et de type XII (\*) qui possèdent le 2,6 dideoxy-2-acétamido galactose ( fig. 23 ,p. 74 ).

Cette L-fucosamine a déjà été identifiée dans les polysaccharides isolés des pneumocoques du type IV (HIGGINBOTHAM (122)), du type V (BARKER (123)), et du type XII (CIFONNELLI (124))(Lactobacillaceae). Elle a été également décrite dans les polysaccharides de Citrobacter freundii O5:H30 ( GUY (125)) et de E.coli ( JANN (126))(Entérobactériaceae), ainsi que chez Pseudomonas aeruginosa ( HORTON (127)).

#### 4. Etude de la séquence glucidique

Les études de séquences glucidiques ont été effectuées sur la fraction F<sub>I</sub> qui a subi une protéolyse à l'aide de la pronase.

##### A. Matériel et méthodes

##### 1. Hydrolyse pronasique.

L'hydrolyse pronasique de la fraction F<sub>I</sub> a été effectuée selon la méthode de MONSIGNY et al. (128).

A une solution de 1.3 g de fraction F<sub>I</sub> dans 130 ml d'acétate de calcium 0.01 M, on ajoute 25 mg de pronase P (TOUZART-MATIGNON).

L'hydrolyse est effectuée à pH 8 et à 40°C, sous agitation, pendant 48 heures en présence de toluène. Le pH est maintenu constant par l'addition de NaOH 0.1 N, contrôlé par un titrateur automatique (pH-stat Radiometer).

A la fin de l'hydrolyse le pH est ajusté à 5 avec de l'acide acétique

---

\* Nous remercions les Laboratoires Berri-Balzac pour nous avoir fourni les échantillons de pneumocoques.



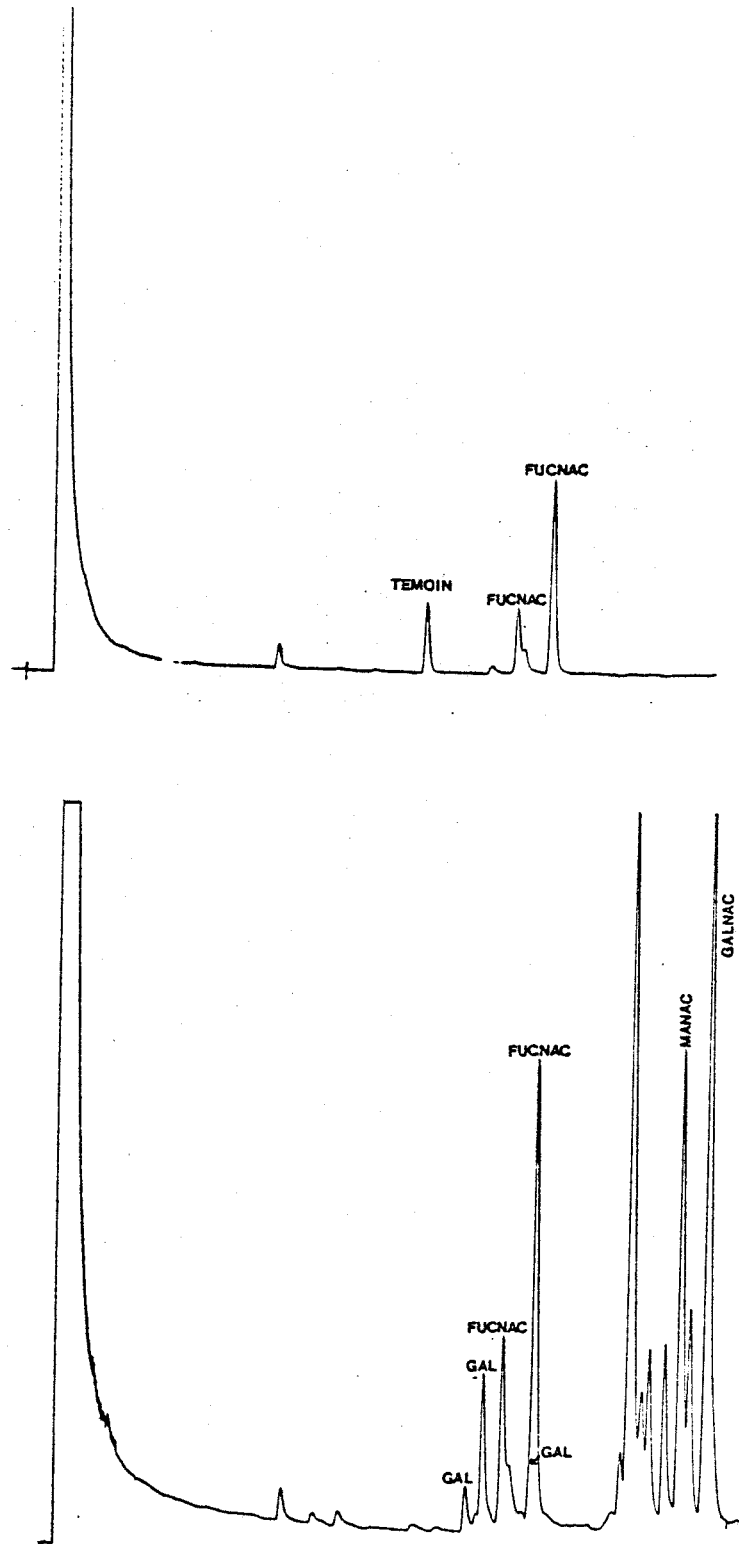


Figure 23

Chromatographie en phase gazeuse des méthyl glycosides trifluoroacétylés obtenus à partir de la fraction FbII et à partir du polysaccharide de pneumocoques de type IV. Conditions expérimentales décrites à la page 75 .



et l'hydrolysate précipité avec 6 volumes d'éthanol à +4°C pendant une nuit.

Le précipité est recueilli par centrifugation, redissous dans 100 ml d'acétate de calcium 0.01 M puis soumis à une nouvelle hydrolyse pronasique dans les mêmes conditions.

Après trois cycles de traitement par la pronase, le produit résistant à l'hydrolyse est soumis à une purification par filtration sur gel de Sephacryl S300 ( 3.5 x 115 cm; bicarbonate d'ammonium 0.1 M ;40 ml l'heure), puis Biogel P<sub>4</sub> pour dessaler les fractions.

## 2. Dosage des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse.

### a) Dosage après méthanolyse

Les monosaccharides sont identifiés et dosés selon le procédé de ZANETTA (129).

300 à 400 g de fraction F<sub>I</sub> sont méthanolysés en présence de 50 g de mésoinositol (étalon interne) par 500 l de méthanol chlorhydrique 0.5 N à 80°C pendant 24 heures.

Après séchage à l'azote, le résidu sec est trifluoroacétylé par 400 l de mélange dichlorométhane/anhydride trifluoroacétique ( v/v ) à 150°C pendant 2 fois 5 minutes.

Les méthyl glycosides trifluoroacétylés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de silicone OV 210 à 5p100 sur chromosorb W-HP (WAW DMCS) 100-200 mesh. La température est programmée de 100 à 200°C en raison de 2°C par minute. Le débit de gaz vecteur est de 7.5 ml par minute.

### b) Dosage après hydrolyse acide

Les monosaccharides constituant le F<sub>I</sub> sont libérés par hydrolyse acide et après réduction et péricétylation, ils sont identifiés par G.L.C. sous forme de polyols acétates.

### 1.-HYDROLYSE

1 mg de  $F_I$  est hydrolysé par 1 ml d'acide trifluoroacétique 4 N à 100°C pendant 4 heures. L'acide trifluoroacétique en excès est éliminé par évaporation avec de l'éthanol.

### 2.PERACETYLTION

Le résidu sec est repris par une goutte de formamide avant d'ajouter le mélange acétylant pyridine:anhydride acétique (v:v). Après 45 min à 105°C les réactifs en excès sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif.

### 3.REDUCTION

Le résidu sec est repris par quelques gouttes de méthanol. On ajoute 1 ml d'eau distillée et 10 mg de  $KBH_4$ . On laisse au repos pendant 1 à 2 heures puis la réaction est arrêtée par de la Dowex 50X8. Le borate est éliminé par plusieurs codistillations au méthanol.

### 4.PERACETYLTION

Le résidu sec est péracétylé comme en 2.

Les polyols acétates sont purifiés sur silice A60 (colonne 10 x 0.5 cm) équilibrée dans du chloroforme. Les polyols acétates sont désorbés par le mélange chloroforme/méthanol, 95/5 (v/v). Ils sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne ECNSSM à 5pl00 sur chromosorb HP, WAW, HMDS 80-100 mesh. La température est programmée de 150°C à 230°C, en raison de 2°C/minute. Le débit de gaz vecteur est de 20 ml /minute.

### 3.Méthylation

Nous avons utilisé le procédé d'HAKOMORI (130), modifié par FINNE et al. (131) pour la préparation du méthyl sulfinyl carbanion.

Le méthyl sulfinyl carbanion est préparé par dissolution (30 min, 60°C) de tert-butoxide de potassium dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) à une concentration de 3 M. (La concentration finale de la base est de 1.9 M, le sulfinyl carbanion étant en équilibre avec le tertbutoxide.

3 mg de produit à méthyler sont introduits dans un tube SOVIREL avec bouchon(13 mm)puis repris par 0.5 ml de DMSO.

Après passage sous courant d'azote, le tube est fermé hermétiquement et placé pendant au moins 30 minutes( et jusqu'à dissolution totale) dans un bain ultrasonique.

0.3 ml de base sont alors ajoutés et toujours sous azote le tube est placé une heure dans le bain ultrasonique.

Après congélation l'alkylation est conduite en ajoutant 0.5 ml d'iodure de méthyle et sonication pendant 45 minutes à une température qui ne doit pas excéder 20°C.

Le milieu réactionnel est déversé dans de l'eau distillée. Le polysaccharide méthylié est extrait par trois fois 5 ml de chloroforme, les phases organiques sont réunies, lavées par de l'eau et séchées par du sulfate de sodium anhydre.

La phase chloroformique est filtrée, évaporée à sec puis lyophilisée pour éliminer par sublimation les traces de DMSO.

Les éthers méthyliques libérés par méthanolyse sont analysés par chromatographie en phase gazeuse:

#### A. AVANT ACÉTYLATION

Colonne de Carbowax 20 M 3p100 sur chromosorb HP, WAW, HMDS, 60-80 mesh.

Température programmée de 130 à 220°C, 4°C/minute

Débit de gaz vecteur : 25 ml/minute.

B. APRES ACÉTYLATION par le mélange pyridine/anhydride acétique (v/v), 45 min, 105°C.

1. Même colonne que pour les éthers méthyliques avant acétylation.

2. Colonne capillaire OV 101 ( 0.3 mm de diamètre intérieur )

Injecteur de Ross ou Split-less

Température programmée de 110 à 230°C, 3°C/minute.

Débit du gaz vecteur : 0.45 bar

3. Couplage G.L.C.-M.S., avec le spectromètre RIBER 10-10(Rueil-malmaison)

#### 4. Oxydation périodique

Nous avons utilisé la méthode de GOLDSTEIN et al. (132).

Une solution de 500 mg d'hydrolysate pronasique de F<sub>I</sub> dans 125 ml d'eau distillée, est additionnée de 255 ml de métapériodate de sodium 0.05 M. Le mélange est maintenu 8 jours à l'obscurité à +4°C.

L'excès de métapériodate est éliminé par addition d'éthylène glycol. La fraction est dialysée et les polyaldéhydes formés lors de l'oxydation sont réduits par du borohydrure de potassium ( 500 mg ).

La solution neutralisée par de l'acide acétique, est débarrassée de l'acide borique par plusieurs codistillations avec du méthanol.

Le résidu est repris dans de l'eau distillée, ajusté à pH 1 avec de l'acide sulfurique 2 N et hydrolysé pendant 18 heures à température ambiante. Après passage sur une colonne de Dowex 1X2, l'oligosaccharide résistant à l'oxydation périodique est purifié par gel filtration sur une colonne de Biogel P<sub>2</sub>.

L'oligosaccharide ainsi purifié est réduit de nouveau par du borohydrure de potassium. La composition molaire de cet oligosaccharide est effectuée par méthanolyse et la séquence des monosaccharides étudiée par méthylation.

#### 5. Détermination des anoméries de liaison par oxydation chromique.

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

Nous avons utilisé le procédé d' HOFFMAN et al. (133).

Le polysaccharide est péracétylé par le mélange formamide 5ml, anhydride acétique 1.6 ml, pyridine 1.6 ml pendant une nuit, dialysé et lyophilisé.

Le polysaccharide péracétylé est traité par 50 mg de trioxyde de

chrome dans 1 ml d'acide acétique à 50°C pendant 2 heures. A la fin de la réaction on rajoute 4 ml d'eau distillée et on extrait le résidu résistant à l'oxydation chromique par le chloroforme.

La phase chloroformique est étudiée pour sa composition en monosaccharides par méthanolyse et trifluoroacétylation.

#### 6. Acétolyse partielle

Nous avons utilisé le procédé de BAYARD et MONTREUIL (134).

100 mg de F<sub>I</sub> sont dissous dans 2.5 ml de réactif d'acétolyse ( acide acétique:anhydride acétique:acide sulfurique; 10:10:1 ), conservé à +4°C.

La réaction est poursuivie de 1 à 3 jours à température ambiante. On déverse la solution sur 25 g de glace. Ensuite on neutralise le milieu réactionnel avec du bicarbonate de sodium et on extrait les oses et oligosaccharides acétylés par 8 fois 15 ml de chloroforme.

Les phases chloroformiques réunies sont lavées par une solution de bicarbonate de sodium à 1p100, séchées par du sulfate de sodium anhydre.

La phase organique, après réduction( qui réalise de plus la O-désacétylation des oligosaccharides ) est chromatographiée par H.P.L.C. sur une colonne d'AMINEX A14.

La phase aqueuse est dessalée sur une colonne de Sephacryl S300.

Les deux fractions sont étudiées par méthanolyse et trifluoroacétylation pour leur composition en monosaccharides.

### B. Résultats

#### 1. Hydrolyse pronasique

Le poids du protéolysat obtenu est de 0.88 g ce qui correspond à un rendement de 67p100.

2. Composition molaire en monosaccharides de la fraction F<sub>I</sub> PRONASE

La composition molaire en monosaccharides obtenus par méthanolyse de la fraction F<sub>I</sub> hydrolysée par la pronase ( F<sub>I</sub> PRONASE ) reste inchangée, cependant, les rapports molaires en monosaccharides de la fraction F<sub>I</sub> PRONASE obtenus par hydrolyse et analysés sous forme de polyols acétates, indiquent une libération plus importante des hexosamines ( voir tableau XVI, p. 82 ).

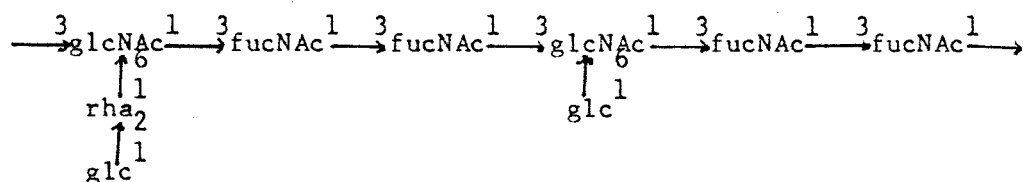
Ce résultat sera plus en accord avec les rapports molaires des éthers méthyliques obtenus après perméthylation du F<sub>I</sub> et méthanolyse.

3. Méthylation

L'analyse des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse de la fraction F<sub>I</sub> PRONASE perméthylée à permis d'identifier le 2,3,4,6 tetra-O-méthyl glucose, le 3,4 di-O-méthyl rhamnose ainsi que la 4-mono-O-méthyl fucosamine et la 4-mono-O-méthyl glucosamine ( fig. 25 , p. 83 ).

Les rapports molaires en éthers méthyliques déterminés sur la base de deux résidus de 2,3,4,6-tetra-O-méthyl glucose sont donnés dans le tableau XVI, p. 86 . Ces résultats obtenus sont en accord avec les résultats de rapports molaires en monosaccharides obtenus par hydrolyse trifluoro-acétique sur le F<sub>I</sub> natif et sur le F<sub>I</sub> PRONASE. Ils indiquent la présence de deux fois plus de N-acétyl fucosamine par rapport à la N-acétyl-glucosamine.

Sur la base de ces résultats, nous proposons la structure de répétition suivante:



où nous tenons compte du rapport 1:2 entre rhamnose et glucose et du rapport 1:2 entre N-acétyl glucosamine et N-acétyl fucosamine. Il nous a été malheureusement impossible de déterminer la nature des éthers méthyliques

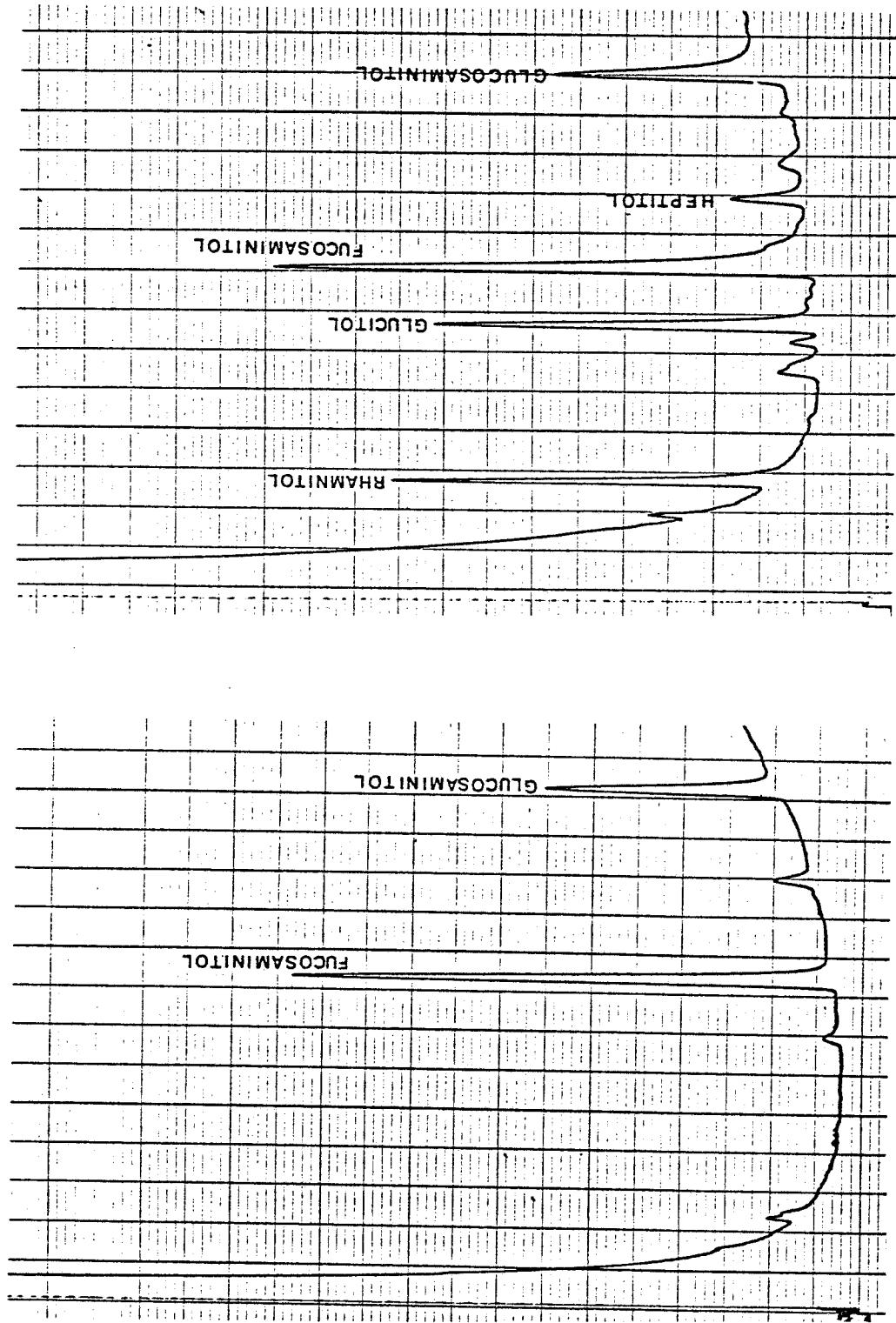


Figure 24

Chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides obtenus par hydrolyse acide, sous la forme de polyols acetates. Conditions operatoires page 75.





TABLEAU XVI

COMPOSITION MOLLAIRE EN MONOSACCHARIDES DE LA FRACTION F<sub>I</sub> PRONASE  
OBTENUE APRES METHANOLYSE ET APRES HYDROLYSE \*

	RHA	GLC	GLCNAC	FUCNAC	HEPT	TOTAL %
F <sub>I</sub> METHANOLYSE	0.92	2	1.17	2.2	0.3	50
F <sub>I</sub> HYDROLYSE	1	2	2.1	4.2	0.3	64

\* sur la base de deux résidus de glucose.



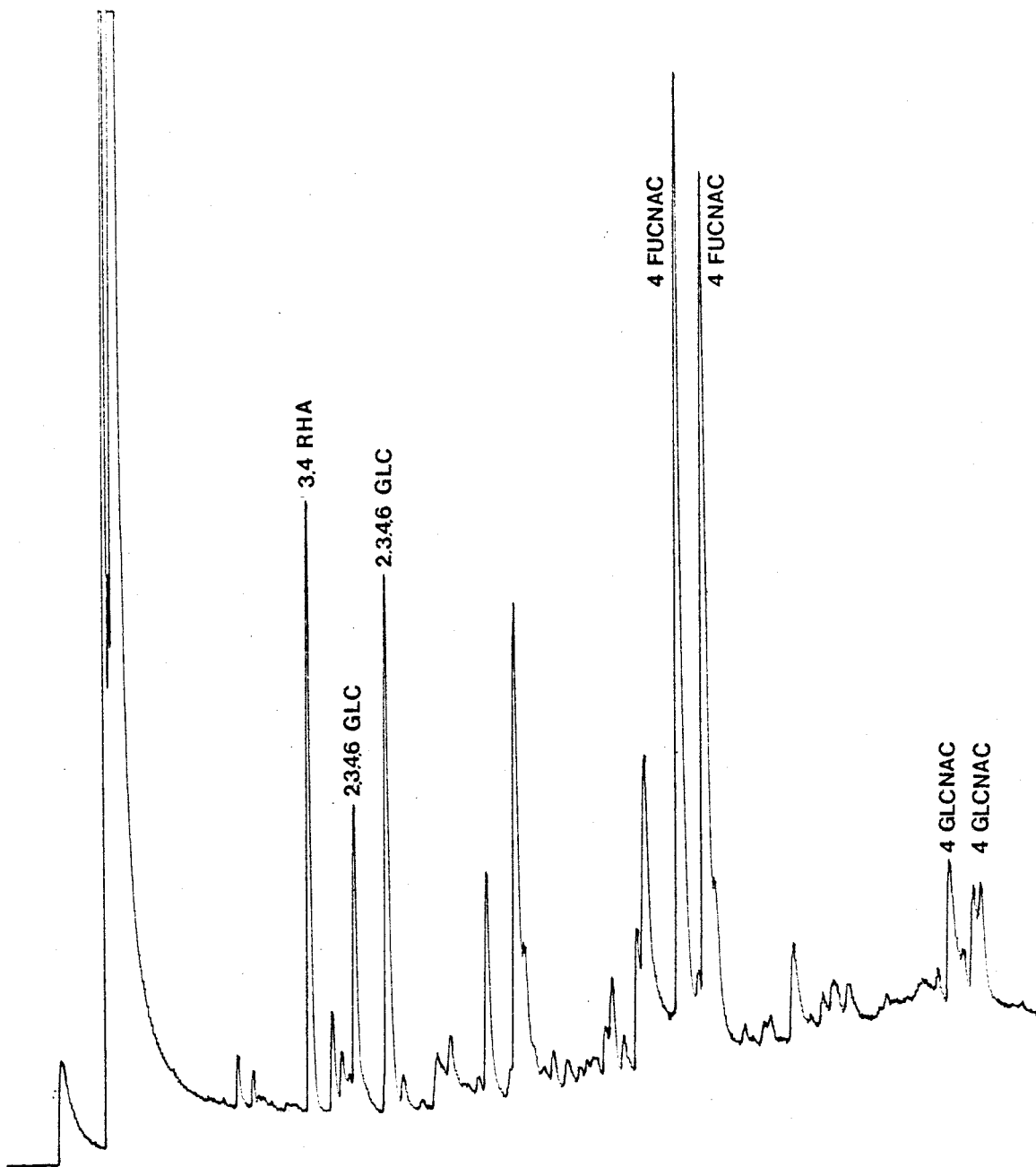


Figure 25

Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques  
de la fraction F<sub>I</sub> PRONASE.



des résidus d'heptose, ceci nous interdit de les positionner.

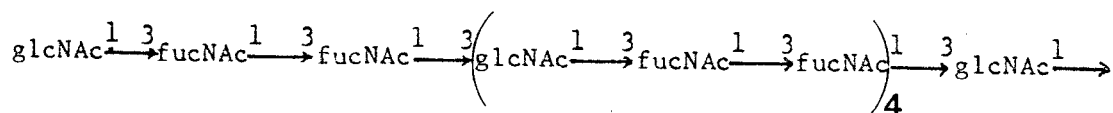
4. Etude du polysaccharide résistant à l'oxydation périodique

Après un cycle d'oxydation périodique du F<sub>I</sub> PRONASE, nous avons obtenu 100 mg de polysaccharide ce qui correspond à un rendement de 20p100. La composition en monosaccharides de cette fraction est donnée dans le tableau XVI p. 86 ; on constate que le polysaccharide résistant à l'oxydation périodique ne contient plus que des osamines: N-acétyl glucosamine et N-acétyl fucosamine dans les rapports molaires 1:2 respectivement (fig. 26 p. 85 ). Les chaînes latérales constituées de rhamnose et de glucose sont quantitativement éliminées.

Ces résultats sont confirmés par l'étude des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse de la fraction résistante à l'oxydation périodique perméthylée. En effet nous identifions de la 3,4,6-tri-O-méthyl glucosamine correspondant au monosaccharide en position terminale non réductrice, de la 4-mono-O-méthyl fucosamine et de la 4,6-di-O-méthyl glucosamine dans les rapports molaires 0.2:2:1 respectivement (tabl. XVIII, p.86) (fig.27 , p.87 ).

L'identification de la 4,6-di-O-méthyl glucosamine dans le produit résistant à l'oxydation périodique permet de positionner, sans ambiguïté les chaînes latérales constituées de glucose et de rhamnose en position 6 des résidus de glucosamine.

Enfin, sur la base des résultats des rapports molaires en éthers méthyliques et du calcul de la masse moléculaire obtenue par gel filtration sur Sephacryl S300, nous proposons la séquence primaire suivante:



caractérisée par la présence de 10 résidus de fucosamine et de 6 résidus de glucosamine.



à l'oxydation périodique.

Chromatographie en phase gazeuse du polysaccharide résistant

Figure 26

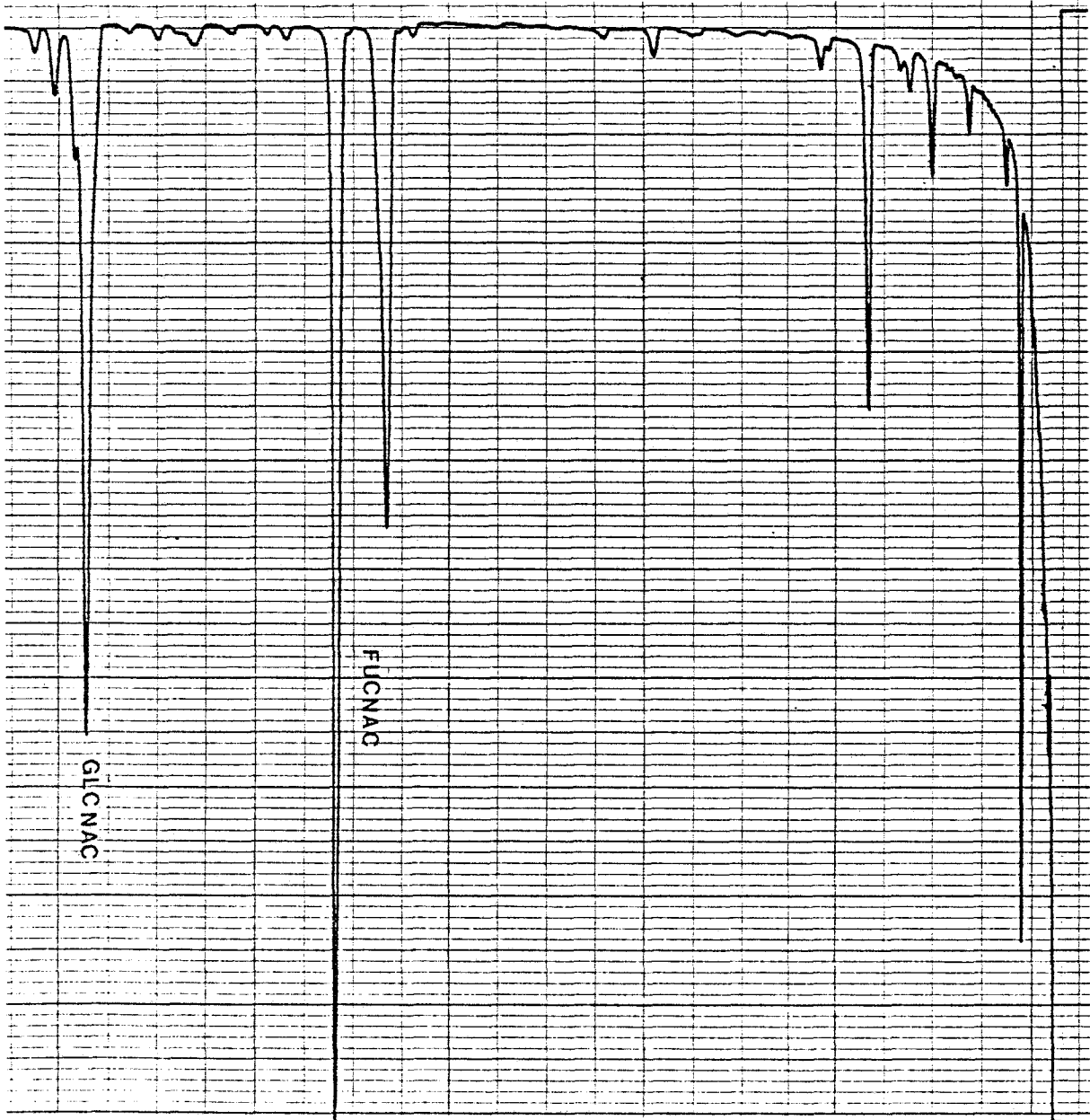


TABLEAU XVII

COMPOSITION EN ETHERS METHYLIQUES DU F<sub>I</sub> \*

	3,4 di-O-méthyl rhamnose	glucose 2,3,4,6 tetra-O-méthyl	4 mono-O-méthyl glcNAc	4 mono-O-méthyl fucNAc
F <sub>I</sub> NATIF	1.06	2	2.5	5
F <sub>I</sub> PRONASE	1.1	2	2.5	5

\* sur la base de deux résidus de glucose par molécule.

TABLEAU XVIII

COMPOSITION EN ETHERS METHYLIQUES DU F<sub>I</sub> OXYDE \*

	4 mono-O-méthyl fucNAc	4,6 di-O-méthyl glcNAc	3,4,6 tri-O-méthyl glcNAc
F <sub>I</sub> OXYDE	2	1	0.2

\* sur la base de 1 résidu de glcNAc par molécule.



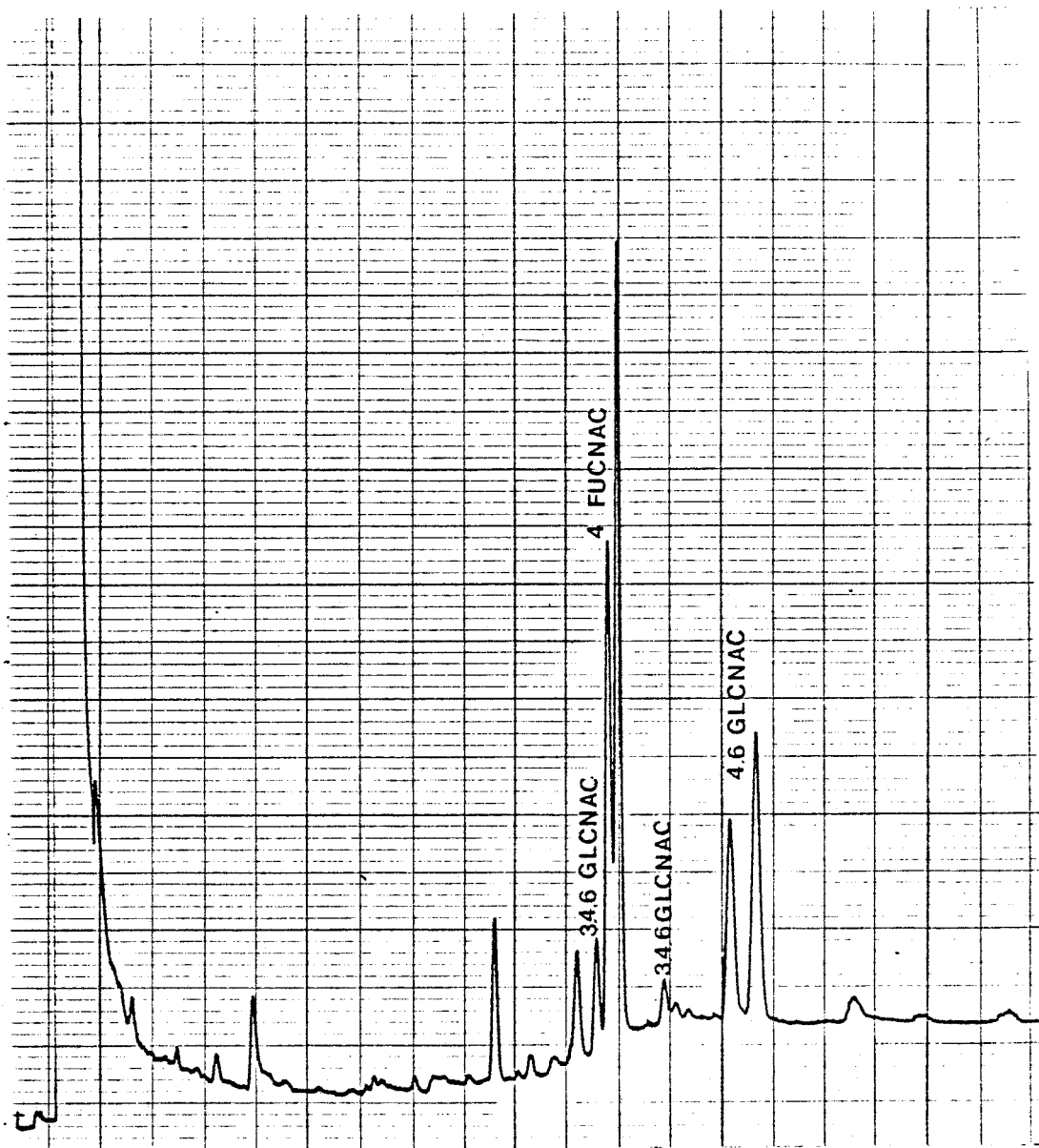


Figure 27

Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques  
de la fraction F<sub>I</sub> oxydée.



### 5. Détermination des anoméries de liaison

L'analyse en chromatographie en phase gazeuse du produit résistant à l'oxydation chromique montre la présence uniquement de glucose (fig. 28, p. 89). Nous pouvons donc conclure à une liaison du type  $\alpha$  pour le glucose et  $\beta$  pour le rhamnose, la glucosamine et l'heptose. Ce résultat de l'oxydation chromique du résidu de rhamnose nous a étonné; en effet en règle générale le rhamnose est conjugué dans les polysaccharides bactériens par une liaison de type  $\alpha$ .

Quant à la fucosamine, étant donné qu'il s'agit d'un 2,6 dideoxy-2-acétamido hexose, nous ne pouvons conclure à l'anomérie  $\alpha$  ou  $\beta$  car les cinétiques d'oxydation de ces deux anomères sont semblables (JANSSON (135)).

### 6. Acétolyse partielle

#### a. Etude de la phase organique

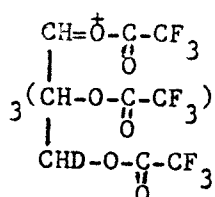
La phase chloroformique désacétylée lors de la réduction par le borohydrure de potassium, a été chromatographiée par H.P.L.C. sur colonne d'AMINEX Al4. Les résultats sont donnés dans la figure 29, p. 90.

Huit fractions sont obtenues, quatre ( fractions II, III, IV, et V) contenant des oligosaccharides, les fractions VI, VII et VIII étant constituées de polyols libres. La fraction I ne contenant que 2p100 de monosaccharides n'a pas été étudiée.

Les fractions oligosaccharidiques contiennent toutes du rhamnose, du glucose de la glucosamine et de la fucosamine (tableau XIX, p. 91).

Un composé (X) est apparu sur les chromatogrammes de G.L.C., ayant un temps de rétention très proche de la fucosamine. L'interprétation de son spectre de masse (fig. 30, p. 92) est difficile à cause de la proximité de la fucosamine.

Toutefois, la présence du fragment primaire m/e 632 de structure suivante:



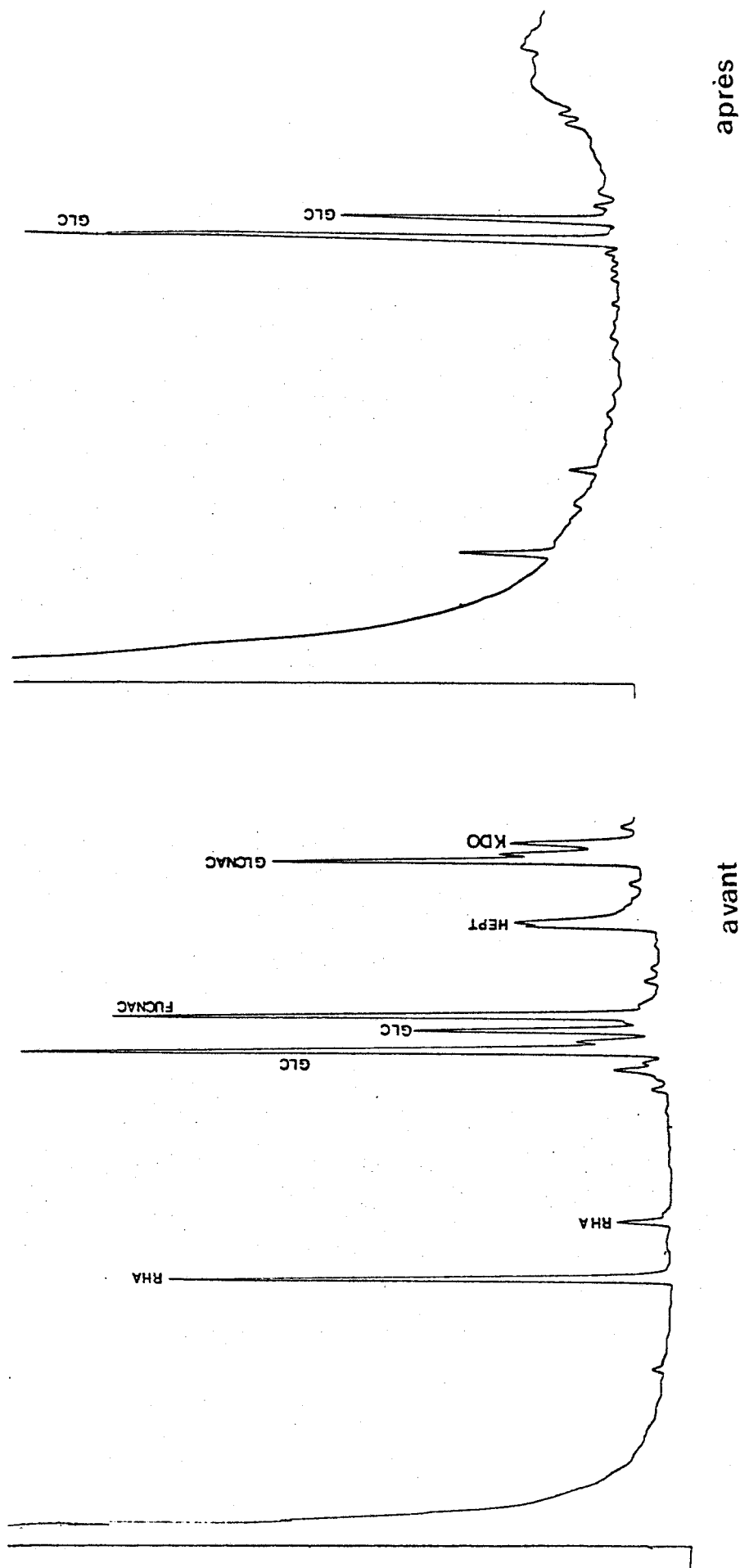


Figure 28

Chromatographie en phase gazeuse du produit de F<sub>I</sub> résistant à l'oxydation chromique.





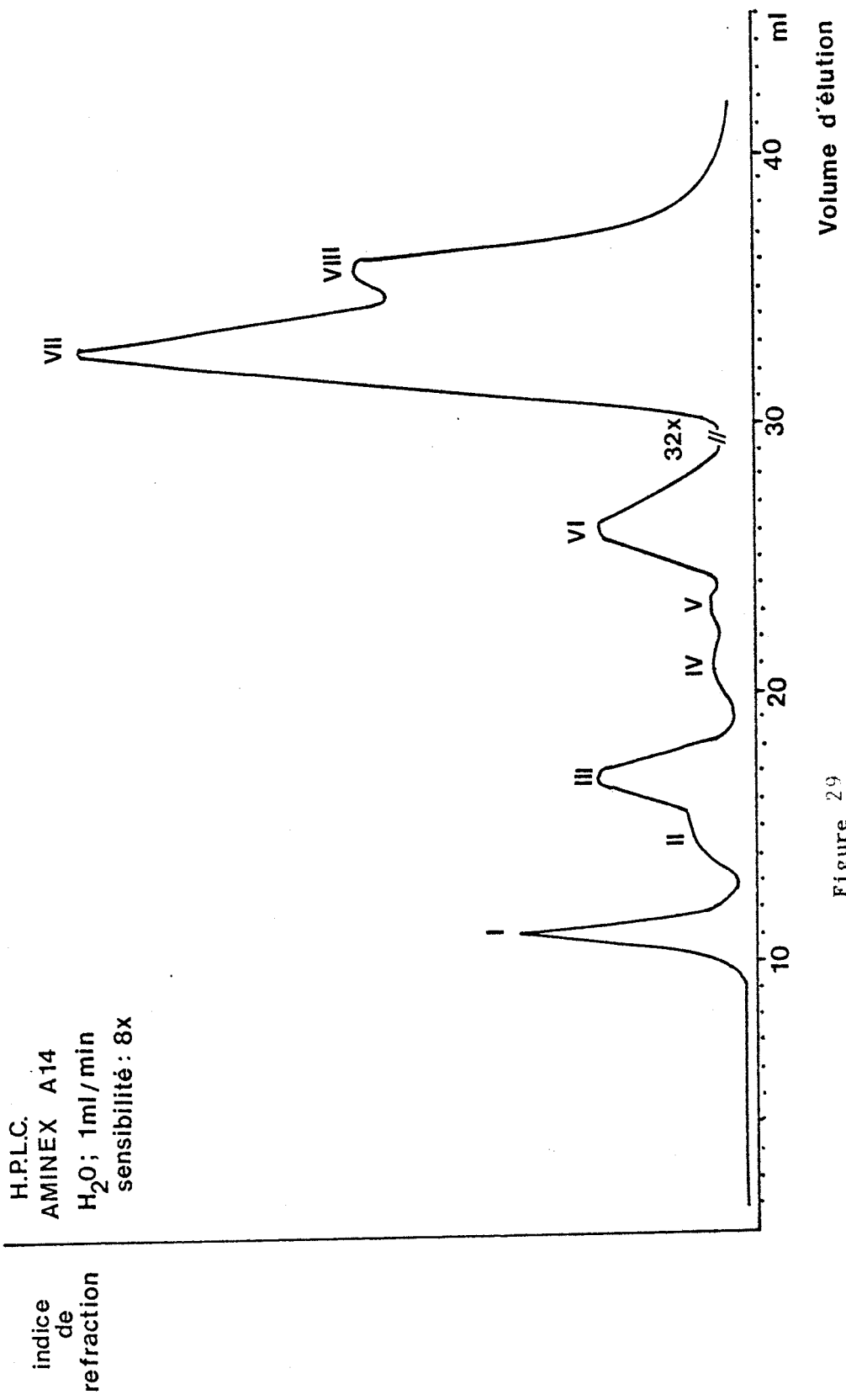


Figure 29

Chromatographie par H.P.L.C. sur colonne AMINEX A14 de la fraction obtenue après desacétylation de la phase organique de l'acétolysat de la fraction F<sub>I</sub>.



TABLEAU XIX

COMPOSITION MOLAIRES EN MONOSACCHARIDES DES FRACTIONS  
DE L' ACETOLYSAT\*

	RHA	GLC	GLCNAC	FUCNAC	HEPTITOL
I	---	---	---	---	---
II	2	2	2	2	+
III	2	---	2	2	+
IV	1.4	1	1.4	2	+
V	1	1	1	2	+
VI, VII et VIII	polyols libres				

\* sur la base de deux résidus de fucNac par molécule.

TABLEAU XX

COMPOSITION MOLAIRES EN MONOSACCHARIDES DES PHASES  
ORGANIQUE ET AQUEUSE DES ACETOLYSATS DE LA FRACTION F<sub>I</sub>\*

	RHA	GLC	GLCNAC	FUCNAC	POLYOLS
PHASE ORGANIQUE	1	1	1	2	+
PHASE AQUEUSE	1	1	1	2	---

\* sur la base de deux résidus de fucNac par molécule.

BUS  
FILE

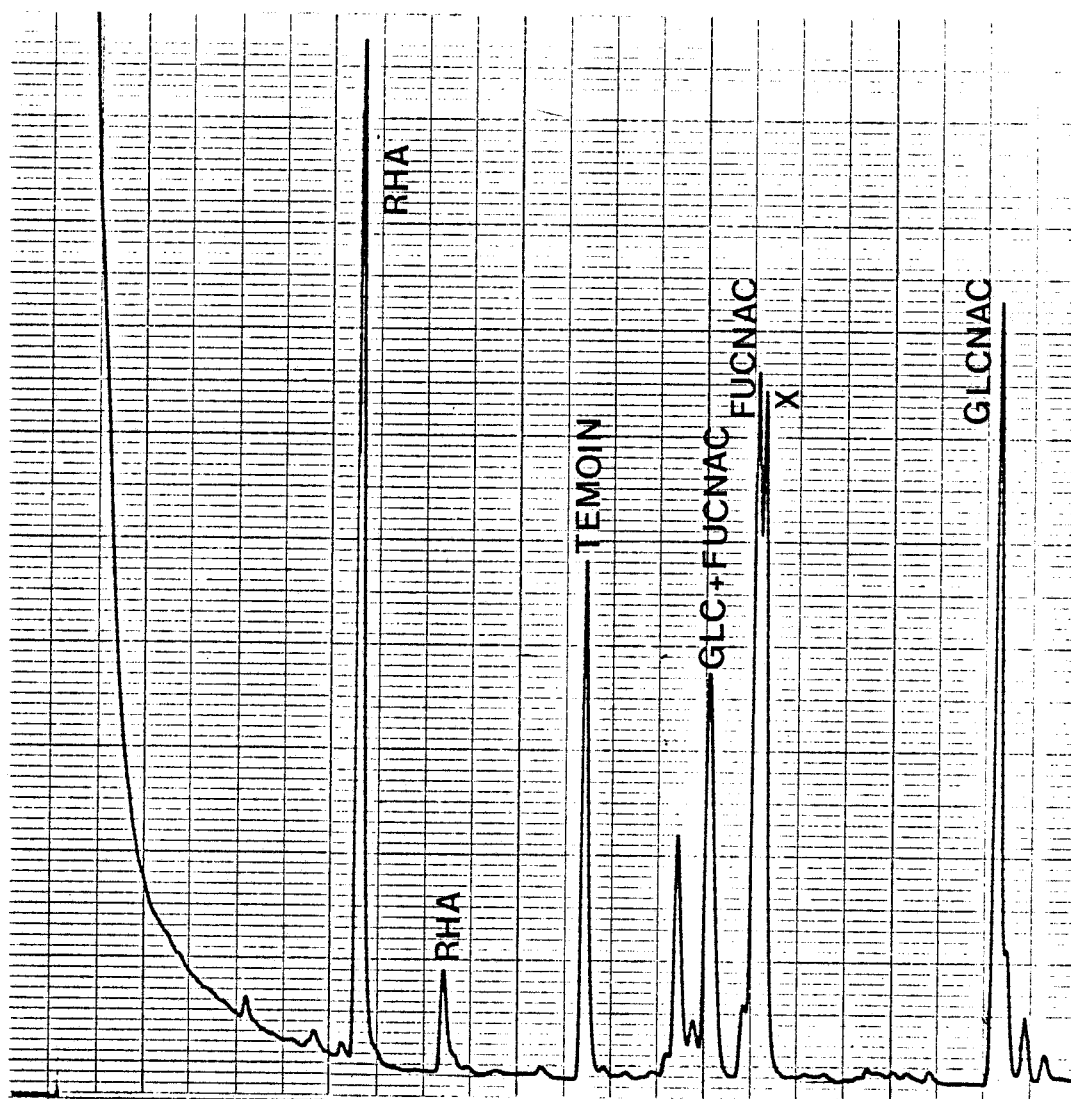


Figure 30

Chromatographie en phase gazeuse de la fraction III obtenue par H.P.L.C. de l'acétolysat sur colonne AMMINEX A14.



correspond aux 5 premiers carbones d'une structure de type heptitol.

Ce résultat est confirmé par la présence sur le spectre des fragments de masse  $m/e$  518 ( $632 - 114$ , perte d'une molécule d'acide trifluoroacétique) et de masse  $m/e$  404 ( $632 - 2 \times 114$ , perte de deux molécules d'acide trifluoroacétique).

Sur la base des résultats de la composition molaire en monosaccharides d'une part et des résultats obtenus sur le  $F_I$  natif et sur l'oligosaccharide obtenu par oxydation périodique d'autre part, nous posons les hypothèses de structure suivantes pour les oligosaccharides obtenus par acétolyse ( fig. 31, p. 94 ).

#### b. Etude de la phase aqueuse

La phase aqueuse a été dessalée sur une colonne de Sephacryl S300. Sa composition molaire en monosaccharides est identique à la composition molaire de la fraction organique comme nous pouvons le constater dans le tableau XX, p. 91.

#### C. Conclusions

La composition en monosaccharides du  $F_I$  ainsi que tous les résultats de la composition des produits obtenus après oxydation périodique, oxydation chromique et acétolyse partielle nous permettent de conclure à la structure présentée dans la figure 32, p. 95.

FRACTION

STRUCTURE PROPOSEE

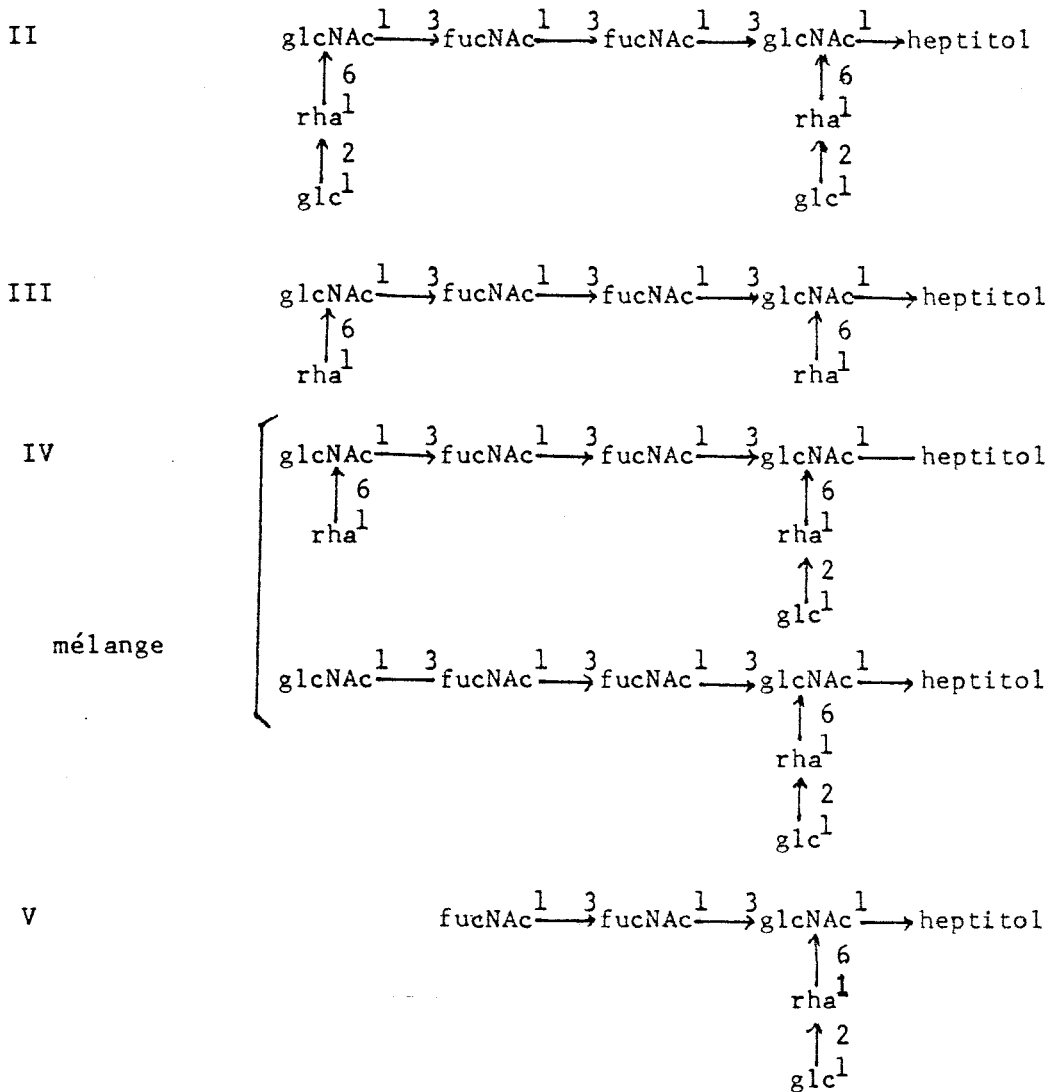


Figure 31

Hypothèses de structure pour les fractions de l'acétolysat.



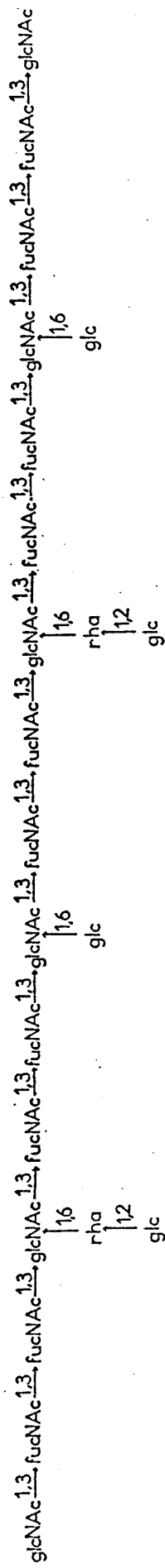


Figure 32

Structure du polysaccharide du F<sub>I</sub> obtenue par les méthodes classiques d'étude des glycoconjugués (méthylation, oxydation périodique, acétolyse, etc )



5. Recherche de la nature lipopolysaccharidique de la fraction  
active F<sub>I</sub>

La présence dans les méthanolysats de la fraction active F<sub>I</sub> de l'heptose et du KDO nous a amené à mettre en évidence sa nature lipopolysaccharidique.

En effet, les lipopolysaccharides contiennent en plus des monosaccharides constituant la chaîne polysaccharidique ( SIDE-CHAIN ), de l'heptose, du KDO ( CORE ) ainsi que des acides gras ( lipide A ), tels que les acides 3-OH-alcanoïques, conjugués sur les résidus de glucosamine.

Nous avons recherché la présence de tels acides gras dans la fraction lipide A obtenue par hydrolyse acide partielle.

A. Matériel et méthodes

1. Isolement de la fraction lipide A du F<sub>I</sub>

20 mg de F<sub>I</sub> dans 2 ml d'acide acétique 1p100 (ph 3.4) sont hydrolysés 90 min à 105°C.

Cette hydrolyse a pour effet de couper spécifiquement les lipopolysaccharides au niveau des résidus KDO de la région CORE, libérant ainsi la partie polysaccharidique ( SIDE-CHAIN ) hydrosoluble et la partie lipide A riche en acides gras, insoluble dans l'eau et qui par conséquent précipite lors de l'hydrolyse.

Cette fraction lipide A peut être obtenue par extraction chloroformique ( 3 fois 5 ml de chloroforme, la phase organique est séchée au sulfate de sodium anhydre ). La phase aqueuse contenant le polysaccharide est chromatographiée par gel filtration sur une colonne de Sephacryl S300, en vue d'évaluer son poids moléculaire.

La phase chloroformique ( lipide A ) est étudiée pour sa composition en acides gras. Afin de confirmer les résultats nous avons traité en parallèle le lipopolysaccharide d'E.coli O<sub>11</sub>:B<sub>4</sub>;

## 2. Identification des acides gras du lipide A

La phase chloroformique contenant la fraction lipide A du lipopolysaccharide est évaporée et le résidu sec est méthanolysé par du méthanol chlorhydrique 0.5 N, 24 H à 80°C. Les acides gras sont identifiés sous forme métyl ester par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire de silicone SE52 couplée au spectromètre de masse RIBER 10-10.

## 3. Dosage des acides gras dans la fraction F<sub>I</sub>.

1 mg de F<sub>I</sub> est méthanolysé en présence de 20 g d'acide heptadécanoïque (acide margarique) servant d'étalon interne pour le dosage des acides gras (méthanol/HCl 0.5 N, 24 H, 80°C). Le résidu sec de l'évaporation sous azote du méthanolysat est repris par de l'heptane et la composition en acides gras étudiée par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne de Carbowax 20 M (0.3 x 300 cm) 3p100 sur chromosorb HP, WAW, HMDS, 60-80 mesh. La température est programmée de 130°C à 220°C, 4°C par minute. Le débit du gaz vecteur est fixé à 25 ml par minute.

Par ce dosage des acides gras directement sur le F<sub>I</sub> nous minimisons les pertes dues à l'extraction chloroformique. De plus cette recherche peut être menée en même temps qu'une analyse des monosaccharides constituant le F<sub>I</sub>. Il suffit alors d'introduire dans l'échantillon en plus de l'acide margarique, le mésoinositol servant d'étalon interne pour le dosage des monosaccharides.

Une partie du méthanolysat sera trifluoroacétylée et étudiée selon la technique décrite page 75.

## B. Résultats

Le polysaccharide contenu dans la phase aqueuse se comporte en gel filtration comme une molécule ayant un poids moléculaire inférieur à 10 000 daltons (fig. 33 p. 98).



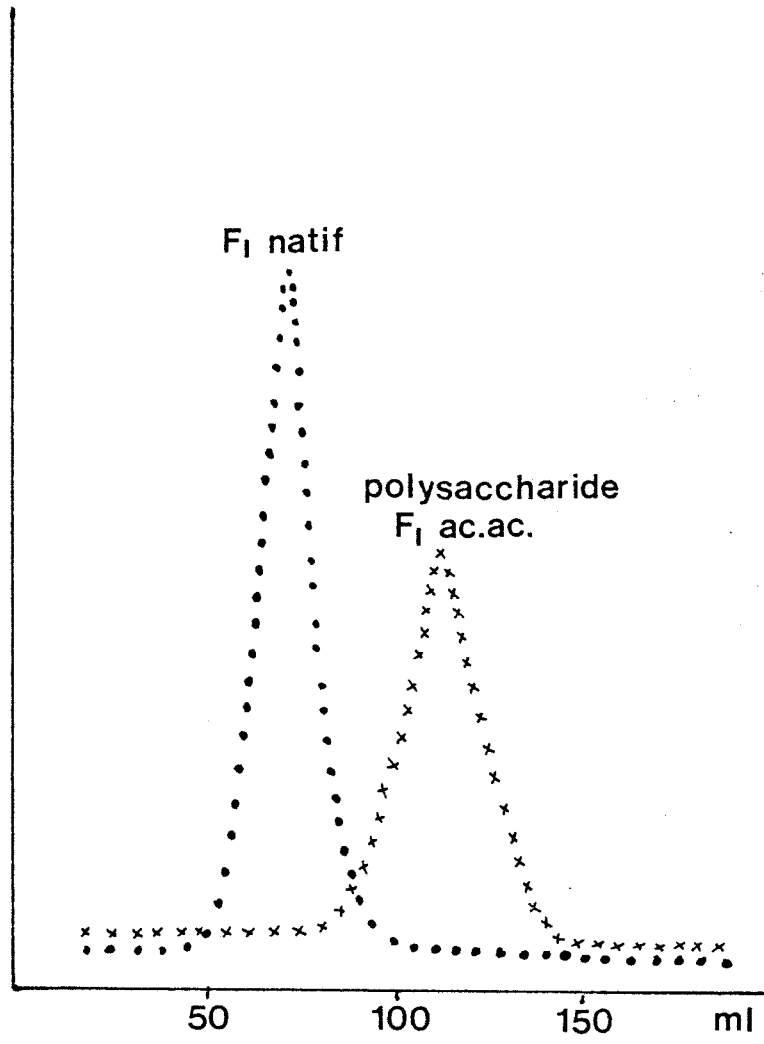


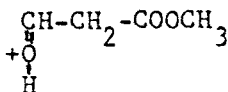
Figure 33



Diagramme d'élution de la colonne Sephacryl S300 du polysaccharide obtenu par hydrolyse acide ménagée ( acide acétique 1p100 ).

Ceci est en contradiction avec le résultat obtenu pour le  $F_I$  total contenant le lipide, qui se comporte comme une macromolécule. La composition molaire en monosaccharides du polysaccharide est identique à celle du  $F_I$  sauf pour l'acide 2-céto-3-deoxy octulosonique ( KDO ) qui diminue.

La composition en acides gras du lipide A est présentée dans la figure 34, p.100. Il est constitué des acides laurique (12:0), myristique (14:0) palmitique (16:0) et de l'acide -OH-myristique ( 3-OH 14:0) qui peut être identifié par spectrométrie de masse sur la base des pics de masse m/e 103 correspondant à l'ion



et de l'ion m/e 258 correspondant à la masse moléculaire de l'acide gras.

La composition en acides gras du témoin lipopolysaccharide d'E.coli  $O_{111}B_4$  est présentée dans la même figure.

Par le dosage des acides gras dans la fraction  $F_I$  total, nous avons évalué à 8p100 le pourcentage en acides gras du lipopolysaccharide.

### C. Conclusions

Nous avons pu montrer que la fraction active  $F_I$  est de nature lipopolysaccharidique. En effet les méthanolysats obtenus à partir du  $F_I$  natif contiennent des résidus d'acide 2-céto-3-deoxy octulosonique ( KDO ), des résidus d'heptose et de la glucosamine. Ces résidus sont les constituants communs du CORE et du lipide A des LPS.

D'autre part, l'hydrolyse acide ménagée par l'acide acétique 1p100 nous a fourni deux fractions; l'une organique contenant les acides gras et l'autre aqueuse qui possède la chaîne polysaccharidique ( SIDE-CHAIN ) et une partie du CORE.

Cette dernière expérience démontre la nature lipopolysaccharidique de notre fraction active  $F_I$ .

BUS  
LILLI

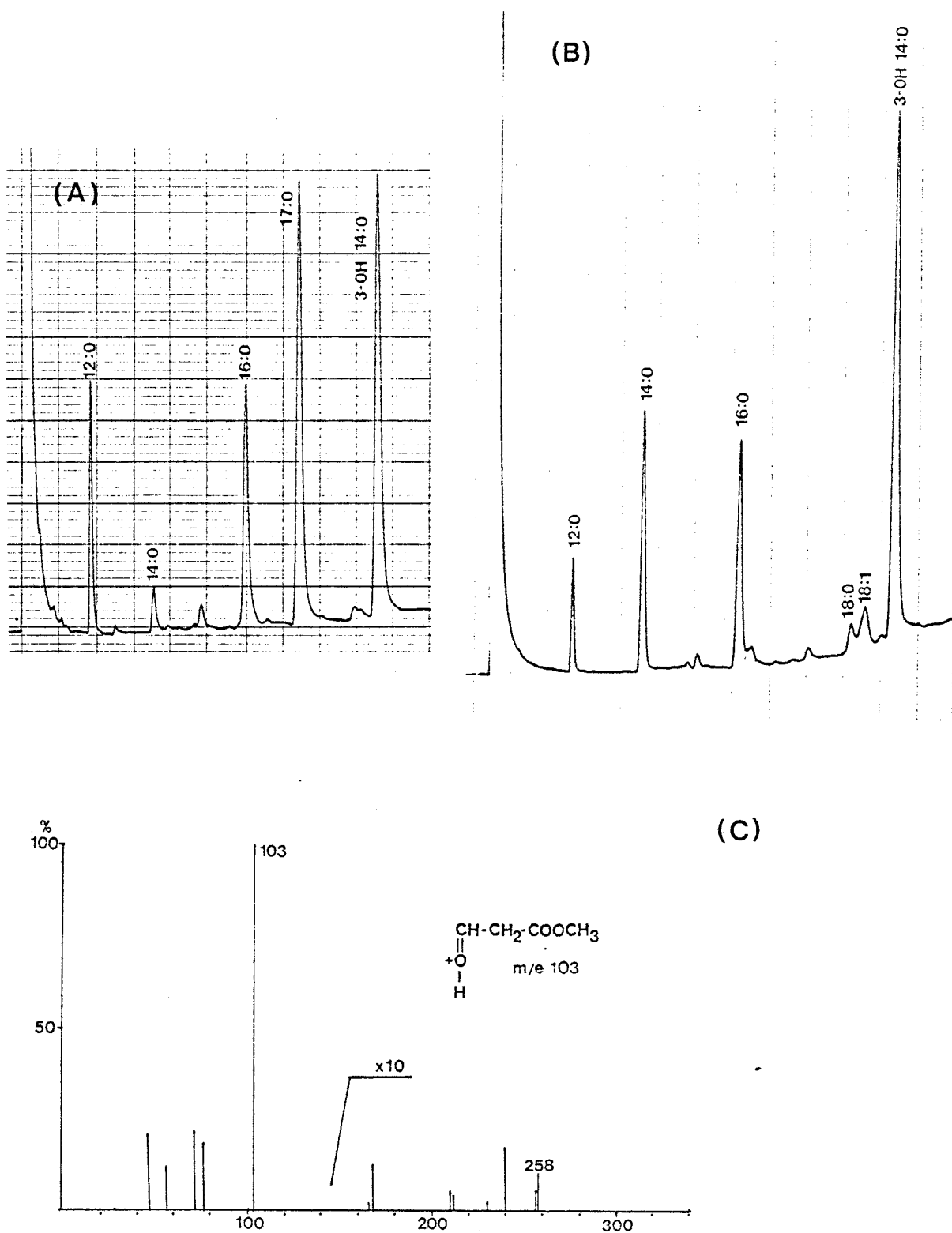


Figure 34

Composition en acides gras du lipide A d'Entérobacter agglomerans (A)  
 et d' E.coli O<sub>111</sub>:B<sub>4</sub> ( B). Spectre de masse de l'acide β-OH-myristique(C)



6. Evaluation du poids moléculaire du  $F_I$  et de ces produits de dégradation

Le  $F_I$  apparaît homogène en ultracentrifugation analytique. Le coefficient de sédimentation évalué sur une solution de 15 mg de  $F_I$  pour 1 ml de tampon TRIS/HCl 0.15 M; 20°C est de 9.4 S.

Compte tenu de son comportement chromatographique par filtration sur gel Sephacryl S300 nous pouvons estimer son poids moléculaire à 250 000 daltons. Nous avons effectué un étalonnage d'une colonne de Sephacryl S300 (1.3 x 130 cm) avec des dextrans de différents poids moléculaires.

Le  $F_I$  natif et le  $F_I$  PRONASE se comportent comme les dextrans de 100 000 à 300 000 (fig. 35 p. 103) ce qui est en accord avec les résultats de l'ultracentrifugation analytique.

Le résidu résistant à l'oxydation périodique ( $F_I$  oxydé) se comporte comme une molécule de poids moléculaire inférieur à 10 000 daltons.

Compte tenu des rapports molaires en éthers méthyliques obtenus par méthanolyse de cet oligosaccharide perméthylé ( 3,4,6-tri-O-méthyl glucosamine: 1; 4,6-di-O-méthyl glucosamine : 5 ; 4-mono-O-méthyl fucosamine : 10 ) le poids moléculaire calculé est de 3376 daltons ce qui n'est pas très éloigné du résultat expérimental de la filtration sur gel de Sephacryl S300 et qui correspond à la structure proposée dans la figure de la page 84.

Sur la base des résultats de l'oxydation périodique ( $F_I$  oxydé, contenant 16 monosaccharides) et de la composition en hexoses et méthyl pentoses de la chaîne polysaccharidique, nous proposons comme structure minimale pour la fraction polysaccharidique du  $F_I$  la structure présentée dans la figure 32 p. 95. La composition molaire en monosaccharides de cette séquence est en accord avec la composition molaire en éthers méthyliques de la fraction  $F_I$  perméthylée et méthanolysée.

Son poids moléculaire calculé est de 4424 daltons. Ce résultat est en accord avec celui obtenu pour le polysaccharide détaché par hydrolyse acide

ménagée du  $F_I$  natif. Les volumes d'élution de ces deux fractions sont très proches. (fig. 35 p. 103). Le poids moléculaire élevé de la fraction  $F_I$  natif peut être expliqué par la formation de micelles, ce qui est une propriété générale des lipopolysaccharides.

L'utilisation de la gel filtration en milieu dissociant (en particulier désoxycholate de sodium) devrait confirmer cette hypothèse.

Le poids moléculaire de 4424 daltons concerne seulement la chaîne polysaccharidique (SIDE-CHAIN) du  $F_I$ . Si nous admettons que notre molécule répond à la formule générale des lipopolysaccharides des Entérobacteriaceae, avec un CORE constitué de 3 résidus d'heptose et de 3 résidus de KDO et le lipide A de 1 résidu d'acide laurique, 1 résidu d'acide palmitique et de 3 résidus d'acide -OH-myristique, la masse calculée pour la molécule du lipopolysaccharide total est de 7216 et après soustraction des résidus  $H_2O$  de condensation 6730.

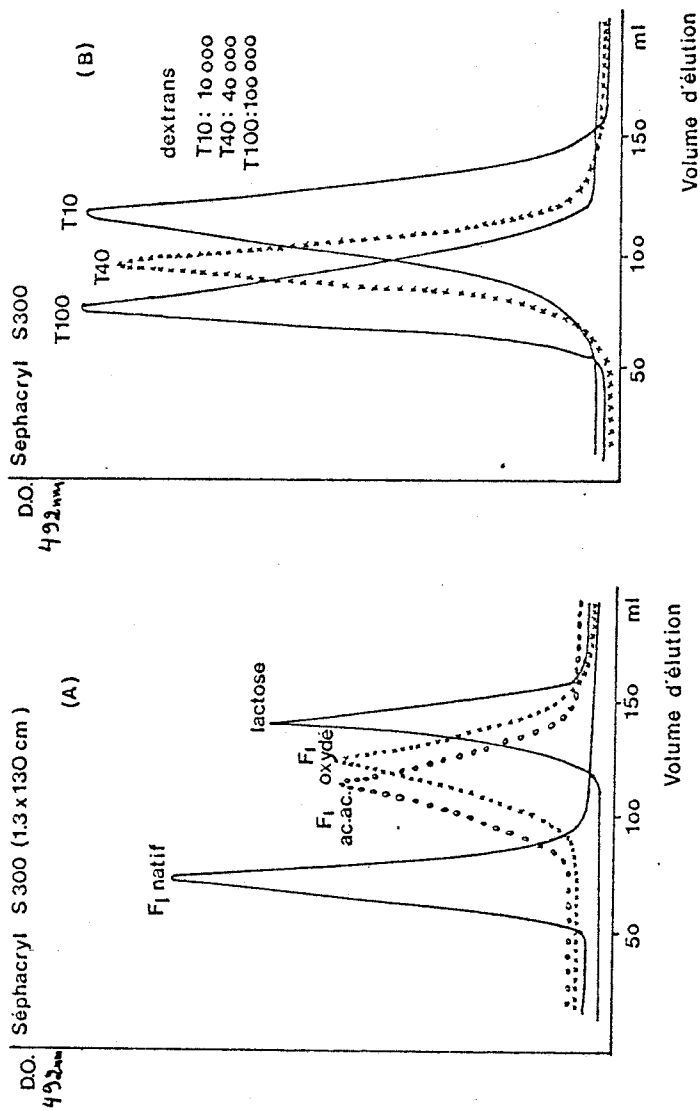


Figure 35

Diagrammes d'élution de la Sephacryl S300. ( A ) : Elution du F<sub>I</sub> natif, du polysaccharide détaché par hydrolyse partielle (F<sub>I</sub> ac.ac.). ( B ) : Etalonnage avec des dextrans.



## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de notre travail sont les suivantes:

1°. L'extrait brut (RCl292) renferme des glucides (47p100) constitués d'un pentose, l'arabinose, de trois hexoses, glucose, galactose et mannose, de deux méthyl pentoses, le fucose et le rhamnose, d'un heptose, de l'acide 2-céto-3-deoxy octulosonique et de deux osamines, la glucosamine et la fucosamine. En outre le principe actif brut renferme 33p100 de protéines caractérisées par l'absence de cystéine et d'histidine et par l'importance des acides aminés (acide aspartique et acide glutamique).

2°. Le principe actif hétérogène, fractionné par la méthode de précipitation au Cétavlon a conduit à l'obtention d'une fraction surnageante contenant l'essentiel de l'activité pharmacologique. Ce surnageant purifié par gel filtration sur Sephacryl S300 a fourni trois fractions  $F_I$ ,  $F_{II}$ ,  $F_{III}$ . La fraction  $F_I$  possède l'activité anti-inflammatoire la plus importante.

3°. La fraction  $F_I$  possède une composition glucidique simplifiée par rapport à l'extrait brut: présence de L-rhamnose, D-glucose, heptose, acide 2-céto-3-deoxy octulosonique, D-glucosamine et L-fucosamine.

La configuration des monosaccharides ( D ou L ) a été précisée après isolement de chaque monosaccharide et mesure du pouvoir rotatoire.

L'identification de l'osamine particulière (L-fucosamine) a pu être effectuée après désamination oxydative et identification du 5-deoxy-lyxose.

4°. L'application des techniques d'investigation de la séquence glucidique des polysaccharides (méthylation, oxydation périodique, acétolyse partielle, oxydation chromique) à la fraction  $F_I$  a permis d'identifier une structure de base ( fig. 32 p. 95 ) constituée de résidus d'osamines: N-acétyl glucosamine et N-acétyl fucosamine sur laquelle se branchent des

monosaccharides neutres: rhamnose et glucose.

5°. La fraction active  $F_I$  est de nature lipopolysaccharidique. En effet par hydrolyse acide partielle ( acide acétique 1p100 ) suivie d'une extraction chloroformique, nous obtenons une fraction organique constituée essentiellement d'acides gras ( 12:0, 14:0, 16:0,  $\beta$ -OH 14:0 ) et une fraction aqueuse de nature polysaccharidique de même composition en monosaccharides que la fraction  $F_I$  natif. Cette expérience nous a donc permis d'obtenir la fraction lipide A ( phase organique ) et la partie SIDE-CHAIN ( chaîne polysaccharidique ) du lipopolysaccharide, l'acide acétique coupant les liaisons de l'acide 2-céto-3-deoxy octulosonique contenu dans la région CORE de la molécule.

6°. La masse moléculaire de la fraction active  $F_I$  déterminée par ultracentrifugation analytique et par gel filtration est surévaluée ( 250 000 daltons ). En effet les produits de dégradation du  $F_I$  ( oxydation périodique, hydrolyse acide partielle par l'acide acétique 1p100 ), montrent que la SIDE-CHAIN de ce lipopolysaccharide a une masse moléculaire de 4424 daltons. La molécule totale ( SIDE-CHAIN + CORE + lipide A ) reconstituée sur la base de nos connaissances de la structure des lipopolysaccharides des Entérobactériaceae aurait une masse moléculaire de 7216 daltons.

Cette différence s'explique d'une part par la présence d'une fraction protéique ( 15p100 ) dont nous ne connaissons ni la structure ni le mode de liaison avec la fraction polysaccharidique et d'autre part par l'agrégation des sous-unités sous forme de micelles par des interactions hydrophobes et ioniques. Ce fait d'ailleurs a été démontré pour E.coli par traitement du LPS avec du désoxycholate de sodium, ce qui a réduit le coefficient de sédimentation de 73 à 0.94 S ( de 400 000 daltons à 9-20 000 daltons (McINTIRE (136)).

7°. Nous avons isolé à partir d'un extrait bactérien doué d'activité



anti-inflammatoire, une fraction active de nature lipopolysaccharidique.

Nous nous sommes particulièrement attachés dans ce mémoire à démontrer la structure de la chaîne polysaccharidique (SIDE-CHAIN). La connaissance complète de ce lipopolysaccharide nécessitera des travaux sur la structure des régions "CORE" et lipide A, ainsi que sur la nature et le mode de liaison des protéines qui sont constamment associées à cette molécule.

Enfin, il serait intéressant d'examiner les activités anti-inflammatoires comparées de la fraction  $F_I$  native et de ces produits de dégradation, afin d'établir les relations structures-activités.

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

- ADAMS, G. A., 1967, Canadian J. Biochem., 45, 422-426 ( 13 )
- ADAMS, G. A., SINGH, P. P., 1970, Biochim. Biophys. Acta, 202, 553-555 ( 31 )
- BAGDIAN, G., LUDERITZ, O., STAUB, A. M., 1966, Ann. N. Y. Acad. Sci., 133, 405- ( 81 )
- BARBER, G., STAMATESCU-EUSTATZIU, S., TULPAN, G., PETROVICI, A., 1960, J. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 4, 387- ( 48 )
- BARKER, S. A., BRIMACOMBE, J. S., HOW, M. J., STACEY, M., 1961, Nature, 189, 303-304 ( 119  
120 )
- BATES, T., 1942, Nat. Bur. Stánd. Circ. C440 US Government (117 )
- BAYARD, B., MONTREUIL, J., 1972, Carbohydr. Res., 24, 427-443 ( 134 )
- BECKMANN, I., SUBBAIAH, T. V., STOCKER, B. A. D., 1964, Nature, 201, 1299- ( 80 )
- BLACHE, D., BRUNETEAU, M., MICHEL, G., 1981, Eur. J. Biochem., 113, 563-568 ( 45 )
- BLADEN, H. A., MERGENHAGEN, S. E., 1964, J. Bacteriol., 88, 1482- (88 )
- BOIVIN, A., MESROBEANU, I., MESROBEANU, L., 1933, Compt. Rend. Soc. Biol., 114, 307-  
( 29, 90 )
- BRAY, D., ROBBINS, P. N., 1967, Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 334-339 ( 74 )
- BURTON, A. J., CARTER, H. E., 1964, Biochemistry, 3, 411-418 ( 27 )
- CIFONNELLI, J. A., REBERS, P., PERRY, M. B., JONES, J. K. N., 1966, Biochemistry, 5,  
3066-3072 ( 124 )
- DIMITRIEV, B. A., KNIREL, Y. A., KOCHETKOV, N. K., 1975, Carbohydr. Res., 40, 365-372 ( 58 )
- DISCHE, Z., 1947, J. Biol. Chem., 167, 189- ( 101 )
- DROGE, W., LEHMANN, V., LUDERITZ, O., WESTPHAL, O., 1970, Eur. J. Biochem., 14, 175-184  
( 38, 40 )
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F., 1951, Nature,  
168, 167- ( 112 )
- EIDELS, L., OSBORN, L., 1971, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 68, 1673-1677 ( 67 )
- ELSON, L. A., MORGAN, W. T. J., 1933, Biochem. J., 27, 1824- ( 104 )
- FINNE, J., KRUSIUS, T., RAUVALA, H., 1980, Carbohydr. Res., 80, 336-339 ( 131 )
- FUKASAWA, T., NIKAIDO, H., 1961, Biochim. Biophys. Acta, 48, 470-483 ( 71 )
- FUKASAWA, T., NIKAIDO, H., 1960, Virology, 11, 508-515 ( 70 )
- GALANOS, C., LUDERITZ, O., WESTPHAL, O., 1969, Eur. J. Biochem., 9, 245-249 ( 10 )

- GARDELL, S., 1953, Acta Chem. Scand., 7, 207- ( 113 )
- GARDELL, S., HEIJENSTOLD, F., OCHNORLUND, A.E., 1950, Acta Chem. Scand., 4, 970- ( 115 )
- GMEINER, J., LUDERITZ, O., WESTPHAL, O., 1969, Eur. J. Biochem., 7, 370-379 ( 30 )
- GOLDSTEIN, I.J., HAY, G.W., LEWIS, B.A., SMITH, F., 1965, Methods Carbohydr. Chem., 5, 361-370
- GOLOVTCHENKO, A.M., 1973, Thèse Pharmacie, Université de Paris-Sud ( 1 )
- GUY, T., ELSON, P., 1964, Nature, 202, 493-494 ( 125 )
- HAKOMORI, S.I., 1964, J. Biochem., 55, 205-208 ( 130 )
- HAVERKAMP, J., SPOORMAKER, T., DORLAND, L., Vliegenthart, J.F.G., SHAUER, R., 1979, J. Am. Chem. Soc., 101, 4851-4853 ( 66 )
- HIGGINBOTHAM, J.D., HEIDELBERGER, M., 1972, Carbohydr. Res., 23, 165-173 ( 122 )
- HINDENNACH, I., HENNING, U., 1975, Eur. J. Biochem., 59, 207-213 ( 7 )
- HOFFMAN, J., LINDBERG, B., SVENSSON, S., 1972, Acta Chem. Scand., 26, 661-666 ( 133 )
- HORTON, D., RODEMEYER, G., HASKELL, T.H., 1977, Carbohydr. Res., 55, 35-47 ( 127 )
- HUDSON, C.S., ISBELL, H.S., 1929, J. Am. Chem. Soc., 51, 2225- ( 120 )
- HUMPHREYS, G.O., HANCOCK, I.C., MEADOW, P.M., 1971, J. Gen. Microbiol., 71, 221- ( 64 )
- ISBELL, H.S., PIGMAN, W., 1937, J. Res. Nat. Bur. Stard., 18, 141- ( 116 )
- JANN, B., JANN, K., SCHMIDT, G., ORSKOV, F., ORSKOV, I., 1971, Eur. J. Biochem., 23, 515-522 ( 126 )
- JANN, K., WESTPHAL, O., 1975, in "The Antigens" M. Sela, ed., Vol. 3, 1-126, Academic Press, N.Y. and London ( 8, 55 )
- JANSSON, P.E., LINDBERG, B., LINDQUIST, U., 1981, Carbohydr. Res., 95, 73-80 ( 135 )
- JOHNSON, E.M., KRAUSKOPF, B., BARON, L.S., 1966, J. Bacteriol., 92, 1457- ( 83 )
- KANEGASAKI, S., WRIGHT, A., 1970, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 67, 951-958 ( 73 )
- KAUFFMAN, F., JANN, B., KRUGER, L., LUDERITZ, O., WESTPHAL, O., 1962, Zentz. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig., 186, 509- ( 52 )
- KOELTZOW, D.E., EPLEY, J.D., CONRAD, H.E., 1968, Biochemistry, 7, 2920-2928 ( 60 )
- LAMERAND, J.M., 1981, Thèse 3ème cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille ( 2, 97, 106, 107, 110, 111, 114 )

- LEHMANN, V., LUDERITZ, O., WESTPHAL, O., 1971, Eur. J. Biochem., 21, 339-347 (46, 47)
- LEIVE, L., MORRISON, D. C., 1972, Meth. in Enzymology, Vol. 28, 254-262 (12)
- LINDBERG, B., LONNGREN, J., RUDEN, U., SIMMONS, D. A. R., 1973, Eur. J. Biochem., 32,  
15-18 (57)
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J., 1951, J. Biol. Chem.,  
193, 265-275
- LUDERITZ, O., GALANOS, C., LEHMANN, V., NURMINEN, M., RIETSHEL, E. T., ROSENFELDER, G.,  
SIMON, M., WESTPHAL, O., 1973, J. of Infections Diseases, 128, 517-529 (36)
- LUDERITZ, O., JANN, K., WHEAT, R., 1968, in "Comprehensive Biochem.", 26A, 105-228,  
(Florkin, M., Stotz, E., editors) Elsevier Amsterdam, N. Y., London  
(49, 50, 51, 53, 54)
- LUDERITZ, O., WESTPHAL, O., STAUB, A. M., NIKAIDO, H., 1971, in "Microbial toxins"  
(Weinbaum, G., Kadis, S., Ajl, S. J., editors) Vol. IV, 145-233, Academic  
Press, N. Y. and London (56)
- LUDERITZ, O., STAUB, A. M., WESTPHAL, O., 1966, Bacteriol. Rev., 30, 192- (5, 16)
- LUGOWSKI, C., ROMANOWSKA, E., 1974, Eur. J. Biochem., 48, 319-323 (33)
- McINTIRE, F. C., SIEVERT, H. W., BARLOW, G. H., FINLEY, R. A., LEE, A. Y., 1967, Biochemistry  
6, 2363-2372 (25)
- MAKELA, P. H., MAKELA, O., 1966, Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., 44, 310- (84)
- MILNER, K. C., ANACKER, R. L., FUKUCHI, K., HASKINS, W. T., LANDY, M., MALMGREN, B.,  
RIBI, E., 1963, Bacteriol. Rev., 27, 352- (23)
- MONSIGNY, M., ADAM-CHOSSON, A., MONTREUIL, J., 1968, Bull. Soc. Chim. Biol., 50,  
857-865 (128)
- MUHLRADT, P., 1971, Eur. J. Biochem., 18, 20-27 (69)
- MUHLRADT, P., RISSE, H. J., LUDERITZ, O., WESTPHAL, O., 1968, Eur. J. Biochem., 4,  
139-145 (68)
- MUHLRADT, P., WRAY, V., LEHMANN, V., 1977, Eur. J. Biochem., 81, 193-203 (35, 37)
- NIAZI, S., STATE, D., 1948, Cancer Res., 8, 653- (102)
- NIKAIDO, H., NIKAIDO, K., NAKAE, T., MAKELA, P. H., 1971, J. Biol. Chem., 246, 3902-3911  
(77)

- NIKAIDO, H., 1970, Int. J. Syst. Bacteriol., 20, 383- ( 75, 78 , 87 )  
1974
- NIKAIDO, H., in "Bacterial Membranes and Walls" Vol.1, 131- (Leive, L. ed.)  
Dekker, N.Y. ( 82 )
- NIMMICH, W., KORTEN, G., 1970, Pathologia et Microbiologia, 36, 179-190 ( 60 )
- NIWA, M., MILNER, K. C., RIBI, E., RUDBACH, J. A., 1969, J. Bacteriol., 97, 1069- ( 93 )
- OLINS, . , WARNER, R. C., 1967, J. Biol. Chem., 242, 4994-5001 ( 14, 18, 21, 26, 28 )
- OSBORN, M. J., 1969, Annu. , Rev. Biochem., 38, 501- ( 42 )
- OSBORN, M. J., GANDER, J. E., PARISI, E., CARSON, J., 1972, J. Biol. chem., 247, 3962-3972  
( 86 )
- OSBORN, M. J., MUNSON, R. S., RASMUSSEN, N. S., 1978, J. Biol. Chem., 253, 1503-1511 ( 65 )
- PREHM, P., STIRM, S., JANN, B., JANN, K., 1975, Eur. J. Biochem., 56, 41-55 ( 39, 41, 43, 44 )
- PREIS, . , 1964, J. Biol. Chem., 239, 3127-3132 ( 118 )
- RIBI, E., ANACKER, R. L., BROWN, R., HASKINS, W. T., MALMGREN, B., MILNER, K. C., RUDBACH, J. A.  
1966, J. Bacteriol., 92, 1493- ( 17, 20 )
- RIBI, E., ANACKER, R. L., FUKUSHI, K., HASKINS, W. T., LANDY, M., MILNER, K. C., 1964,  
in "Bacterial Endotoxins" (Landy, M., Braun, W., editors ) 16-28,  
Rutgers Univ. Press, New Brunswick, New Jersey ( 95 )
- RIBI, E., HASKIN, W. T., MILNER, K. C., ANACKER, R. C., RITTER, D. B., GOODE, G., TRAPANI, R. J.  
LANDY, M., 1962, J. Bacteriol., 84, 803- ( 92 )
- RIETSCHER, E. T., GOTTERT, H., LUDERITZ, O., WESTPHAL, O., 1972, Eur. J. Biochem., 28,  
166-173 ( 32 )
- RIMINGTON, G., 1931, Biochem. J., 25, 1062- ( 100 )
- ROANTREE, R. J., KUO, T., MCPHEE, D. G., STOCKER, B. A. D., 1969, Bacteriol. Proc., p79 (85 )
- ROBBINS, P. N., KELLER, J. M., WRIGHT, A., BERNSTEIN, R. L., 1965, J. Biol. Chem., 240,  
384- 390 ( 79 )
- ROONEY, S. A., GOLDFINH, H., SWEELY, C. C., 1972, Biochim. Biophys. Acta, 270, 289-295 (34)
- ROTHFIELD, L., TAKESHITA, M., PEARLMAN, M., HORNE, R. W., 1966, Federation Proc., 25,  
1495- ( 24 )
- RUFF, O., 1898, Ber., 31, 1573- ( 121 )
- SAMUELSSON, K., LINDBERG, B., BRUBAKER, R. R., 1974, J. Bacteriol., 117, 1010-1016 (63)

- SCOTT, J.E., 1965, Methods in Carbohydr. Chem., V, 38-44 (108,109 )
- SHANDS, J.W., 1965, J. Bacteriol., 90, 266- ( 89 )
- SHANDS, J.W., 1971, in "Microbial Toxins", Vol. IV, 127-144 (Weinbaum, G., Kadis, S.,  
Ajl, S.J., editors ), Academic Press, N.Y., London ( 3 )
- SHANDS, J.W., GRAHAM, J.A., NATH, K., 1967, J. Mol. Biol., 25, 15- 21 ( 19 )
- STAUB, A.M., 1965, Methods in Carbohydr. Chem., V, 92-93 ( 11 )
- TAL, C., GOEBEL, W.F., 1950, J. Exptl. Med. 92, 25- ( 91 )
- TARCSAY, L., WANG, C.S., LI, S.C., ALAUPOVIC, P., 1973, Biochemistry, 12, 1948-1955 ( 62 )
- TILLMANS, J., PHILIPPI, K., 1929, Biochem. Z., 214, 36- ( 99 )
- TRIPODI, D., NOWOTNY, A., 1966, Ann. N.Y. Acad. Sci., 133, 604- ( 94 )
- WANG, C.S., ALAUPOVIC, P., 1973, Biochemistry, 12, 309-315 ( 61 )
- WATSON, D.W., KIM, Y., 1964, in "Bacterial Endotoxins" (Landy, M., Braun, W., editors )  
522-536 , Rutgers Univ. Press, New Brunswick, New Jersey ( 96 )
- WERNER, I., ODIN, L., 1952, Acad. Soc. Med. Upsaliensis, 57, 230- ( 103 )
- WESTPHAL, O., JANN, K., 1965, Methods in Carbohydr. Chem., V, 83-91 ( 9,15 )
- WESTPHAL, O., LUDERITZ, O., 1954, Angew. Chem., 66, 407- ( 4 )
- WILKINSON, S.G., 1977, in "Surface Carbohydrates of the procaryotic Cell "  
( Sutherland, I.W. editor ) 97-175, Academic Press, N.Y. and London (22)
- WRIGHT, A., 1971, J. Bacteriol., 105, 927- ( 76 )
- WRIGHT, A., DANKERT, M., ROBBINS, P.N., 1965, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 54, 228- ( 72 )
- ZANETTA, J.P., BRECKENRIDGE, W.C., VINCENDON, G., 1972, J. Chromatogr., 69, 291-304  
(105,129 )

