

CONFIDENTIEL JUSQU'EN
2003

THESE

présentée à

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRE ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

par

Marc FRENOY

**ETUDES DES PROPRIETES BIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES
D'UN PRINCIPE ACTIF D'ORIGINE BACTERIENNE DOTE DE
PROPRIETES IMMUNOMODULATRICES**

Présentée le 08 novembre 1993 devant la Commission d'Examen

Président : Pr. VERBERT

Rapporteurs : Pr. DIVIES
Pr. GUENOUNOU

Examineurs : Pr. ROUSSEL
Dr. MAZZA

**Que le matin se lève
Sur un tout nouveau monde comme on l'imagine
Laissez passer les rêves**

à tous ceux que j'aime,

Je remercie vivement :

le Professeur FOURNET, Monsieur HOFFELT, Monsieur LEDUC et le Professeur VERBERT de m'avoir confié ce travail, accueilli dans leurs laboratoires et encouragé tout au long de ce travail.

Je remercie :

Monsieur le Professeur C. DIVIES,

Monsieur le Professeur M. GUENOUNOU,

Monsieur le Docteur M. MAZZA,

Monsieur le Professeur Ph. ROUSSEL

et Monsieur le Professeur A. VERBERT d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie :

Monsieur MAZZA, Directeur du Département d'Analyses des Laboratoires CASSENNE, Madame MANDRAY, Chef du laboratoire Contrôle Biologique des Laboratoires CASSENNE de m'avoir laissé la possibilité de poursuivre ce travail.

Je remercie :

Anne-Marie, Christelle, Christine, Danièle, François, Françoise, Geneviève, Joëlle, Lucette, Madeleine, Odile, Thérèse, Yvette, qui par leur sympathie et leur gentillesse ont aussi contribué à ce travail.

Ce travail est dédié au Professeur Bernard FOURNET

Sommaire

I - Objet de l'étude	p. 18
II - Introduction	p. 20
III - Synthèse Bibliographique	p. 23
III-I) La réaction immunitaire	p. 24
<u>A) Les cellules phagocytaires</u>	p. 24
1) Polynucléaires	p. 24
1-1) Polynucléaires neutrophiles	
1-2) Basophiles	
1-3) Eosinophiles	
2) Lignée monocyte macrophage	p. 27
<u>B) Lymphocytes</u>	p. 28
1) Lymphocytes B	p. 29
2) Lymphocytes T	p. 31
3) Autres lymphocytes	p. 34
3-1) Cellules tueuses naturelles (NK)	
3-2) Cellules tueuses activées par des lymphokines (LAK)	
<u>C) Complément</u>	p. 35
<u>D) Régulation de la réponse immunitaire</u>	p. 36
III-II) Les immunomodulateurs	p. 39
<u>A) Immunomodulateurs isolés de micro-organismes</u>	p. 39
1) Immunomodulateurs isolés de mycobactéries	p. 39
1-1) Le bacille de Calmette Guérin (BCG)	
1-2) Le MER (méthanol-extract-residu)	

1-3) Motifs structuraux des mycobactéries possédant une activité immunomodulatrice	
2) Autres micro-organismes	p. 42
2-1) <i>Corynebacterium parvum</i>	
2-2) Dérivés de <i>Nocardia</i>	
2-3) Composés de la paroi des staphylocoques	
2-4) Composés des Streptocoques	
2-5) <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
2-6) <i>Bordetella pertussis</i>	
2-7) <i>Brucella abortus</i>	
2-8) Les lipopolysaccharides	
2-9) La bestatine	
2-10) Autres préparations bactériennes	
2-11) Polysaccharides	
2-12) Immunosuppresseurs	
<u>B) Hormones thymiques et immunomodulateurs synthétiques</u>	p. 50
1) Hormones thymiques	p. 50
2) Diéthylthiocarbamate	p. 51
3) Lévamisole	p. 52
4) Isoprinosine®	p. 52
5) NPT 15392	p. 53
6) Azimexon	p. 53
7) Tufsine	p. 53
<u>C) Autres immunomodulateurs</u>	p. 54
1) Immunomodulateurs d'origine leucocytaire	p. 54
1-1) Interleukine (IL) 1, 5, 6	
1-2) Facteurs stimulant les colonies (CSF)	
1-3) Interleukine 4 (IL-4)	
1-4) Interleukine 2 (IL-2)	
1-5) Interférons	
1-6) Facteurs de nécrose tumorale (TNF)	
2) Les inhibiteurs biologiques	p. 63

- 2-1) Anticorps monoclonaux
- 2-2) Récepteurs solubles et antagonistes

III-III) RU 41740 p. 67

A) Fabrication, structure et distribution du RU 41710 p. 67

- 1) Process de fabrication p. 67
- 2) Structure du principe actif p. 68
 - 2-1) La fraction P1
 - 2-2) La fraction F1
- 3) Pharmacocinétique du RU 41740 p. 70

B) Immunopharmacologie expérimentale du RU 41740 p. 70

- 1) Les cellules phagocytaires p. 70
 - 1-1) Les polynucléaires (PMN)
 - 1-2) Les monocytes macrophages
- 2) Les lymphocytes p. 73
 - 2-1) Les lymphocytes B
 - 2-2) Les lymphocytes T
 - 2-3) Les cellules NK
- 3) Production de cytokines p. 75
 - 3-1) Production d'interleukine 1
 - 3-2) Production de facteur de nécrose tumorale (TNF)
 - 3-3) Production de facteur stimulant les colonies (CSF)
 - 3-4) Production de prostaglandines
- 4) Action aux cours d'infections expérimentales p. 77

C) Essais thérapeutiques chez l'homme p. 78

D) Tolérance et toxicité p. 79

E) Activités des sous-fractions du RU 41740 p. 79

IV - Matériel et Méthodes	p. 82
IV-I) Etudes réalisées sur l'automate de microbiologie Malthus 2000	p. 83
<u>A) Matériel</u>	p. 83
1) Matériel biologique	p. 83
1-1) Micro-organismes	
1-2) Animaux	
2) Matériel impédimétrique	p. 84
2-1) Description générale de l'appareil	
2-1-1) Cellules	
2-1-2) Incubateur	
2-2) Traitement des données	
<u>B) Milieux de culture et solutions</u>	p. 87
1) Composition et préparation des milieux	p. 87
1-1) Milieux gélosés	
1-2) Milieux liquides	
2) Autres réactifs	p. 90
<u>C) Méthodes</u>	p. 90
1) Méthodes communes aux tests épuration bactérienne et suivi de l'activité d'un sérum anti RU 41740	p. 90
1-1) Traitement des animaux	
1-2) Droite de corrélation	
2) Test d'épuration bactérienne	p. 91
2-1) Principe	
2-2) Test d'épuration de particules de carbone	
3) Suivi de l'activité d'un sérum anti RU 41740 par conductance-métrie	p. 93
3-1) Principe	
3-2) Electrosynérèse	

3-3) Décomplémentation du sérum

3-4) Immunonéphélométrie

IV-II) Autres études p. 97

A) Dosages colorimétriques des constituants du RU 41740 p. 97

1) Dosage des monosaccharides du RU 41740 p. 97

1-1) Protocoles

1-2) Calculs

2) Dosage des protéines du RU 41740 p. 99

2-1) Préparation des solutions

2-2) Dosage

2-3) Calculs

B) Dosage des monosaccharides du RU 41740 par Chromatographie Liquide Haute Performance

(CLHP) p. 100

1) Matériel p. 100

2) Méthode de calcul p. 100

3) Analyse du principe actif RU 41740 après hydrolyse acide p. 101

4) Analyse du principe actif RU 41740 après méthanolyse p. 102

4-1) Principe

4-2) Analyse statistique

C) Dosage des monosaccharides du RU 41740 par chromatographie en phase gazeuse p. 103

V - Résultats et Discussion p. 104

V-I) Travaux utilisant l'automate de microbiologie Malthus 2000 p. 105

A) Test d'épuration bactérienne p. 105

1) Présentation du test p. 105

1-1) Présentation du Malthus

1-2) Mise au point du protocole expérimental	
1-2-1) Mesure de conductance dans le sang	
1-2-2) Cinétique d'épuration	
1-3) Présentation du protocole définitif	
1-4) Exemple	
2) Validation de la méthode	p. 114
2-1) Réalisation et analyse de la droite de corrélation	
2-2) Validation de l'automate Malthus	
2-3) Fidélité de la méthode	
2-3-1) Etude de répétabilité	
2-3-2) Etude de reproductibilité	
2-4) Recherche d'une activité dépendante de la dose	
3) Transposition en test de routine	p. 121
3-1) Choix du mode d'expression des résultats	
3-2) Définition de la norme	
4) Activités stimulatrices d'autres immunomodulateurs	p. 125
4-1) Muramyl dipeptide (MDP)	
4-2) Stimugène®	
5) Conclusion	p. 127
<u>B) Suivi de l'activité d'un sérum anti RU 41740 sur la croissance de <i>K. pneumoniae</i></u>	p. 129
1) Premiers travaux	p. 130
1-1) Recherche d'un milieu de culture permettant la détection de la croissance de <i>K. pneumoniae</i> par conductance-métrie.	
1-2) Etude de la cinétique de <i>K. pneumoniae</i> dans le sang de souris.	
1-3) Effet d'un sérum anti RU 41740 sur le croissance de <i>K. pneumoniae</i>	
2) Optimisation du test	p. 135
2-1) Dose et voie d'administration du RU 41740	
2-2) Rapport concentration en germes et suspension bactérienne	
2-3) Protocole définitif	
3) Signification du test	p. 139
3-1) Signification des résultats	

3-2) Parallèle boîtes de Petri	
3-3) Présence d'anticorps anti RU 41740 et rôle du complément	
3-4) Etude de lots de faible activité	
4) Activité d'un sérum anti RU 41740 sur la croissance d'autres germes	p. 146
4-1) Recherche des différents milieux de culture	
4-1-1) Conductance indirecte	
4-1-2) Conductance directe	
4-2) Recherche des droites de corrélation	
4-3) Activité antibactérienne suivie par conductance-métrie	
5) Conclusion	p. 152
V-II) Autres études	p. 154
<u>A) Analyse de la composition du RU 41740</u>	p. 154
1) Dosages colorimétriques	p. 154
2) Analyse par chromatographie en phase gazeuse	p. 155
3) Analyse par chromatographie liquide haute performance	p. 156
3-1) Analyse des monosaccharides du RU 41740 après hydrolyse acide	
3-1-1) Travaux sur Aminex HPX 87H	
3-1-1-1) Séparation des monosaccharides du RU 41740	
3-1-1-2) Choix de l'étalon interne	
3-1-1-3) Temps d'hydrolyse	
3-1-1-4) Analyse des monosaccharides du RU 41740	
3-1-2) Travaux sur Aminex HPX 87P	
3-1-2-1) Séparation des monosaccharides du RU 41740	
3-1-2-2) Analyse des monosaccharides du RU 41740	
3-2) Analyse des monosaccharides du RU 41740 après méthanolyse	
3-2-1) Séparation des monosaccharides du RU 41740	
3-2-2) Essais	
3-2-3) Validation de la technique	
3-2-3-1) Linéarité	
3-2-3-2) Détermination des seuils de détection et de quantification	

- 3-2-3-3) Fidélité de la méthode
 - 3-2-3-3-1) Répétabilité
 - 3-2-3-3-2) Reproductibilité

4) Conclusion p. 173

B) Etude d'autres immunomodulateurs p. 176

1) Galactanne p. 176

2) RU 41740 nouvelle lyse p. 178

2-1) Etude de trois nouvelles lyses

2-2) Etude de la lyse lysozyme

VI - Conclusion p. 185

VII - Références Bibliographiques p. 188

VIII - Annexe p. 203

Liste des Abréviations

Cellules NK	Cellules tueuses naturelles
Cellules LAK	Cellules tueuses activées par des lymphokines
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CSF	Facteur de stimulation des colonies
DO	Densité optique
fMLP	N-formylmethionyl-leucyl-phénylalanine
Gal	Galactose
G-CSF	Facteur de stimulation des colonies granulocytaires
Glc	Glucose
GlcUA	Acide glucuronique
GM-CSF	Facteur de stimulation des colonies granulocytaires et macrophagiques
IL	Interleukine
IMN	Immunonéphélométrie
INF	Interféron
LGL	Lymphocyte granulaire large
LPS	Lipopolysaccharide
M-CSF	Facteur de stimulation des colonies macrophagiques
MDP	Muramyl dipeptide
PMA	Phorbol myristate acétate
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
TNF	Facteur de nécrose tumorale

I - Objet de l'étude

L'étude a été effectuée dans le cadre d'une convention industrielle de formation par la recherche (CIFRE) entre les Laboratoires CASSENNE et le Laboratoire de Chimie Biologique de Monsieur le professeur FOURNET de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE FLANDRES ARTOIS.

Elle avait pour objectif la mise au point de méthodes analytiques et biologiques applicables au développement de molécules d'origine biotechnologique possédant des propriétés immunomodulatrices.

Les travaux se sont intéressés à un complexe glycoprotéique extrait de *Klebsiella pneumoniae*, le RU 41740, commercialisé sous le nom Biostim.

Nous développons tout d'abord deux tests permettant la mise en évidence des propriétés biologiques de ce composé. Le premier étudie les propriétés de stimulation du RU 41740 sur la phagocytose, le second, les propriétés antibactériennes de sérum de souris traitées par le RU 41740.

Ces deux études utilisent un automate de microbiologie et participent au développement de la conductance-métrie dans l'industrie pharmaceutique.

Dans un second temps, nous étudions la structure du principe actif en recherchant une méthodologie permettant le dosage de sa fraction glucidique.

Ces trois méthodes sont appliquées à l'étude d'immunomodulateurs actuellement commercialisés ou en développement au sein des Laboratoires Cassenne.

II - Introduction

Les cellules et les molécules du système immunitaire constituent un réseau de défense qui protègent l'organisme contre les agents pathogènes. Lorsque ces derniers pénètrent dans le corps, elles les détectent et se mobilisent pour les éliminer. Elles possèdent, en plus, la faculté de les mémoriser et combattent ainsi plus efficacement les infections ultérieures.

Les laboratoires pharmaceutiques mettent à la disposition des cliniciens des composés capables de modifier cette réponse immunitaire. Appelés généralement immunomodulateurs ou modificateurs de la réponse biologique, ils se décomposent en deux grandes familles :

- les immunostimulants qui potentialisent et restaurent les capacités du système immunitaire pour lutter plus efficacement contre des agents invasifs qu'ils soient externes comme les micro-organismes ou internes comme les cellules cancéreuses,
- les immunosuppresseurs qui diminuent les réponses immunitaires quand elles sont préjudiciables à l'organisme (rejet de greffe).

Les potentialités thérapeutiques des immunomodulateurs concernent le cancer, les maladies infectieuses, auto-immunes, inflammatoires, allergiques et les greffes d'organes.

Parmi les immunomodulateurs actuellement commercialisés, citons :

- Lantigen et Biostim (Laboratoires CASSENNE), Ribomunyl (Laboratoires INAVA, Pierre Fabre médicament) et Imocur (Laboratoires FOURNIER). Ils sont principalement utilisés pour combattre les infections récidivantes des voies aériennes.
- Sandimmun (Laboratoires SANDOZ). Cette ciclosporine A est prescrite dans les transplantations d'organes pour éviter les phénomènes de rejet.

Grâce au développement du génie génétique, des immunomodulateurs de nouvelle génération sont désormais à la disposition des cliniciens. Ce sont de petites molécules médiateurs de la communication cellulaire : les cytokines. Deux interférons alpha avec Intron A (SCHERING PLOUGH) et Roféron A (ROCHE), une interleukine 2 avec Proleukin (EUROCETUS France) et un facteur de stimulation de colonies granulocytaires (G-CSF) avec Neupogen (ROCHE) sont déjà commercialisés. Ces composés sont surtout utilisés dans la lutte contre le cancer.

Pour que la réponse immunitaire soit optimale, les cellules qui participent à la lutte contre l'agent étranger communiquent entre elles. Cette communication fait du système immunitaire un réseau complexe où la stimulation d'un type cellulaire entraîne, par libération de cytokines, des réactions en cascade qui mobilisent l'ensemble des défenses de l'organisme. En conséquence, les immunomodulateurs qui modifient la réponse immunitaire, doivent être utilisés avec prudence, sous peine de perturber le système dans son ensemble.

Une meilleure connaissance du système immunitaire, de la structure des immunomodulateurs et de leurs points d'impacts est indispensable à l'élaboration de composés mieux définis qui permettront de répondre plus précisément et efficacement aux multiples désordres immunologiques à traiter.

III - Synthèse Bibliographique

III-I) La réaction immunitaire

Pour se défendre contre les agents envahisseurs, le système immunitaire a à sa disposition un arsenal composé d'éléments spécifiques et d'éléments non spécifiques. Parmi ces derniers, on trouve les granulocytes, les macrophages, les monocytes et plus généralement les cellules présentatrices d'antigènes. Les lymphocytes représentent le système spécifique. Ils se répartissent en deux catégories : les lymphocytes B et les lymphocytes T. Des cellules agissant sans spécificité particulière pour l'antigène sont décrites comme appartenant à la lignée lymphocytaire. Ce sont les cellules tueuses naturelles (NK), les lymphocytes granulaires larges (LGL), les cellules tueuses activées par des lymphokines (LAK).

Dans cette première partie, nous nous attacherons à décrire brièvement les cellules et les mécanismes de la réponse immunitaire (Roitt et Delves, 1992).

A) Les cellules phagocytaires

Les cellules phagocytaires sont définies par leur aptitude à ingérer et à digérer des particules vivantes ou inertes. Elles comprennent essentiellement les polynucléaires, les monocytes et les macrophages.

1) Polynucléaires

Les polynucléaires sont divisés en trois catégories selon la teinte de leurs granulations : les polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles. Ils jouent un rôle essentiel dans l'immunité non spécifique, par phagocytose.

1-1) Polynucléaires neutrophiles

Les neutrophiles sont matures dans la moëlle osseuse en deux semaines environ. Ils se différencient à partir de myéloblastes donnant naissance à des promyélocytes puis aux myélocytes. Les granules se forment au stade promyélocyte. On distingue deux types de granules : les granules azurophiles et les granules spécifiques des neutrophiles. La

myéloperoxydase et la lactotransferrine sont considérées comme respectivement de bons marqueurs des granules azurophiles et des granules spécifiques. Dans des conditions normales, les neutrophiles sont libérés dans la circulation sanguine deux jours après leur maturation complète. Ils restent dans la circulation pendant 6 à 10 heures puis migrent dans les tissus.

Les neutrophiles sont sensibles aux facteurs chimiotactiques produits dans la région enflammée. Les composés produits lors de la réaction inflammatoire, par exemple l'interleukine 1 (IL-1) et le facteur de nécrose tumorale (TNF) font augmenter les molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales et favorisent l'adhérence des neutrophiles. Des patients qui présentent une défectuosité dans ce processus d'appel et d'adhérence sont plus sensibles aux infections et présentent une réponse à l'inflammation lente.

Les neutrophiles sont spécialisés dans l'ingestion et la destruction d'un grand nombre de micro-organismes. Ils peuvent ingérer des particules après opsonisation par des anticorps spécifiques ou par des éléments du complément. La liaison opsonine-récepteur provoque deux événements cellulaires : la production de radicaux oxygénés et la dégranulation.

La génération de radicaux oxygénés est assurée par l'activation de la NADPH oxydase. C'est une enzyme complexe composée de six protéines dont trois membranaires et trois cytosoliques à l'état quiescent. Lors de l'activation des neutrophiles, les trois protéines du cytoplasme sont incorporées aux protéines membranaires pour former un complexe actif qui peut synthétiser des superoxydes. Ces derniers se décomposent spontanément en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui, sous l'action de la myéloperoxydase, réagit avec les ions chlores pour former l'acide hypochloreux (HOCl). L'acide hypochloreux est un agent antimicrobien puissant mais de durée de vie très courte. Il réagit avec des amines primaires et secondaires ($R-NH_2$ et R_1-NH-R_2) pour donner naissance à des chloramines, agents antimicrobiens stables.

La dégranulation est un autre moyen de défense contre l'agent étranger. Les constituants des granules sont libérés. Les granules azurophiles contiennent, entre autre, des hydrolases acides de faibles pH optimum, de la myéloperoxydase, des petits peptides qui présentent des activités bactéricides et des protéines BPI (bactericidal permeability-increasing protein) présentant de véritables propriétés antibiotiques pour les bactéries

Gram négatives. Le lysosyme, enzyme qui hydrolyse le peptidoglycane des bactéries Gram positives, est présent dans les granules azurophiles mais aussi dans les granules spécifiques des neutrophiles. Dans ces granules spécifiques, on trouve la lactotransferrine et la protéine liant la vitamine B₁₂.

L'activité antimicrobienne des neutrophiles est essentielle dans la lutte anti-infectieuse. Des patients présentant une déficience dans l'activité de la NADPH oxydase sont incapables de synthétiser des superoxydes. Ces sujets atteints de granulomatose septique chronique souffrent très tôt d'infections. Il en est de même pour les patients qui présentent le syndrome de Chediak-Higashi. Ils possèdent des granules géants moins mobiles qui ne relarguent pas leurs contenus lors de la phagocytose.

Les neutrophiles jouent également un rôle important dans la réaction inflammatoire en éliminant les micro-organismes, les cellules âgées ou endommagées mais aussi en sécrétant des agents inflammatoires comme les leucotriènes, les cytokines ou des médiateurs lipidiques.

Quand l'agent infectieux qui a provoqué l'intervention des neutrophiles est éliminé et que les facteurs chimiotactiques ne sont plus produits, l'invasion des neutrophiles s'arrête et la réparation tissulaire peut intervenir. Si l'infiltration perdure comme dans le cas d'une inflammation chronique, les dommages cellulaires se poursuivent.

1-2) Basophiles

Ce sont les cellules effectrices de l'hypersensibilité immédiate. Elles se différencient dans la moëlle osseuse et possèdent un noyau plurilobé et un cytoplasme granulaire. Cellules circulantes d'une durée de vie inférieure à deux semaines, elles représentent moins de 1 % des leucocytes. Les granules contiennent de l'histamine, des enzymes protéolytiques et des médiateurs inflammatoires. Les basophiles expriment, à leurs surfaces, des récepteurs de haute affinité pour les IgE. L'union entre l'allergène et l'IgE est le principal facteur déclenchant la dégranulation.

1-3) Eosinophiles

Le noyau des éosinophiles est segmenté et le cytoplasme est rempli de granules qui renferment des protéines cationiques responsables de la liaison avec les colorants acides comme l'éosine. La membrane porte des récepteurs pour des éléments du complément,

pour le fragment Fc des immunoglobulines, pour le facteur stimulant les colonies granulocytaires et macrophagiques (GM-CSF), l'IL-3, l'IL-5, le TNF et d'autres cytokines.

La stimulation des éosinophiles provoque la libération du contenu des granules sécrétoires, l'explosion oxydative et la libération de composés lipidiques pharmacologiquement actifs. L'explosion oxydative est comme chez les autres granulocytes accompagnée de production de radicaux oxygénés agressifs.

Ils sont capables de phagocyter des micro-organismes mais généralement leur capacité est plus faible que celle des autres phagocytes. Par contre, la libération de composés toxiques contre des particules non phagocytées est de grande importance. Par ce mécanisme, ils sont capables de détruire des parasites.

Les éosinophiles interviennent surtout dans les réactions inflammatoires qui accompagnent les phénomènes allergiques et anaphylactiques ainsi que dans certaines affections parasitaires.

2) Lignée monocyte macrophage

Les monocytes, cellules phagocytaires circulantes, produits dans la moëlle osseuse, donnent naissance aux macrophages après leur sortie des vaisseaux par diapédèse. Ces deux types cellulaires et les cellules qui leur donnent naissance constituent le système phagocytaire mononucléé. Les monocytes sanguins entrent dans les tissus et plusieurs cycles de division cellulaire seraient nécessaires pour l'obtention de macrophages matures.

La phagocytose de particules étrangères est la fonction principale de ce système phagocytaire mononucléé. A la surface de ces cellules s'expriment des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines, pour des éléments du complément et des récepteurs lectiniques qui sont essentiels lors de la phase d'ingestion. Ensuite, la particule est internalisée formant un phagosome qui fusionnera avec un lysosome. La particule est alors digérée. Les différentes étapes d'un processus de phagocytose sont repris dans la figure 1.

Les cellules de ce système phagocytaire représentent également une source de substances biologiquement actives. Ils produisent des enzymes (élastase, collagénase, hydrolases acides lysosomiales), des inhibiteurs d'enzymes (α 2 macroglobuline,

$\alpha 1$ antitrypsine), des dérivés de l'acide arachidonique (prostaglandines, thromboxane) et des protéines plasmatiques (composants du complément, facteurs de coagulation, fibronectine). Ils régulent la fonction d'autres types cellulaires en produisant des interleukines, le TNF, le GM-CSF et l'interféron (INF) α et β .

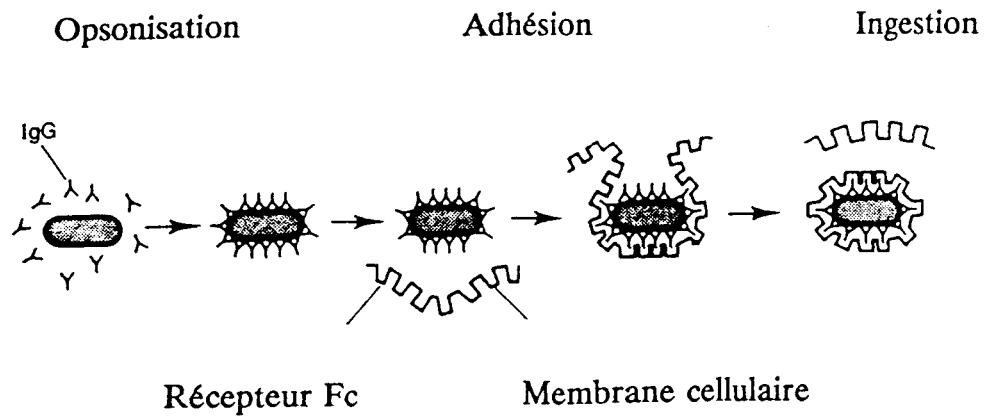


Figure 1. Différentes étapes de la phagocytose.

B) Lymphocytes

Les réponses immunitaires, pour cette lignée, sont caractérisées par leur spécificité pour l'antigène qui les a induite. Cette spécificité est complètement assurée par les cellules lymphoïdes dont on distingue deux familles principales : les lymphocytes T responsables de l'immunité cellulaire dont la maturation dépend du thymus et les lymphocytes B responsables de l'immunité humorale qui se différencient en dehors du thymus, dans la bourse de Fabricius chez les oiseaux et dans la moëlle osseuse chez les mammifères.

Parmi les lymphocytes, on distingue aussi les cellules NK, les cellules LAK et les lymphocytes granulaires larges.

1) Lymphocytes B

Ces cellules participent à la réponse humorale par la synthèse d'immunoglobulines. Elles représentent 2 à 5 % des cellules nucléées du sang et elles sont aussi localisées dans les organes lymphoïdes comme les ganglions lymphatiques, la rate, les amygdales et les plaques de Peyer.

Les lymphocytes B exposent à leur surface des immunoglobulines. Ce sont des récepteurs antigéniques et chaque lymphocyte B porte un type d'immunoglobuline reconnaissant un seul antigène. Quand il y a liaison antigène-immunoglobuline, les cellules B se transforment en cellules productrices d'anticorps appelées plasmocytes et en cellules mémoires. Ces dernières améliorent l'efficacité de la réponse immunitaire lors d'une seconde stimulation par le même antigène.

La synthèse des immunoglobulines est un phénomène complexe. L'organisme, pour répondre spécifiquement à toutes les stimulations antigéniques, doit être capable de produire un grand nombre d'immunoglobulines. Ce sont des réarrangements à l'intérieur des gènes d'immunoglobulines qui permettent d'obtenir cette diversité d'anticorps. Ces anticorps sont des glycoprotéines en forme de Y (Figure 2). Il en existe différentes classes.

Les IgM sont pentamériques. Elles sont produites lors de la première exposition à un antigène.

Les IgG sont produites plus tardivement et représentent les anticorps les plus nombreux dans le plasma.

Les IgA sont des anticorps sécrétoires que l'on retrouve dans la salive, les larmes, le mucus. Immunoglobulines dimériques, elles protègent les épithéliums contre l'invasion des micro-organismes.

De faibles quantités d'IgE sont dénombrées dans le plasma. Elles interviennent dans la réaction avec l'allergène et déclenchent l'inflammation. Elles sont produites lors des infections parasitaires.

Les IgD sont très peu nombreuses et leurs fonctions ne sont pas claires.

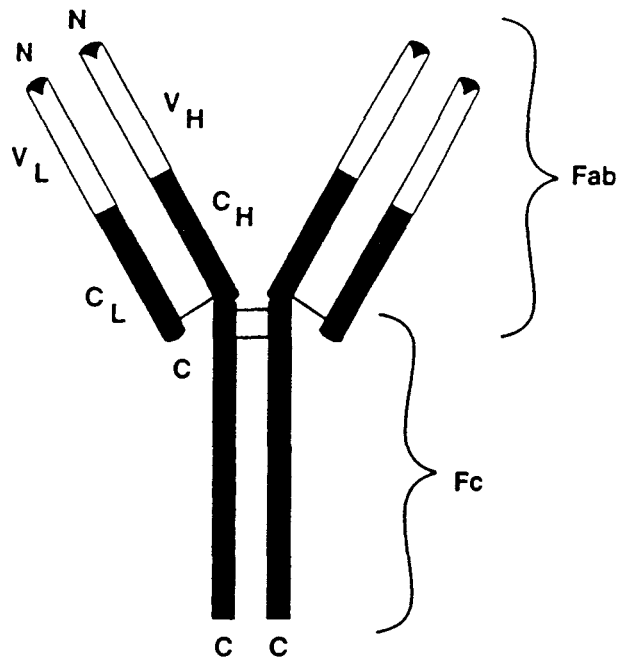


Figure 2. Structure d'une immunoglobuline de type G montrant les régions variables (V_H et V_L) et les régions constantes (C_H et C_L) des chaînes lourdes (H) et légères (L), les extrémités C et N terminales. Le fragment Fab se lie à l'antigène.

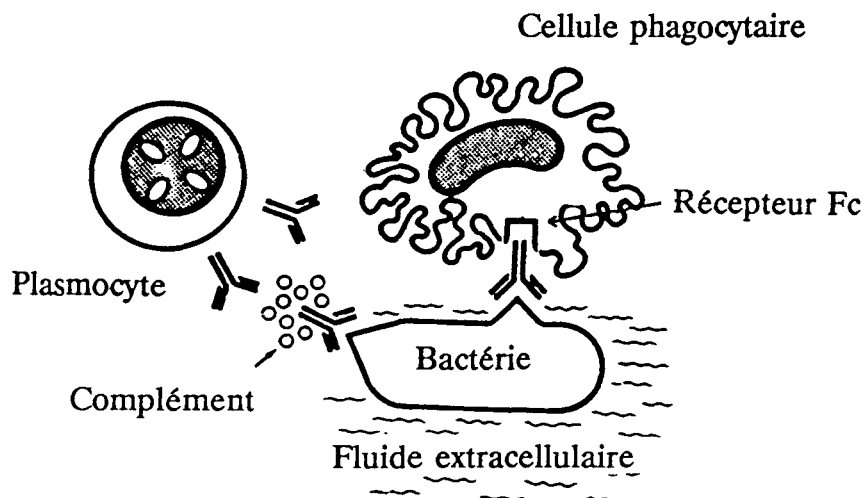


Figure 3. Immunité contre un agent pathogène extracellulaire (bactérie). Intervention de l'immunité humorale.

La réponse humorale aboutit à la destruction de l'agent invasif grâce à l'activité combinée des anticorps et du complément. Un schéma de réponse humorale est présenté figure 3.

La production d'anticorps peut être déclenchée avec ou sans intervention des cellules T. Elle est dite respectivement T-dépendante et T-indépendante. Les antigènes T-indépendants sont généralement des molécules polymériques avec des déterminants antigéniques répétés. La reconnaissance des antigènes T-dépendants doit s'effectuer à la fois par les cellules B et T. Le mécanisme de collaboration entre ces deux types cellulaires est présenté figure 4. Le lymphocyte B modifie l'antigène et le peptide antigénique résultant, combiné à des éléments du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, est présenté aux récepteurs des cellules T. Activés, ces derniers délivrent des signaux qui induisent, entre autre, la prolifération et la différenciation des cellules B.

Dans la réponse immunitaire indépendante des cellules T, les anticorps produits appartiennent principalement à la classe des IgM. Dans la réponse T-dépendante, les IgM produites sont rapidement remplacées par d'autres familles d'immunoglobulines : IgG, IgA ou IgE. Ce mécanisme appelé effet switch est induit par des facteurs sécrétés par les lymphocytes T.

Le fonctionnement de l'immunité humorale est parfois perturbé. Si la tolérance immunologique, phénomène qui empêche les lymphocytes de réagir contre les antigènes du soi est perturbée, des anticorps sont produits contre des éléments de notre propre organisme. On parle alors de maladies auto-immunes.

2) Lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des cellules qui reconnaissent l'antigène lorsqu'il est présenté au sein de protéines appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité. Les lymphocytes T se divisent en quatre sous-classes : les lymphocytes T helper, les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes T suppresseurs et les cellules T de l'hypersensibilité retardée. Ces classes expriment différemment des molécules de surface CD4 et CD8 (CD pour Cluster of Differentiation) qui appartiennent à la "super" famille des immunoglobulines.

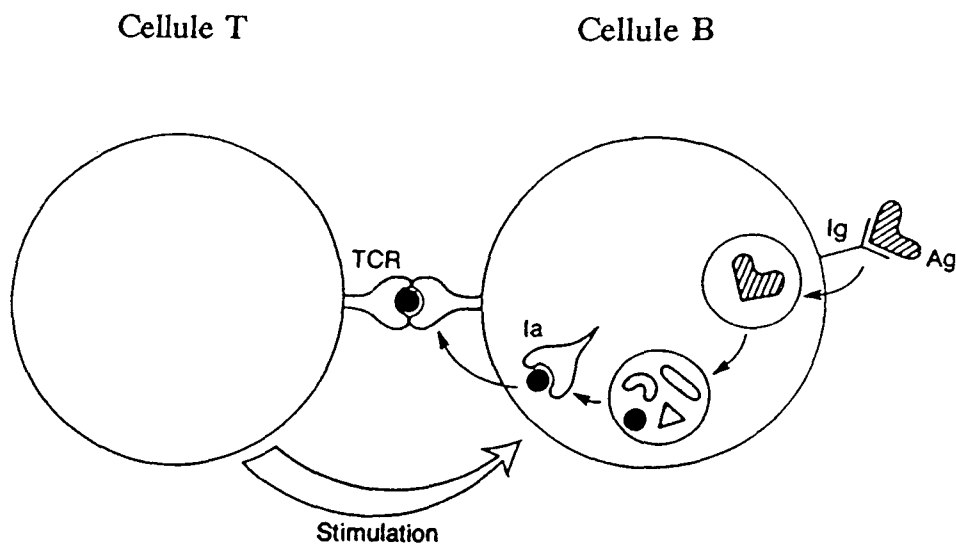


Figure 4. Collaboration entre les cellules B et T. Ag = Antigène ; Ig = Immunoglobuline ; TCR = Récepteur des cellules T ; Ia = Molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (d'après Hozumi, 1992).

Les cellules $CD4^+$ c'est à dire porteuses du CD4 sont des cellules régulatrices encore appelées cellule T helper. Les cellules $CD8^+$ sont principalement cytotoxiques et supresseurs. Cette subdivision n'est pas absolue et la relation entre les molécules de surface est bien meilleure si l'on considère les éléments du complexe majeur d'histocompatibilité associés à l'antigène présenté. Les $CD4^+$ réagissent avec des antigènes associés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II alors que les $CD8^+$ réagissent avec des antigènes associés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.

Les lymphocytes T régulent le fonctionnement du système immunitaire, en agissant à la fois sur les cellules B et T, par contact cellulaire ou par l'intermédiaire de composés solubles appelés lymphokines. Activés, ils peuvent directement tuer des cellules infectées ou endommagées, des cellules tumorales et dans les cas de maladies auto-immunes des cellules de l'organisme.

La régulation positive des lymphocytes est assurée par les lymphocytes helper. La régulation négative revient aux lymphocytes suppresseurs.

Les lymphocytes helper $CD4^+$ participent à la réponse humorale des cellules B et à la génération des $CD8^+$ cytotoxiques.

Les lymphocytes T cytotoxiques participent à l'immunité à médiation cellulaire et jouent un rôle majeur dans la protection contre les infections virales, dans les rejets de greffe, dans certaines maladies auto-immunes et dans les luttes antibactérienne et antitumorale. Le processus d'activation des lymphocytes cytotoxiques comprend tout d'abord la présentation de l'antigène au sein du complexe majeur d'histocompatibilité. Les synthèses de protéines surviennent et il y a expression du récepteur de l'IL-2. En réponse à l'IL-2, les cellules T synthétisent de l'ADN et se divisent pour donner des lymphocytes T cytotoxiques matures et à mémoire. La cytolysse intervient ensuite. Le mécanisme lytique semble faire intervenir l'insertion d'une protéine perforatrice (perforine) dans la membrane de la cellule cible. Une fragmentation de l'ADN par des endonucléases interviendrait également. Un schéma de cytotoxicité cellulaire est présenté figure 5.

Les lymphocytes T suppresseurs jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie du système immunitaire par libération de facteurs inhibiteurs. Il semble qu'ils agissent sur les facteurs de croissance produits par les lymphocytes T helper.

Les cellules T de l'hypersensibilité retardée ou cellules mémoires sont produites lors de la première exposition à l'antigène. Lors d'une deuxième stimulation par un même antigène, la réponse immunitaire est plus efficace.

Chez les humains ou les animaux dépourvus de cellules T, une faible résistance aux infections est observée. C'est le cas chez les patients atteints du syndrome de Di George dont le thymus ne permet pas le développement des cellules T. Dans le cas du SIDA, l'infection et la destruction des lymphocytes $CD4^+$ réduisent de manière sévère les fonctions immunitaires.

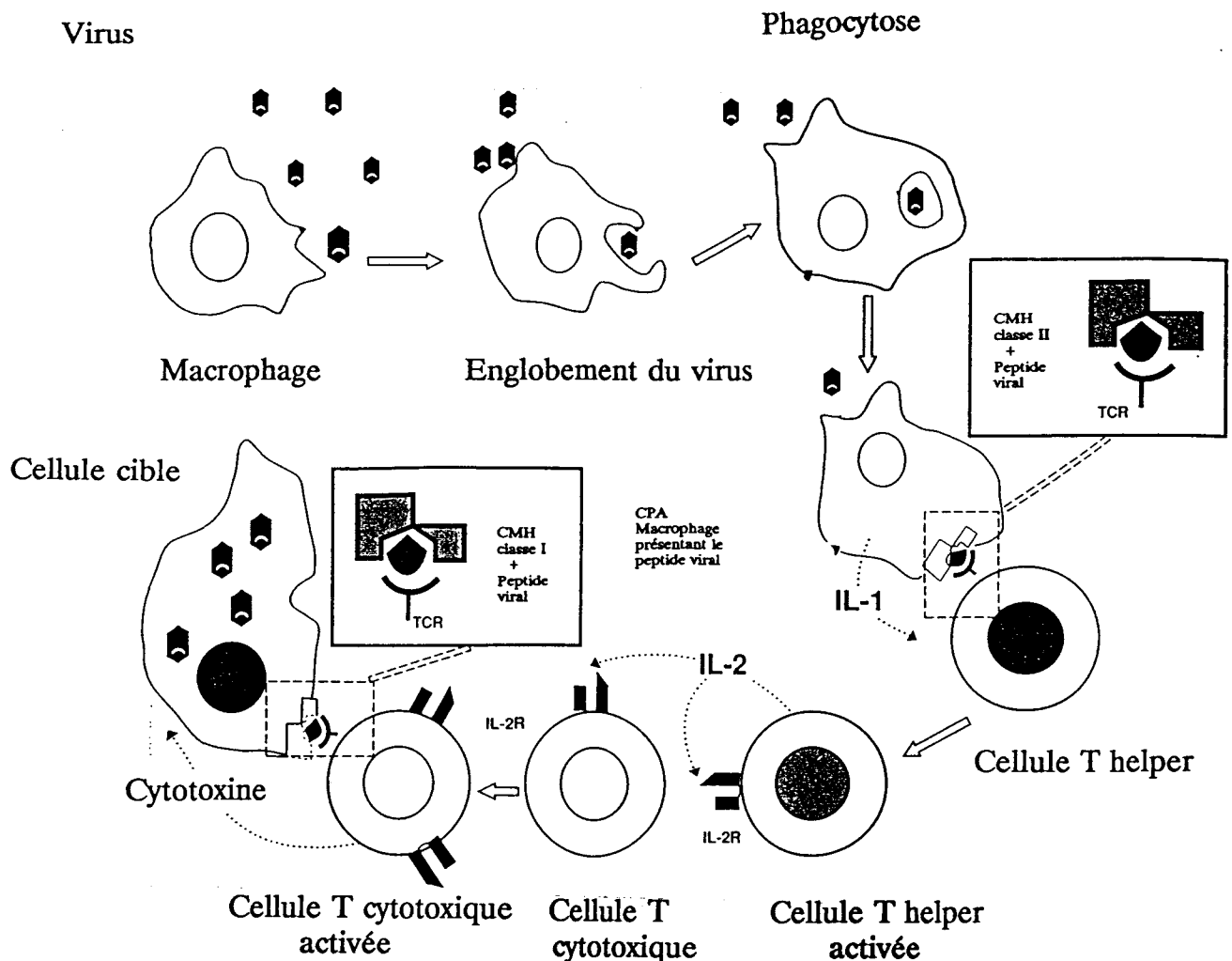


Figure 5. Mécanisme de cytotoxicité cellulaire (d'après McIntyre, 1992). CPA = Cellule présentatrice d'antigène ; IL-2R = Récepteur de l'interleukine 2 ; CMH = Complexe majeur d'histocompatibilité ; TCR = Récepteur des cellules T.

3) Autres lymphocytes

3-1) Cellules tueuses naturelles (NK)

Dans le sang, elles représentent entre 5 à 10 % des cellules mononucléées et elles sont rares voire absentes dans les tissus lymphoïdes. A la suite d'une activation, elles migrent dans la zone infectée et dans les autres organes. Ce sont des cellules cytotoxiques qui n'appartiennent pas à la lignée des lymphocytes T. Leur différenciation a lieu dans la moëlle osseuse.

Elles peuvent lyser à la fois des cellules normales et des cellules tumorales. Leur activité est généralement testée contre des cellules leucémiques humaines (K562) et contre des cellules de lymphome induit par le virus de Moloney (YAC-1). Le mécanisme lytique ferait intervenir, comme pour les lymphocytes T cytotoxiques, la perforine et des endonucléases destructrices de l'ADN.

Dans des modèles animaux, les cellules NK sont efficaces contre les cellules tumorales et notamment contre la dissémination de métastases. On ne sait pas encore si la dépression de l'activité des cellules NK dans les cancers est un des mécanismes par lequel les cellules tumorales échappent à la surveillance immunitaire.

Les activités des cellules NK sont influencées par les cytokines. *In vivo*, l'IL-2 et l'INF induisent la prolifération des cellules NK. Enfin, une des fonctions très importantes des cellules NK est la fonction régulatrice qu'elle exerce sur le système immunitaire et le système hématopoïétique grâce à la production de lymphokines. Elles produisent les interférons α et γ , le GM-CSF et l'IL-3.

3-2) Cellules tueuses activées par des lymphokines (LAK)

Les cellules LAK constituent une subpopulation de cellules NK et de lymphocytes granulaires larges. Le développement de l'activité cytotoxique ne nécessite pas la présence d'éléments du complexe majeur d'histocompatibilité ni la présence d'anticorps. Elles sont stimulées par l'IL-2 et montrent alors une cytotoxicité accrue. Comme les cellules NK, les cellules LAK produisent de nombreuses cytokines comme le TNF α et l'INF γ .

Il existe un groupe de cellules proches des cellules LAK. Il s'agit des cellules TIL pour tumor infiltrating lymphocytes. Ces cellules peuvent être recueillies, par exemple, après élimination du tissu cancéreux par digestion enzymatique. Ces cellules stimulées par l'IL-2 expriment une haute cytotoxicité contre les tumeurs. Chez la souris, l'effet antitumoral des cellules TIL est cinquante à cent fois plus puissant que celui des cellules LAK.

C) Complément

Le complément représente avec les anticorps l'élément essentiel du système humoral. Il est composé d'une vingtaine de protéines circulantes capables d'interagir avec les membranes biologiques. Le complément améliore trois fonctions immunologiques de base : la lyse cellulaire, l'opsonisation, l'activation cellulaire.

Le complément peut être activé par deux voies : la voie classique et la voie alterne. La

voie classique est activée par le complexe antigène-anticorps. La voie alterne est activée directement par certaines bactéries, certaines toxines bactériennes et par des parasites. Les deux voies d'activation du complément sont présentées dans la figure 6.

Le processus d'opsonisation dépend d'un élément du complément : le C3b. La fixation de cette protéine à un micro-organisme facilite la phagocytose.

Il attire également les phagocytes au site inflammatoire. Le C5a est un puissant agent chimiotactique.

D) Régulation de la réponse immunitaire

La régulation de la réponse immunitaire est un phénomène complexe qui fait intervenir de multiples éléments.

Tout d'abord, elle est sous contrôle génétique. La diversité des anticorps produits et donc la capacité de l'organisme à répondre spécifiquement à une stimulation antigénique est sous la dépendance de réarrangements au sein des gènes d'immunoglobulines.

Les cellules immunocompétentes sont également des cellules régulatrices de la réponse immunitaire. Par exemple, le nombre et la fonctionnalité des cellules présentatrices d'antigènes et des cellules T helper conditionnent la production d'anticorps par les cellules B. Le système se complique par l'existence de lymphocytes T suppresseurs régulant la fonction des lymphocytes helper et de lymphocytes contre-suppresseurs qui insensibilisent les lymphocytes T helper aux effets des cellules T suppressives.

La réaction immunitaire est également contrôlée par des médiateurs qui stimulent ou inhibent l'activité cellulaire du système immunitaire. La figure 7 montre une représentation simplifiée des interactions cellulaires intervenant au cours d'une réaction immunitaire. L'antigène est pris en charge par une cellule présentatrice. Cette fonction de présentation est assurée par de nombreux types cellulaires : les monocytes/macrophages, les cellules B, les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques. En association avec les éléments du complexe majeur d'histocompatibilité, l'antigène est présenté aux lymphocytes T. Dans le même temps, les cellules présentatrices d'antigènes sécrètent de l'IL-1. Sous l'impact de ces signaux, les lymphocytes T s'activent et produisent des médiateurs comme l'interleukine 2, 3, 4 l'INF γ

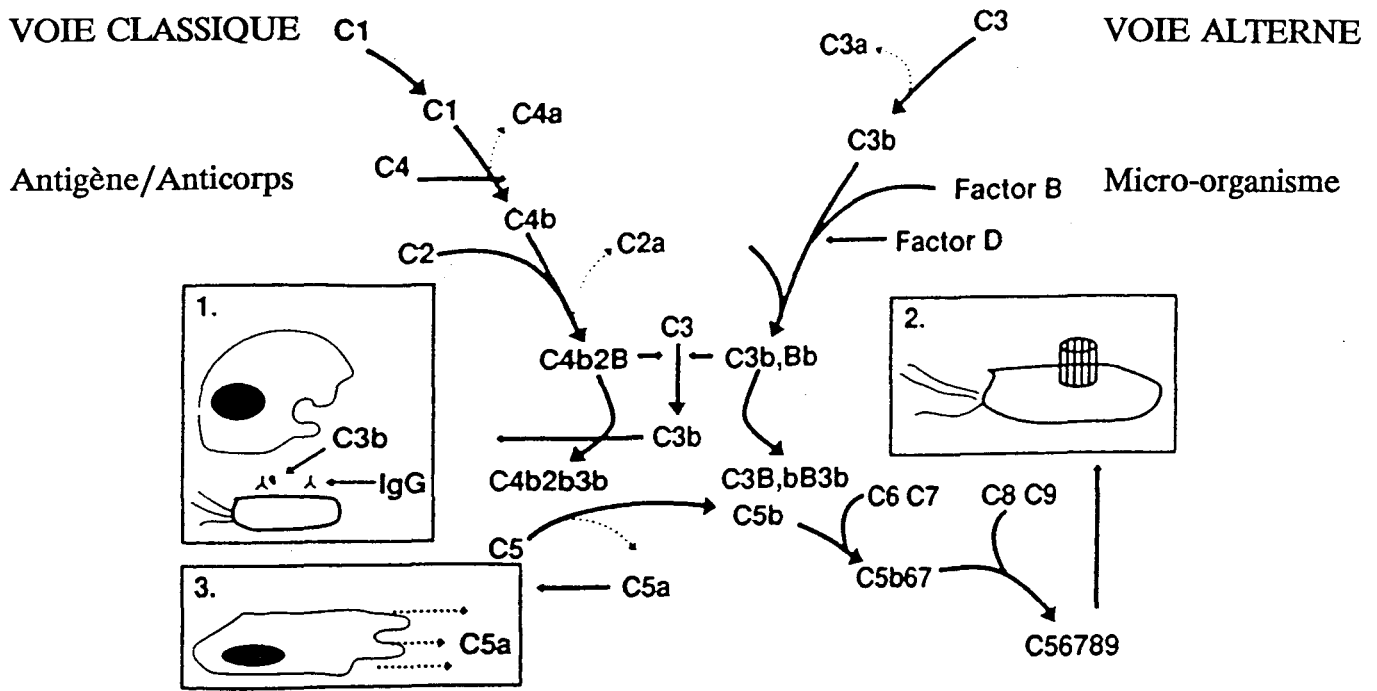


Figure 6. Différentes voies d'activation du complément (d'après McIntyre, 1992). Les trois principales fonctions du complément sont représentées : (1) Opsonisation, (2) Lyse cellulaire par formation d'un complexe attaquant la membrane, (3) Chimiotactisme.

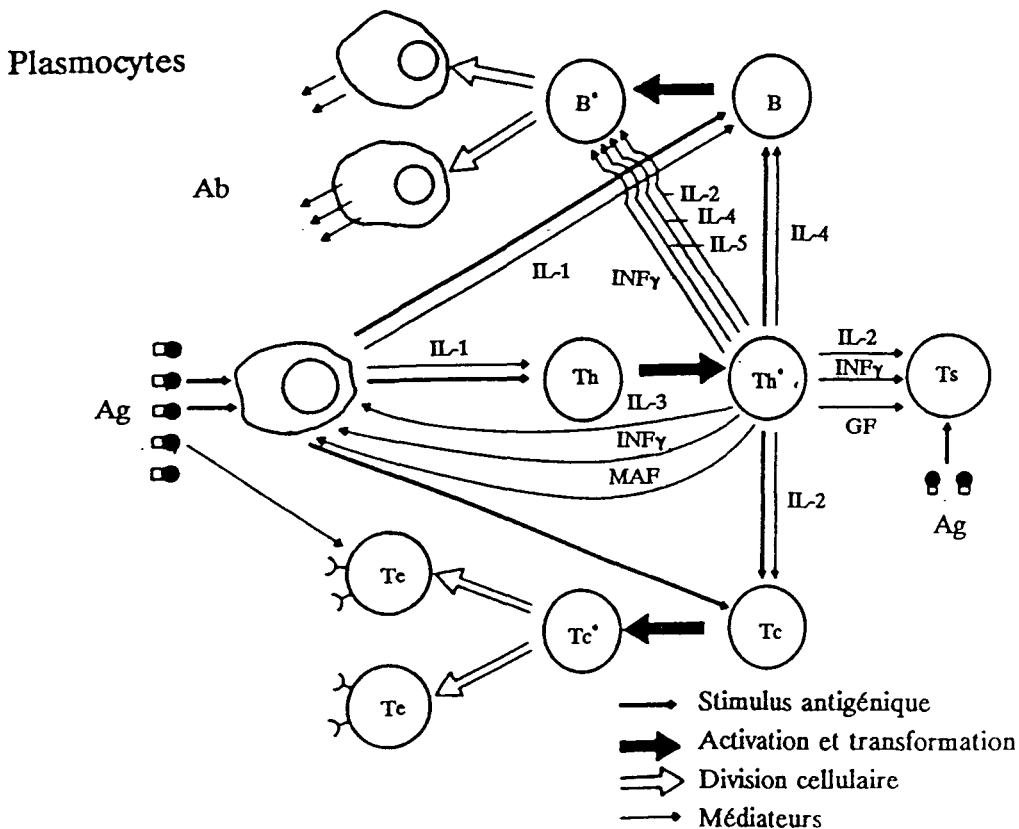


Figure 7. Principaux événements cellulaires dans la réponse immunitaire (d'après Petrov, 1992). CPA ; Cellule présentatrice d'antigène ; Ag = Antigène ; GF = Facteur de croissance ; MAF = Facteur activant les macrophages ; Th = Cellule T Helper ; Te = Cellule effectrice ; Ts = Cellule T suppresseur ; Tc = Cellule T cytotoxique ; * = Cellule activée.

Sous l'effet de ces cytokines, les métabolismes cellulaires se modifient : les cellules B prolifèrent et se différencient en plasmocytes producteurs d'anticorps et les lymphocytes T se différencient en cellules effectrices qui interagiront avec des cellules immunocompétentes ou non. La mobilisation des cellules B et T est elle même sous le contrôle des lymphocytes T suppresseurs.

Les propriétés des cytokines de la figure 7 seront reprises plus loin dans la discussion.

Ce schéma, bien que simplifié, révèle la complexité de la réaction immunitaire. On sait aujourd'hui qu'elle résulte de l'action combinée d'une armée de cellules différentes, notamment les monocytes, les macrophages, les éosinophiles, les basophiles et les lymphocytes mais aussi d'éléments extérieurs au système immunitaire (système hormonal). Ces cellules ne sont pas en contact permanent les unes avec les autres ; au contraire, elles circulent dans l'organisme, séjournant occasionnellement dans le sang et la lymphe. Dotées de fonctions particulières, elles contrôlent mutuellement leurs activités en sécrétant de petites quantités de cytokines qui agissent localement. Cette communication cellulaire intense permet l'amplification de la réponse immunitaire par un recrutement optimal des cellules immunocompétentes et évite toute prolongement de la réaction qui pourrait s'avérer préjudiciable pour l'organisme. Cette communication cellulaire complique également le travail des cliniciens qui tentent de modifier la réponse immunitaire. Le recours aux modificateurs de la réponse biologique pour activer ou inhiber le système doit se faire avec prudence sous peine d'obtenir des effets contraires à ceux espérés par perturbation du système entier.

III-II) Les immunomodulateurs

La famille des immunomodulateurs constitue un groupe très hétérogène. Ils présentent des structures, des mécanismes d'action et des propriétés pharmacologiques fort différents.

Le terme d'immunomodulateur recouvre des produits d'origine bactérienne, fongique et virale, des cytokines, des anticorps et des composés synthétiques. Généralement, on distingue les immunomodulateurs qui nécessitent un système immunitaire fonctionnel (adjuvants) de ceux qui présentent un pouvoir de restauration (cytokines).

Cliniquement, ils sont employés principalement pour stimuler ou reconstituer le système immunitaire de patients souffrant de cancer ou d'infections récurrentes. Ils peuvent être associés à d'autres traitements comme l'antibiothérapie et la chimiothérapie.

Dans cette partie, nous décrirons les immunomodulateurs, leur importance actuelle et leur devenir.

A) Immunomodulateurs isolés de micro-organismes

Il y a plus de trente ans, des mycobactéries tuées par la chaleur dans une émulsion sont reconnues comme stimulant l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité humorale (Freund, 1956). L'adjuvant complet et l'adjuvant incomplet de Freund augmentent, de façon importante, la production d'anticorps et rendent immunogéniques des doses d'antigènes qui ne l'étaient pas spontanément. Par exemple, l'administration d'antigènes tumoraux de poumons en association avec l'adjuvant de Freund augmentent la survie des patients victimes d'un cancer du poumon (Stewart, 1977).

1) Immunomodulateurs isolés de mycobactéries

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

Le vaccin Bacille de Calmette et Guérin souche atténuée de *Mycobacterium bovis* présente, à côté de son activité protectrice contre la tuberculose, des propriétés immunomodulatrices contre un nombre varié d'antigènes (Howard, 1959).

Cet agent immunothérapeutique non spécifique agit en stimulant le système réticulo-endothélial, l'immunité humorale, l'immunité à médiation cellulaire et les cellules NK. En 1959, des tumeurs expérimentales sont inhibées par le BCG et il est utilisé avec succès contre des mélanomes en 1970 (Morton). Le premier rapport sur un traitement du cancer de la vessie par le BCG est publié en 1976 (Morales). C'est contre ce type de cancer que les meilleurs résultats sont obtenus. Le mécanisme d'action du BCG contre ces cellules tumorales n'est pas totalement élucidé. La mort cellulaire pourrait être due à une augmentation de la cytotoxicité NK et/ou à la production de cytokines telle que l'IL-2, l'INF ou le TNF.

1-2) Le MER (méthanol-extract-residu)

Des fractions non purifiées de mycobactéries avec une activité adjuvante sont obtenues après une extraction au méthanol. Le MER augmente les capacités phagocytaires et possède un effet antitumoral (Mathé, 1976). Des résultats prometteurs ont été obtenus contre des leucémies et des mélanomes, principalement en association avec une chimiothérapie.

1-3) Motifs structuraux des mycobactéries possédant une activité immunomodulatrice

L'étude de la paroi des mycobactéries par le groupe de Lederer aboutit à l'isolement d'une fraction possédant des propriétés adjuvantes. Le MDP (N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) est qualifié comme la plus petite structure capable de remplacer la totalité des mycobactéries de l'adjuvant complet de Freund (Ellouz, 1974). Sa structure est présentée dans la figure 8. Ce composé est le premier constituant de la paroi des mycobactéries à être synthétisé puis ensuite modifié pour obtenir des analogues structuraux et ainsi définir des relations structures fonctions (Chedid, 1981). De nombreux dérivés de muramyl dipeptide sont synthétisés (Adam, 1985). Parmi eux, le Murabutide, un butyl ester, est apyrogène et possède les mêmes activités biologiques que le MDP.

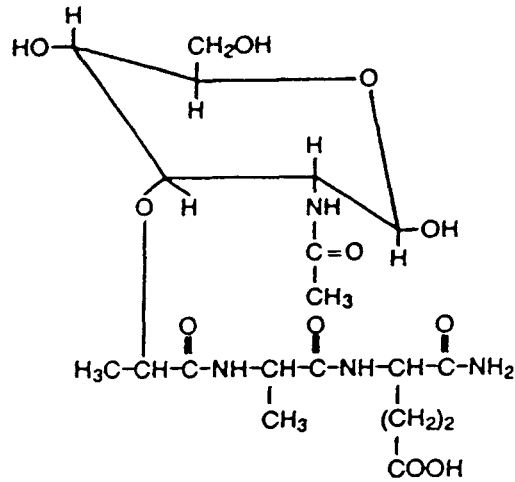


Figure 8. Structure du N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine.

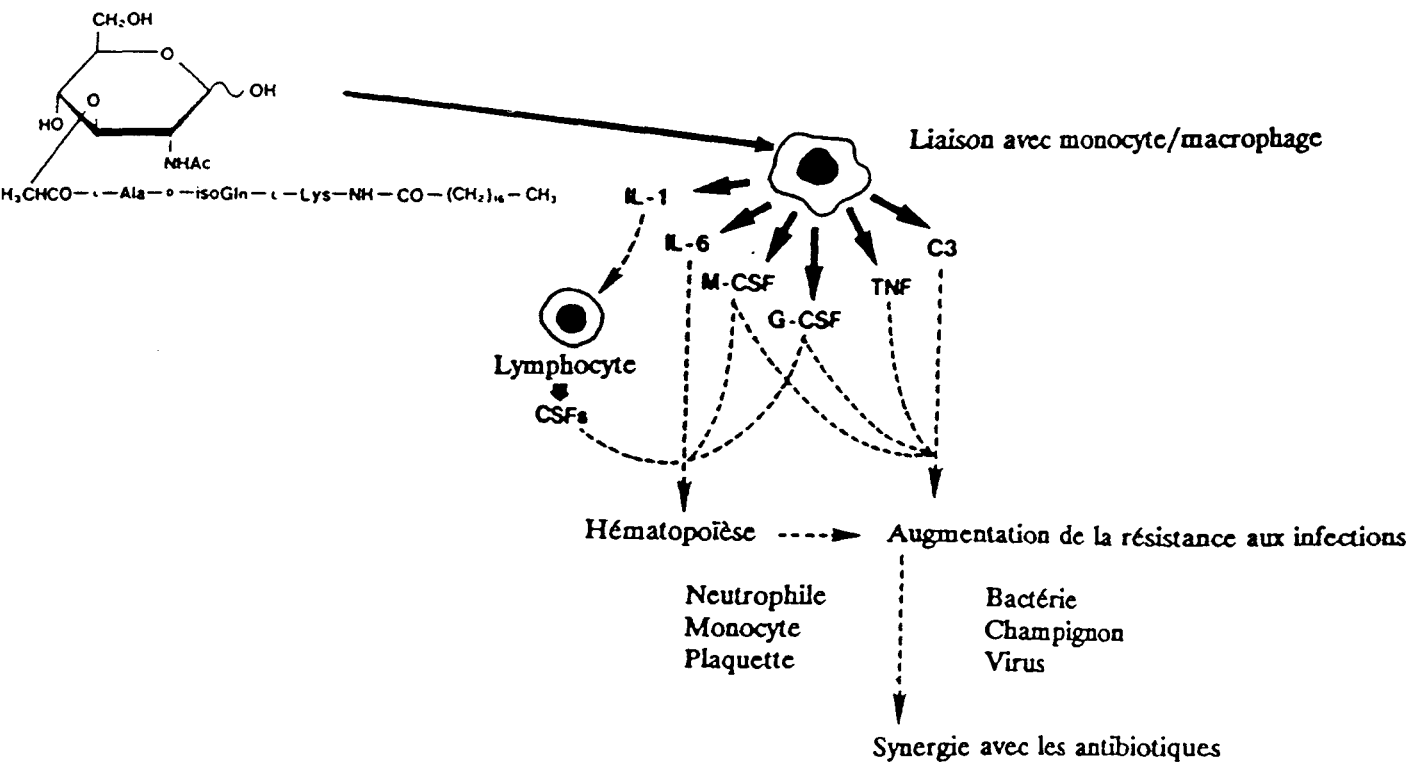


Figure 9. Structure et mode d'action d'un dérivé de muramyl dipeptide (Romurtide) (d'après Azuma, 1992).

En plus de ces propriétés adjuvantes, le MDP possède des propriétés immunostimulantes plus générales. Il protège contre des infections dues à des bactéries Gram négatives et Gram positives et à des virus (Parant, 1984). La protection contre l'infection est également mise en évidence chez les souris immunodéprimées. L'activité antitumorale des MDP est observée dans des modèles expérimentaux. Fidler décrit, en 1981, la réduction de métastases pulmonaires lors d'injections répétées de MDP encapsulés dans des liposomes.

Des études du point d'impact des muramyl dipeptides sont réalisées (Audibert, 1985). Ils agissent sur les cellules B et T, augmentent la cytotoxicité NK *in vivo* (Le Garrec, 1985) mais les macrophages sont leurs cibles privilégiées. La figure 9 résume les activités biologiques d'un MDP modifié, le Romurtide.

2) Autres micro-organismes

2-1) *Corynebacterium parvum*

Corynebacterium parvum est un organisme Gram positif qui présente des propriétés adjuvantes dans des suspensions tuées par la chaleur ou traitées par le formaldéhyde. Ces suspensions sont décrites originellement comme stimulant le système réticulo-endothélial (Halpern, 1975) et la production d'anticorps.

Les effets biologiques induits par ces suspensions dépendent du protocole d'administration. Elles augmentent la réponse humorale quand elles sont injectées par voie intraveineuse ou intrapéritonéale avec ou avant l'antigène administré par voie intraveineuse. Si l'antigène et *C. parvum* sont administrés par voie intrapéritonéale, une suppression de la réponse humorale est observée (Ghaffar, 1981).

Ces suspensions présentent une action non spécifique contre les tumeurs. En clinique, ces préparations sont utilisées en association avec une chimiothérapie dans le traitement du cancer du poumon, du sein et des mélanomes. Son efficacité est plus importante quand la tumeur est petite ou réduite par une chimiothérapie. Des effets indésirables sont observés comme des fièvres, des maux de têtes, des vomissements.

2-2) Dérivés de *Nocardia*

Ce sont des bactéries Gram positives. Les caractéristiques des nocardies sont similaires à celles des mycobactéries. L'activité adjuvante est démontrée par Freund qui substitue les mycobactéries de son adjuvant complet par des nocardies tuées par la chaleur sans perte d'activité. La fraction la mieux étudiée est la fraction soluble dans l'eau. Cette fraction stimule l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire chez la souris. C'est une fraction mitogène pour les lymphocytes B de lapins, de souris et humains (Bona, 1979).

2-3) Composés de la paroi des staphylocoques

La paroi des staphylocoques est le site des plus importants facteurs de virulence conditionnant la sévérité des infections. Tous ces composants majeurs capsule, protéine A, peptidoglycane possèdent de nombreuses activités biologiques.

La capsule, principalement composée de polysaccharides acides, inhibe la phagocytose en interférant avec l'opsonisation (Karakawa, 1979).

La protéine A montre des activités sur la coagulation, les défenses non spécifiques et les réactions immunitaires. Sa réaction avec le fragment Fc des immunoglobulines est sa principale propriété (Kronvall, 1970). Ces complexes peuvent induire l'activation du complément avec la production de facteurs chimiotactiques, la coagulation du sang, la libération d'histamine par les leucocytes, l'inhibition de la phagocytose et une réaction d'hypersensibilité immédiate. Les activités qui semblent indépendantes de la formation de ces complexes sont les actions mitogènes vis à vis des lymphocytes B et T humains.

Le peptidoglycane possède également un grand nombre d'activités (Heymer, 1977). *In vitro*, il influence la mitogénicité, l'adjuvantité et l'activation du complément.

2-4) Composés des Streptocoques

Des préparations cellulaires et de la paroi (dont le peptidoglycane) des streptocoques groupe A possèdent des propriétés immunomodulatrices. Des extraits cellulaires de ce micro-organisme suppriment la réponse anticorps d'autres, augmentent les fonctions des

cellules T. Le peptidoglycane est un activateur puissant de la voie alterne du complément (Greenblatt, 1978).

Un extrait appelé OK 432, préparé à partir de *Streptococcus pyogenes*, montre des propriétés antitumorales. La survie des patients atteints de cancer avancé du poumon ou de l'estomac est augmentée (Uchida, 1982). Cet extrait stimule les cellules T, le système réticulo-endothélial, les cellules NK (Kimura, 1976) et il induit la production de cytokines comme les interférons et l'IL-2 qui sont essentiels pour la génération des cellules tueuses. Nanjo *et al.* en 1991 proposent un mécanisme pour expliquer l'activité de l'extrait. La première étape consisterait en l'activation des cellules non spécifiques comme les PMN, macrophages et les cellules NK. Ces cellules possèderaient alors la capacité de tuer directement les cellules cancéreuses. L'activation des cellules T par les cellules non spécifiques se ferait par libération de cytokines. Activées, les cellules T agirait sur les cellules cancéreuses directement ou grâce aux lymphokines produites.

2-5) *Klebsiella pneumoniae*

Le Biostim commercialisé par les Laboratoires Cassenne est un immunomodulateur extrait de *Klebsiella pneumoniae*. L'ensemble de ses propriétés biologiques sera repris plus loin dans la discussion.

2-6) *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis est une bactérie Gram négative pathogène chez l'homme provoquant de graves maladies respiratoires. En plus de ces propriétés spécifiques, le vaccin préparé à partir de *B. pertussis* possède une propriété adjuvante (Greenberg, 1947). Son administration concomitante avec la toxine diphtérique se traduit par un taux d'anticorps anti toxine plus élevé. Cette activité adjuvante n'est pas uniquement due à la présence du lipopolysaccharide mais aussi à la toxine de *B. pertussis*. Elle est mitogénique pour les lymphocytes T humains et murins et elle augmente la production IgE et d'IgG. L'injection du vaccin augmente la résistance aux bactéries et virus. La phagocytose et l'activité lysosomiale des macrophages sont stimulées (Klein, 1981).

2-7) *Brucella abortus*

Brucella abortus est une bactérie Gram négative. Injectée par voie intraveineuse, elle induit la production d'interféron (Stinebring, 1964). L'extrait protège contre les infections virales et contre l'implantation de tumeurs expérimentales (Billian, 1970). L'obtention par purification d'un extrait (Bru-Pel) possédant les mêmes propriétés que l'extrait total permet de travailler avec un produit mieux défini et des risques de toxicité moins importants.

Une régression des métastases accompagnée de l'accumulation locale de macrophages a été démontrée dans les poumons de souris traitées avec l'extrait Bru-Pel (Schultz, 1978).

2-8) Les lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des composants de la paroi bactérienne de toutes les bactéries Gram négatives (Lüderitz, 1978). Ils sont localisés dans le feuillet externe de la membrane externe et sont chez les souches non capsulées exposés à la surface cellulaire. Ils contribuent à l'intégrité de la membrane externe et confèrent des propriétés antigéniques à la cellule, ils sont nommés "O antigènes". Le terme endotoxine est également utilisé comme synonyme (Westphal, 1977).

Les lipopolysaccharides sont construits selon la même architecture de base (Lüderitz, 1966) :

- la chaîne O-spécifique,
- le core,
- le lipide A.

Les deux premières régions sont de nature polysaccharidique, dans la plupart des cas, constituées d'unités de répétition oligosaccharidiques. C'est la chaîne O-spécifique qui est responsable de la diversité des LPS.

Les LPS présentent des propriétés adjuvantes, une activité antitumorale et augmentent la résistance contre des infections virales, bactériennes et fongiques (Rowley, 1956).

Le LPS agit sur un grand nombre de composants du système immunitaire comme les lymphocytes et les macrophages. C'est un activateur polyclonal des cellules B à la fois *in vitro* et *in vivo*. Exposés au LPS, les macrophages libèrent des cytokines. Parmi elles, l'IL-1 qui joue un rôle majeur dans le caractère adjuvant des LPS, le facteur stimulant les colonies (CSF), l'INF et le TNF. Enfin, l'activité NK est fortement accrue par le LPS.

La haute toxicité de ces molécules empêche leurs utilisations cliniques et, en conséquence, des dérivés détoxifiés sont recherchés. Par exemple, des phtalyl-LPS ont une toxicité et une pyrogénicité diminuées.

2-9) La bestatine

La bestatine est un métabolite dipeptidique isolé de *Streptomyces olivoreticuli* qui a pour formule (2S, 3R) 3-amino-2-hydroxy-4-phényl-butanoyl-L-leucine (Figure 10) (Umezawa, 1980). C'est un inhibiteur de la leucine aminopeptidase et de l'aminopeptidase B. Elle potentialise l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire *in vivo* et *in vitro*.

Son administration orale à des cancéreux augmente la cytotoxicité NK et le nombre de cellules T dans la circulation sanguine. Elle semble induire la libération d'IL-2 par les lymphocytes (Blomgren, 1982).

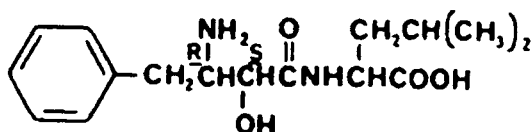


Figure 10. Structure de la bestatine.

2-10) Autres préparations bactériennes

Des préparations mixtes de différents extraits bactériens comme *Haemophilus influenza*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Brahnamella catarrhalis* ont déjà été introduites en clinique. Elles peuvent être administrées par voie orale et sont bien tolérées. Elles sont utilisées contre les infections récurrentes (Messerli, 1981 ; Maistrone, 1984).

Des extraits bactériens riches en ribosomes exercent une protection antibactérienne et antifongique. Le Ribomunyl®, par exemple, est composé d'extraits ribosomiaux de *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* et *Haemophilus influenza*.

2-11) Polysaccharides

Le schizophyllan est un glucan isolé du milieu de culture d'un basidiomycète : *Shizophyllum commune* Fries. C'est un polymère de glucose d'un poids moléculaire de 450000 daltons. Ce polysaccharide possède des activités antitumorales (Komatsu, 1969). C'est un immunopotentiateur ayant une activité adjuvante sur les cellules T et sur les macrophages. L'interaction des cellules T avec les macrophages joue un rôle important dans la lutte antitumorale et ce polysaccharide montre un effet thérapeutique contre les tumeurs expérimentales spécialement en association avec un traitement chimiothérapeutique (Mitani, 1982).

Le lentinan extrait de *Lentinus edodes* est un polysaccharide ramifié, composé d'unités de répétition de $\beta(1-3)$ glucopyranose. Deux chaînes glucopyranosidiques sont greffées par des liaisons $\beta(1-6)$ (Chichara, 1969). Son poids moléculaire est de 500000 daltons. Il stimule l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire et participe aux luttes antibactérienne, antivirale, antiparasitaire et antitumorale. Il agit sur les macrophages en induisant leur cytotoxicité *in vivo* et en augmentant *in vitro* la production d'IL-1. La production de cette interleukine déclenche la stimulation de la lignée T qui stimule l'immunité humorale et la cytotoxicité des lymphocytes T (Isawa, 1981). Le lentinan est actif, en association avec une chimiothérapie, chez des patients atteints de cancer gastrique (Taguchi, 1982).

Le polysaccharide extrait de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae* est un polymère de glucose lié en $\beta(1-3)$. Il montre une activité antitumorale contre des tumeurs expérimentales (Suzuki, 1969). Il agit sur les cellules phagocytaires et stimule l'immunité humorale et à médiation cellulaire.

Le PSK isolé de l'actinomycète *Coriolus versicolor* contient des protéines et des glucides dont le glucose, mannose, galactose, fucose et xylose. Il possède des propriétés antitumorales. Il présente un caractère restauratif chez les sujets immunodéprimés porteurs d'une tumeur. Il est largement utilisé au Japon contre les cancers des organes digestifs, du sein et du poumon (Kamamatsu, 1982).

2-12) Immunosuppresseurs

La ciclosporine A, le FK 506 et la rapamycine sont des produits microbiens qui possèdent des propriétés immunosuppressives.

La ciclosporine A (Sandimmun®), isolée de culture de champignon *Tohyocladium inflatum* a été découverte en 1972 (Borel, 1991). Depuis lors, ce peptide a révolutionné le domaine de la transplantation d'organes et son efficacité est étudiée actuellement dans le traitement d'un certain nombre de maladies auto-immunes, en particulier le psoriasis et la polyarthrite rhumatoïde. Elle est néphrotoxique.

Le FK 506 a été isolé à partir du milieu de fermentation de *Streptomyces tsukubaensis* (Kino, 1987). C'est un antibiotique de la famille des macrolides qui possède un mécanisme d'action semblable à celui de la ciclosporine. Il montre un tropisme important pour le foie ce qui explique son succès dans la transplantation de cet organe. Comme pour la ciclosporine, un effet de néphrotoxicité a été mis en évidence.

La rapamycine est produite par *Streptomyces hygroscopicus*. Elle fut initialement décrite comme un antibiotique (Vezina, 1975 ; Sehgal, 1975) puis se révéla posséder des propriétés immunosuppressives. Elle est efficace dans beaucoup de modèles de transplantation. La rapamycine est un immunosuppresseur puissant en cours d'expérimentation chez l'animal.

Kahan *et al.* en 1991 démontrent que la suppression du rejet de greffe peut être atteinte par l'action combinée de la rapamycine et de la ciclosporine A à des doses où elles sont inefficaces seules.

La formule de ces trois immunosuppresseurs est présentée dans la figure 11.

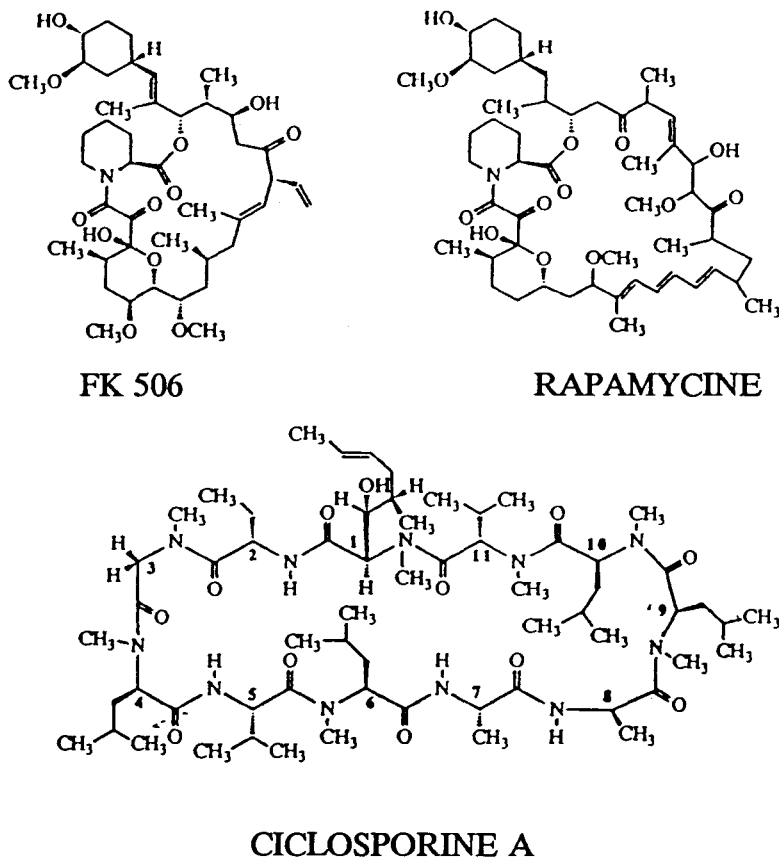


Figure 11. Structure de la ciclosporine A, du FK 506 et de la rapamycine.

Les mécanismes d'action de ces trois immunosuppresseurs ne sont encore pas bien définis. L'effet immunosuppresseur de ces trois composés résulte d'actions sur les fonctions des cellules T. Bien que chimiquement différents, la ciclosporine et le FK 506 semblent agir par des chemins métaboliques identiques alors que la rapamycine de structure semblable au FK 506 affecterait de manière différente le métabolisme des cellules T.

La ciclosporine A interagit avec une protéine de 17 KDa appelée cyclophiline qui appartient à la famille des immunophilines. Tous les membres de cette famille identifiés jusqu'à présent possèdent une activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase catalysant l'isomérisation cis-trans des liaisons peptidiques intéressant les résidus prolyl (Fischer, 1989). La rapamycine et le FK 506 interagissent avec un groupe distinct de protéines réceptrices appelées protéines de liaison. Les trois immunosuppresseurs liés à la protéine inhibent l'activité isomérisique et cette liaison est une condition préalable à l'activité immunosuppressive.

La ciclosporine et le FK 506 inhibent la prolifération des lymphocytes T en affectant des mécanismes de régulation de l'expression de gènes de lymphokines. Ce phénomène est démontré dans le cas de la ciclosporine pour le gène de l'IL-2 (Krönke, 1984). Tocci *et al.* en 1989 indiquent que le FK 506 inhibe l'expression de certains gènes dont ceux des interleukines 2, 3, 4, du GM-CSF et de l'INF γ .

Des données récentes éclairent le mode d'action de la ciclosporine et du FK 506. Les équipes de Schreiber et Weissman (Liu, 1991 ; Friedman, 1991) ont montré que les couples médicament-immunophiline se lient, de manière compétitive, directement à la calcineurine, une sérine thréonine phosphatase et, de manière indirecte, à la calmoduline en présence de calcium. Comme ces deux immunosuppresseurs témoignent d'une spécificité pour les voies d'activation qui induisent une augmentation des concentrations calciques intracellulaires, on peut imaginer que les complexes immunophiline-médicament viendraient inhiber la calcineurine. Cette inhibition pourrait interférer avec des modifications post-traductionnelles des composants cytoplasmiques de facteurs de transcription.

La rapamycine n'influence pas l'expression des lymphokines. Elle inhibe aussi la prolifération des cellules T mais elle intervient plus tard dans le processus d'activation cellulaire. Ce macrolide interfère avec la croissance des cellules T induite par les interleukines 2, 4, 6 (Dumont, 1990). Par conséquent, elle agit plus en aval bloquant les phénomènes qui aboutissent à la prolifération lymphocytaire c'est à dire la voie de transduction du signal émanant de la liaison récepteur lymphokine. Contrairement aux deux autres immunosuppresseurs, la rapamycine inhibe la prolifération spontanée des cellules lymphoïdes et retarde la croissance de cellules tumorales transplantées chez la souris (Eng, 1984) suggérant que ce composé agit plutôt comme un agent antiprolifératif.

B) Hormones thymiques et immunomodulateurs synthétiques

1) Hormones thymiques

En 1961, Miller montre qu'une thymectomie néonatale chez la souris engendre des désordres immunologiques. Le thymus exerce son influence par la libération de molécules variées, à la fois, dans son microenvironnement et à distance via la circulation sanguine. En ce sens, ces composés peuvent être qualifiés d'hormones thymiques et

plusieurs ont été isolés et décrits : la thymosine, le facteur thymique sérique et la thymopoïétine. La thymosine est un mélange de peptides possédant différentes activités biologiques. Elle induit la différenciation des cellules T.

Tableau 1. Applications cliniques des hormones thymiques (d'après Werner, 1987).

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">(1) Immunodéficience primaire (Syndrome de Di George)(2) Immunodépression des sujets âgés(3) Syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA)(4) Varicelle chez les sujets immunodéprimés(5) Herpes simplex récurrent(6) Hépatite B(7) Lèpre(8) Arthrite rhumatoïde(9) Tumeur (Cancer du poumon, colorectal) |
|---|

Les autres hormones thymiques ont des activités comparables. Elles sont généralement utilisées chez les patients présentant une défectuosité des cellules T et de spectaculaires améliorations sont rapportées. Les applications cliniques sont présentées dans le tableau 1. Des fragments synthétiques d'hormones thymiques ont été préparés. Le pentapeptide nommé TP5 de séquence Arg-Lys-Asp-Val-Tyr possède des propriétés immunomodulatrices. Ce peptide correspond à la région 32-36 de la thymopoïétine. Les peptides TP3 (Arg-Lys-Asp) et TP4 (Arg-Lys-Asp-Val) sont également actifs.

2) Diéthylthiocarbamate (DTC)

A côté de ces propriétés de chélateurs, le DTC (Imuthiol) possède des capacités immunomodulatrices. Il influence le recrutement et l'activation des lymphocytes T et l'activité des cellules NK. L'Imuthiol est utilisé chez les sujets immunodéprimés après une chimiothérapie ou victimes d'infections opportunistes liées au virus du SIDA (Pompidou, 1984). Chez ces derniers, l'administration de l'Imuthiol ralentit l'évolution de la maladie vers la mort.

3) Lévamisole

Découvert dans les années 1960 pour ses propriétés antihelminthiques, le lévamisole est un agent synthétique actif oralement qui possède des propriétés immunomodulatrices. Les premières expériences réalisées par Renoux & Renoux (1971, 1972a, 1972b) indiquent que le lévamisole interagit avec l'immunité à médiation cellulaire. Son mécanisme d'action est complexe et encore mal défini. Il apparaît restaurer de nombreuses fonctions des cellules T et des phagocytes. Il est capable d'augmenter les capacités d'un système déprimé mais incapable de stimuler un système immunitaire intact (Symoens, 1977). Compte tenu de ces propriétés sur le système immunitaire, cette drogue a été testée contre de nombreuses pathologies comme les infections virales et bactériennes, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn... .

La première utilisation de ce composé en oncologie date de 1973 (Tripodi). C'est seulement à partir de 1989 que le lévamisole a été reconnu comme un agent efficace contre le cancer du colon. Associé à la 5 fluorouracile, il réduit d'un tiers le risque de décès de patients atteints d'un cancer du colon de stade C. La Federal Drug Administration autorisa sa prescription pour combattre ce type de cancer. Son utilisation s'accompagne d'effets indésirables comme les nausées, des éruptions cutanées qui disparaissent après la thérapie. L'effet secondaire le plus sérieux est une granulocytopenie.

4) Isoprinosine®

C'est un complexe d'inosine et de para acétamidobenzoate de N,N diméthyl amino 2 propanol dans les rapports molaires 3 : 1. Cet immunomodulateur montre son efficacité dans la lutte antivirale. *In vitro*, l'isoprinosine inhibe la réplication des virus à ARN et à ADN et potentialise l'immunité à médiation cellulaire : augmentation de la réponse proliférative aux antigènes ou aux mitogènes, activation de la formation des rosettes et activation des macrophages.

Son efficacité, *in vivo*, semble liée à sa capacité d'empêcher la dépression de l'immunité cellulaire qui survient lors d'une infection virale (Wybran, 1973). Elle augmente la production de l'IL-2.

Elle est bien tolérée, et on ne dénombre pas d'effet indésirable même après un traitement prolongé.

5) NPT 15392

C'est un analogue de l'hypoxanthine qui possède une activité stimulante vis à vis des neutrophiles, des cellules T et des cellules NK. Il augmente la réponse des cellules T humaines à la phytohémagglutinine et à la concanavaline A, la prolifération des macrophages induite par des lymphokines et induit les cellules T suppresses. Le NPT 15392 et l'isoprinosine agissent en synergie sur la stimulation mitogénique et sur l'induction d'une activité suppressive *in vitro*.

Chez vingt patients cancéreux traités avec le NPT 15392 tous les trois jours pendant dix jours, le nombre de cellules T dans le sang augmente. Le NPT 15392 ne présente pas d'effet indésirable (Fudenberg, 1984).

6) Azimexon

Il fait partie des dérivés de l'aziridine développés par les laboratoires Boëhringer Mannheim et il active principalement les cellules T mais aussi les cellules B de système immunitaire déficient comme dans le cas de leucémie lymphocytaire chronique (Bicker, 1984). Aucun effet indésirable n'est observé. Les effets thérapeutiques sont obtenus dans les cas d'arthrite et de tumeurs. Il semble également diminuer l'immunosuppression liée à la chimiothérapie utilisant la cyclophosphamide.

Imexon, un autre dérivé montre une activité antivirale sur un modèle de SIDA murin (Chirigos, 1990).

7) Tufsine

La tufsine est un immunomodulateur tétrapeptidique (Thr-Lys-Pro-Arg). Elle est synthétisée naturellement dans le sérum par deux coupures enzymatiques d'immunoglobulines G. Elle influence les fonctions des neutrophiles et des macrophages : mobilité, phagocytose, activité bactéricide, activité antitumorale (Najjar, 1978).

Le tripeptide Thr-Lys-Pro présente des propriétés pharmacologiques opposées (Auriault, 1985). Il supprime la libération de β glucuronidase, la production d'IL-1 et d'anions superoxydes par les macrophages de rats, le chimiotactisme et l'expression du récepteur spécifique aux IgE par les macrophages alvéolaires humains.

C) Autres immunomodulateurs

A cette famille appartiennent les cytokines et les inhibiteurs biologiques.

Les cytokines regroupent un grand nombre de protéines également nommées lymphokines, monokines, interférons, interleukines, facteurs de croissance, facteurs de nécrose tumorale. Elles jouent des rôles importants dans les processus physiologiques.

De petits poids moléculaires, ces molécules sont souvent des glycoprotéines. Ce sont des médiateurs de la communication intercellulaire synthétisés sous l'influence d'agents variés. Ils sont produits durant une période très courte et actifs à très faibles concentrations. Leurs effets nécessitent la liaison avec un récepteur membranaire spécifique.

1) Immunomodulateurs d'origine leucocytaire

1-1) Interleukine (IL) 1, 5, 6

L'IL-1 joue un rôle majeur dans l'initiation de l'activation lymphocytaire et le développement des mécanismes de défense. Elle est produite par de nombreuses cellules comme les monocytes et les macrophages mais aussi les kératinocytes, les cellules endothéliales, les cellules de Langerhans, les cellules NK... (Oppenheim, 1986).

Associée au $TNF\alpha$, elle est responsable des processus cellulaires qui interviennent dans l'inflammation. Elle induit la synthèse de protéines de la phase aiguë, de prostaglandines et de collagénase par les fibroblastes et les chondrocytes.

L'activation des cellules T qu'elle provoque résulte de l'augmentation de l'expression de l'IL-2 et de ses récepteurs. L'IL-1 joue, par ce mécanisme, un rôle dans l'activation des cellules B (Falkoff, 1984).

Elle agit en synergie avec l'INF et l'IL-2 pour augmenter de 40 à 50 % la cytotoxicité. La liaison des cellules tueuses avec les cellules tumorales et la lyse de ces dernières sont augmentées en présence d'IL-1 (Herman, 1985).

L'IL-5 est une glycoprotéine produite par les lymphocytes T activés. Ce médiateur active la prolifération des cellules B, la sécrétion d'IgM, d'IgG, et d'IgA et possède une

activité formatrice de colonies éosinophiles à partir de précurseurs médullaires. Sur les éosinophiles matures, elle agit comme un agent chimiotactique, prolonge leur survie et stimule leur propriété cytotoxique et leur production d'anion superoxyde (Banchereau, 1990). Son utilisation en thérapeutique est envisagée dans la régression de tumeurs et la lutte antiparasitaire.

L'IL-6 a été indépendamment découverte et décrite comme une molécule type interféron et comme un facteur stimulant les lymphocytes B. L'IL-6 est une cytokine ubiquitaire car elle est produite par de nombreuses cellules (monocytes, lymphocytes T activés, fibroblastes, cellules endothéliales, kératinocytes...). Certaines cellules tumorales en produisent (Sakai, 1991). Elle joue un rôle central dans la prolifération des cellules malignes de myélome, de lymphome hodgkinien, de sarcome de Kaposi, d'adénocarcinome du rein. Chez les malades souffrant de myélome, une hyperproduction de cette interleukine par le micro-environnement tumoral corrélée à l'agressivité de la maladie est observée.

Elle agit sur un grand nombre de cellules. Elle constitue un facteur de différenciation pour la lignée lymphoïde B, T et pour les cellules hématopoïétiques.

L'IL-1 et l'IL-5 sont en cours d'expérimentation *in vitro* et chez l'animal alors que les premières études cliniques sont entreprises pour l'IL-6.

1-2) Facteurs stimulant les colonies (CSF)

Ils interviennent dans la régulation de l'hématopoïèse. Ils interagissent de la cellule souche à la cellule mature du sang. Certains comme l'IL-3 agissent sur les cellules souches et les cellules progénitrices, tandis que d'autres stimulent la prolifération, la différenciation et l'activation de lignées spécifiques comme l'érythropoïétine (érythrocytes), le facteur stimulant les colonies macrophagiques (M-CSF), le facteur stimulant les colonies granulocytaires (G-CSF) et le facteur stimulant les colonies granulocytaires et macrophagiques (GM-CSF) (Figure 12). Les lymphocytes T, les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes représentent la source majoritaire de facteur de croissance hématopoïétique.

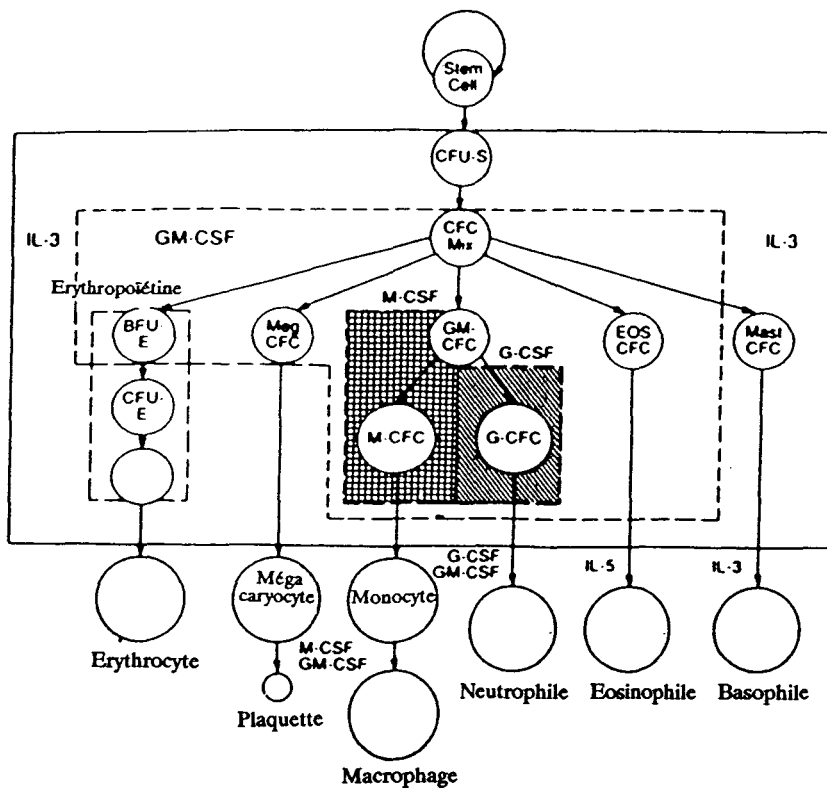


Figure 12. Spectre d'activité des différents facteurs stimulant les colonies sur les cellules sanguines et leurs précurseurs (d'après Takx-Köhlen, 1992).

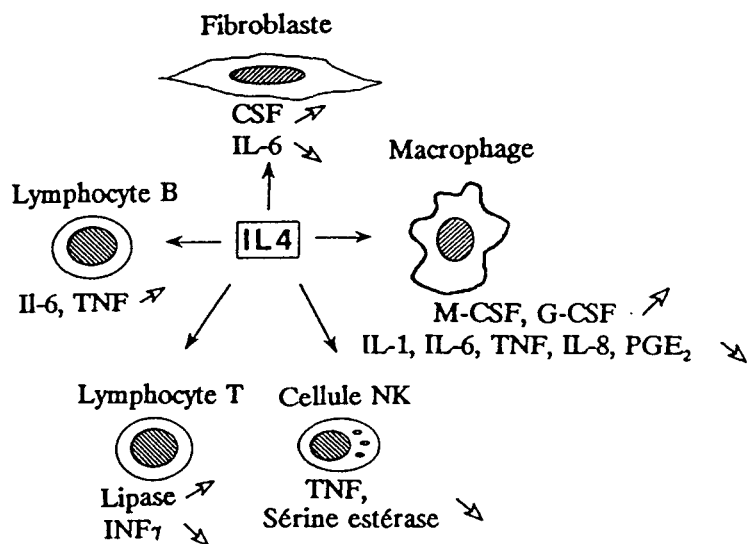


Figure 13. Régulation de la production de cytokines par l'IL-4 (d'après Banchereau, 1993).

L'IL-3 est en cours d'essais cliniques de phase II et III sur des patients atteints de lymphome hodgkinien et non hodgkinien, après chimiothérapie et lors de transplantation de moëlle osseuse.

Le GM-CSF (Leucomax®) est prescrit contre des leucopénies liées au SIDA, à des traitements chimiothérapeutiques et dans les cas de transplantations de moëlle osseuse (Metcalf, 1989). Les contre-indications sont liées à l'activation des granulocytes, des monocytes et des macrophages. A des doses supérieures à 10 µg/kg/jour, les fièvres, les malaises et les anorexies sont fréquents. Des effets toxiques plus graves sont observés si la dose dépasse 30 µg/kg/jour.

Le G-CSF (Neupogen®) est utilisé contre les neutropénies survenues à la suite d'une chimiothérapie (Crawford, 1991). Parmi les effets indésirables, on trouve, par exemple, des douleurs musculaires et des éruptions cutanées.

Les traitements utilisant les CSF réduisent la durée de la granulocytopenie et diminuent le nombre d'épisodes fébriles nécessitant des traitements antibiotiques et une hospitalisation. Cette approche permet un meilleur respect des protocoles des traitements anticancéreux, qui doivent souvent être interrompus du fait d'effets secondaires.

1-3) Interleukine 4 (IL-4)

Tout d'abord décrite comme le facteur de croissance des cellules B, l'IL-4 est une glycoprotéine sécrétée par un nombre restreint de cellules dont les lymphocytes T activés et les basophiles/mastocytes. Elle est active sur un grand nombre de types cellulaires (lymphocytes B et T, granulocytes, monocytes/macrophages, fibroblastes et cellules endothéliales). Elle augmente la cytotoxicité des cellules T et la croissance des cellules TIL en présence d'IL-2. De plus, elle joue un rôle biologique important de façon indirecte car elle module la production des cytokines d'un grand nombre de cellules (Figure 13). L'IL-4 recombinante, *in vitro*, inhibe la prolifération de cellules tumorales comme les cellules B leucémiques et des cellules de mélanomes (Dean, 1992).

1-4) Interleukine 2 (IL-2)

Décrite pour la première fois en 1976, elle est aussi appelée facteur de croissance des cellules T. De toutes les cytokines, l'IL-2 est l'interleukine à laquelle les scientifiques se sont le plus intéressés. Produite par les cellules T activées, elle stimule la multiplication de globules blancs variés comme les lymphocytes T cytotoxiques, les cellules LAK et TIL qui reconnaissent, attaquent et détruisent les cellules cancéreuses. L'IL-2 stimule les cellules T pour aider les lymphocytes B à produire des anticorps.

Elle est commercialement disponible sous le nom de Proleukin® et elle est utilisée dans le cancer rénal. Les effets négatifs de l'IL-2 sont sévères et dépendants de la dose : fièvre, frisson, maux de têtes, douleur musculaire, malaise, hypotension, oedème, dysfonctionnement rénal.

En 1984, des traitements associent l'IL-2 et des cellules LAK (Figure 14). Les lymphocytes du sang sont isolés et mis en culture avec de l'IL-2 afin de produire des cellules LAK. Elles sont réinjectées aux malades en même temps qu'une dose d'IL-2. Comme le montre le tableau 2, 25 % des patients (n = 177) montrent des réponses positives à ce type de traitement. Des rémissions complètes sont obtenues principalement dans les cancers du rein et de la peau. Si l'IL-2 est utilisée seule, les résultats obtenus sont moins favorables. Des essais cliniques utilisent les cellules TIL. Dans ce cas, un nodule tumoral est prélevé chez le patient et les cellules sont séparées par digestion enzymatique. Cultivées en présence d'IL-2, les cellules TIL dispersées dans la tumeur prolifèrent et détruisent les cellules cancéreuses. Après 30 à 45 jours, les lymphocytes en culture ont complètement éliminé les cellules tumorales et les cellules TIL sont réinjectées aux malades. Cette technique semble aboutir à des régressions tumorales plus importantes.

Le potentiel de l'IL-2 dans le traitement des maladies infectieuses est en cours d'évaluation. Cette approche serait particulièrement intéressante dans le traitement des infections causées par des germes intracellulaires, comme la lèpre ou la tuberculose (Dodet, 1993).

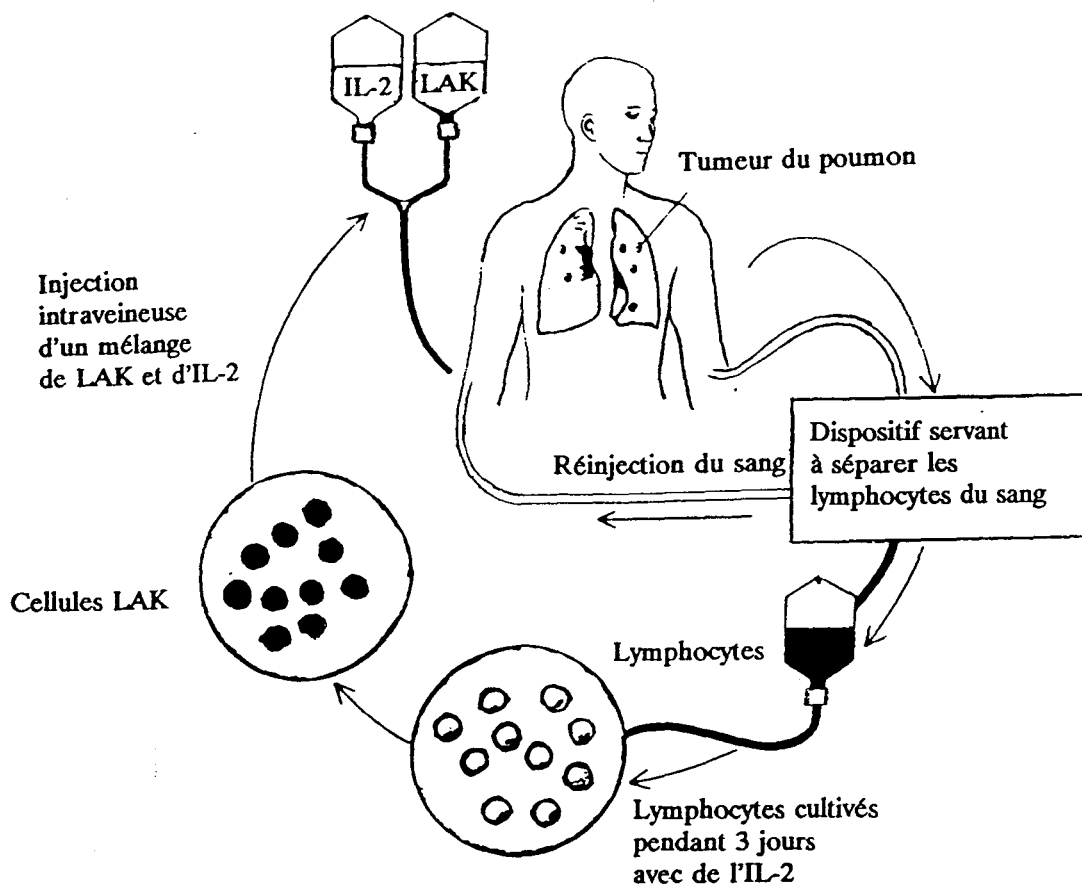


Figure 14. Traitement associant l'IL-2 et les cellules LAK (Rosenberg, 1990).

Type de cancer	Nombre de patients	Rémission totale	Rémission partielle	Rémission partielle ou totale
Rein	72	8	17	25 (35%)
Mélanome	48	4	6	10 (21%)
Colon-rectum	30	1	4	5 (17%)
Lymphome non hodgkinien	7	1	3	4 (57%)
Sarcome	6	0	0	0
Poumon	5	0	0	0
Sein	-	-	-	-
Autres	9	0	0	0
Total	177	14	30	44 (25%)

Tableau 2. Résultats obtenus après un traitement associant l'IL-2 et les cellules LAK (Rosenberg, 1990).

1-5) Interférons

Il y a plus de trente ans, les biologistes découvraient les interférons, de petites molécules qui favorisent la résistance des cellules aux infections virales (Isaacs, 1957).

Le terme interféron recouvre une famille de molécules assez similaires, les interférons α , β , γ . Ces molécules ont suscité un grand intérêt en raison de leurs applications dans les luttes antivirale et anticancéreuse. Ils stimulent de nombreuses fonctions biologiques : activation des macrophages, recrutement des lymphocytes stimulés, régulation de la sécrétion d'IgE, production d'anticorps, production de protéines de la phase aigüe lors de l'inflammation, induction d'antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité.

Les mécanismes de transduction qui suivent la liaison de l'INF α avec son récepteur sont élucidés. Cette liaison aboutit à l'activation, dans le noyau, de l'expression de certains gènes. Par ce mécanisme, la production d'une série de protéines parmi lesquelles des enzymes et des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité est augmentée. En 1988, les groupes de I. Kerr et G. Stark montrent que les gènes cibles de l'interféron possèdent tous une même région régulatrice appelée ISRE (pour Interferon Stimulated Response Element) qui est la cible de plusieurs facteurs de transcription. L'un d'entre eux apparaît dans les minutes qui suivent le contact avec l'interféron. Appelé ISGF3 (pour Interferon Stimulated gene factor 3), ce facteur est composé de quatre protéines dont la plus petite interagit avec l'ADN. Naturellement présentes dans la cellule, sous l'action de l'interféron, trois protéines cytoplasmiques sont phosphorylées par une tyrosine kinase. Phosphorylées, elles s'associent et migrent dans le noyau où elles se joignent à la quatrième pour former le facteur actif. Ainsi constitué, le complexe se fixe sur l'élément de régulation ISRE et stimule l'expression des gènes cibles situés à proximité.

Une remarquable propriété de l'INF α est sa capacité à augmenter l'activité cytotoxique des lymphocytes T et l'activité NK. Les effets thérapeutiques de l'INF α sont décrits dans la figure 15. Deux interférons α sont disponibles dans le commerce : Roferon A[®] et Intron A[®]. Ils sont utilisés dans le traitement des cancers. Les effets indésirables sont dépendants de la dose. On observe des symptômes d'états grippaux de type fièvre, frisson, maux de tête et des désordres gastro-intestinaux.

Activité clinique significative (> 30 %)

- Leucémie à tricholeucocytes
- Leucémie myéloïde chronique
- Lymphome non hodgkinien
- Lymphome cutané à cellule T
- Thrombocytémie essentielle
- Syndrome de Kaposi chez les patients atteints par le virus du SIDA
- Tumeur carcinoïde
- Tumeur de la vessie

Activité clinique limitée (entre 10 et 30 %)

- Myélome
- Leucémie lymphocytaire chronique
- Mélanome
- Cancer rénal
- Cancer ovarien

Pas d'activité clinique (< 10 %)

- Cancer du sein
- Cancer du colon
- Cancer du poumon

Figure 15. Activités thérapeutiques de l'INF α (Fauci, 1987).

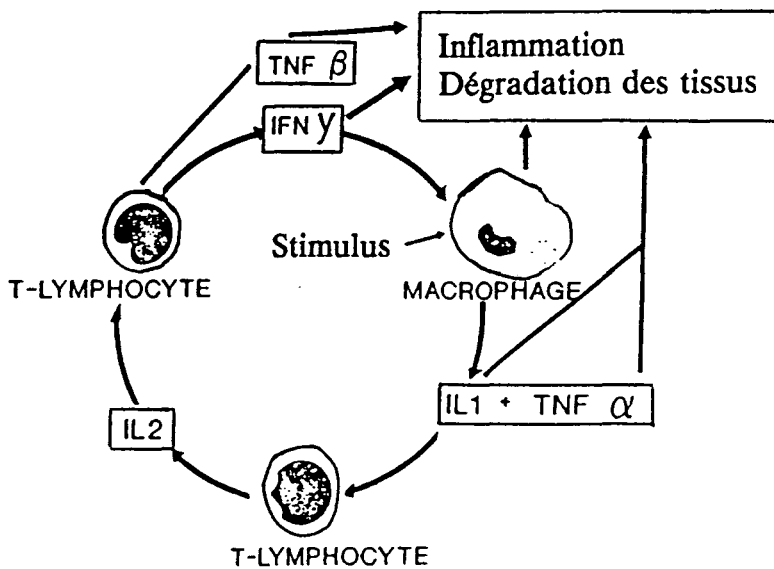


Figure 16. Rôle des cytokines dans les processus inflammatoires (Takx-Köhlen, 1992).

L'INF α , au départ, a été considéré comme la molécule idéale pour lutter contre tous les cancers. Nous savons maintenant qu'il est efficace dans de nombreux cas mais il semble nécessaire de l'utiliser en combinaison avec d'autres agents pour l'obtention d'une réduction optimale de la maladie (INF γ , interleukine, agents cytostatiques...).

L'INF γ est nettement différent des deux autres types d'interférons si l'on s'intéresse à ses propriétés antivirales, antitumorales et à ses effets immunomodulateurs. Produit par les lymphocytes stimulés, il possède des capacités immunomodulatrices beaucoup plus importantes que l'INF α ou β . Son activité antivirale est plus faible (Horohov, 1987). Beaucoup de propriétés immunomodulatrices sont confirmées *in vivo* chez l'homme. Une activation des macrophages est détectée après un traitement avec l'INF γ (Nathan, 1985). Il est aussi un élément important de la réponse inflammatoire au lipopolysaccharide (Heremans, 1989). L'INF γ a démontré une activité contre plusieurs types de tumeurs. Cependant, les taux de guérison sont faibles : jusqu'à 20 % dans le cancer du sein et de 7 à 10 % dans les mélanomes.

Dans les cas de granulomatose septique chronique, il semble être bien toléré et réduit la fréquence des épisodes infectieux (International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group, 1991).

1-6) Facteurs de nécrose tumorale (TNF)

Les facteurs de nécrose tumorale sont au nombre de deux : TNF α et β . Ils correspondent aux molécules initialement identifiées comme la cachectine produite par les monocytes et la lymphotoxine produite par les cellules T. Ils possèdent une large panoplie d'activités, concernant l'inflammation, la résistance aux maladies parasitaires, le catabolisme et la modulation des propriétés de l'endothélium vasculaire.

Le TNF α est décrit comme une substance qui provoque une nécrose des tumeurs. Il est détecté dans le sérum des animaux en contact avec le bacille de Calmette Guérin, *C. parvum* ou après une stimulation par des lipopolysaccharides bactériens (Horohov, 1987). Contrairement à l'IL-1, le TNF α ne semble pas avoir d'effet direct sur l'activation lymphocytaire. C'est un médiateur de la cachexie dans les infections chroniques et il participe aux processus inflammatoires (Figure 16). Une stimulation provoque la libération de cytokines (IL-1, TNF α) qui par leurs effets sur l'endothélium

vasculaire engendrent une inflammation, des dommages vasculaires et la coagulation. L'INF γ agit en synergie avec ces cytokines en augmentant leurs productions et leurs actions.

Le TNF β comporte des similarités structurales et fonctionnelles avec le TNF α mais son développement clinique n'est pas aussi avancé.

La toxicité du TNF limite son utilisation en cancérologie. Les essais cliniques de phase I, réalisés chez des patients souffrant de cancers avancés, entraînent des effets secondaires importants (fièvre, myalgies, hypotension). La dose requise pour un effet antitumoral est dix fois supérieure à la dose maximale tolérée. Cependant, des résultats spectaculaires sont obtenus chez des sujets atteints de mélanome, en administrant le produit par la perfusion de membres isolés (en dérivation de la circulation sanguine).

2) Les inhibiteurs biologiques

Les cytokines sont au coeur des réponses immunitaires en stimulant ou en inhibant la croissance et la différenciation des cellules immunocompétentes et en modulant la sécrétion d'autres cytokines.

Elles représentent des médiateurs importants dans des pathologies diverses et la neutralisation de leurs activités devrait représenter un bénéfice thérapeutique. Les domaines d'applications sont variés : choc septique, maladies inflammatoires, cancer, rejet de greffe.

La figure 17 représente les diverses stratégies envisageables pour moduler l'action de ces cytokines. Des anticorps, des antagonistes naturels et des récepteurs solubles sont en cours de développement.

2-1) Anticorps monoclonaux

Deux anticorps anti-endotoxine sont à l'étude : Le Centoxin[®] est une IgM qui se lie spécifiquement au lipide A des lipopolysaccharides. Les applications cliniques de cet anticorps sont limitées aux infections Gram négatives. L'anticorps monoclonal E5 d'origine murine est en cours d'expérimentation.

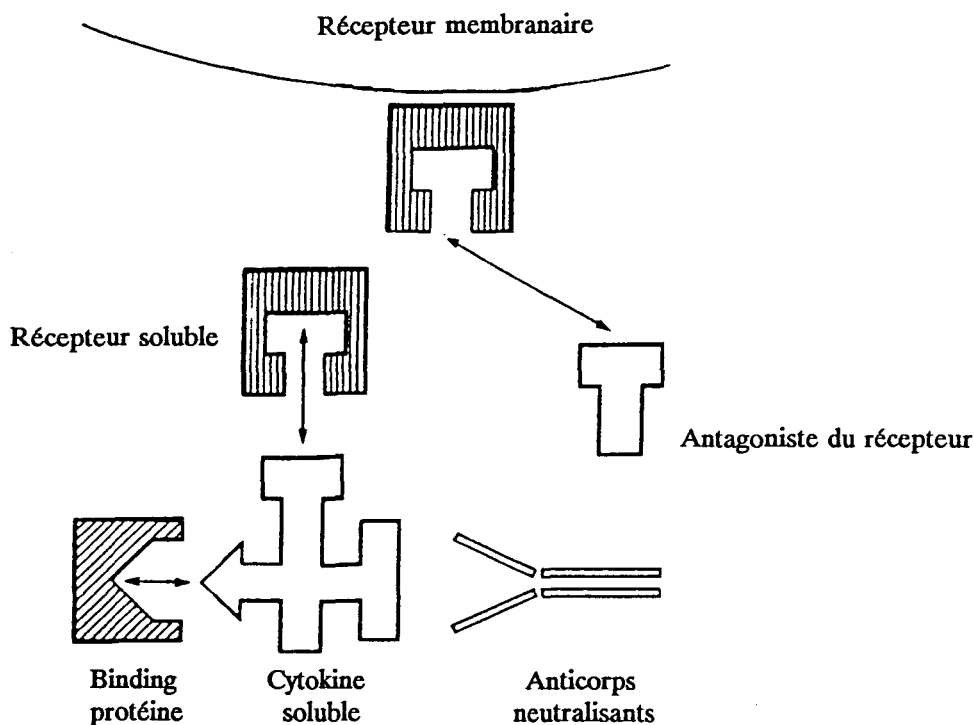


Figure 17. Les différents modes de neutralisation des cytokines (Henderson, 1992).

Les recherches se concentrent surtout sur les anticorps anti TNF et anti IL-1 car ils seraient efficaces, à la fois, dans les septicémies à bactéries Gram positives et Gram négatives. Des anticorps anti TNF ou des anticorps anti IL-1 peuvent empêcher la mort de souris, de lapins ou de singes soumis à des doses létales d'endotoxines. Un anticorps CB 00006, immunoglobuline murine de type G, dirigé contre le TNF α neutralise sa cytotoxicité. Testé chez des patients présentant un grave choc septique, son efficacité n'est pas encore définie.

Des anticorps anti IL-6 contre le cancer sont en développement. Les essais de phase I et II dans les lymphomes non hodgkiniens sont en cours d'évaluation. Les essais les plus importants sont effectués chez des malades atteints de myélome en phase terminale. Les anticorps anti IL-6 stoppent la prolifération tumorale et la masse tumorale régresse. Cependant, la maladie reprend de façon fulgurante dès l'arrêt du traitement (Dodet, 1993).

Des anticorps dirigés contre la chaîne α du récepteur de l'IL-2 pourraient constituer des agents immunosuppresseurs dans les rejets de greffe.

2-2) Récepteurs solubles et antagonistes

Ils présentent une meilleure affinité pour les cytokines que les anticorps et ne risquent pas, en principe, de déclencher une réponse immunitaire.

Dans l'arthrite rhumatoïde, les taux d'IL-1 dans les liquides synoviaux sont corrélés avec la sévérité des symptômes. L'antagoniste biologique de l'IL-1 (IL-1ra), produit par recombinaison génétique, se lie au récepteur de l'IL-1 mais ne déclenche pas les effets qui suivent la liaison avec le ligand naturel. Il réduirait l'afflux des neutrophiles au site inflammatoire et empêcherait la production par les cellules locales de protéases ou de médiateurs lipidiques. Son utilisation comme agent anti-inflammatoire est prometteur d'autant plus que récemment des chercheurs ont montré qu'il était naturellement produit par l'organisme (Thompson, 1992). Il est en cours d'essais cliniques.

Le récepteur de l'IL-1 (IL-1r), par injection intra-articulaire, est testé contre l'arthrite rhumatoïde.

Les autres inhibiteurs de la réponse biologique à l'étude et les applications thérapeutiques envisagées sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3. Inhibiteurs de cytokines à l'étude et applications thérapeutiques envisagées (Dodet, 1993).

	Société	Indications
Inhibiteur de l'IL-1		
Antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1ra)	Synergen	Septicémie, choc toxique, arthrite rhumatoïde, leucémie myéloïde, asthme, cachexie, allergies oculaires
Récepteur soluble de l'IL-1 (IL-1r)	Immunex	Allergie, arthrite rhumatoïde, leucémie myéloïde chronique, greffe, choc septique
Inhibiteur de l'IL-2		
Antagoniste de l'IL-2	Synergen Seragen	Arthrite rhumatoïde Arthrite rhumatoïde, diabète type 1, lymphomes, SIDA
Inhibiteur de l'IL-4		
Récepteur de l'IL-4	Immunex	Allergie, asthme, rejet de greffe
Inhibiteur de l'IL-5		
Récepteur de l'IL-5	Hoffmann-La Roche	Asthme
Inhibiteur de l'IL-6		
Anticorps anti IL-6	Centre de transfusion	Cancer du rein, myélome, lymphome non hodgkinien du SIDA
Inhibiteur de l'IL-7		
Récepteur de l'IL-7	Immunex	Rejet de greffe, diabète
Inhibiteur de l'IL-8		
Récepteur de l'IL-8	Repligen	Inflammation
Inhibiteur du TNF		
Anticorps monoclonaux	Chiron Centocor Knoll AG	Choc septique Choc septique Choc septique
Récepteur soluble (TNF-r)	Immunex Yeda research & development Synergen	Choc septique, perte de poids liée au cancer et au SIDA Choc toxique Maladies inflammatoires

III-III) RU 41740

A) Fabrication, structure et distribution du RU 41710

1) Process de fabrication

Le RU 41740 est un immunomodulateur d'origine bactérienne. Il est obtenu à partir de *Klebsiella pneumoniae* O₁K₂ (NCTC 5055) (Bruvier, 1980). Les différentes étapes du process de fabrication sont indiquées dans la figure 18. Après revivification de la souche, la culture est réalisée en fermenteur. En fin de phase exponentielle, la culture est bloquée par l'ajout d'un cocktail d'agents lysants et maintenue, pendant une heure, à 56°C. Les agents lysants, polysorbate 80, EDTA, chlorhydrate de lysozyme et mercurothiolate de sodium réalisent la rupture de la paroi des bactéries qui entraînent la libération de constituants cytoplasmiques. Le lysat obtenu, lyophilisé, représente le produit sous une forme grossière et les étapes qui suivent le purifie. Les lipides sont éliminés par deux extractions solide liquide, une dans l'acétone, l'autre dans le méthanol. La fraction insoluble dans le méthanol est mise en solution aqueuse et les particules insolubles sont éliminées par centrifugation. Enfin, les molécules d'un poids moléculaire supérieur à 300000 sont recueillies par diafiltration sur une membrane ultrafiltrante dont la porosité moyenne est de 0,11 micromètres. La solution est ensuite clarifiée par une centrifugation et une filtration sur une membrane de 1,2 micromètres. Le principe actif est obtenu après lyophilisation.

Souche de *Klebsiella pneumoniae*
Culture
Lyse
Lyophilisation
Extraction acétone méthanol
Centrifugation
Diafiltration
Clarification
Principe actif RU 41740

Figure 18. Process de fabrication du RU 41740.

2) Structure du principe actif

Le RU 41740 renferme environ 60 % de glucides, 26 % de protéines et une faible proportion de minéraux comme les phosphates et sulfates (Bruvier, 1983). Les 60 % de glucides totaux se décomposent en 50,18 % d'oses neutres, 8,76 % d'acides uroniques, et 1,23 % d'osamines. La chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides libérés par méthanolyse permet d'identifier le galactose, le glucose, le mannose et l'acide glucuronique.

Le traitement du principe actif par un ammonium quaternaire (bromure de cétyltriméthyl ammonium ou Cétavlon®) aboutit à l'isolement de deux fractions. Une fraction précipitante P1 qui est d'origine capsulaire. Le surnageant, après précipitation éthanolique, donne une fraction F1 provenant de la membrane externe bactérienne. Les poids moléculaires de ces deux fractions sont respectivement environ 95 Kda et 350 Kda.

2-1) La fraction P1

Cette fraction renferme 11 % de protéines et 89 % de glucides. Elle est enrichie par rapport au RU 41740, en hexoses neutres et surtout en acides uroniques qui passent de 9 à 18 %.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides trifluoro-acétylés permet de caractériser le glucose, le mannose et l'acide glucuronique. Cette fraction est constituée d'une unité de répétition tétrasaccharidique présentée figure 19 (Bruvier, 1983).

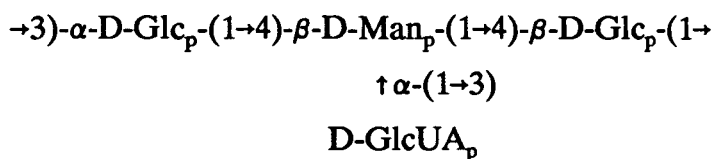


Figure 19. Unité de répétition de la fraction P1 (Bruvier, 1983).

2-2) La fraction F1

La fraction F1 renferme 33 % de protéines, 42,5 % de glucides, 5,5 % de lipides, 1,55 % de phosphates. L'analyse de la composition glucidique de cette fraction montre la présence de trois monosaccharides neutres, galactose, glucose et glycer-D-mannoheptose, d'un monosaccharide acide, l'acide 2-céto-3-deoxy-D-manno octulosonique (KDO) et de la glucosamine. Elle contient aussi des acides gras : l'acide n-tétradécanoïque, 2-hydroxytétradécanoïque, 3-hydroxytétradécanoïque, et l'acide n-hexadécanoïque. Ces éléments sont caractéristiques des lipopolysaccharides ce qui suggère que la fraction F1 est constituée du lipopolysaccharide (LPS) de *K. pneumoniae* contaminé par des protéines. Kol *et al.* en 1987 séparent le LPS des protéines contaminantes par chromatographie liquide haute performance (CLHP). La fraction obtenue, ne contient pratiquement pas de protéines (0,8 %), et dans le même temps les glucides et les lipides passent, en comparaison avec la fraction F1, respectivement de 42,5 % à 80 % et de 5,5 % à 8,5 %. La composition molaire de cette fraction LPS est déterminée par chromatographie en phase gazeuse (Tableau 4).

Tableau 4. Composition molaire de la fraction F1 et du LPS de *K. pneumoniae* (Kol, 1987).

	Rapport molaire (Glc = 1)				
Fraction	Gal	Glc	Heptose	GlcNH ₂	KDO
F1	4,6	1	1,4	0,10	0,9
LPS	4,2	1	1,2	0,18	0,8

Aucune différence significative n'est constatée dans la composition molaire des deux fractions.

L'équipe du professeur Fournet élucide la structure de la fraction polysaccharidique du LPS de *K. pneumoniae*. Cette fraction est séparée du lipide A par un traitement avec une solution d'acide acétique 1 % à 80°C pendant une heure. Le fractionnement des oligosaccharides est opérée par CLHP sur une colonne échangeuse d'anions et six fractions différentes sont obtenues (S1 à S6). La fraction S1, non retenue, contient uniquement du galactose et correspond à la chaîne latérale glucidique du LPS

(Kol *et al.*, 1989). Elle est composée de deux polymères de galactose (région 1 et 2) dont les unités de répétition ne diffèrent que par l'anométrie d'un monosaccharide. La structure 1 est liée au core du LPS par la région 2 (Figure 20).

$\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Gal}_p-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Gal}_p-(1\rightarrow$ unité de répétition 1

$\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Gal}_p-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Gal}_f-(1\rightarrow$ unité de répétition 2

$\{\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Gal}_p-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Gal}_p-(1\rightarrow\}_n-\{\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Gal}_p-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Gal}_f-(1\rightarrow\}_m\text{-Core}$

Figure 20. Structure de la chaîne O spécifique du LPS de *K. pneumoniae* (Kol, 1992).

3) Pharmacocinétique du RU 41740

L'utilisation de RU 41740 tritié montre, qu'après un traitement oral, la molécule franchit la barrière intestinale chez le rat. Le principe actif passe au travers des villosités intestinales et des plaques de Peyer. La radioactivité est essentiellement associée à de petits fragments d'un poids moléculaire inférieur à 10000 au niveau du duodénum alors que les fragments au niveau des plaques de Peyer sont de tailles plus importantes (Fortier, 1989).

Chez le singe, la radioactivité maximale est retrouvée dans la circulation une à quatre heures après l'administration de 2 mg/kg de RU 41740 par voie orale (Smets, 1988). Ensuite, la radioactivité est retrouvée principalement dans le foie puis dans les reins et les poumons.

B) Immunopharmacologie expérimentale du RU 41740

1) Les cellules phagocytaires

1-1) Les polynucléaires (PMN)

La préincubation de polymorphonucléaires humains avec le RU 41740 améliore leur capacité à ingérer des érythrocytes "coatés" d'IgG et à adhérer au plastique (Capsoni, 1988a). *In vitro*, la phagocytose de *Candida albicans* par les polynucléaires est également augmentée (Capsoni, 1988b).

Le RU 41740 augmente le métabolisme oxydatif des PMN prélevés après induction d'une réaction inflammatoire par des cristaux de pyrophosphate (Roch-Arveiller, 1987). L'augmentation de la chimioluminescence est très importante *in vitro* puisqu'elle est multipliée par un facteur de 2,5 à 5 pour une dose de 10 $\mu\text{g/ml}$.

De même, il stimule la dégranulation par libération de β glucuronidase (Minonzio, 1989).

Le RU 41740 présente un pouvoir restauratif sur l'activité des PMN.

Des PMN de rats brûlés, incubés avec le RU 41740, voient leur chimioluminescence stimulée d'une manière dose-dépendante (1 à 10 $\mu\text{g/ml}$) (Roch-Arveiller, 1987). Extraits, après un traitement par voie orale (1 à 50 mg/kg/jour pendant trois jours), les PMN montrent également un métabolisme oxydatif augmenté.

La stimulation par le N-formylmethionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) et le zymosan opsonisé des PMN de rats brûlés est diminuée si l'on s'intéresse à la production d'inositol phosphate, processus qui permet la transduction de l'information cellulaire en réponse à une stimulation. Dans le cas de PMN de rats brûlés, le RU 41740 stimule la génération d'inositol phosphate et restaure l'effet stimulant du fMLP et du zymosan opsonisé (Tissot, 1991).

Des modifications de la phagocytose et de l'adhérence induit par un corticostéroïde (méthyl prednisolone) sont réversibles *in vitro* après addition de RU 41740 (Capsoni, 1988a).

Minonzio *et al.* (1989) montrent que l'administration orale de RU 41740 à des sujets âgés est capable de restaurer les capacités phagocytaires des PMN préalablement décrites comme défectueuses. Dès la première semaine de traitement, une amélioration significative de la phagocytose de particules opsonisées est observée tant en nombre de particules phagocytées par cellule qu'en nombre de cellules phagocytant. Ensuite, la phagocytose s'améliore pour qu'il n'y ait plus de différence entre les sujets jeunes (groupe de contrôle) et les sujets âgés traités.

1-2) Les monocytes macrophages

La capture de *Saccharomyces cerevisiae* par des macrophages péritonéaux résidents de rats est augmentée par une injection de RU 41740, par voie intraveineuse, à la dose de 1 à 50 $\mu\text{g/kg}$ (Rommain, 1985).

La candidacidie et la production des superoxydes par les monocytes humains sont significativement augmentées. L'effet est dose dépendant (Nielsen, 1986).

Rajagopalan *et al.* (1987) étudient la multiplication intracellulaire de la souche virulente *Legionella pneumophila* chez les monocytes-macrophages humains traités par le RU 41740. Cette bactérie, naturellement ingérée par les macrophages et les monocytes, résiste à la destruction et même se multiplie. Après l'infection cellulaire, en présence de RU 41740, la multiplication bactérienne est inhibée. L'effet du RU 41740 est confirmé si le traitement a lieu avant l'infection.

Exposé au RU 41740, l'activité cytotoxique des monocytes est accrue (Sozzani, 1988).

Le RU 41740 n'affecte pas la migration spontanée des monocytes humains ni celle induite par le fMLP *in vitro* (Nielsen, 1986). Ceci n'exclue pas l'existence d'un effet *in vivo* via la stimulation par les monokines. En effet, l'interleukine 1 (Durum, 1985) et le TNF (Wang, 1987) possède une activité chimioattractive permettant le recrutement des phagocytes du compartiment sanguin vers le site de l'infection.

Le RU 41740 modifie le métabolisme de la lignée monocyte-macrophage. Chez les macrophages alvéolaires de rat, l'effet du RU 41740, administré par voie orale, (10 mg/kg/jour pendant 5 jours) modifie l'activité d'enzymes dégradant l'acide hyaluronique, constituant majeur du mucus. Les trois hydrolases étudiées sont : la hyaluronidase, la N-acétyl- β -D-glucosaminidase et la β -glucuronidase. Le RU 41740 augmente de 200 % l'activité des trois enzymes (Fischer-Szafarz, 1988). La stimulation affecte la forme intracellulaire de la N-acétyl- β -D-glucosaminidase et de la β -glucuronidase et la forme extracellulaire de la hyaluronidase. L'activation de ces enzymes a plusieurs conséquences : la hyaluronidase extracellulaire dégrade l'acide hyaluronique en plus petites molécules lesquelles sont phagocytées par les macrophages. Les enzymes intracellulaires stimulées complètent l'hydrolyse. Forrester et Balazs en 1980 montrent que l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire inhibe la phagocytose de macrophages péritonéaux cultivés en monocouche alors que l'acide hyaluronique de faible poids moléculaire lève cette inhibition. La dégradation de l'acide hyaluronique induite par un traitement avec le RU 41740, permettrait de restaurer les capacités phagocytaires des macrophages alvéolaires et ainsi d'augmenter la résistance contre les infections pulmonaires récurrentes.

Briend-Sutren en 1990 étudie, chez le cobaye, l'effet stimulant du RU 41740 (100 mg/kg/jour pendant 7 jours) administré par voie orale sur la machinerie des glycosidases : sialidase, β -galactosidase, β -glucuronidase et N-acétyl- β -D-glucosaminidase. Le seul changement significatif est une diminution de l'activité sialidase dans l'homogénat et dans les fluides de lavage. Les acides sialiques possèdent au niveau cellulaire une position stratégique et interviennent dans la reconnaissance cellulaire. Ainsi, un changement dans la sialylation pourrait modifier la capacité des macrophages alvéolaires à répondre à un stimulus exogène.

Par cytométrie de flux, l'effet du RU 41740 sur l'expression des récepteurs (CR1 et CR3) pour des composés du complément (respectivement C3b et C3bi) est étudié. Ces récepteurs sont essentiels pour les fonctions des phagocytes dépendantes de l'adhésion comme la phagocytose, l'aggrégation et le chimiotactisme (Unkless, 1988). Des stimuli comme l'ionophore A23187, le TNF et le GM-CSF augmentent cette expression. L'incubation de sang total avec le RU 41740 provoque une augmentation dose dépendante de l'expression des récepteurs CR1 et CR3 chez les monocytes (Capsoni, 1991). Une stimulation est observée de 0,01 μ g/ml jusqu'à 10 μ g/ml. Ces concentrations sont en parfait accord avec celles reportées pour la stimulation de la phagocytose chez les monocytes.

2) Les lymphocytes

2-1) Les lymphocytes B

Le RU 41740 est un activateur des lymphocytes B murins (Guenounou, 1984). Il induit la transformation blastique de cellules spléniques de souris normales et athymiques.

In vivo, il augmente le nombre de cellules produisant des anticorps anti-ovalbumine, anti-sérum albumine ou anti-globules rouges de mouton chez la souris (Griscelli, 1982).

Le RU 41740 active la sécrétion des immunoglobulines par les cellules B humaines de rate et du sang périphérique *in vitro*. Dans le cas du RU 41740, le phénomène semble être T dépendant quand les cellules sont obtenues du sang périphérique et indépendant des cellules T quand les lymphocytes proviennent de la rate. La stimulation optimale est obtenue pour une concentration en RU 41740 de 200 μ g/ml (Martinez-Maza, 1985).

2-2) Les lymphocytes T

Le RU 41740 augmente les réactions d'hypersensibilité retardée à l'ovalbumine ou au dichlorobenzène chez le porc et le cobaye (Takada, 1982). Il restaure l'hypersensibilité retardée de patients cancéreux (Lang, 1980 ; Lang, 1986).

Le RU 41740 n'a pas d'effet stimulant sur des cellules T purifiées. Il ne stimule pas l'incorporation de thymidine tritiée de thymocytes de souris. Il n'augmente la réponse aux mitogènes des lymphocytes T qu'en présence de cellules accessoires (Wood, 1985).

En présence de RU 41740, la cytotoxicité des lymphocytes humains est augmentée. Cette activité est largement dépendante de la présence des monocytes (Viland, 1987a ; Viland 1987b). La cytotoxicité des lymphocytes est améliorée par des facteurs contenus dans les surnageants de culture de monocytes exposés au RU 41740. Ces facteurs sont différents de l'IL-2 et des interférons α et γ . Il est possible que le RU 41740 active le métabolisme de l'acide arachidonique des monocytes donnant naissance à des métabolites qui augmentent la cytotoxicité spontanée des lymphocytes.

2-3) Les cellules NK

Une administration du principe actif par voie intrapéritonéale ou orale provoque une augmentation marquée, localisée principalement dans le poumon, de la cytotoxicité NK vis à vis des cellules cibles YAC-1. Lors d'un traitement par voie intrapéritonéale à la dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, l'activité mise en évidence est durable : elle débute seulement après 24 heures, atteint son maximum après 48 heures et elle est toujours supérieure à celle du groupe témoin après 10 jours (Sozzani, 1986).

Le RU 41740 est également capable d'augmenter, *in vitro* en présence d'IL-2 recombinante, la génération de cellules NK en agissant sur les précurseurs de la moëlle osseuse (Migliorati, 1989).

L'interféron qui joue un rôle majeur dans le contrôle de l'activité NK (Timonen, 1982), ne semble pas intervenir dans la progression de l'activité cytotoxique induite par le RU 41740. Elle se réalise sans augmentation du taux d'interféron du sérum (Sozzani, 1986).

3) Production de cytokines

Le RU 41740 agit préférentiellement sur les cellules phagocytaires et augmentent de ce fait bon nombre de facteurs produits par ces cellules.

3-1) Production d'interleukine 1 (IL-1)

En présence de RU 41740 (25 µg/ml), les macrophages de souris et les cellules mononucléaires adhérentes humaines sécrètent de l'IL-1 (Guenounou, 1985).

Chez le singe, l'administration de RU 41740 par voie orale à la dose de 10 ou 50 mg/kg pendant trois ou quatre jours, provoque la synthèse d'IL-1. Elle est détectable dans le sérum après quatre à cinq jours (Guenounou, 1987).

Sous l'effet du RU 41740, les cellules NK humaines produisent de l'IL-1 (Herman, 1986).

3-2) Production de facteur de nécrose tumorale (TNF)

Exposés à 1 ng/ml de RU 41740 pendant six heures, les monocytes humains présentent une activité cytotoxique accrue contre les cellules WEHI 164 (cellules de fibrosarcome de souris sensibles au TNF). Une augmentation rapide du TNF, médiateur de la cytotoxicité NK est observée (Sozzani, 1988).

3-3) Production de facteur stimulant les colonies (CSF)

Les facteurs de croissance sont des composés capables de stimuler la formation de colonies *in vitro* à partir de précurseurs hématopoïétiques.

Andreux *et al.* en 1985 démontrent qu'il y a une stimulation de la granulopoïèse chez la souris recevant un traitement par le RU 41740. Administré par voie intrapéritonéale pendant dix jours, il augmente le taux de granulocytes, de monocytes et de leurs cellules souches dans la moëlle osseuse et dans la rate (Andreux, 1986). De plus, on observe dans le sérum, des CSF en quantité proportionnelle à la dose de RU 41740 administrée. Il est aussi intéressant de signaler que les fibroblastes qui relarguent des CSF apparaissent en

nombre plus important dans les cultures de cellules de moëlle osseuse et de rate prélevées de souris traitées par le principe actif.

La reconstitution hématopoïétique après une irradiation est un phénomène lent et progressif. Dix jours après l'irradiation, l'augmentation des cellules souches est plus importante chez les souris traitées au RU 41740 (10 mg/kg/j pendant cinq jours). Si le traitement est administré avant l'irradiation, les résultats sont encore plus favorables (Rezzoug, 1988 ; Rezzoug, 1990).

Ces résultats suggèrent un effet radioprotecteur du RU 41740.

La meilleure résistance aux infections observée chez les animaux traités serait, en partie, due à l'effet stimulant du RU 41740 sur les cellules souches.

3-4) Production de prostaglandines

Le RU 41740 améliore, *in vivo*, la guérison des blessures chez le rat et l'homme. *In vitro* à 5 µg/ml, il induit la prolifération des fibroblastes embryonnaires de souris et augmente la production de PGE₂, de 6 céto PGF_{1α} et à un moindre taux de PGF_{2α}. Ce sont des composés qui appartiennent au métabolisme de l'acide arachidonique (Figure 21). La stimulation de la production de prostaglandines est également observée chez des cellules phagocytaires thymiques (Durant, 1985a ; Durant, 1985b ; Durant, 1986a ; Durant, 1986b ; Homo-Delarche, 1986).

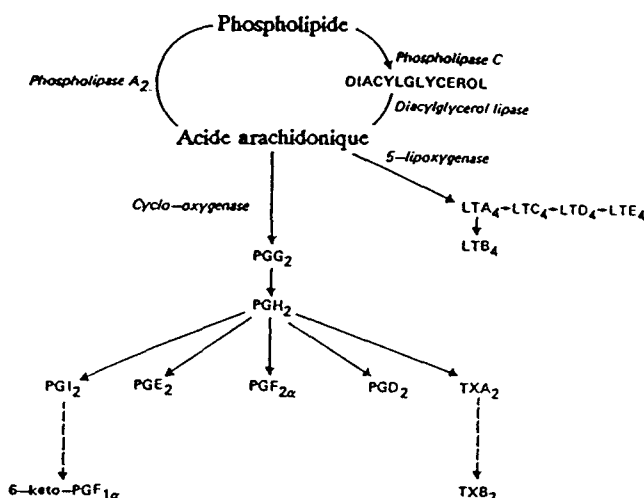


Figure 21. Métabolisme de production d'eicosanoïdes à partir des phospholipides membranaires (d'après Pettipher, 1992). PG = prostaglandines ; TX = thromboxane ; LT = leucotriène.

Les prostaglandines ne sont pas sans influence sur la modulation de la réponse immunitaire induite par le RU 41740. Les réponses mitogéniques de lymphocytes de sang humain au RU 41740 sont plus faibles dans des préparations non purifiées car les monocytes sécrètent des agents immunosuppresseurs (Viland, 1988 ; Blomgren, 1991). Les inhibiteurs de la cyclooxygénase qui diminuent la biosynthèse des prostaglandines, peuvent partiellement bloquer la suppression induite par le RU 41740. Ainsi, les monocytes humains exposés au RU 41740 libèrent des facteurs immunosuppresseurs semblables aux prostaglandines qui immunodépriment les lymphocytes.

4) Action aux cours d'infections expérimentales

Ce modèle d'étude permet d'évaluer, *in vivo*, le rôle d'un immunomodulateur.

Dans les infections bactériennes, l'administration parentérale de RU 41740 protège les souris contre une grande variété de micro-organismes à développement extracellulaire (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) et à développement intracellulaire (*Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*). Par voie orale, il protège également contre *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Listeria monocytogenes* (Griscelli, 1982 ; Zalisz, 1983).

Le RU 41740 protège les souris contre les infections virales dues aux virus de l'influenza et à celui de l'encéphalomyélocardite (Rudent, 1985). Dans le cas d'une infection au virus de l'influenza, les souris traitées par le RU 41740, en aérosol à la dose de 10 mg/kg tous les jours pendant cinq jours, montrent une mortalité réduite qui s'accompagne de lésions pulmonaires diminuées et d'un titre viral pulmonaire plus faible.

Administré par voie intrapéritonéale, un jour avant l'infection, le RU 41740 protège les souris contre une infection à *Candida albicans*. Par voie orale, le temps de survie est augmenté si le RU 41740 est administré pendant cinq jours avant l'infection à la dose de 10 mg/kg (Smets, 1987).

Chez le porc infecté par *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Bacille du rouget), le RU 41740 augmente la capacité de résistance des animaux (Laval, 1985).

L'administration par voie intrapéritonéale de RU 41740 quatre jours avant une infection par *Mycoplasma arthritidis* et poursuivie pendant dix jours un jour sur deux réduit le développement de l'arthrite chez la souris. Cet effet est dose dépendant (Kaklamani, 1991).

De plus, le RU 41740 administré par voie intrapéritonéale ou orale agit en synergie avec l'ampicilline pour combattre des infections à *Staphylococcus aureus* et à *Listeria monocytogenes* (Brossard, 1983). Cet effet est observé aussi bien en traitement préventif que curatif.

Enfin, le RU 41710 protège des souris immunodéprimées par la cyclophosphamide à l'égard d'une infection à *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Klebsiella pneumoniae*.

C) Essais thérapeutiques chez l'homme

Une étude réalisée sur 2997 patients évalue l'efficacité thérapeutique du RU 41740 dans les infections aiguës récidivantes du tractus respiratoire : bronchites et affections de la sphère ORL. Le RU 41740 est administré durant trois périodes d'une semaine, séparées de deux semaines de repos thérapeutique. Un antibiotique est associé au traitement durant la première semaine. Dans les affections aiguës, les résultats sont bons et excellents dans 60 % des cas durant la première semaine de traitement. L'activité du RU 41740 contre les récurrences est mise en évidence dans 75 % des patients après les trois mois qui suivent le traitement initial (Bouvier).

Dans un essai multicentrique, chez des patients présentant une bronchopneumopathie chronique, une diminution significative du nombre d'épisodes infectieux chez les patients à haut risque est observée. Dans un groupe de malades atteints de bronchite chronique simple, il n'y a pas de différence significative entre le groupe traité et le groupe placebo (Anthoine, 1985).

Sur une période de neuf mois, la durée des épisodes infectieux et du traitement antibiothérapeutique diminue chez les patients recevant du RU 41740 (Viallat, 1983). Cet effet est également observé chez des enfants atteints par la mucoviscidose, maladie héréditaire autosomale récessive (Lenoir, 1991). Cette action thérapeutique semble due à l'augmentation des fonctions phagocytaires des monocytes et neutrophiles. La candidacidie est améliorée (Fietta, 1988 ; Fietta, 1992).

Le RU 41740 administré (à la dose de 8 mg par jour pendant 14 jours) à des patients atteints de maladie de Hodgkin ou de lymphome non hodgkinien, permet de restaurer, de façon significative, l'hypersensibilité cutanée retardée obtenue en utilisant un Multitest® (Lang, 1980 ; Lang, 1986). Des traitements de 2 ou de 32 mg sont inefficaces.

D) Tolérance et toxicité

Dans les essais cliniques décrits dans le paragraphe précédent, aucun effet secondaire sérieux n'est observé. Sur les 2997 malades suivis dans la première étude (Bouvier) 2,2 % des patients ont présenté une intolérance, essentiellement digestive, qui a motivé un arrêt du traitement.

Dans un autre essai étudiant l'efficacité du RU 41740 dans la prévention des infections ORL et respiratoires récidivantes de l'enfant (effectif 122), 7 enfants ont présenté une intolérance contre 2 dans le groupe placebo. Les effets secondaires sont, comme chez l'adulte, de nature digestive.

La tolérance immunobiologique est également satisfaisante. Chez l'adulte et chez l'enfant, aucun symptôme clinique évocateur d'une perturbation immunologique n'est signalé. La vitesse de sédimentation, la teneur en immunoglobulines A, E, M, G, les facteurs antinucléaires, la sérologie rhumatoïde et les anticorps antiérythrocytaires ne montrent aucune variation pathologique significative avant et après le traitement (Viallat, 1983 ; Griscelli, 1982). De plus, chez des sujets allergiques, l'évolution des IgE et de l'éosinophilie sanguine s'est révélée indépendante du traitement.

E) Activités des sous-fractions du RU 41740

Le RU 41740 est composé de deux sous-fractions : la fraction acide P1 et la fraction neutre F1. Différents auteurs étudient les rôles biologiques de ces deux fractions. Pour déterminer si une activité biologique du RU 41740 est due à la présence dans la fraction F1 du LPS de *K. pneumoniae*, ils utilisent des souris insensibles aux effets du LPS (C3H/HeJ) ou de la polymyxine B, un antibiotique qui inhibe les effets induits par les endotoxines (Jacobs and Morisson, 1977).

Comme le RU 41740, la fraction F1 :

- augmente l'activation polyclonale induite par le Pokeweed mitogen et la production d'anticorps spécifiques au mannane, polysaccharide extrait de la paroi de *Candida albicans* (Durandy, 1988).
- augmente la cytotoxicité spontanée des lymphocytes (Viland, 1987a).
- stimule la synthèse, par les monocytes, d'agents immunosuppresseurs pour les

lymphocytes (Viland, 1988).

- protège les souris contre une infection au virus de l'influenza (Rudent, 1985).
- possède un effet radioprotecteur.

La fraction P1 possède un effet radioprotecteur (Rezzoug, 1990). La polymyxine B ne modifie pas l'expression des récepteurs CR1 et CR3 sur les monocytes et les neutrophiles (Capsoni, 1991).

Enfin, les fractions P1, F1, RU 41740 et le LPS de *K. pneumoniae* sont mitogéniques pour les cellules B. La fraction F1 est active à des doses inférieures à 10 µg/ml alors que l'activité des fractions P1, RU 41740 et LPS est maximum à des doses plus élevées (entre 10 et 50 µg/ml). L'activité mitogénique est conservée pour la fraction RU 41740 et P1 lorsque l'on utilise des cellules de souris C3H/HeJ ou de la polymyxine B. Dans ces conditions, les activités de la fraction F1 et du LPS de *K. pneumoniae* sont fortement réduites. Les résultats sont identiques lorsque l'on s'intéresse à la production d'IL-1 et de TNF par les macrophages (Vacheron, 1989). Le RU 41740, la fraction F1 et le complexe F1-P1 augmentent l'explosion oxydative des PMN stimulés par le zymosan opsonisé, le fMLP, le phorbolmyristate acétate (PMA) et l'ionophore A23187. La fraction P1 n'a pas d'effet. De la même façon, la libération de la β-glucuronidase est stimulée par les mêmes composés quand le zymosan et le fLMP sont utilisés comme stimuli. Ces effets sont dépendants de la dose (El Abbouyi, 1989). L'addition de polymyxine B provoque une inhibition profonde des effets de la fraction F1 et du LPS et une inhibition partielle de ceux du RU 41740.

Les sous-fractions du RU 41740 agissent sur les lymphocytes, sur les cellules phagocytaires et sur les cellules souches. Aucune famille cellulaire ne semble être stimulée exclusivement par les fractions P1 ou F1.

La fraction F1 agit par un mécanisme identique au LPS, la fraction P1 par un mécanisme non identifié. Ainsi, de mêmes effets biologiques sont produits par des voies différentes et ces deux fractions agissent en synergie dans le principe actif.

En résumé, le RU 41740 est un complexe glycoprotéique immunostimulant aux points d'impacts multiples. A côté de son action sur la première ligne de défense de l'organisme que forment polynucléaires et macrophages, il augmente la réponse anticorps en potentialisant la coopération et le recrutement des lymphocytes B et T. Il possède aussi une action sur le système hématopoïétique.

A son contact, les cellules produisent des cytokines dont la libération participera au développement d'une réponse immunitaire optimale. Cette production de cytokines est probablement l'élément fondamental qui confère au RU 41740 son caractère immunomodulateur.

IV - Matériel et Méthodes

IV-I) Etudes réalisées sur l'automate de microbiologie Malthus 2000

A) Matériel

1) Matériel biologique

1-1) Micro-organismes

Les différents micro-organismes utilisés au cours des expériences sont énumérés dans le tableau 5.

Tableau 5. Liste des souches utilisées.

Micro-organismes	Références	Test
<i>Escherichia coli</i>	CIP 52167	Clearance bactérienne suivie par conductance-métrie
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	Activité d'un sérum anti RU 41740 suivie par conductance-métrie
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 5055	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CIP 69.2	
<i>Candida albicans</i>	CIP 884.65	

CIP : Collection Institut Pasteur, ATCC : American Type Culture Collection, NCTC : National Collection of Type Cultures.

Conservation des souches

Tous les micro-organismes utilisés sont conservés en azote liquide.

Préparation des souches conservées en azote liquide

Les micro-organismes sont revivifiés par mise en culture en milieu liquide des souches lyophilisées. Après 18 heures de culture à 37°C pour les bactéries et 25°C pour les levures, les micro-organismes sont repiqués sur milieux gélosés. Ils sont ensuite récoltés et mis en suspension dans un bouillon approprié. Une solution cryoprotectrice de glycérol à 20 % (m/v) est ajoutée en quantité égale (v/v) à la suspension initiale. Après quinze minutes d'homogénéisation et de pénétration de la substance cryoprotectrice dans les cellules, la suspension bactérienne est répartie en cryotubes. Ceux-ci sont alors placés

pendant 24 heures à -80°C puis conservés en azote liquide. Lors de l'utilisation, la décongélation doit être rapide. La concentration bactérienne de chaque "pool" est déterminée par dénombrement sur boîtes de Petri.

1-2) Animaux

Des souris femelles Swiss de six à huit semaines pesant de 18 à 20 grammes (Iffa Credo (Lyon)) sont utilisées. Elles sont placées dans l'animalerie où elles reçoivent nourriture et eau *ad libitum*.

2) Matériel impédimétrique

Les charges bactériennes sont analysées par l'automate de microbiologie Malthus 2000 (Malthus Instrument Ltd., Crawley UK). Cet appareil mesure, au cours de la croissance bactérienne, les propriétés électriques (conductance) du milieu de culture et définit un temps de détection (Td) qui est inversement proportionnel à la charge bactérienne présente dans la cellule Malthus.

2-1) Description générale de l'appareil

L'automate est constitué d'incubateur(s), de cellules de mesure, et d'une partie informatique.

2-1-1) Cellules

La cellule de mesure comprend : un tube de verre d'une contenance de 7 ml ou 10 ml, un capuchon, un joint et un support d'électrodes en céramique. Les électrodes sont constituées chacune d'un dépôt de platine, le tout recouvert d'un vernis céramique, excepté aux extrémités.

Il existe deux types de détection : la conductance directe et indirecte (Figure 22). En conductance directe, les électrodes plongent dans le milieu de culture. En conductance indirecte, un septum sépare le milieu de culture d'une solution de potasse dans laquelle plongent les électrodes. Ce sont les variations de conductance de cette solution d'hydroxyde de potassium qui sont mesurées par l'automate.

2-1-2) Incubateur

L'incubateur comprend un bain-marie finement régulé en température ($\pm 0,006^{\circ}\text{C}$) et une unité de mesure. La gamme de température disponible va de $+5^{\circ}\text{C}$ à $+56^{\circ}\text{C}$.

La mesure de conductance est relevée automatiquement toutes les 6 minutes (un "scan"). Ces valeurs sont stockées en mémoire dans la partie mesure de l'incubateur et transmises à un ordinateur PC. Un progiciel traite et analyse les données.

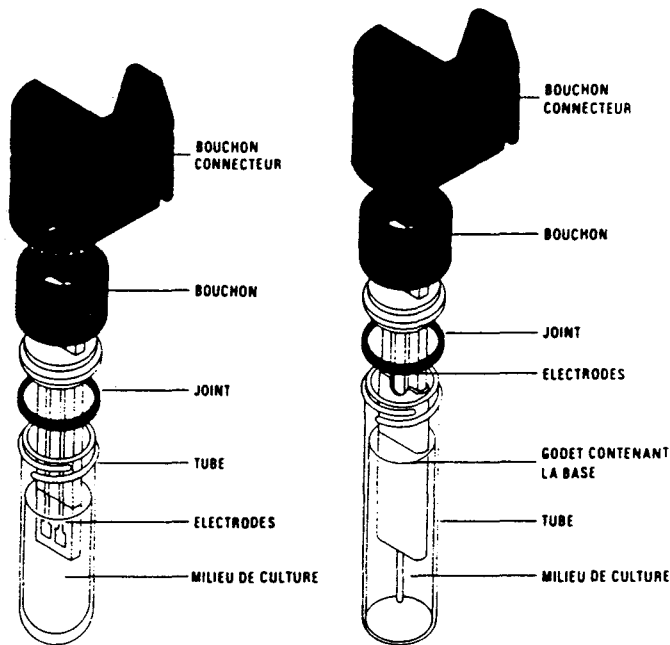


Figure 22. Cellules Malthus (détection directe et indirecte).

2-2) Traitement des données

Le système relève les variations de conductance au cours du temps. La valeur initiale (G_0) est considérée comme valeur référence. Toute mesure de conductance sera ensuite retranchée à cette valeur.

Les trois premières lectures de conductance de chaque analyse ne sont pas prises en compte par le système. Elles correspondent au temps minimal nécessaire à la

stabilisation de la température dans les cellules (Scan number).

Le temps de détection est calculé à l'aide d'un algorithme de calcul (Figure 23). Cet algorithme est fondé sur les cinétiques de conductance et tient compte de trois paramètres seuils exprimés en microSiemens (μS) qui sont :

- le seuil de ligne de base "base level",
- le seuil de première différence "first difference",
- le seuil de deuxième différence "second difference".

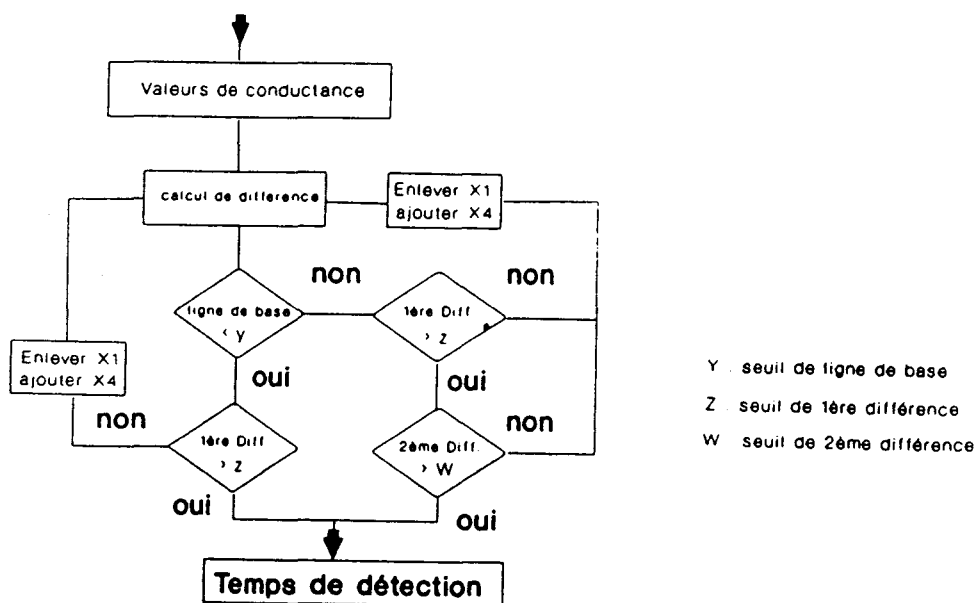


Figure 23. Algorithme de détection du système Malthus.

L'appareil, entre les mesures, effectue des calculs de différence. La différence entre les valeurs de conductance définit la "première différence" et la différence entre les valeurs successives de premières différences définit la valeur de "deuxième différence".

Le temps de détection (temps pour lequel il y a une variation significative de conductance) est déterminé lorsque les valeurs seuils sont atteintes ou dépassées.

Pour qu'il y ait détection deux possibilités sont envisagées :

- absence de ligne de base,
- présence d'une ligne de base.

La ligne de base est définie lorsque trois valeurs consécutives de première différence sont inférieures au seuil de ligne de base. En présence d'une ligne de base, le temps de détection est obtenu lorsque trois premières différences consécutives sont supérieures au seuil de première différence. En l'absence de ligne de base, la détection n'aura lieu que si trois valeurs de premières différences consécutives sont supérieures au seuil de première différence et si les trois valeurs de deuxième différence correspondantes sont supérieures au seuil de deuxième différence.

Le système de traitement des données calcule le temps de détection à partir de paramètres seuils fixés (paramètres par défaut) :

- nombre de scan 3,
- seuil de première différence 0,8 μ S,
- seuil de deuxième différence 0,1 μ S,
- seuil de ligne de base 0,6 μ S.

Ces paramètres peuvent être ajustés par retraitement de données.

B) Milieux de culture et solutions

1) Composition et préparation des milieux

1-1) Milieux gélosés

Le dénombrement sur boîtes de Petri de *C. albicans* s'effectue sur de la gélose Sabouraud (bioMérieux). Sa composition est la suivante :

Peptones de viande et de caséine	10 g/l,
Glucose monohydraté	20 g/l,
Gélose	15 g/l,
pH = 5,6 \pm 0,2 à 25°C.	

Dissoudre 45 g de poudre lyophilisée dans un litre d'eau distillée et autoclaver à 115°C pendant 20 minutes.

Le dénombrement sur boîtes de Petri de *S. pneumoniae* s'effectue sur de la gélose Columbia (Diagnostics Pasteur) supplémentée avec 5% de sang. Sa composition est la suivante :

Mélange spécial de peptones	23 g/l,
Amidon	1 g/l,
Chlorure de sodium	5 g/l,
Agar	10 g/l,
pH = 7,3 ± 0,2.	

Les autres bactéries sont dénombrées sur de la gélose nutritive (Diagnostics Pasteur). Sa composition est :

Peptone	5,0 g/l,
Extrait de viande	1,0 g/l,
Extrait de levure	2,5 g/l,
Chlorure de sodium	5,0 g/l,
Agar	15,0 g/l,
pH = 7,3 ± 0,2 à 25°C.	

1-2) Milieux liquides

L'analyse conductance-métrique de la croissance de *S. aureus*, *S. typhimurium* et *E. coli* est réalisée avec le milieu Spye pour "Special Peptone Yeast Extract" (Malthus). Sa composition est confidentielle.

Dissoudre 37,5 g du milieu en poudre dans 1 litre d'eau distillée et stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

La détection de la croissance *C. albicans*, par conductance-métrie indirecte, est réalisée sur le milieu Sabouraud (bioMérieux). Sa composition est la suivante :

Peptone pancréatique de caséine	5 g/l,
Peptone pepsique de viande	5 g/l,
Glucose monohydraté	20 g/l,
pH = 5,6 ± 0,2 à 25°C.	

Peser 30 g de poudre déshydratée de milieu Sabouraud pour un litre d'eau distillée. Autoclaver à 118°C pendant 15 minutes.

Différents milieux de culture sont testés pour suivre la croissance de *S. pneumoniae* par conductance-métrie.

* Bouillon Trypcase soja (bioMérieux) de composition :

Peptone pancréatique de caséine	17,0 g/l,
Peptone papainique de soja	3,0 g/l,
Chlorure de sodium	5,0 g/l,
Phosphate dipotassique	2,5 g/l,
Glucose	2,5 g/l,
pH = 7,3 ± 0,1 à 25°C.	

Dissoudre 30 g de poudre prête à l'emploi dans un litre d'eau distillée et stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

* Milieu spécifique au pneumocoque (Diagnostics Pasteur) de composition :

Macération de viande (1 kg/l)	500 ml,
Eau distillée stérile	500 ml,
Peptone trypsique de viande	10 g,
Peptone pepsique de viande	10 g,
Chlorure de sodium	5 g,
Phosphate monopotassique	0,70 g,
Phosphate disodique	8,3 g,
Glucose	4 g,
pH = 7,3 ± 0,2.	

* Milieu Columbia Broth (Malthus) dont la composition est confidentielle.

Dissoudre 32 g du milieu en poudre dans 1 litre d'eau distillée et stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

Différents milieux de culture sont testés pour suivre la croissance de *K. pneumoniae* par conductance-métrie.

* Milieu Enterobacteriaceae (Malthus) dont la composition est confidentielle.

Dissoudre 14,5 g du milieu en poudre dans 1 litre d'eau distillée et stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

* Milieu Neutralized soja (Malthus) dont la composition est confidentielle.

Dissoudre 14,5 g du milieu en poudre dans 1 litre d'eau distillée et stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

* Milieu Spye et Columbia broth déjà cités.

2) Autres réactifs

La liste et l'origine des réactifs sont présentées dans le tableau 6.

Tableau 6. Liste des réactifs utilisés.

Réactif	Source
Bleu de Coomassie	Pharmacia
Agarose	Pharmacia
Diéthylmalonylurée sodée	Prolabo
Diéthylmalonylurée	Prolabo
Alcool éthylique	Prolabo
Chlorure de sodium	Prolabo
Acide acétique	Prolabo
Bicarbonate sodique	Prolabo
Hydroxyde de potassium	Sigma
Glycérol	Roussel Uclaf
Muramyl dipeptide	Sigma

C) Méthodes

1) Méthodes communes aux tests épuration bactérienne et suivi de l'activité d'un sérum anti RU 41740

1-1) Traitement des animaux

Une solution mère de principe actif (MDP, RU 41740) à la concentration de 1 mg/ml est préparée dans l'eau distillée stérile. Elle est maintenue une nuit à 4°C. Elle est amenée à la concentration appropriée dans de l'eau physiologique stérile (Diagnostics Pasteur) et injectée aux animaux.

Lorsque le traitement par un principe actif est effectué à une dose supérieure ou égale à la dose de 25 mg/kg (RU 41740, Stimugène®), la solution est réalisée directement dans l'eau physiologique stérile et injectée telle quelle.

1-2) Droite de corrélation

Elles sont établies pour définir la relation existante entre le temps de détection donné par l'automate et la concentration bactérienne présente dans la cellule Malthus. Des gammes de concentrations bactériennes sont analysées à la fois par l'automate Malthus et par dénombrement sur boîtes de Petri. Les temps de détection et les concentrations bactériennes correspondantes obtenues sont analysés par régression linéaire et une droite de corrélation est définie.

Pour le suivi de l'activité d'un sérum anti RU 41740, ce sont des mélanges sérum, suspension bactérienne et milieu de culture qui sont analysés simultanément par la technique conductance-métrique et la technique de dénombrement sur boîtes de Petri. Les droites de corrélation sont définies pour *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *S. typhimurium* et *C. albicans*. Pour déterminer le milieu le plus favorable à la détection de la croissance *K. pneumoniae*, des droites de corrélation sont établies dans quatre milieux : les milieux Enterobacteriaceae, Columbia, Neutralized soja et Spye.

Dans le cas de la clearance bactérienne, différentes suspensions de germes sont injectées aux souris par voie intraveineuse. Après prélèvement et traitement du sang (Cf protocole clearance bactérienne) ce sont des mélanges sang, eau distillée et milieu de culture qui sont analysés par les deux techniques de dénombrement.

2) Test d'épuration bactérienne

2-1) Principe

Ce travail met en évidence, *in vivo*, la stimulation de la phagocytose par le RU 41740. Les souris sont traitées par un immunomodulateur par voie intrapéritonéale et parallèlement des animaux témoins reçoivent de l'eau physiologique. Les effectifs de chaque groupe sont de cinq animaux.

A J=0, par voie intraveineuse, les souris traitées et témoins reçoivent 0,2 millilitre d'une suspension bactérienne.

Le sang est ensuite prélevé par ponction intracardiaque à l'aide de seringues héparinées. 2 millilitres d'eau distillée stérile sont ajoutés et lysent les cellules sanguines. Enfin, on ajoute 2,5 millilitres de milieu Spye deux fois concentré (solution de 65 g/l). Les 0,5 millilitre de sang sont dilués dix fois : d'abord au cinquième dans l'eau distillée stérile puis au demi dans le milieu de culture Spye.

La teneur en germes du mélange sang/eau distillée/Spye des deux groupes est déterminée par conductance-métrie de la manière suivante : deux millilitres du mélange sont introduits dans la cellule Malthus. Deux cellules sont préparées par souris et incubées à 37°C. La mesure de la conductance est enregistrée. Le système de traitement des données calcule le temps de détection à partir de paramètres seuils suivants :

- nombre de scan 5,
- seuil de première différence 3,4 μ S,
- seuil de deuxième différence 0,2 μ S,
- seuil de ligne de base 3 μ S.

Les temps de détection de chaque groupe sont relevés et moyennés (n = 10). Un ΔTd est calculé : $\Delta Td = Td_{\text{Traité}} - Td_{\text{Témoin}}$.

L'intensité de la stimulation est également évaluée par le calcul d'un pourcentage d'épuration.

$$\% \text{ épuration} = \frac{((C \text{ germes})_{\text{Témoins}} - (C \text{ germes})_{\text{Traités}}) \times 100}{(C \text{ germes})_{\text{Témoins}}}$$

C germes = concentration en germes par millilitre

Le calcul du pourcentage d'épuration, nécessite de disposer des concentrations bactériennes présentes dans les différentes cellules. Elles sont obtenues en utilisant la droite de corrélation qui convertit les temps de détection moyens de chaque groupe en leurs concentrations en germes moyennes correspondantes.

2-2) Test d'épuration de particules de carbone

Le test d'épuration bactérienne est comparé au test d'épuration de particules de carbone décrit par Biozzi (1955).

Après traitement, les animaux reçoivent à J=0, 0,2 millilitre d'une suspension de particules de carbone (16 mg/ml) par voie intraveineuse. Après huit minutes, les animaux sont décapités et des fractions de 0,1 millilitre de sang sont recueillies. Les échantillons sanguins sont hémolysés dans 2,5 millilitres de carbonate disodique 0,1 M et les concentrations sanguines de particules de carbone sont déterminées par mesure de l'absorbance à 650 nm. Le pourcentage d'épuration est défini par le calcul suivant :

$$\frac{((\text{DO})_{\text{Groupe Témoin}} - (\text{DO})_{\text{Groupe Traité}}) \times 100}{(\text{DO})_{\text{Groupe Témoin}}}$$

3) Suivi de l'activité d'un sérum anti RU 41740 par conductance-métrie

3-1) Principe

Cette étude suit l'activité d'un sérum anti RU 41740 sur la croissance bactérienne.

Les animaux reçoivent un traitement par le RU 41740 à J-6 et J-2. Les voies intrapéritonéale, intraveineuse et orale sont testées. Des doses de 250 µg/kg à 25 mg/kg sont étudiées. Parallèlement, un groupe témoin est traité, dans les mêmes conditions, avec de l'eau physiologique. L'effectif de chaque groupe est de dix souris.

A J=0, les souris sont saignées par ponction intracardiaque à l'aide de seringues non héparinées et les prélèvements de chaque groupe sont rassemblés.

Les sérums sont préparés de la manière suivante : après un maintien pendant une nuit à 4°C, les sangs sont centrifugés (5000 tr/min, 30 minutes) puis filtrés sur une membrane de 0,22 µm (Millipore).

Le tableau 7 indique la composition du milieu réactionnel en fonction de la dilution sérique étudiée. Six cellules Malthus de 1,5 millilitres sont préparées à partir des dix millilitres de milieu réactionnel. Elles sont introduites dans l'incubateur Malthus et la mesure de la conductance est enregistrée. Pour *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* et *S. pneumoniae*, l'incubation se fait à 37°C dans des cellules classiques. Pour *C. albicans*, l'incubation est réalisée à 25°C dans des cellules à CO₂ (conductance indirecte).

Tableau 7. Composition des suspensions bactériennes en fonction de la dilution sérique. Les volumes en millilitre des différents composants du milieu réactionnel sont reportés.

Composants du milieu	Facteur de dilution						
	2,5	5	6,67	7,33	10	50	100
Milieu de culture	5	5	5	5	5	5	5
Sérum	4	2	1,5	1,36	1	0,2	0,1
Suspension bactérienne	1	1	1	1	1	1	1
Eau distillée stérile	0	2	2,5	2,64	3	3,8	3,9

Le système de traitement des données calcule le temps de détection à partir de paramètres seuils fixés. Pour la détection des germes *C. albicans* et *S. pneumoniae* les paramètres par défaut sont utilisés.

Pour *K. pneumoniae* et *S. typhimurium* ils sont :

- nombre de scan 5,
- seuil de première différence 3,4 μ S,
- seuil de deuxième différence 0,2 μ S,
- seuil de ligne de base 3 μ S.

Les temps de détection de chaque groupe sont relevés et moyennés (n = 6). Un Δ Td est calculé : Δ Td = Td_{Traité} - Td_{Témoin}.

3-2) Electrosynérèse

Cette méthode est utilisée pour identifier les anticorps anti RU 41740 dans le sérum de souris traitées par le principe actif. Elle consiste à faire migrer de façon convergente des antigènes et des anticorps dans un gel d'agarose soumis à un champ électrique. Lorsque le point d'équivalence est atteint entre l'anticorps et l'antigène, le complexe précipite. Ce dernier est visualisé par coloration au bleu de Coomassie.

Le tampon utilisé pour la migration est un tampon véronal à pH = 8,6.

Diéthylmalonylurée	2,2 g
Diéthylmalonylurée sodée	11,33 g
Eau distillée qsp	2,2 l

Un gel d'agarose à 1 % dans le tampon véronal est coulé sur un film de polyester. A l'aide d'un emporte-pièce et d'une source de vide, des puits sont percés pour y déposer les solutions d'antigènes et d'anticorps. Une solution de RU 41740 de référence (Ti05) à 100 µg/ml est déposée du côté cathodique et le sérum anti RU 41740 est déposé côté anodique. La migration s'opère pendant dix huit heures sous une tension de 2 volts/cm.

Après la migration, le gel est d'abord séché entre des feuilles de papier filtre puis au séchoir.

La lame est ensuite placée dans une solution de chlorure de sodium 0,1 M pendant environ deux heures puis dans l'eau distillée pendant trente minutes pour éliminer les protéines non précipitantes.

Après séchage, la lame est colorée au bleu de Coomassie (5 grammes par litre de solution décolorante) puis décolorée dans la solution suivante :

Ethanol	500 ml,
Acide acétique	100 ml,
Eau distillée	400 ml.

3-3) Décomplémentation du sérum

Avant d'être mis en contact avec la suspension bactérienne, le sérum est chauffé à 56°C pendant 30 minutes.

3-4) Immunonéphélométrie

L'immunonéphélométrie (IMN) est une technique utilisée pour le dosage du principe actif RU 41740. Le néphélomètre (type ICS-Analyzer II Beckman) mesure l'intensité de la lumière diffusée par les complexes formés lors d'une réaction antigène-anticorps en milieu liquide. Les résultats exprimés en unité relative (RU) rendent compte de la cinétique de la réaction.

Préparation du sérum anti RU 41740

Le sérum utilisé en immunonéphélogométrie est un sérum de lapin anti RU 41740. Les animaux sont des lapins femelles néo-zélandaise ou Hymalaya de 2 à 2,5 kg.

Ces animaux reçoivent à J0 et entre J21 et J28 (immunisation secondaire), une injection sous-cutanée, en six points, de 0,1 ml de la solution antigénique. La composition de cette solution est la suivante :

à J0, RU 41740 1 mg/ml, Adjuvant de Freund complet (Difco) (v/v),

entre J21 et J28, RU 41740 1 mg/ml, Adjuvant de Freund incomplet (Difco) (v/v).

7 à 10 jours après une immunisation secondaire, le sang du lapin est prélevé et le sérum est préparé.

Préparation des solutions antigéniques

La veille du dosage IMN, des solutions mères à 1 mg/ml du principe actif à étudier et du témoin interne (mélange de différents lots de RU 41740 considérés comme référence) sont préparées.

Le jour du dosage, les deux solutions mères d'antigènes à 1 mg/ml sont diluées d'abord au 25^{ème} puis de 8/10^{ème} en 8/10^{ème} pour obtenir les concentrations suivantes : 40 µg/ml - 32 - 25,6 - 20,5 - 16,4 - 13,1 - 10,5 - 8,4.

Dosage immunonéphélogométrique

Dans un premier temps, les réponses immunonéphélogométriques en RU, de la réaction témoin interne sérum anti RU 41740 sont enregistrées pour les huit concentrations antigéniques. A partir de cinq valeurs choisies, une équation de la droite $RU = a \log (Ag) + b$ est établie. La même opération est réalisée pour la solution antigénique à doser et on obtient une droite $RU = a_1 \log (Ag) + b_1$.

Une activité relative de l'échantillon par rapport à la référence est calculée. A partir de la médiane des 5 concentrations retenues de la référence sont déterminées la valeur y théorique (pour la référence) et y' de l'échantillon. Ainsi, est déduite l'activité,

exprimée en pourcentage, de l'échantillon par rapport à la référence.

Un lot RU 41740 est déclaré conforme si :

le rapport des pentes a_1/a est de $1 \pm 0,1$,

l'activité relative est de $100 \% \pm 25 \%$.

IV-II) Autres études

Le tableau 8 répertorie les réactifs et leurs origines.

A) Dosages colorimétriques des constituants du RU 41740

1) Dosage des monosaccharides du RU 41740

1-1) Protocoles

Le dosage colorimétrique des hexoses neutres est effectué par la méthode à l'orcinol sulfurique décrite par Tillmans et Philippi (1929) et modifiée par Rimington (1931).

Dans des tubes à essai très propres sont introduits 1 ml de la solution à doser, 2 ml d'une solution d'orcinol (1,5 % dans de l'acide sulfurique 30 %) et 15 ml d'acide sulfurique à 60 %. Les solutions sont mélangées soigneusement à l'aide d'un agitateur de verre aplati à l'une des extrémités. Les tubes sont ensuite maintenus 20 minutes dans un bain-marie à 80 °C. Les tubes, refroidis sous un courant d'eau, sont placés 45 minutes à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 510 nm.

Les solutions suivantes sont analysées :

Solution de RU 41740 à 0,5 mg/ml (Absorbance α),

Solution d'acide glucuronique 0,2 mg/ml (Absorbance b),

Solution contenant du glucose (0,1 mg/ml), du mannose (0,05 mg/ml) et du galactose (0,05 mg/ml) (Absorbance a).

Tableau 8. Liste et origine des réactifs utilisés.

Réactif	Source
Méthanol HCL 3N et 0,5 N	Supelco
Glucose	Prolabo
Galactose	Prolabo
Mannose	Prolabo
Acide glucuronique	Sigma
Diméthyl-L-tartrate	Sigma
Mannitol	Sigma
Méso-inositol	Sigma
Xylitol	Sigma
Mélibiose	Sigma
Méthyl α D galactopyranoside	Sigma
Méthyl β D galactopyranoside	Sigma
Méthyl α D glucopyranoside	Sigma
Méthyl β D glucopyranoside	Sigma
Méthyl α D mannopyranoside	Sigma
Méthyl β D glucuronide	Sigma
Orcinol	Merck
Carbazol	Prolabo
Sérum albumine bovine	Sigma
Réactif de Folin	Merck
Sulfate de cuivre	Prolabo
Tartrate de sodium et potassium	Baker chemicals
Carbonate disodique	Prolabo
Hydroxyde de sodium	Sigma
Acide trifluoroacétique	Sigma
Acide sulfurique	Riedel-de-Haën

Les acides uroniques sont dosés par la technique au carbazol décrite par Dische (1947). Dans des tubes à essai très propres sont introduits 1 ml de la solution à doser et 6 ml d'acide sulfurique concentré. Après agitation, les tubes sont maintenus 20 minutes dans un bain-marie bouillant puis refroidis rapidement. 0,2 ml d'une solution alcoolique de carbazol (0,1 %) est ajouté. Le mélange est soigneusement agité puis les tubes sont placés à l'obscurité pendant trois heures. L'absorbance est mesurée à 530 nm. Les solutions suivantes sont analysées :

Solution de RU 41740 à 0,5 mg/ml (Absorbance β),

Solution d'acide glucuronique 0,05 mg/ml (Absorbance c),

Solution contenant du glucose (0,1 mg/ml), du mannose (0,05 mg/ml) et du galactose (0,05 mg/ml) (Absorbance d).

1-2) Calculs

La teneur (en milligrammes) en oses neutres est calculée par la formule :

$$\frac{200 (4\alpha c - \beta b)}{(4ac - db)}$$

La teneur (en milligrammes) en acides uroniques est obtenue par la formule :

$$\frac{200 (\beta a - \alpha d)}{(4ac - db)}$$

2) Dosage des protéines du RU 41740

Les protéines du principe actif sont dosées par la technique de Lowry (1951).

2-1) Préparation des solutions

Solution A : Na_2CO_3 4 % dans une solution de NaOH 0,1 N.

Solution B : $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1 % dans une solution de tartrate potassique sodique 1 %.

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

2-2) Dosage

A 1 ml de la solution à doser sont ajoutés 2,5 millilitres de la solution C. Le mélange est agité puis laissé 10 minutes à l'obscurité. Ensuite 0,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté et le tout est laissé 30 minutes à l'obscurité. La mesure de l'absorbance est effectuée à 745 nm.

Les solutions suivantes sont analysées :

Solutions de 20 à 80 μg de sérum albumine bovine,

Solution de RU 41740 à 0,25 mg/ml.

2-3) Calculs

En utilisant les résultats obtenus pour la sérum albumine bovine, une droite d'étalonnage liant la quantité protéique à l'absorbance est établie. Elle sert à déterminer la teneur protéique (en équivalent sérum albumine bovine) du principe actif.

B) Dosage des monosaccharides du RU 41740 par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

1) Matériel

La chaîne CLHP comprend :

une pompe Waters 610,

un autoinjecteur Waters WISP 712,

un réfractomètre Waters 410,

un enregistreur intégrateur Waters 746,

un contrôleur Waters 600 E.

2) Méthode de calcul

Les dosages en CLHP sont réalisés de la manière suivante :

- analyse d'une solution témoin contenant tous les monosaccharides à doser plus un étalon interne. Le coefficient de réponse (C_R) des différents monosaccharides par

rapport à cet étalon interne est défini (Aire du monosaccharide / Aire de l'étalon interne),

- analyse de l'échantillon contenant la même quantité d'étalon interne que la solution témoin.

Pour chaque espèce détectée dans l'échantillon, on calcule :

* L'aire corrigée (B) = $\frac{A}{C_R}$ avec A l'aire du pic analysé

* La quantité de l'espèce (M) = $\frac{B}{D} \times m$ m masse de l'espèce introduite dans la solution témoin
D l'aire de l'étalon interne dans l'échantillon

* Le pourcentage de sucre = $\frac{M}{m_T} \times 100$ m_T la masse totale de l'échantillon

* Le rapport molaire est calculé pour deux résidus de glucose ou pour un résidu de mannose de la manière suivante :

$$\text{rapport molaire} = \frac{\frac{M \text{ espèce} \times 2}{M_E}}{\frac{M \text{ glucose}}{180}}$$

ou $M_E = 180$ pour Gal, Glc, Man et 194 pour GlcUA

$$\text{rapport molaire} = \frac{\frac{M \text{ espèce}}{M_E}}{\frac{M \text{ mannose}}{180}}$$

3) Analyse du principe actif RU 41740 après hydrolyse acide

Les échantillons sont hydrolysés par l'acide trifluoroacétique 4N pendant 4 heures à 100°C. Après l'hydrolyse, l'acide est éliminé par co-distillation avec le méthanol (trois fois). L'échantillon hydrolysé est repris par 100µl d'eau distillée et analysé sur deux colonnes différentes : HPX 87H et HPX 87P.

Aminex HPX 87H

Colonne Aminex HPX 87H (Biorad) T=60°C,

Phase mobile : acide sulfurique 0,01N,

Débit : 0,6 ml/min,

Détection par réfractométrie différentielle.

Aminex HPX 87P

Après reprise de l'échantillon par l'eau distillée, les 100 µl sont passés sur un Sep Pak C18 (Millipore). L'élution est réalisée par 5 ml de méthanol. Ces 5 ml sont évaporés et l'échantillon est repris par 100µl d'eau. Il est analysé dans le système :

Colonne Aminex HPX 87P (Biorad) T=85°C, Colonne Amino-NH₂ T ambiante,

Phase mobile : eau,

Débit : 0,6 ml/min,

Détection par réfractométrie différentielle.

4) Analyse du principe actif RU 41740 après méthanolyse

4-1) Principe

Après lyophilisation, l'équivalent de 250 µg de monosaccharides sont méthanolysés par 500 µl de méthanol chlorhydrique 3N pendant 22 heures à 80 °C. Après refroidissement, le méthanol est évaporé sous un courant d'azote. Repris dans 100 µl d'eau distillée, les échantillons sont analysés dans le système suivant :

Colonne Spherisorb 5 µm (C₁₈) (Shandon),

Phase mobile : eau,

Débit : 0,8 ml/min,

Détection par réfractométrie différentielle.

4-2) Analyse statistique

Dans l'étude de fidélité de la méthode du dosage des monosaccharides du RU 41740, les coefficients de répétabilité et de reproductibilité sont déterminés.

Le coefficient de variation de répétabilité est calculé de la manière suivante :

$CVR = 100 Sr/m$ où Sr^2 est la moyenne des variances ($\Sigma S_i^2/3$) des trois groupes (J1, J2, J3) et m la moyenne des moyennes ($\Sigma m_i/3$) des trois groupes.

Le coefficient de variation de reproductibilité est calculé de la manière suivante :

$$CVR = 100 SR/m \text{ ou } SR^2 = Sr^2 + Sg^2 \text{ avec } Sg^2 = \frac{(kT_2) - T_1^2}{k(k-1)} - \frac{Sr^2}{n}$$

k est le nombre de groupes (3)

n est le nombre de valeurs par groupe (6)

T_2 est la somme des moyennes au carré (Σm_i^2)

T_1 est la somme des moyennes (Σm_i)

C) Dosage des monosaccharides du RU 41740 par chromatographie en phase gazeuse

A l'équivalent de 100 μg de monosaccharides sont ajoutés 10 μg de témoin interne (Mannitol + Méso-inositol) sous forme liquide. Les tubes sont ensuite lyophilisés. Les monosaccharides sont méthanolysés par 500 μl de méthanol chlorhydrique 0,5 N pendant 24 heures à 80 °C. Après 24 heures, les solutions méthanoliques sont neutralisées par ajout d'une pointe de spatule de carbonate d'argent. L'excès de carbonate et le chlorure d'argent formé est éliminé par centrifugation. Les produits sont ensuite re-Nacétylés par addition de 20 μl d'anhydride acétique et laissés à l'obscurité pendant une nuit. Après une triple extraction avec de l'heptane distillé, les tubes sont séchés sous un courant d'azote et triméthylsilylés par addition de 100 μl de pyridine et de BSTFA (N, O Bis(triméthylsilyl)Trifluoroacétamide). Cette triméthylsilylation s'effectue pendant deux heures à l'obscurité. Des fractions de 1 à 1,5 μl sont injectées et analysées en chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire (25 m x 0,02 mm ; Silicone OV 101) à une température programmée de 120°C à 240°C à raison de 2°C/min.

V - Résultats et Discussion

V-I) Travaux utilisant l'automate de microbiologie Malthus 2000

A) Test d'épuration bactérienne

Le RU 41740, complexe glycoprotéique extrait d'un lysat de *Klebsiella pneumoniae*, stimule le système réticulo-endothélial. Cette activité du RU 41740 est suivie par un test d'épuration de particules de carbone décrit par Biozzi (1955). De l'encre est injectée aux souris par voie intraveineuse et le taux de particules de carbone dans le sang est déterminé par spectrophotométrie.

Les stocks de la solution particulaire injectée s'épuisent et, en conséquence, les Laboratoires Cassenne recherchent un test de remplacement permettant la mise en évidence de la stimulation de la phagocytose *in vivo*.

Nous développons un test d'épuration bactérienne et c'est la charge bactérienne sanguine qui est déterminée. Pour éviter des numérations répétées sur boîtes de Petri, nous utilisons un automate de microbiologie (Malthus 2000).

1) Présentation du test

1-1) Présentation du Malthus

Le Malthus est un matériel qui permet de détecter une croissance bactérienne par conductance-métrie. Une courbe de conductance lors de la croissance d'*Escherichia coli* CIP 52167 dans le milieu de culture sang/eau distillée/Spye est présentée en figure 24. Comme une courbe de croissance, elle se décompose en trois phases : une phase de latence, une phase exponentielle et une phase stationnaire. La courbe de conductance est caractérisée par trois paramètres : la pente de la phase exponentielle, la variation de conductance (ΔG), le temps de détection (Td). C'est ce dernier qui est actuellement le paramètre de la courbe de conductance le plus exploité. Il permet de s'affranchir de l'utilisation de boîtes de Petri : le temps de détection est inversement proportionnel au logarithme de la concentration en germes. Plus le temps de détection est faible plus la concentration en germes est élevée. Il est possible d'établir une corrélation entre le temps de détection et la concentration en germes. On dispose alors d'une équation du type $Td = a \log C(\text{germes/ml}) + b$. Cette équation n'est valable que pour un seul germe

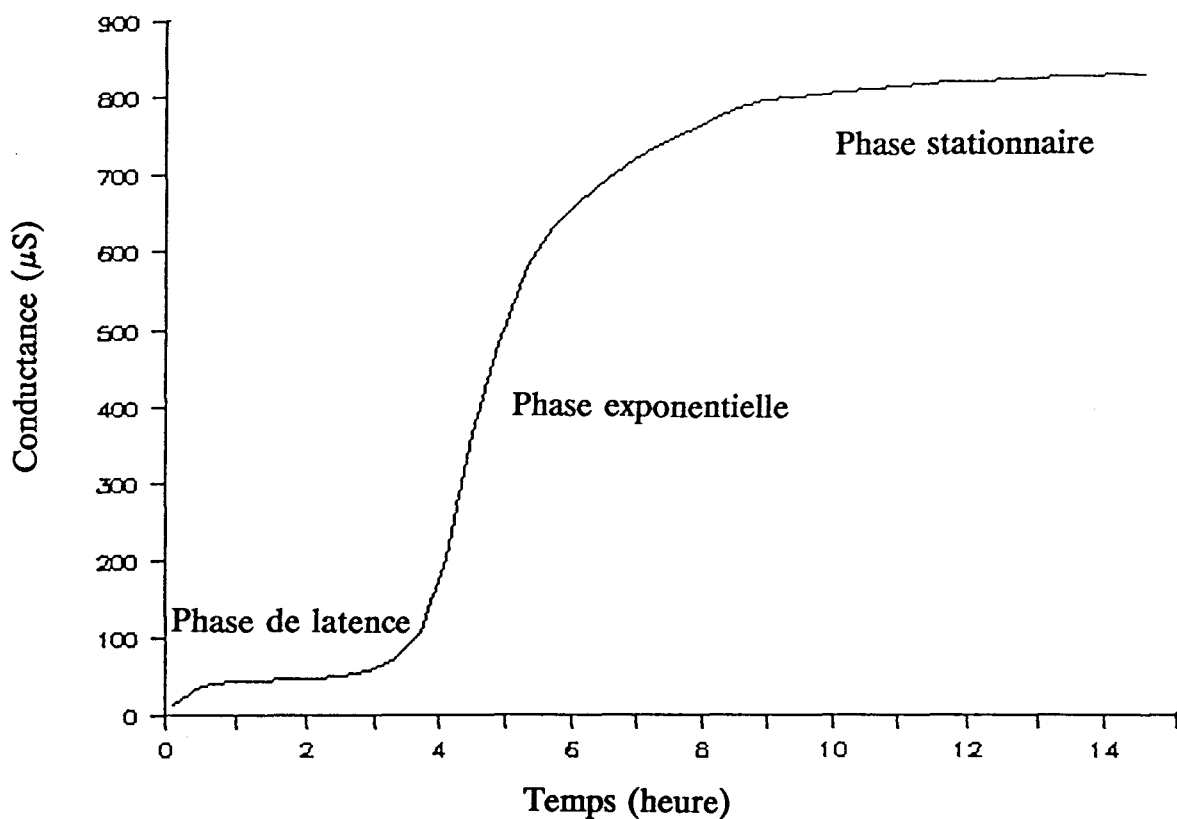


Figure 24. Courbe de conductance associée à la croissance d'*E. coli* dans le milieu sang/eau distillée/Spye ($C_t = 510^3$ germes/ml).

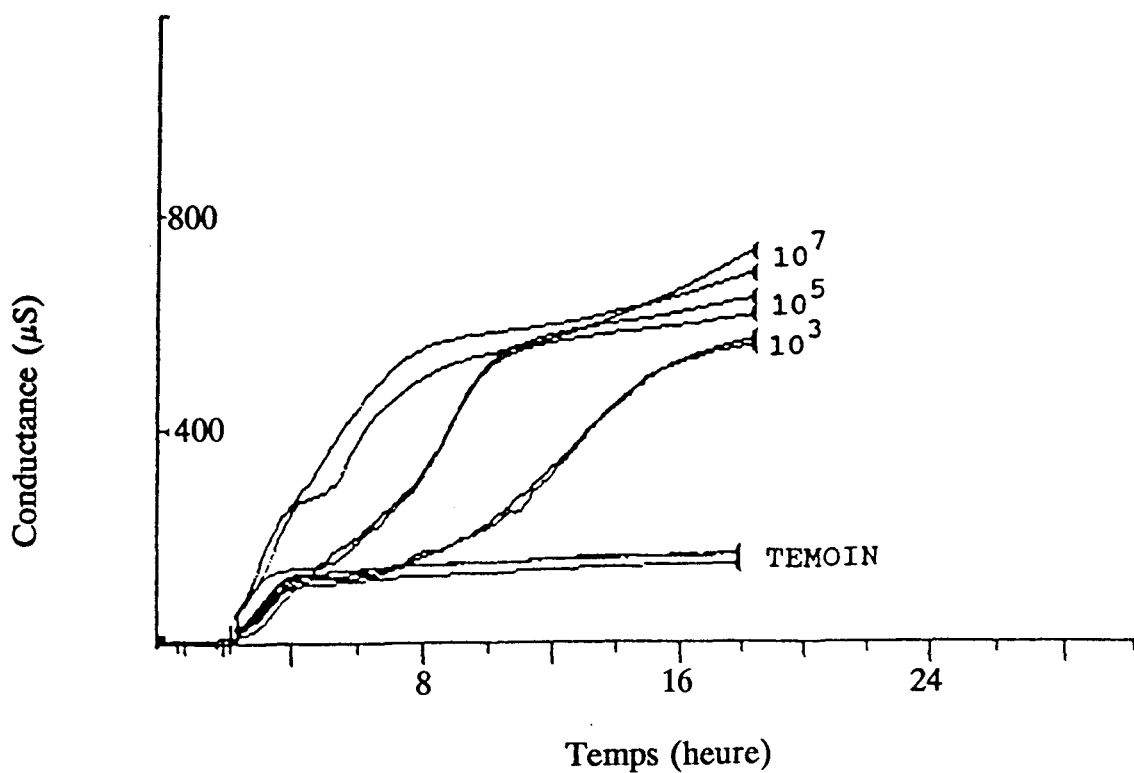


Figure 25. Courbes de conductance associées à la croissance de *S. aureus* dans le milieu sang/eau distillée/Spye. Trois concentrations bactériennes sont étudiées.

dans des conditions expérimentales définies (température d'incubation, milieu de culture utilisé...).

1-2) Mise au point du protocole expérimental

Nous établissons un protocole de base, inspiré du test de la clearance au carbone (Cf Matériel et Méthodes).

Traitement des souris à -48h et -24h par voie intrapéritonéale, injection de germes à J=0 par voie intraveineuse (v = 0,2ml), prélèvement du sang par ponction intracardiaque (v = 0,5 ml), analyse de la teneur en germes du sang par conductance-métrie.

Restent à définir :

le germe étudié,
la concentration bactérienne injectée aux souris,
le temps séparant l'injection des germes et la ponction intracardiaque.

Les premiers travaux portent sur le germe *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

1-2-1) Mesure de conductance dans le sang

Un millilitre de sang et un millilitre d'une suspension de *S. aureus* dans le milieu de culture Spye sont introduits dans des cellules Malthus et mis à incuber à 37°C. Les concentrations finales testées sont : 10^7 , 10^5 , 10^3 germes par millilitre. La conductance de cellules contenant un millilitre de sang et un millilitre de milieu de culture est également enregistrée (témoin). Les courbes de conductance obtenues sont présentées figure 25. La variation de conductance est nulle pour les cellules témoins et les phases exponentielles des autres courbes de conductance sont d'autant plus tardives que la concentration en germe est faible. Durant les quatre premières heures de la mesure, une augmentation de la conductance est observée pour toutes les cellules. Elle apparaît être indépendante de la charge bactérienne et des temps de détection non liés à la

concentration bactérienne apparaissent. Comme le montre le tableau 9, des temps de détection sont révélés pour les cellules témoins et une différence de quatre logarithmes entre les concentrations bactériennes se traduit par des temps de détection seulement espacés d'environ une heure trente.

L'augmentation de la conductance qui perturbe la détection est attribuée à la sédimentation des cellules sanguines et nous testons l'emploi d'agents hémolytiques sur la mesure conductance-métrique.

Tableau 9. Temps de détection révélés lors de la croissance *S. aureus* dans un milieu contenant du sang. Différentes concentrations bactériennes sont étudiées.

C (germes/ml)	Temps de détection
10^7	0,7
10^7	0,9
10^5	0,9
10^5	1,8
10^3	2,4
10^3	2,3
Témoin (0)	2,4
Témoin (0)	2
Témoin (0)	2,2

Du sang est dilué au cinquième dans de l'eau distillée ou du carbonate disodique 0,1 M puis au demi dans le milieu de culture.

En l'absence de micro-organisme, deux millilitres de ces solutions et une solution témoin contenant sang et Spye (v/v) sont répartis dans les cellules Malthus et la conductance est enregistrée.

La figure 26 montre que :

- la conductance augmente durant les quatre premières heures de la détection des cellules témoins. Des temps de détection apparaissent malgré l'absence de germes,
- l'augmentation de la conductance est fortement réduite pour les cellules dont le sang a été mis en contact avec de l'eau distillée. Cette augmentation de conductance est progressive et ne perturbe pas la mesure : aucun temps de détection n'apparaît,

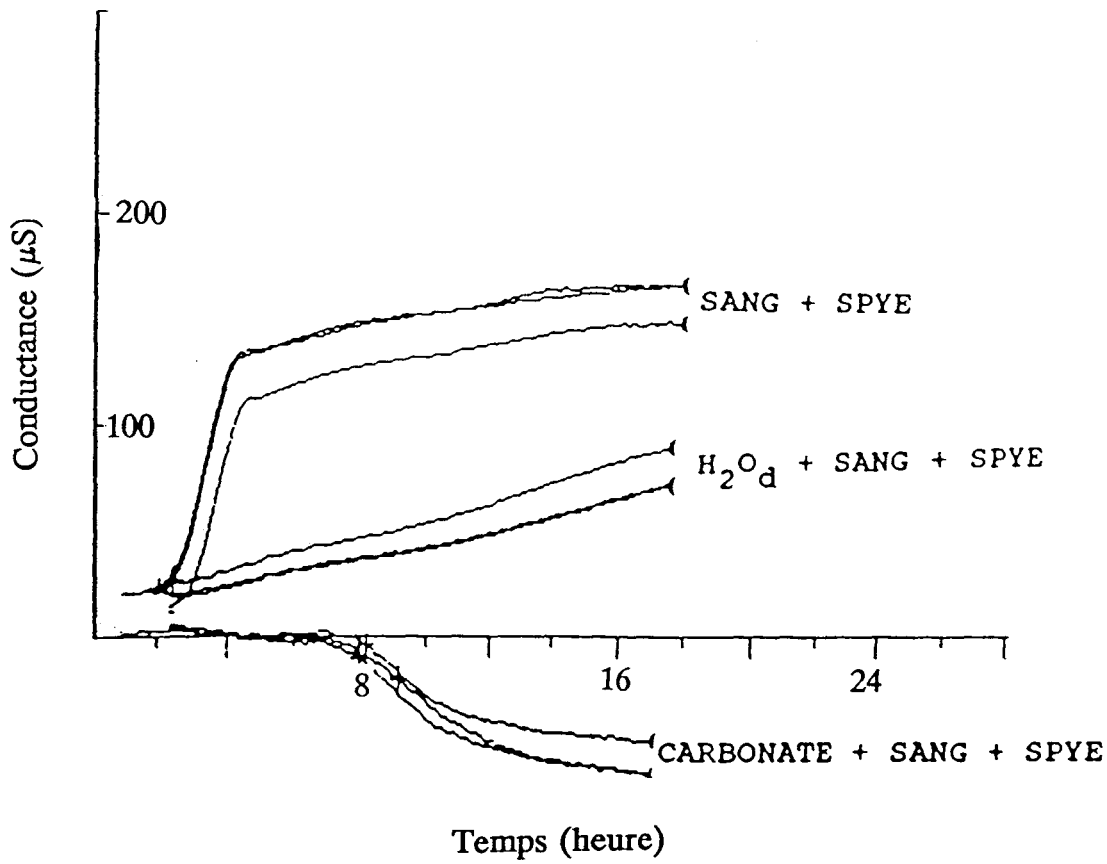


Figure 26. Influence du milieu de culture sur la mesure conductance-métrique en l'absence de micro-organisme.

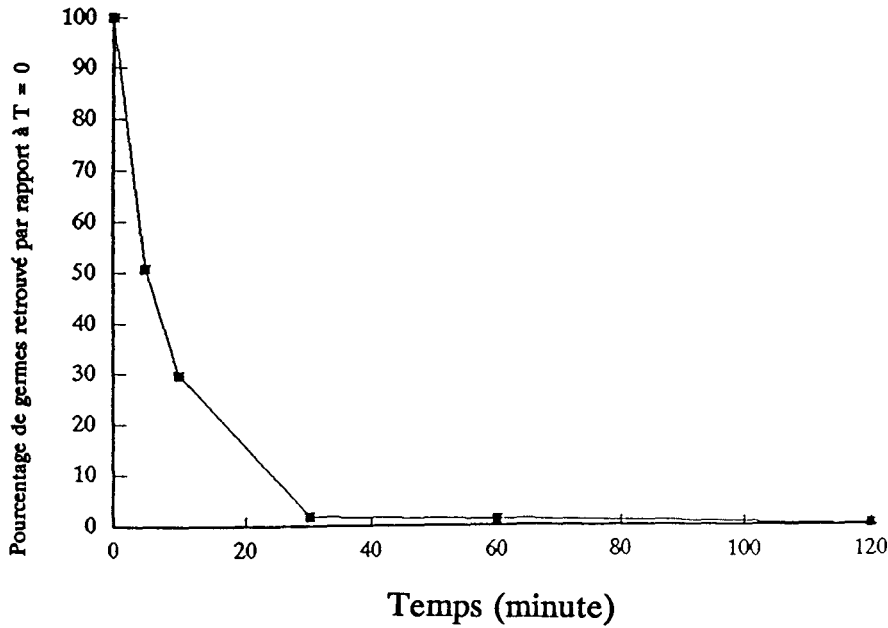


Figure 27. Cinétique d'épuration de *S. aureus* chez la souris. 0,2 ml d'une suspension de 10^8 germes/ml est injecté à T = 0 par voie intraveineuse.

- la présence de carbonate disodique 0,1 M supprime l'augmentation de la conductance pendant les 8 premières heures. Ensuite, d'autres perturbations, sans doute liées à l'apport dans le milieu de culture de substances chargées, apparaissent et des temps de détection sont révélés.

En conséquence, l'eau distillée sera utilisée comme agent d'hémolyse. Enfin, pour éviter l'apparition de temps de détection non opportuns, nous optimisons les paramètres d'analyses de l'automate. Le tableau 10 présente ces nouveaux paramètres de détection.

Tableau 10. Nouvelles valeurs des paramètres de détection permettant la mesure conductance-métrique dans le sang.

Paramètres	Valeurs par défaut	Nouvelles valeurs
- seuil de première différence	0,8 μ S	3,4 μ S
- seuil de deuxième différence	0,1 μ S	0,2 μ S
- seuil de ligne de base	0,6 μ S	3 μ S
- nombre de scan	3	5

1-2-2) Cinétique d'épuration

Pour établir le temps qui doit séparer l'injection des germes par voie intraveineuse et la ponction intracardiaque, nous déterminons le temps de séjour du germe dans le sang de l'animal.

Nous injectons à des souris une concentration en *S. aureus* de 10^8 germes par millilitre ($v = 0,2$ ml) et, à intervalle régulier, nous prélevons 0,5 millilitre de sang. Après dilution au cinquième du sang dans de l'eau distillée, puis au demi dans le milieu Spye, un dénombrement sur boîtes de Petri est réalisé. La figure 27 montre que trente minutes après l'injection de la suspension, seulement 1,83% des germes sont encore présents dans le sang de l'animal. Ainsi, *S. aureus* disparaît naturellement très rapidement du sang circulant et le temps séparant l'injection des germes de la ponction intracardiaque doit être court. Il est fixé à cinq minutes.

Parallèlement, le même type d'étude est réalisé sur *E. coli*. La clearance naturelle de ce germe est bien plus longue et les paramètres expérimentaux déterminés sont les suivants :

concentration de la suspension injectée : 10^6 germes / ml,
temps séparant l'injection du prélèvement sanguin : 2 heures.

Un temps de latence de deux heures permet une organisation pratique plus simple et la technique de contrôle utilisera le germe *E. coli*.

1-3) Présentation du protocole définitif

Traitement des souris à -48h et -24h par voie intrapéritonéale. Les animaux traités (n = 5) reçoivent les deux jours du traitement une dose de 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de RU 41740. Les animaux témoins (n = 5) reçoivent 0,5 millilitre d'une solution de chlorure de sodium 0,9 % apyrogène.

Injection des germes à J=0 par voie intraveineuse. Le germe utilisé est *E. coli*. 0,2 millilitre d'une suspension de 10^6 germes par millilitre est injecté par voie intraveineuse aux souris traitées et témoins.

Prélèvement de 0,5 millilitre de sang par ponction intracardiaque deux heures après l'injection des germes. Au 0,5 millilitre de sang prélevé, sont ajoutés 2 millilitres d'eau distillée stérile puis 2,5 millilitres de milieu de culture Spye.

La teneur en germes du mélange sang/eau distillée/Spye des souris traitées et témoins est déterminée par conductance-métrie de la manière suivante : deux millilitres du mélange sang/eau distillée/Spye sont introduits dans la cellule Malthus. Deux cellules sont réalisées pour chaque souris et incubées à 37°C. La mesure de la conductance est enregistrée.

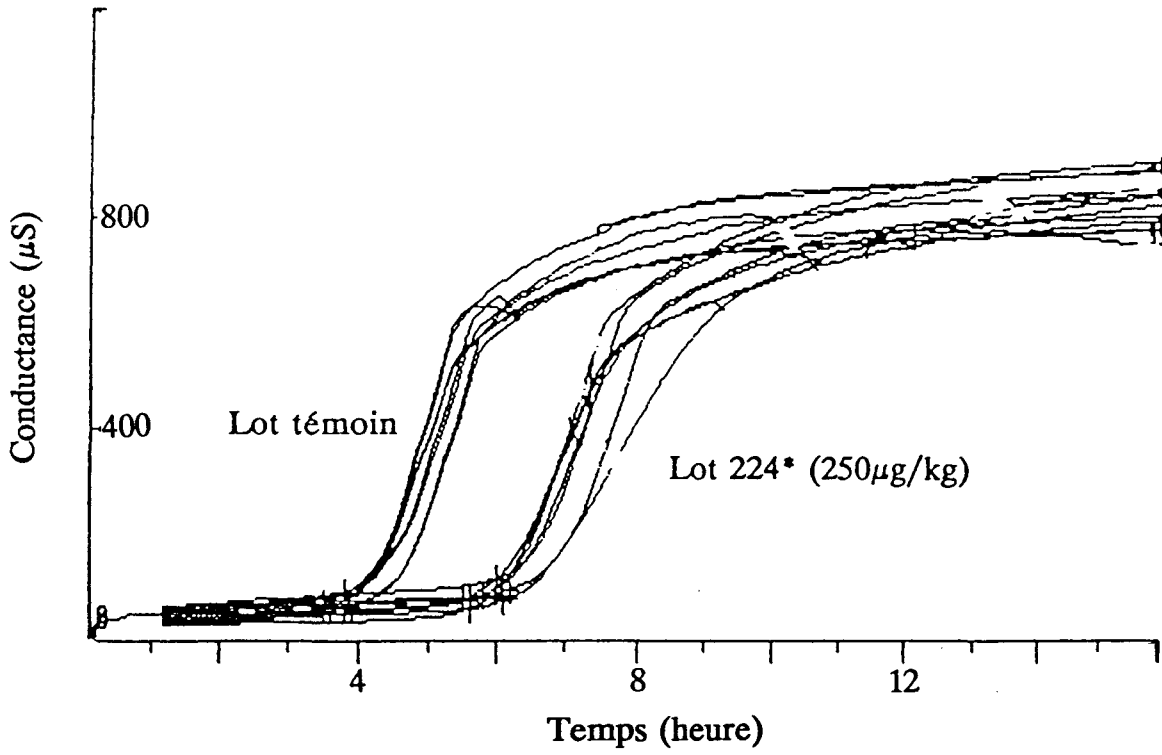


Figure 28. Courbes de conductance associées aux groupes témoins et aux groupes traités par le principe actif 224*.

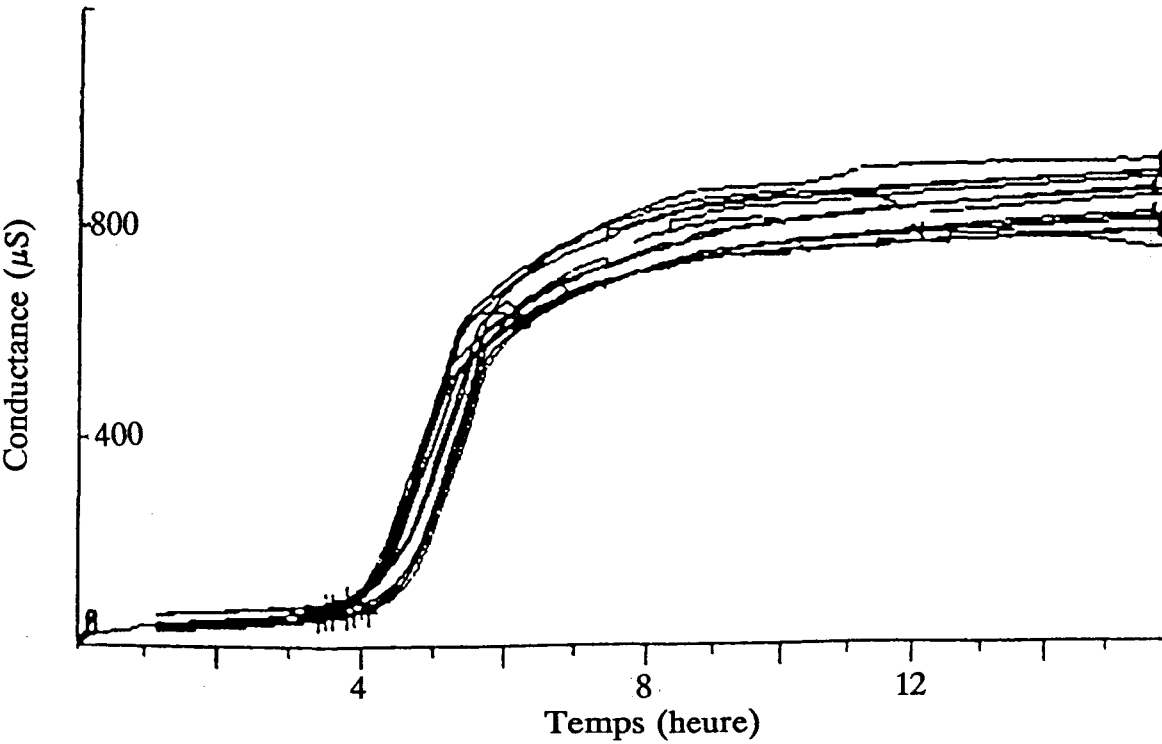


Figure 29. Courbes de conductance associées aux groupes témoins et aux groupes traités par le principe actif 1496.

1-4) Exemple

Les lots étudiés sont deux principes actifs RU 41740 : le lot 224 radiostérilisé (*) et le lot 1496. Les courbes de conductance associées aux témoins et aux différents lots étudiés sont présentées dans les figures 28 et 29. Dans la figure 28, deux groupes de courbes de conductance distinctes sont observées. Les premières présentent une phase exponentielle précoce. Elles correspondent au groupe témoin. Les secondes qui présentent une phase exponentielle plus tardive sont associées au groupe traité par le principe actif 224*. Dans la figure 29, au contraire, il est impossible de différencier les courbes correspondant aux groupes témoins de celles du groupe traité par le lot 1496.

Si l'on calcule la différence (Tableau 11) entre les temps de détection moyens des deux groupes (ΔT_d), elle atteint 2,1 heures \pm 4,4 % dans le cas du principe actif 224* et seulement 0,17 heure \pm 10,9 % pour le lot 1496.

Dans notre exemple, le traitement par le lot 224* a provoqué une épuration plus importante que le traitement par le lot 1496.

Tableau 11. Résultats d'un test de clearance bactérienne. Les concentrations bactériennes (C(germes/ml)) sont calculées en utilisant l'équation $T_d = -0,929 \log C (\text{germes/ml}) + 7,161$.

	Lot témoin	Lot 224 *	Lot 1496
Td moyen (h) (n=10)	3,73	5,83	3,90
Cv (%)	3,09	4,4	10,9
ΔT_d (h)		2,1	0,17
C (germes/ml)	5844	33	5496
% d'épuration		99,44	5,96

L'intensité de la stimulation induite par les principes actifs étudiés peut être également évaluée par le calcul du pourcentage d'épuration. Ce calcul nécessite la réalisation préalable d'une droite de corrélation puisqu'il utilise les concentrations bactériennes présentes dans les cellules (Cf Matériel et Méthodes). L'équation de la droite de corrélation a été déterminée : $T_d = -0,929 \log C (\text{germes/ml}) + 7,161$ (n =94). Comme le montre le tableau 11, le pourcentage d'épuration obtenu lors du traitement par le lot

224* est 99,44%. Dans le cas du lot 1496, l'épuration est négligeable (5,96%). Les concentrations sanguines en germes du groupe témoin et du groupe traité par le 1496 sont quasiment identiques.

Comme le montre cet exemple, il est possible de suivre une épuration bactérienne par conductance-métrie. L'intensité de l'épuration provoquée par un traitement peut être quantifiée. Dans notre exemple, un lot est révélé actif (224*) alors que le traitement par le lot 1496 ne stimule pas l'épuration bactérienne.

2) Validation de la méthode

Compte tenu des résultats précédents, nous validons le test d'épuration bactérienne. Cette étude comprend la réalisation et l'analyse de la droite de corrélation, la validation de l'automate Malthus, une étude de la fidélité de la méthode et la recherche d'une activité dépendante de la dose.

2-1) Réalisation et analyse de la droite de corrélation

Des suspensions d'*E. coli* de 10^2 à 10^7 germes par millilitre sont injectées à des souris par voie intraveineuse ($v = 0,2$ ml). Après deux heures, le sang est prélevé par ponction intracardiaque, lysé par de l'eau distillée et additionné du milieu de culture Spye. La teneur en germes du mélange est étudiée à la fois par conductance-métrie et par dénombrement sur boîtes de Petri. Les temps de détection obtenus par conductance-métrie et les concentrations en germes correspondantes données par les comptages sur boîtes de Petri sont corrélés. La droite de corrélation obtenue est présentée dans la figure 30 et elle a pour équation : $Td = - 0,929 \log C(\text{g/ml}) + 7,161$. Le coefficient de corrélation est de $- 0,996$ ($n = 94$). Cette corrélation est significative au seuil de 0,1% ($n = 80$, $r = 0,357$). Elle est également significative par le test de Student : $t = 106,92$ (Au seuil de 1‰, pour $n=60$, t doit être supérieur à 3,46).

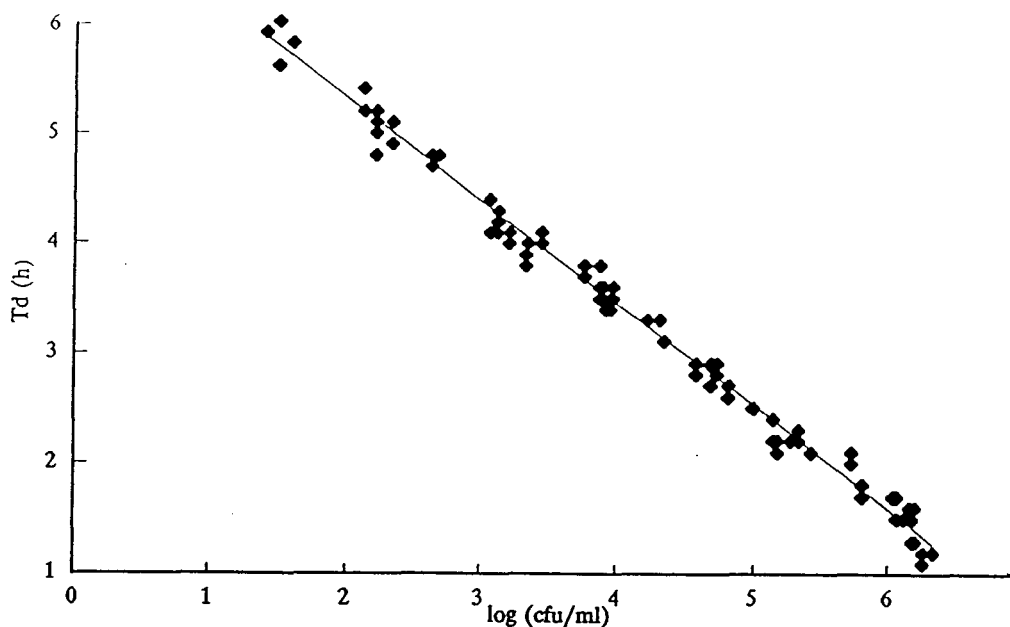


Figure 30. Droite de corrélation liant le temps de détection et la concentration en *E. coli* dans le milieu sang/eau distillée/Spye. ($T_d = -0,929 \log C(g/ml) + 7,161$; $r = -0,996$; $n = 94$).

2-2) Validation de l'automate Malthus

Le but de cette étude est de montrer que les résultats obtenus par la technique classique de dénombrement peuvent être reproduits par conductance-métrie. Ainsi, nous estimons l'activité stimulatrice de la clearance bactérienne du lot 224* par les deux techniques. Cette étude est réalisée quatre fois.

Comme le montre le tableau 12, l'analyse par la technique de dénombrement sur boîtes de Petri met en évidence une épuration bactérienne importante. Le pourcentage d'épuration moyen atteint 99,88 %. Il est du même ordre de grandeur que celui donné par conductance-métrie (99,95%). Pour les deux techniques, les coefficients de variation sont très faibles (0,03% et 0,08%). Une analyse de la variance au seuil de cinq pour cent indique que les résultats des deux techniques ne sont pas significativement différents.

Les concentrations bactériennes moyennes présentes dans les cellules Malthus déterminées par la technique classique et par la technique rapide sont du même ordre

de grandeur. L'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence significative (au seuil de cinq pour cent) entre les concentrations en germes (témoins et traités) données par les deux méthodes.

Les coefficients de variation sont toujours plus faibles par la technique rapide. Dans les deux techniques, ils s'élèvent pour les faibles concentrations bactériennes présentes dans le sang des groupes traités.

Tableau 12. Activité stimulatrice du lot 224* sur la clearance bactérienne (n = 4). Comparaison des résultats obtenus par conductance-métrie et dénombrement sur boîtes de Petri. Par conductance-métrie, les concentrations bactériennes (C(germes/ml)) sont calculées en utilisant l'équation $Td = -0,929 \log C (\text{germes/ml}) + 7,161$.

	Malthus			Boîte de Petri		
	C _{témoin}	C _{traité}	% d'épuration	C _{témoin}	C _{traité}	% d'épuration
1	13737	7	99,95	14288	10	99,93
2	12935	9	99,93	12920	16	99,88
3	11881	6	99,95	10494	25	99,77
4	14196	2	99,99	12983	8	99,94
Moyenne	13187,25	6	99,95	12671,75	14,75	99,88
σ_{n-1}	1014,84	2,94	0,03	1582,55	7,63	0,08
Cv(%)	7,7	49,07	0,03	12,49	51,74	0,08

Cette étude révèle que la conductance-métrie donne des résultats identiques à ceux obtenus par la technique classique de dénombrement. Moins fastidieuse, plus rapide et aussi précise, elle est donc parfaitement adaptée à notre test. Enfin, ces résultats valident *a posteriori* la droite de corrélation présentée dans le paragraphe précédent même si cette dernière n'est pas établie pour des concentrations bactériennes aussi faibles que celles observées dans les groupes traités.

2-3) Fidélité de la méthode

La fidélité d'une méthode est un terme général qui s'applique à la variabilité entre des essais répétés. Elle exprime l'étroitesse de la dispersion entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un échantillon dans des conditions définies. Nous la

définissons en mesurant la répétabilité et la reproductibilité sur le ΔT_d et le pourcentage d'épuration.

2-3-1) Etude de répétabilité

La répétabilité exprime la variabilité minimale des résultats et nous l'évaluons en estimant l'activité d'un même principe actif (lot 224*) dix fois dans les mêmes conditions. Comme le montre le tableau 13, le ΔT_d moyen, lors de ces dix expériences est de 3,135 heures. Le coefficient de variation est de 6 %. L'activité moyenne du lot 224* exprimée en pourcentage d'épuration est de 99,94%. La dispersion des valeurs autour de cette moyenne est très faible ($C_v = 0,02$ %).

Une étude de répétabilité est également réalisée sur un lot de faible activité (lot 1498). Comme le montre le tableau 14, le ΔT_d moyen est de 0,34 heure. Le coefficient de variation est plus élevé (36,40% contre 6 % pour le lot 224*). La variation des résultats est donc beaucoup plus importante lorsque le lot étudié est d'activité faible.

Tableau 13. Etude de répétabilité sur le lot 224*.

	% d'épuration	ΔT_d (Traité-Témoin)
1	99,95	3,08
2	99,93	3,03
3	99,92	2,81
4	99,93	3,09
5	99,96	3,22
6	99,92	2,93
7	99,98	3,42
8	99,96	3,19
9	99,95	3,2
10	99,94	3,38
Moyenne	99,94	3,135
σ_{n-1}	0,02	0,19
C_v (%)	0,02	6,00

Tableau 14. Etude de répétabilité sur le lot 1498.

	% d'épuration	ΔTd (Traité-Témoin)
1	40,83	0,23
2	36,07	0,27
3	51,23	0,33
4	37,45	0,18
5	50,97	0,29
6	63,89	0,45
7	75,95	0,55
8	54,53	0,3
9	63,47	0,48
Moyenne	52,71	0,34
σ_{n-1}	13,42	0,12
Cv (%)	25,46	36,40

2-3-2) Etude de reproductibilité

La reproductibilité exprime la variabilité maximale des résultats. Ainsi, nous testons l'activité de dix principes actifs RU 41740 radiostérilisés issus de la production. Comme le montre le tableau 15, le ΔTd moyen est de 2,99 heures. Le coefficient de variation est faible (6,45 %). Le pourcentage d'épuration moyen est de 99,91%. La dispersion autour de la moyenne est très faible (0,05 %).

Le tableau 15 indique également les activités obtenues pour les mêmes lots par la technique classique d'épuration de particules de carbone (Temps de prélèvement du sang : 8 minutes). Le pourcentage d'épuration moyen est de 55,63 % avec une dispersion autour de cette moyenne de 21,38 %. Ainsi, en moyenne, plus de la moitié des particules inertes injectées sont éliminées du sang périphérique quand l'animal est traité par le RU 41740.

Tableau 15. Etude de reproductibilité.

Lots	% d'épuration	ΔTd (Traité-Témoin)	% épuration carbone à 8 min
244*	99,94	2,93	48,5
247*	99,95	3,15	53,9
243*	99,84	2,82	51,9
248*	99,82	2,67	66,2
250*	99,95	3,11	58,6
242*	99,91	2,84	38,5
224*	99,92	2,93	53,7
239*	99,92	3,01	62,4
253*	99,94	3,05	79,7
254*	99,95	3,35	42,9
Moyenne	99,91	2,99	55,63
σ_{n-1}	0,05	0,19	11,89
Cv (%)	0,05	6,45	21,38

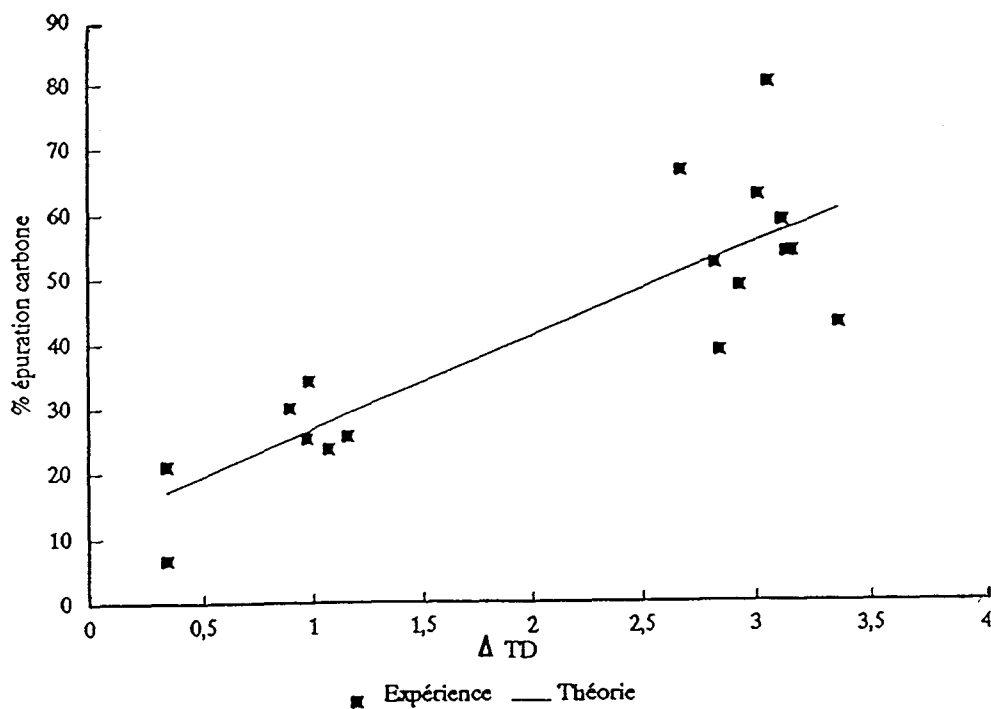


Figure 31. Corrélation entre les activités obtenues par les techniques de clearance au carbone et bactérienne ($\% \text{ épuration}_{\text{carbone}} = 14,33 \Delta Td + 12,30 ; r = 0,857 ; n = 17$).

Les résultats des deux techniques montrent que le RU 41740 stimule la clearance de particules mais les intensités de stimulation calculées ne sont pas comparables. Deux paramètres diffèrent entre les deux techniques :

nature de la particule injectée,

temps de latence séparant l'injection particulaire et le prélèvement du sang.

Toutefois, comme le montre la figure 31, il est possible de corrélérer les ΔTd et les pourcentages d'épuration obtenus dans le test de clearance au carbone. L'équation de la droite de régression est : % épuration = $14,33 \Delta Td + 12,30$ et le coefficient de corrélation calculé est de 0,857 (n = 17). Au risque de cinq pour cent, cette corrélation est significative.

2-4) Recherche d'une activité dépendante de la dose

L'effet stimulant de différentes doses de principe actif (lot 224*) est étudié. Les résultats sont présentés figure 32. L'activité est faible entre 1 et 5 $\mu g/kg$ (le ΔTd est inférieur à une heure). Elle augmente ensuite fortement entre 10 et 100 $\mu g/kg$ pour atteindre un plateau dans les doses supérieures. Sur les 47 observations réalisées, il est possible de corrélérer le ΔTd calculé et le logarithme de la concentration en principe actif exprimée en microgrammes par kilogramme. La droite de corrélation a pour équation : $\Delta Td = 1,05 \log C(\mu g/kg) + 0,2$ et le coefficient de corrélation est de 0,91. Cette corrélation est significative au seuil de 5 % (n = 45, r = 0,2875). Elle est également significative par le test de Student : t = 15,07. (Au seuil de 1%, pour n = 40, t doit être supérieur à 3,37).

La relation liant le ΔTd et la concentration administrée à l'animal, nous permet de définir la dose de RU 41740 entraînant une épuration d'un, de deux et de trois logarithmes.

Une dose de 5 $\mu g/kg$ provoque une épuration d'un logarithme,

une dose de 40 $\mu g/kg$ deux logarithmes,

et enfin il faut 300 $\mu g/kg$ de principe actif pour obtenir une épuration de trois logarithmes.

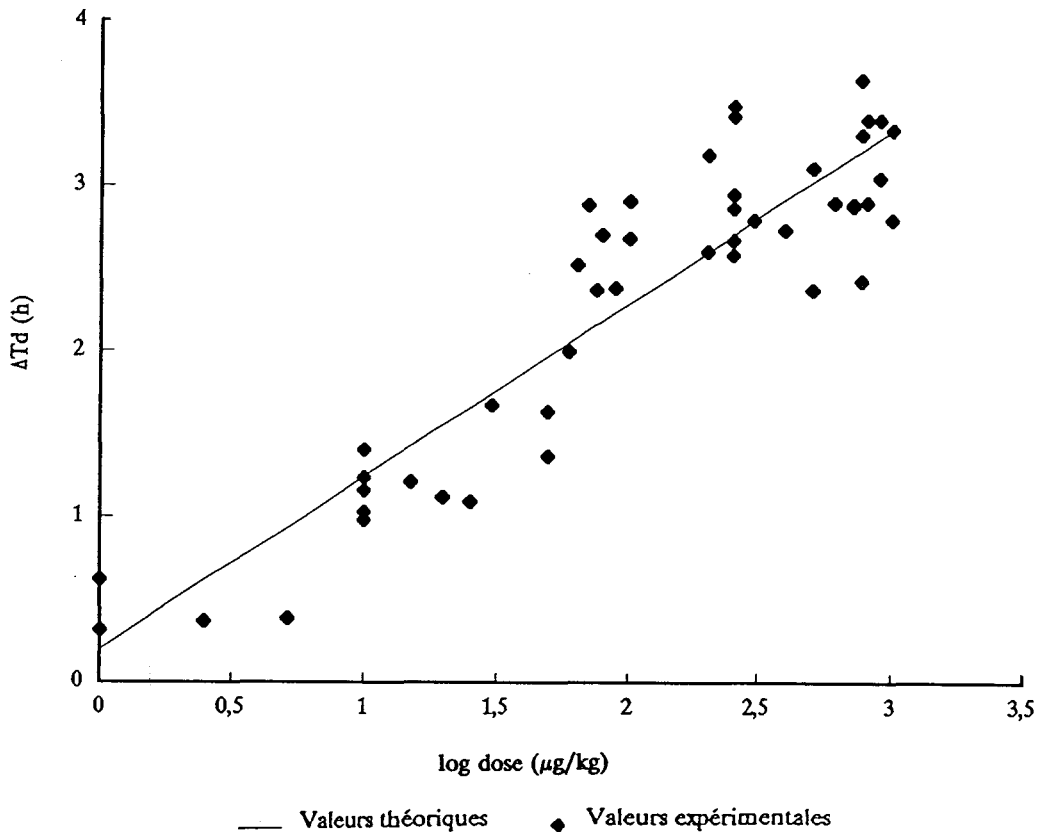


Figure 32. Corrélation entre l'intensité de stimulation de l'épuration bactérienne et la dose de RU 41740 administrée à l'animal ($\Delta Td = 1,05 \log C(\mu g/kg) + 0,2$; $r = 0,91$; $n = 47$).

3) Transposition en test de routine

Ce travail a fait l'objet d'une publication acceptée dans le journal "Letters in Applied Microbiology" et d'un rapport de validation soumis au responsable du département d'analyses des Laboratoires Cassenne. Après approbation, cette technique de clearance bactérienne suivie par conductance-métrie a remplacé la technique de clearance au carbone. Elle fait désormais partie des tests de contrôle permettant d'analyser les lots issus de la production. Pour finaliser ce passage en contrôle de routine, nous avons choisi un seul mode d'expression des résultats et défini précisément l'activité minimale requise validant l'activité d'un principe actif RU 41740.

3-1) Choix du mode d'expression des résultats

Plusieurs arguments nous permettent d'effectuer le choix du mode d'expression des résultats.

La figure 33 rassemble les activités de différents lots exprimées en ΔT_d et en pourcentage d'épuration. Ils sont représentés respectivement sous forme d'histogramme et sous forme de carré. Pour de fortes activités stimulatrices, les variations du ΔT_d sont plus importantes que celles observées pour le calcul du pourcentage d'épuration. Ce dernier masque les différences d'activités : il atteint 99 % pour une épuration de deux logarithmes et 99,9 % pour une épuration de trois logarithmes. Dans le même temps, le ΔT_d , passe respectivement de 1,86 à 2,8 heures.

Le tableau 16 indique, pour chaque mode d'expression des résultats, la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation des activités de tous les lots représentés dans la figure 33.

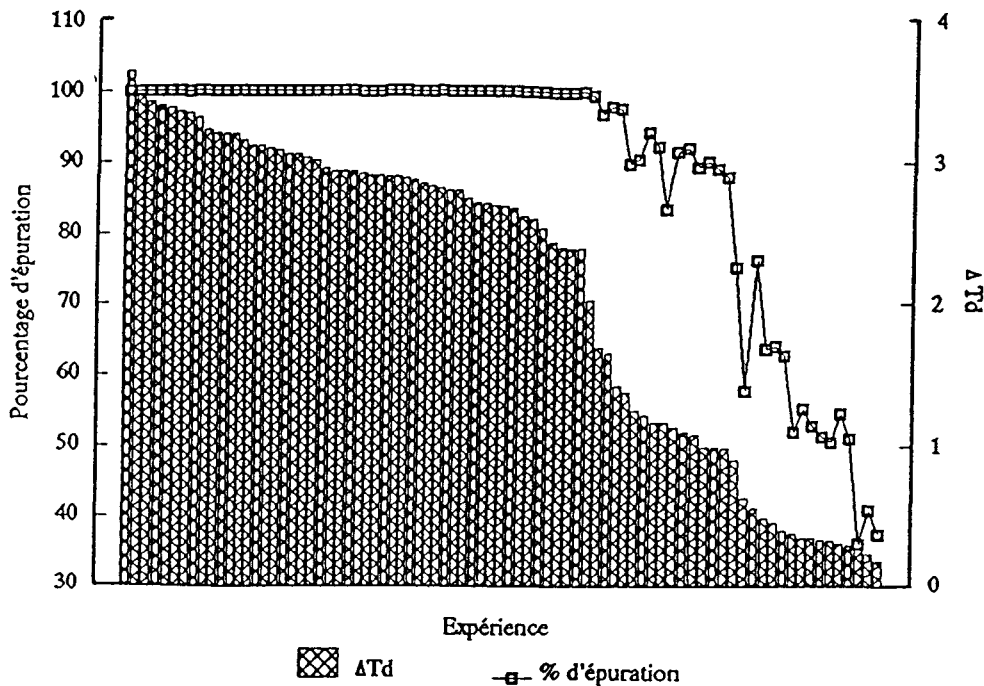


Figure 33. Comparaison des modes d'expression de l'activité de stimulation de l'épuration bactérienne.

Tableau 16. Moyenne des intensités de stimulation de la clearance bactérienne des lots RU 41740. Influence du mode d'expression des résultats.

	ΔTd	Pourcentage d'épuration
Moyenne (n = 81)	2,13	89,54
σ_{n-1}	1,1	18,19
Cv (%)	51,7	20

Pour ces lots d'activités variables, le coefficient de variation est 2,5 fois plus grand dans le cas du ΔTd que dans celui du pourcentage d'épuration. La dispersion des activités est beaucoup plus large avec ce mode de calcul. Nous pourrions donc, plus aisément, comparer des principes actifs entre eux et détecter une dérive éventuelle de l'activité.

Enfin, le ΔTd est bien le reflet d'une activité biologique puisqu'il est lié au logarithme du nombre de bactéries disparues lors de la stimulation du système réticulo-endothélial. Comme le montre la table 1, il est du type :

$$\Delta Td = -ay \quad (\text{et } \Delta Td > 0 \text{ car } a < 0)$$

où y est le nombre de logarithmes de bactéries disparues du sang périphérique et a le coefficient directeur de la droite de corrélation liant le Td et la concentration en germes.

Dans le cas présent, $a = -0,929$ et ΔTd sera :

$\leq 0,929$ pour une épuration inférieure ou égale à un logarithme,

$0,929 \leq \Delta Td \leq 1,858$ pour une épuration comprise entre un et deux logarithmes,

$1,858 \leq \Delta Td \leq 2,787$ pour une épuration comprise entre deux et trois logarithmes,

$\geq 2,787$ pour une épuration supérieure ou égale à trois logarithmes.

Enfin, il est possible de corréler les deux modes d'expression (Figure 34). Le coefficient de corrélation observé pour $n = 81$ est de 0,86. Les tables statistiques, au risque de 5 pour cent indique que cette corrélation est significative (pour $n = 80$, r doit être supérieur à 0,2172).

Soit Td_1 le temps de détection moyen du groupe témoin et $10^{(x+y)}$ la concentration en germes correspondante.

Soit Td_2 le temps de détection moyen du groupe traité et 10^x la concentration en germes correspondante.

$$\Leftrightarrow Td_1 = a \log 10^{(x+y)} + b \text{ et } Td_2 = a \log 10^x + b$$

$$\Leftrightarrow \Delta Td = Td_2 - Td_1 = a \log 10^x + b - (a \log 10^{(x+y)} + b)$$

$$\Leftrightarrow \Delta Td = ax + b - a(x+y) - b$$

$$\Leftrightarrow \Delta Td = -ay$$

Table 1. Relation entre le ΔTd et le nombre de logarithme de bactéries disparues lors d'un test de clearance bactérienne.

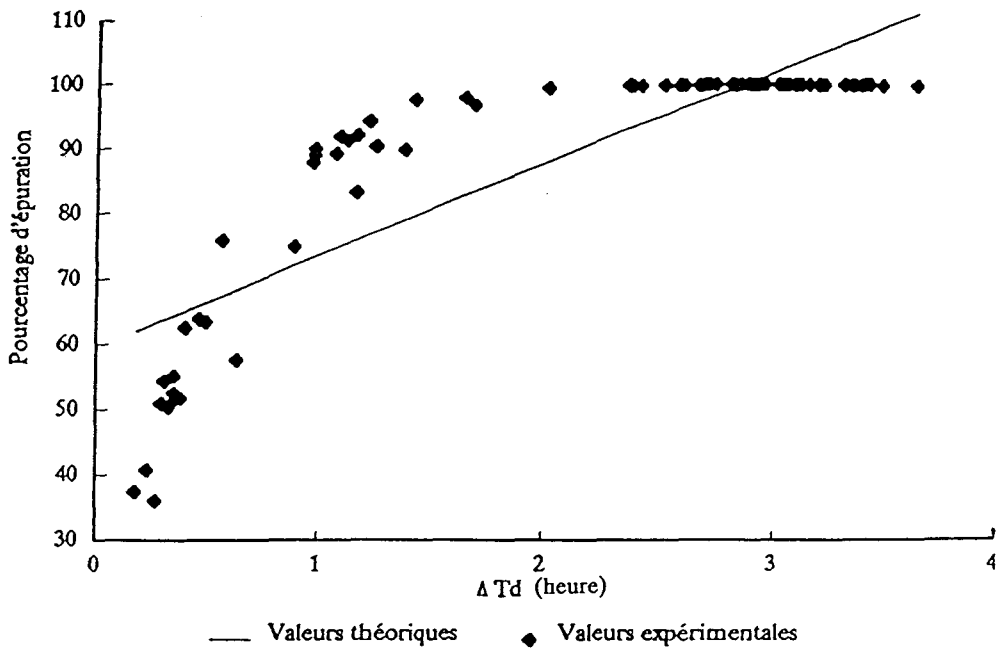


Figure 34. Droite de corrélation entre les deux modes d'expression (pourcentage d'épuration et ΔTd) de l'activité stimulatrice de l'épuration bactérienne.

3-2) Définition de la norme

Arbitrairement, nous définissons qu'un principe actif d'activité correcte doit provoquer une diminution de la charge bactérienne sanguine d'au moins deux logarithmes. Ainsi, la norme théorique à retenir est, selon la formule $Td = -0,929 \log C + 7,161$, de -2a soit 1,85 heures.

La norme établie pour la clearance au carbone est inférieure de 20 % à la norme théorique et nous retenons, pour le test d'épuration bactérienne, la norme suivante : le ΔTd doit être supérieur ou égal à 1,5 heures.

Nous fixons également une norme pour le temps de détection moyen associé au groupe témoin. Il est, en effet, le garant d'une concentration bactérienne injectée correcte et, en conséquence, d'une concentration bactérienne sanguine initiale suffisante pour permettre la mise en évidence d'une stimulation du système réticulo-endothélial. Le temps de détection moyen associé au groupe témoin devra être compris entre 2,9 et 3,8 heures ce qui correspond environ à une concentration bactérienne sanguine comprise entre 4000 et 40000 germes par millilitre.

4) Activités stimulatrices d'autres immunomodulateurs

4-1) Muramyl dipeptide (MDP)

Tanaka *et al.* en 1979 indiquent que le muramyl dipeptide, la plus petite structure capable de remplacer les mycobactéries de l'adjuvant complet de Freund, stimule les capacités phagocytaires du système réticulo-endothélial. Ils indiquent que l'épuration des particules de carbone est stimulée après une simple injection de MDP. L'activité stimulatrice est maximale dès la première journée qui suit le traitement et elle décroît ensuite pour s'annuler après trois jours.

Il nous a semblé intéressant de tester l'activité stimulatrice de cette molécule par épuration bactérienne.

Tableau 17. Activité stimulatrice comparée de l'épuration bactérienne du MDP et du RU 41740. Les animaux sont traités par une seule injection par voie intrapéritonéale à J-1 ou J-2.

	RU 41740 (224*)	MDP			
Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	250	250	1000	2000	10000
	ΔTd	ΔTd			
J-1	2,64 2,73 2,15		- 0,08	0,18	0,08
Moyenne (n = 3)	2,51 \pm 0,31 (12,44%)				
J-2	3,31 3,40 3,18	0,23	0,77	0,14	0,24
Moyenne (n = 3)	3,30 \pm 0,11 (3,35 %)				

Le tableau 17 montre qu'une simple injection de RU 41740, à J-1 ou à J-2, est capable de stimuler l'épuration bactérienne chez la souris. L'activité est plus importante lorsque l'injection est réalisée 2 jours avant l'infection par voie intraveineuse. L'intensité de cette activité est comparable, au seuil de 5 %, à l'activité moyenne du lot 224* (Cf tableau 13) établie lorsque les animaux reçoivent un traitement à J-1 et J-2 ($2,755 < \Delta\text{Td} < 3,515$). Enfin, la dispersion de l'activité stimulatrice du RU 41740 est trois fois plus faible dans le traitement à J-2 que dans celui à J-1.

L'activité de stimulation du MDP sur la clearance bactérienne est négligeable quelque soit la dose injectée aux souris. Les ΔTd sont inférieurs à une heure et, par conséquent, il y a moins de un logarithme de différence entre les concentrations bactériennes des groupes témoins et traités. Ceci est contradictoire avec les travaux Waters et Ferraresi (1980) qui décèlent une activité de stimulation pour des doses comprises entre 0,1 mg/kg et 100 mg/kg.

4-2) Stimugène®

Le Stimugène est un immunomodulateur d'origine bactérienne. Composé de lysats détoxifiés de *Neisseria catarrhalis*, *Haemophilus influenza*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*, il était prescrit dans le traitement préventif des infections des voies aériennes supérieures (rhinopharyngite, rhinite, laryngite, sinusite). Nous testons son activité de stimulation de la clearance bactérienne.

Tableau 18. Activité de stimulation du Stimugène principe actif, glossette et spray sur la clearance bactérienne. Le traitement des animaux est réalisé, comme pour le RU 41740, à J-2 et J-1.

	Stimugène		
	Principe actif	Glossette	Spray
Dose	50 mg/kg	67,20 mg/kg	56 mg/kg
ΔTd (h) (n = 3)	4,01 \pm 0,15 (3,78 %)	2,75 \pm 0,08 (3,08 %)	3,70 \pm 0,16 (4,33 %)

Comme le montre le tableau 18, le Stimugène, sous les trois formes testées, stimule la clearance bactérienne. L'intensité de la stimulation est importante : elle est toujours supérieure ou égale à trois logarithmes. Notons que la quantité de Stimugène active administrée à l'animal est nettement plus importante que celle du RU 41740.

5) Conclusion

Le RU 41740 est un composé d'origine bactérienne qui stimule la capture de particules étrangères par les cellules phagocytaires. Les Laboratoires Cassenne contrôlent cette activité de stimulation de la phagocytose, sur tous les lots de RU 41740 produits, par un test d'épuration de particules de carbone. C'est la disparition de ces particules du sang périphérique qui est mesurée.

La conductance-métrie est une technique rapide de dénombrement bactérien qui permet de s'affranchir du comptage sur boîtes de Petri. Elle mesure le changement des propriétés électriques du milieu au cours de la croissance des germes et détermine un temps de détection qui est inversement proportionnel à la concentration bactérienne. Utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour estimer les qualités bactériologiques des aliments, nous l'avons mise à profit pour déterminer la charge bactérienne sanguine.

Dans ce travail, nous montrons qu'il est possible d'estimer la charge bactérienne sanguine après lyse des cellules du sang par l'eau distillée. Il existe alors une dépendance linéaire entre le nombre de bactéries du sang et le temps de détection donné par l'automate. Nous développons alors un test d'épuration bactérienne qui permet de mettre en évidence les propriétés immunomodulatrices du RU 41740. L'activité est mesurée par le calcul d'un ΔTd qui est lié au logarithme du nombre de bactéries disparues (y) par la

relation $\Delta T_d = -ay$ où a est le coefficient directeur de la droite de corrélation du germe étudié. Dans le cas du RU 41740, le ΔT_d moyen est de 2,99 heures et il traduit une différence de plus de trois logarithmes entre les charges bactériennes des sangs de souris témoins et traitées par le RU 41740.

Nous validons cette technique en la comparant à la technique classique de dénombrement sur boîtes de Petri et en estimant sa répétabilité et sa reproductibilité.

Nous montrons que :

- le dénombrement sur boîtes de Petri et la conductance-métrie donnent des résultats équivalents,
- la technique est reproductible et répétable.

Comparé à la technique de référence de mesure de l'activité phagocytaire *in vivo*, le test d'épuration bactérienne met en évidence l'activité stimulatrice du RU 41740 avec une variabilité plus faible.

En conséquence, ce test se révèle être le remplaçant idéal du test d'épuration de particules de carbone. L'utilisation de cet automate améliore les performances du test de clearance en permettant l'utilisation de particules viables. Le choix de la particule est très large et peut être adapté à chaque étude si le micro-organisme est détectable par conductance-métrie.

Pour chaque germe, il faudra choisir le milieu adéquat permettant la détection et adapter les paramètres concentration en germes injectée et temps séparant cette injection du prélèvement sanguin.

Ce test remplace désormais le test de clearance au carbone dans les contrôles utilisés pour qualifier les lots RU 41740 issus de la production. L'arrivée de cette technique dans le Laboratoire de Contrôle Biologique présente de nombreux avantages :

- homogénéité et la perennité de la suspension bactérienne injectée,
- diminution du nombre de souris utilisées (25 souris pour trois lots soit trois fois moins que pour le test de la clearance au carbone),
- augmentation du nombre de lots contrôlés par manipulation,
- informatisation des résultats.

B) Suivi de l'activité d'un sérum anti RU 41740 sur la croissance de *K. pneumoniae*

L'activité antibactérienne est une des premières propriétés du RU 41740. Elle est mise en évidence par des tests d'infections expérimentales où il se révèle actif contre un grand nombre d'infections bactériennes (Zalish, 1983).

Le calcul de l'activité protectrice du RU 41740 contre une infection à *K. pneumoniae* fait partie des outils de contrôle utilisés pour définir la conformité des lots issus de la production.

La procédure de contrôle comporte trois étapes : une étape de vaccination (J-6 et J-2), une infection à J0 et un suivi des mortalités sur six jours. Le pourcentage de protection calculé doit être supérieur à 60 % pour que l'activité antibactérienne du principe actif soit reconnue.

Ce test est long puisque douze jours sont nécessaires à l'obtention des résultats. Les mécanismes biologiques mis en jeu dans ce type de test sont complexes. En effet, *in vivo*, il est difficile d'identifier les mécanismes précis concourant à la protection des animaux. Elle est la résultante de l'action de l'ensemble du système immunitaire (cellules phagocytaires, immunité humorale, immunité à médiation cellulaire).

Dans le but d'explorer d'autres tests permettant la mise en évidence l'activité antibactérienne du RU 41740. Nous suivons :

- la charge bactérienne sanguine lors d'une infection expérimentale à *K. pneumoniae*,
- l'action d'un sérum de souris anti RU 41740 sur la croissance de *K. pneumoniae*.

Ces deux types de travaux nécessitent un dénombrement bactérien. Ces numérations sont réalisées grâce à l'automate Malthus 2000.

1) Premiers travaux

1-1) Recherche d'un milieu de culture permettant la détection de la croissance de *K. pneumoniae* par conductance-métrie.

Des essais de détection de la croissance de *K. pneumoniae* sont réalisés sur les milieux Enterobacteriaceae, Columbia broth, Neutralized soja et le milieu Spye. Nous établissons les droites de corrélation et comparons les coefficients de corrélation obtenus pour les quatre milieux. Le tableau 19 donne les coefficients de corrélation calculés avec le nombre de valeurs traitées. Pour tous les milieux testés, la corrélation est significative et il y a donc dans tous les cas une relation linéaire entre la charge bactérienne et le temps de détection donnés par l'automate. Pour les milieux Spye, Columbia broth et Neutralized soja des courbes de conductance perturbées apparaissent (Figure 35).

Tableau 19. Recherche d'un milieu de culture permettant la détection conductance-métrique de la croissance de *K. pneumoniae*.

Milieu	Coefficient de corrélation	Nombre de valeur	r théorique seuil 5 %
Enterobacteriaceae	0,998	23	0,3809
Columbia broth	0,994	24	0,3809
Neutralized soja	0,990	15	0,4821
Spye	0,989	24	0,3809

C'est le milieu enterobacteriaceae qui est retenu pour suivre la croissance de *K. pneumoniae* par conductance-métrie. La figure 36 montre une courbe de conductance associée à la croissance de ce germe. Elle n'est pas perturbée et les trois phases caractéristiques d'une courbe de croissance sont retrouvées. La courbe de conductance est caractérisée par une amplitude (ΔG) plus faible que celle associée à la croissance dans le milieu Spye (Cf figure 35). Elle est de 150 à 200 μS .

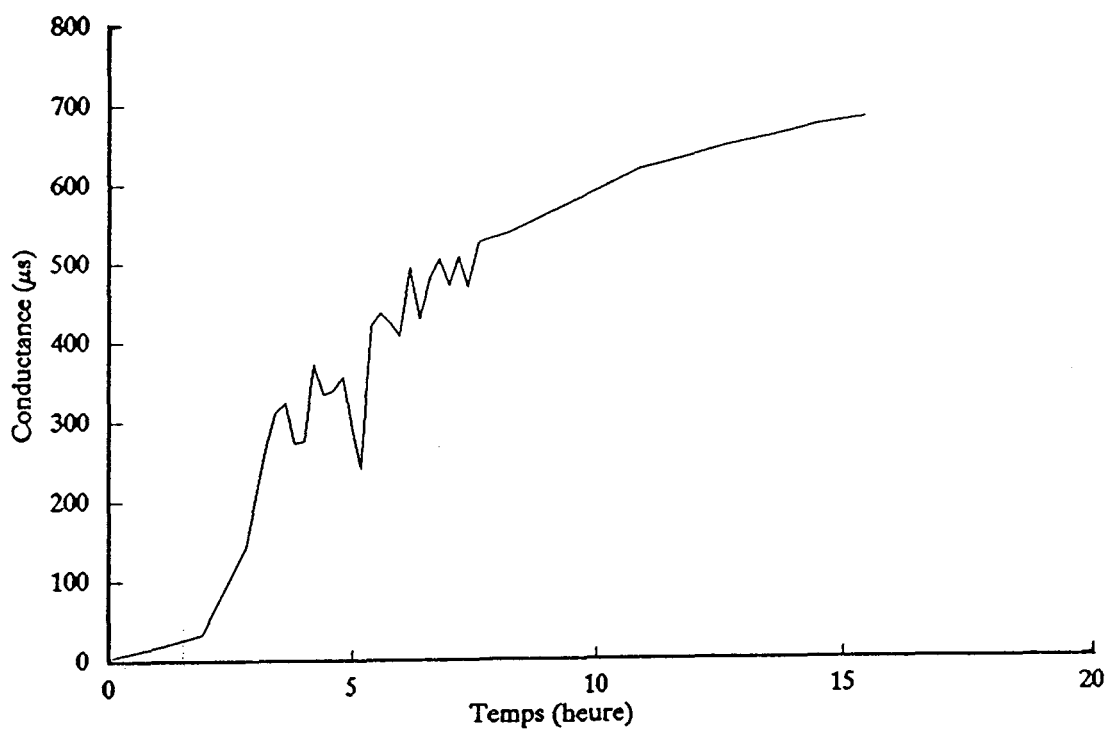


Figure 35. Courbe de conductance associée à la croissance de *K. pneumoniae* dans le milieu Spey.

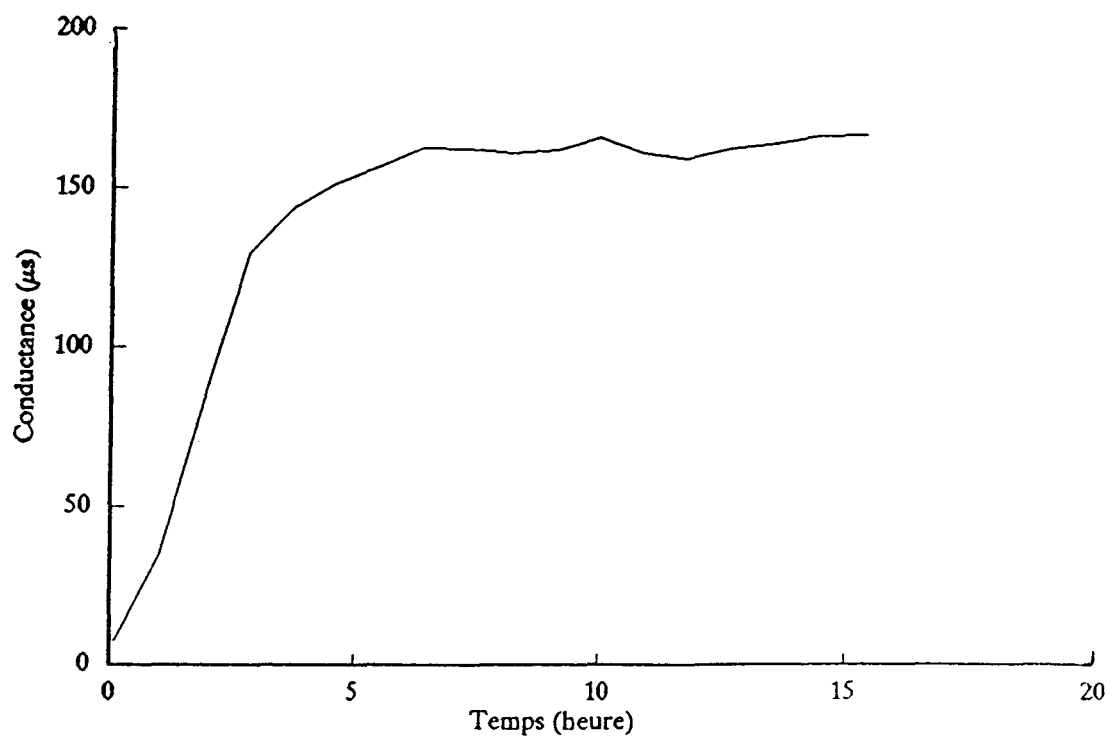


Figure 36. Courbe de conductance associée à la croissance de *K. pneumoniae* dans le milieu Enterobacteriaceae.

1-2) Etude de la cinétique de *K. pneumoniae* dans le sang de souris.

Après infection des souris par voie intrapéritonéale, nous déterminons la charge bactérienne sanguine par conductance-métrie.

Quatre expérimentations sont menées à la fois chez un groupe témoin et un groupe traité par le RU 41740 (J-6, J-2, 10 µg/kg). Les concentrations bactériennes injectées, les temps de latence précédant le prélèvement sanguin et les temps de détection des deux groupes sont présentés dans le tableau 20.

Tableau 20. Analyse conductance-métrique de la charge bactérienne du sang de souris après injection d'une suspension de *K. pneumoniae* par voie intrapéritonéale. Quatre concentrations bactériennes sont injectées et différents temps de prélèvement sont étudiés.

	C _{injectée} (cfu/ml)	Temps de prélèvement (h)	Td (h)	
			Témoin (n=5)	Traité (n=5)
1	8,8 10 ⁴	2	5,9 ± 0,04 (0,68 %)	N.D
		4	6,5 ± 0,09 (1,38 %)	N.D
2	1,6 10 ⁶	4	5,3 ± 0,06 (1,07 %)	N.D
3	2,2 10 ⁷	1	4,6 ± 0,05 (1,09 %)	5,8; 9,2; 5,8; N.D; N.D;
		4	4,5 ± 0,06 (1,33 %)	5,3; 5,7; 5,1; N.D; N.D;
4	4,8 10 ⁸	4	2,2 ± 0,05 (2,27 %)	1,7 ± 0,46 (27,06 %)

N.D signifie qu'aucun temps de détection n'est dévoilé.

Dans les quatre expériences, des temps de détection apparaissent pour les groupes témoins. Ils sont d'autant plus faibles que la concentration en germes injectée est importante. Si les animaux reçoivent un traitement par le RU 41740, aucun temps de détection n'est dévoilé pour les deux premières concentrations injectées quel que soit le temps de latence étudié. Dans la troisième expérience, trois temps de détection sur cinq sont révélés.

Compte tenu du principe de l'appareil, le sang des souris traitées ne contient pas du tout ou pas suffisamment de germes pour obtenir un temps de détection reproductible. Ainsi, une épuration bactérienne, sous l'influence du RU 41740, est mise en évidence. Elle n'est pas mesurable précisément dans les conditions expérimentées puisqu'il est

impossible de calculer un temps de détection moyen pour le groupe traité.

Dans la dernière expérience, les souris reçoivent la dose de germes la plus élevée et les temps de détection des deux groupes sont du même ordre de grandeur ($\Delta T_d = -0,5$ h). Aucun phénomène d'épuration n'est décelé. Dans cette expérience, les temps de détection du groupe traité apparaissent anormalement élevés et un problème de manipulation vient sans doute perturber les résultats.

1-3) Effet d'un sérum anti RU 41740 sur la croissance de *K. pneumoniae*

Cette étude est réalisée chez la souris. Dans cet essai, nous respectons le protocole de vaccination de la technique usuelle de contrôle. Les animaux reçoivent à J-6 et J-2 une dose de RU 41740 de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ par voie intrapéritonéale. Après récupération du sang, les sérums sont préparés et mis en contact avec une suspension de *K. pneumoniae*. L'action du sérum est suivie par conductance-métrie, les temps de détection des deux groupes sont relevés, moyennés ($n = 3$) et le ΔT_d est calculé.

Tableau 21. Effet d'un sérum de souris anti RU 41740 sur la croissance de *K. pneumoniae* ($C_f = 10^3$ germes/ml).

Facteur de dilution du sérum	ΔT_d (h)
5	-0,1
10	0,13

Comme le montre le tableau 21, aux dilutions sériques étudiées, les ΔT_d sont quasi nuls. Les courbes de conductance des deux groupes sont superposables. Le sérum anti RU 41740, ainsi préparé, n'a pas d'influence sur la courbe de conductance.

Compte tenu de ces résultats, nous poursuivons l'étude en modifiant le protocole d'administration du principe actif et la dose de RU 41740 injectée aux animaux. Nous augmentons, volontairement, la quantité de RU 41740 reçue par les souris pour s'assurer de la faisabilité du test.

Le premier protocole testé est le suivant :

A J-6, J-5, J-2, J-1, un groupe de souris est traité par du RU 41740 (Lot 224*), par voie intrapéritonéale, à la dose de 25 mg/kg les quatre jours du traitement. Un groupe témoin reçoit parallèlement de l'eau physiologique.

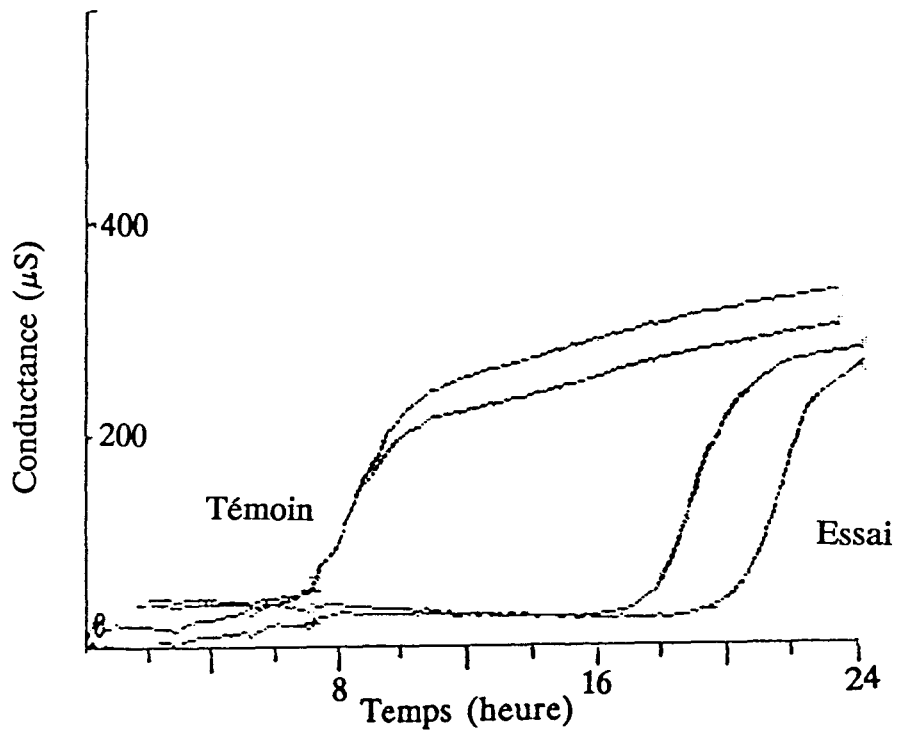


Figure 37. Courbes de conductance obtenues lors de la croissance de *K. pneumoniae* ($C_t = 10^3$ germes/ml). Les sérums témoin et anti RU 41740 sont dilués au demi.

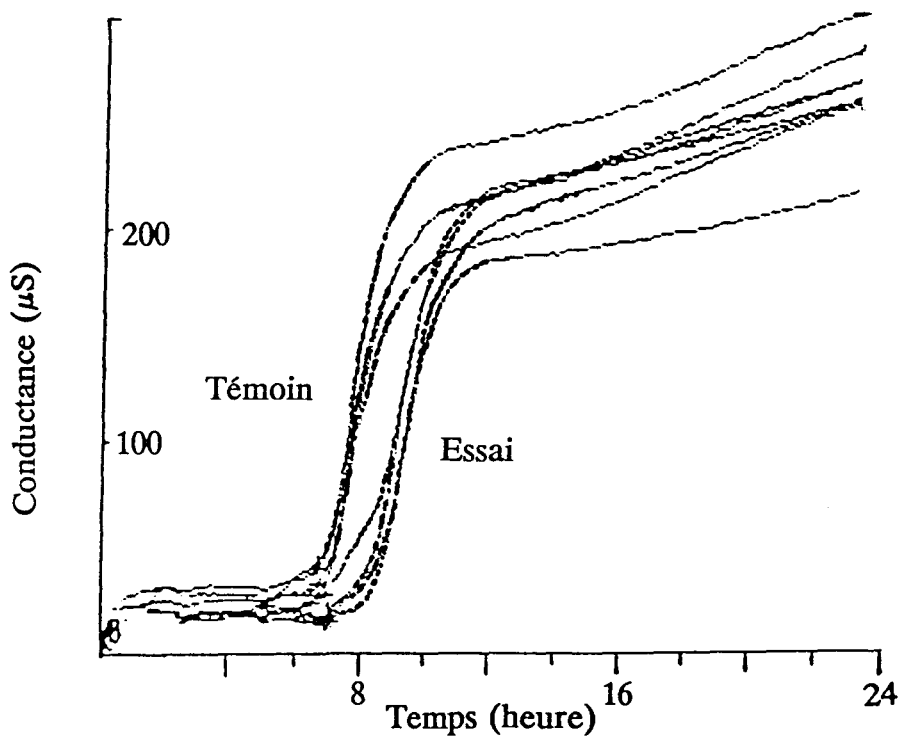


Figure 38. Courbes de conductance obtenues lors de la croissance de *K. pneumoniae* ($C_t = 10^3$ germes/ml). Les sérums témoin et anti RU 41740 sont dilués au dixième.

A J=0, les sangs sont prélevés et les sérums sont préparés.

Dilué au demi, les sérums du groupe traité et témoin sont mis en contact avec une suspension de *K. pneumoniae* (10^3 germes/ml).

Dilué au dixième, les sérums du groupe traité et témoin sont mis en contact avec deux suspensions de *K. pneumoniae* (10^3 et 10^4 germes/ml).

Dans les figures 37, 38, 39, nous distinguons deux groupes de courbes de conductance. Celles dont la phase exponentielle est précoce sont associées aux sérums témoins, les autres, qui présentent une phase exponentielle plus tardive correspondent aux sérums obtenus après traitement par le RU 41740. Dans tous les cas, nous observons donc, un décalage entre les courbes de conductance obtenues en présence de sérum témoin et de sérum anti RU 41740. Il est mis en évidence pour les deux concentrations bactériennes (10^3 et 10^4 germes/ml) étudiées. Enfin, pour la première concentration, la différence entre les deux groupes de courbes est d'autant plus grande que la dilution sérique est faible.

En conséquence, la présence de sérum anti RU 41740 dans le milieu de culture modifie la courbe de conductance associée à la croissance de *K. pneumoniae*. Cette modification de la courbe de conductance est le signe d'un changement du métabolisme bactérien (Lamotte, 1992) et donc d'une action du sérum anti RU 41740 sur la croissance du germe.

Il apparaît donc envisageable de suivre l'activité antibactérienne d'un sérum de souris anti RU 41740 par conductance-métrie.

2) Optimisation du test

L'optimisation de ce test est réalisée en gardant le calendrier de vaccination de la technique classique (J-6, J-2). Nous réalisons une étude pour définir la dose, la voie d'administration du principe actif et le rapport concentration en germes et dilution sérique lors du test.

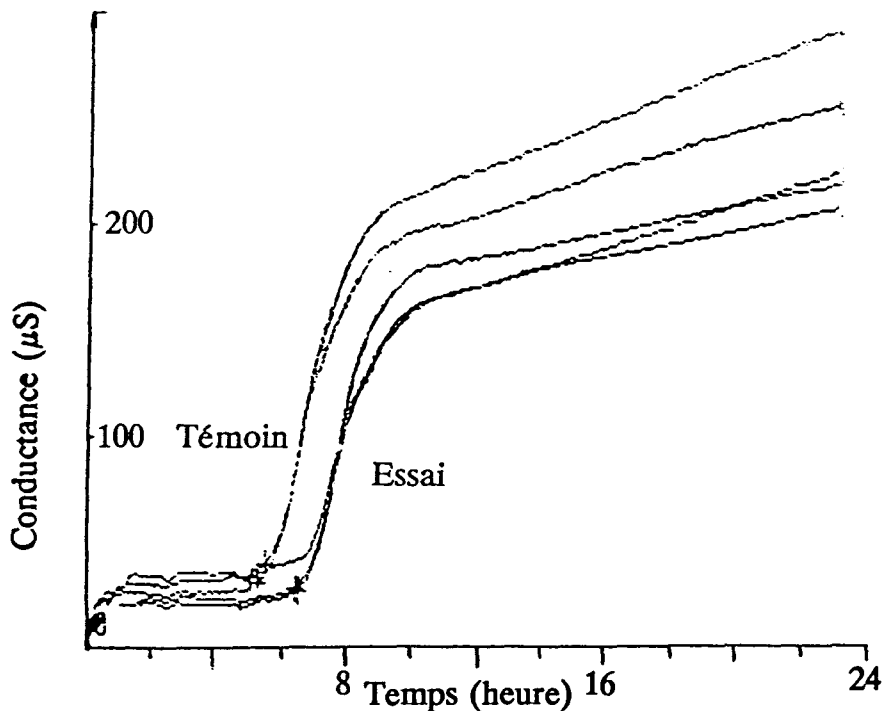


Figure 39. Courbes de conductance obtenues lors de la croissance de *K. pneumoniae* ($C_i = 10^4$ germes/ml). Les sérums témoin et anti RU 41740 sont dilués au dixième.

2-1) Dose et voie d'administration du RU 41740

Trois voies d'administration sont étudiées : la voie intrapéritonéale, la voie intraveineuse et la voie *per os*. Pour ces trois voies d'administration, différentes doses sont testées.

Dans les courbes des figures 37, 38 et 39, une activité antibactérienne est décélée pour un sérum dilué au demi ou au dixième. Ici, nous diluons le sérum 7,33 fois, ce qui nous permet d'envisager une activité importante sans consommer trop de sérum.

Des ΔTd importants, lorsque le RU 41740 est administré par voie intrapéritonéale, sont mis en évidence pour la dose de 25 mg/kg et 10 mg/kg (Tableau 22). En dessous de ces doses, aucun ΔTd significatif n'est observé.

Tableau 22. Activité antibactérienne d'un sérum anti RU 41740 contre une suspension de *K. pneumoniae* de 10^3 germes/ml. Le principe actif est administré par voie intrapéritonéale. Différentes doses sont étudiées.

Sérum		Td moyen (h) (n = 6)	Cv (%)	Δ Td (h)
Témoin		6,06	4,61	
anti RU 41740	25 mg/kg	10,78	3,62	4,72
	10 mg/kg	9,27	3,65	3,21
	1 mg/kg	6,32	1,56	0,26
	250 μ g/kg	6,08	5,03	0,02

Tableau 23. Activité antibactérienne d'un sérum anti RU 41740 contre une suspension de *K. pneumoniae* de 10^3 germes/ml. Le principe actif est administré par voie intraveineuse. Différentes doses sont étudiées.

Sérum		Td moyen (h) (n = 6)	Cv (%)	Δ Td (h)
Témoin		6,16	9,08	
anti RU 41740	1 mg/kg	5,98	1,64	-0,18
	250 μ g/kg	5,97	2,52	-0,19
	100 μ g/kg	5,88	1,28	-0,28
	10 μ g/kg	5,81	2,06	-0,35

Tableau 24. Activité antibactérienne d'un sérum anti RU 41740 contre une suspension de *K. pneumoniae* de 10^2 germes/ml. Le principe actif est administré par voie orale. Différentes doses sont étudiées.

Sérum		Td moyen (h) (n = 6)	Cv (%)	Δ Td (h)
Témoin		7,17	3,26	
anti RU 41740	25 mg/kg	7,2	3,5	0,03
	10 mg/kg	7,26	3	0,09
	1 mg/kg	7,24	4,84	0,07
	250 μ g/kg	7,25	6,15	0,08

Le traitement par voie intraveineuse, aux doses testées, ne permet pas d'obtenir une activité antibactérienne détectable par conductance-métrie (Tableau 23). Enfin, l'analyse de l'activité d'un sérum obtenu lors d'un traitement par voie orale est réalisée contre une suspension finale de *K. pneumoniae* de 10^2 germes par millilitre (Tableau 24). Les ΔTd sont quasiment nuls pour toutes les doses testées. Signalons qu'une activité antibactérienne d'un sérum obtenu après traitement par voie orale a déjà été mise en évidence par une technique de dénombrement sur boîtes de Petri (Rapport interne). Les souris recevaient alors 8 milligrammes de RU 41740 sur quatre jours. Dans notre expérimentation, à la dose maximale, les animaux reçoivent 1 milligramme sur deux jours. Cette différence pourrait expliquer l'absence d'activité observée lors de notre traitement *per os*.

Dans toutes les expériences suivantes, le traitement est effectué par voie intrapéritonéale à la dose de 25 mg/kg (J-2, J-6).

2-2) Rapport concentration en germes et suspension bactérienne

Des sérums anti RU 41740 dilués 2,5 fois à 100 fois sont mis en contact avec trois concentrations en *K. pneumoniae*. Les ΔTd calculés sont reportés dans le tableau 25.

Tableau 25. Effet de la dilution sérique et de la concentration bactérienne sur le ΔTd . Le sérum utilisé est un sérum anti RU 41740 obtenu après un traitement classique à la dose de 25 mg/kg.

Facteur de dilution	2,5	5	10	50	100
(C) germes/ml	ΔTd				
10^5	0,97	0,67	0,2	-0,03	-0,01
10^4	2,8	2,03	0,34	0,1	0,05
10^3	6,43	5,07	0,67	0,07	0,21

Pour les dilutions sériques au 50^{ème} et au 100^{ème}, qu'elle que soit la concentration bactérienne, les ΔTd sont quasi nuls. Pour les trois autres dilutions, des ΔTd plus significatifs sont reportés et ils sont d'autant plus importants que la dilution sérique est faible. Les ΔTd sont inférieurs à une heure pour la dilution au dixième puis

augmentent pour les deux autres concentrations sériques. Enfin, pour une dilution sérique donnée, le ΔTd est d'autant plus fort que la concentration bactérienne est faible. Ainsi, l'activité sérique mise en évidence est d'autant plus importante que la concentration sérique est forte et que la concentration bactérienne faible.

Compte tenu de ces résultats, nous choisissons de travailler à une dilution sérique comprise entre 5 et 10. Une dilution comprise entre 5 et 10 revient à ajouter de 1 à 2 millilitres de sérum pour construire notre milieu réactionnel qui a un volume final de 10 millilitres. Dans un souci de simplicité, 1,5 millilitres de sérum est ajouté soit une dilution finale de 6,67 fois.

2-3) Protocole définitif

Les animaux reçoivent, par voie intrapéritonéale, une dose de RU 41740 de 25 mg/kg les deux jours du traitement (J-6, J-2). Les sérums des deux groupes dilués 6,67 fois sont mis en présence d'une suspension de *K. pneumoniae* de concentration finale de 10^3 germes par millilitre.

Dans le tableau 26 sont reportés les résultats obtenus lors de 11 analyses de l'activité du lot 224* par ce protocole. Cette étude a été réalisée sur six mois. Les coefficients de variation affectés aux temps de détection moyens des groupes traités et des groupes témoins sont inférieurs à 10 %. L'activité moyenne est importante puisque le ΔTd moyen atteint 4,18 heures \pm 0,60 (14,42 %).

3) Signification du test

Dans ce chapitre, nous cherchons à mieux connaître ce test en répondant à quelques questions :

Quelle est la signification du ΔTd observé ?

Que se passe-t-il dans la cellule Malthus ?

Quels sont les rôles des anticorps anti RU 41740 et du complément ?

Quelle est la sensibilité du test ?

Tableau 26. Résultats de onze analyses évaluant l'activité d'un sérum anti RU 41740 (lot 224*) sur une suspension de *K. pneumoniae* ($C_f = 10^3$ germes/ml).

	Td _{témoins}	Td _{traités}	Δ Td
1	6,94	11,64	4,7
2	6,88	11,33	4,45
3	7,1	12,08	4,98
4	7,18	11,95	4,77
5	6,94	10,37	3,43
6	6,5	11,025	4,525
7	6,4	10,12	3,72
8	6,67	9,88	3,21
9	6,55	10,88	4,33
10	6,53	10,07	3,53
11	6,48	9,92	3,44
Moyenne	6,74	10,84	4,18
σ_{n-1}	0,27	0,82	0,60
Cv (%)	4,06	7,60	14,42

3-1) Signification des résultats

Nous établissons la droite de corrélation de *K. pneumoniae* dans un milieu contenant du sérum témoin de souris dilué 6,67 fois (Figure 40). Elle a pour équation : $Td = -1,164 \log (C \text{ (cfu/ml)}) + 9,965$ et le coefficient de corrélation est de $-0,996$ ($n = 44$). Si l'on traduit les données conductance-métriques (Temps de détection moyen) du tableau 26 en concentrations bactériennes présentes dans les cellules Malthus, nous obtenons :

une concentration bactérienne moyenne de 590 germes par millilitre dans les cellules renfermant du sérum témoin,

une concentration bactérienne moyenne de moins d'un germe par millilitre lorsque la croissance est réalisée en présence d'un sérum anti RU 41740.

Tableau 26. Résultats de onze analyses évaluant l'activité d'un sérum anti RU 41740 (lot 224*) sur une suspension de *K. pneumoniae* ($C_f = 10^3$ germes/ml).

	Td _{témoins}	Td _{traités}	ΔTd
1	6,94	11,64	4,7
2	6,88	11,33	4,45
3	7,1	12,08	4,98
4	7,18	11,95	4,77
5	6,94	10,37	4,37
6	6,5	11,025	4,525
7	6,4	10,12	3,72
8	6,67	9,88	3,21
9	6,55	10,88	4,33
10	6,53	10,07	3,53
11	6,48	9,92	3,44
Moyenne	6,74	10,84	4,18
σ_{n-1}	0,27	0,82	0,60
Cv (%)	4,06	7,60	14,42

3-1) Signification des résultats

Nous établissons la droite de corrélation de *K. pneumoniae* dans un milieu contenant du sérum témoin de souris dilué 6,67 fois (Figure 40). Elle a pour équation : $Td = -1,164 \log (C \text{ (cfu/ml)}) + 9,965$ et le coefficient de corrélation est de $-0,996$ ($n = 44$). Si l'on traduit les données conductance-métriques (Temps de détection moyen) du tableau 26 en concentrations bactériennes présentes dans les cellules Malthus, nous obtenons :

une concentration bactérienne moyenne de 590 germes par millilitre dans les cellules renfermant du sérum témoin,

une concentration bactérienne moyenne de moins d'un germe par millilitre lorsque la croissance est réalisée en présence d'un sérum anti RU 41740.

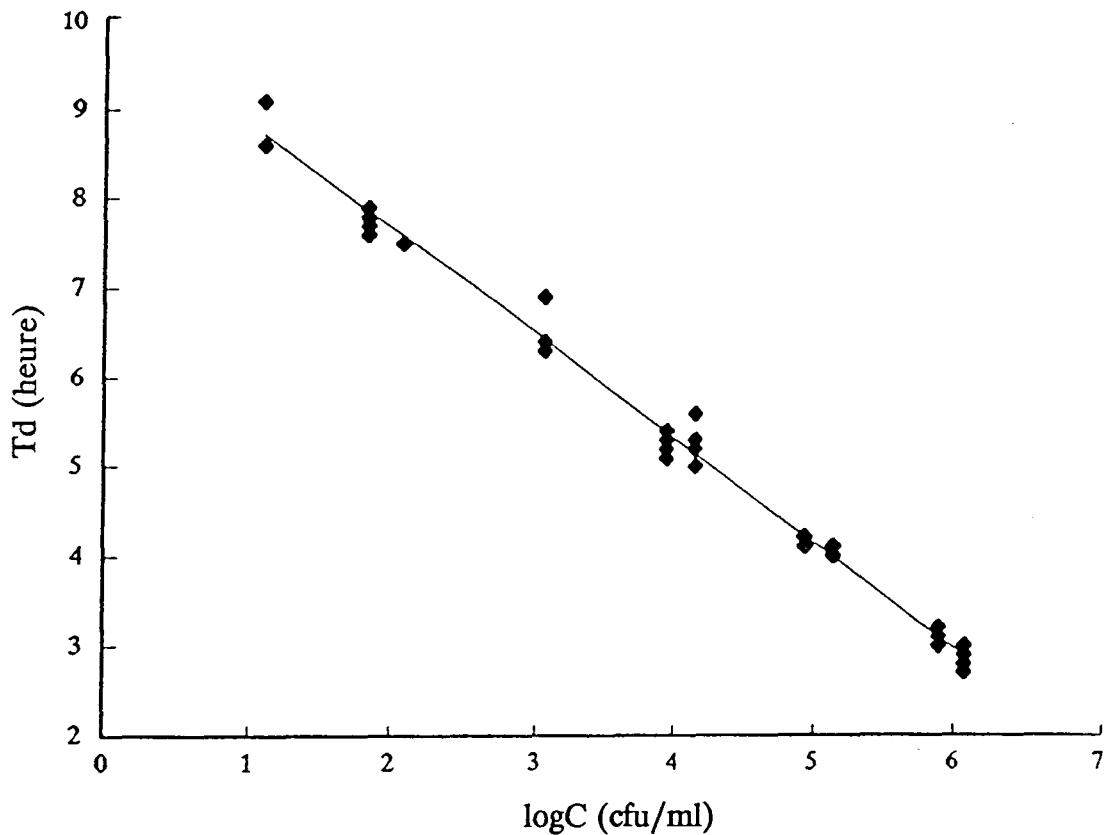


Figure 40. Droite de corrélation de *K. pneumoniae* dans le milieu Enterobacteriaceae additionné d'un sérum témoin dilué en final 6,67 fois. $Td = -1,164 \log (C \text{ (cfu/ml)}) + 9,965$ ($r = -0,996$, $n = 44$).

Comme nous le démontrons dans le chapitre SRE Malthus, le coefficient directeur de la droite de corrélation nous permet de calculer la correspondance entre le ΔTd calculé et le nombre de logarithmes séparant les concentrations bactériennes des groupes traités et témoins. Elle est présentée dans le tableau 27.

Tableau 27. Correspondance entre le ΔTd et la différence de concentration en *K. pneumoniae* ($\Delta \text{Log C}$) entre les groupes témoin et traité.

ΔTd (h) calculé	$\Delta \text{Log C}$
$\Delta Td \leq 1,2$	- de 1 logarithme
$1,2 \leq \Delta Td \leq 2,3$	entre 1 et 2 logarithmes
$2,3 \leq \Delta Td \leq 3,5$	entre 2 et 3 logarithmes
$\Delta Td \geq 3,5$	+ de 3 logarithmes

$\Delta \text{Log C}$ exprime la différence de concentration bactérienne entre les cellules contenant du sérum témoin et les cellules renfermant du sérum anti RU 41740.

Le ΔTd moyen observé lors du test antibactérien (4,18) (Cf tableau 26) traduit donc une différence de concentration en germes de plus de trois logarithmes (3,59) soit la disparition de la totalité des germes introduits dans la cellule Malthus.

En conséquence, tout se passe comme si, la présence du sérum anti RU 41740 "tuait tous les germes" ou ralentissait le métabolisme bactérien de manière telle que le changement de conductance observé corresponde à celui d'une charge bactérienne quasiment nulle.

3-2) Parallèle boîtes de Petri

Notre objectif est de confirmer par la méthode classique que le ΔTd observé correspond effectivement dans la cellule Malthus à une différence de concentration en germes.

Au cours d'une analyse du pouvoir antibactérien d'un sérum anti RU 41740 par conductance-métrie, nous suivons les concentrations en germes des deux groupes, au cours du temps, par dénombrement sur boîtes de Petri. Ainsi, à intervalle régulier, des cellules sont sorties de l'incubateur et leurs charges bactériennes sont analysées par la méthode classique. Cette expérience est renouvelée trois fois.

Comme le montre la figure 41, dans les trois expériences, la différence de concentration en germes est nulle dans les deux premières heures d'incubation. Elle augmente ensuite progressivement, pour atteindre son maximum après six heures de croissance. La différence entre les concentrations en germes des deux groupes est alors de deux à trois logarithmes. Ensuite, la différence décline et s'annule après 18 heures de culture (Tableau 28).

Tableau 28. Contrôle par dénombrement sur boîtes de Petri des concentrations bactériennes présentes dans les cellules Malthus du groupe témoin et traité après 18 heures de culture.

	Groupe témoin	Groupe traité
C_{moyenne} (germes/ml) ($n = 4$)	$3,65 \cdot 10^8$	$3,66 \cdot 10^8$
σ_{n-1}	$4,24 \cdot 10^7$	$4,64 \cdot 10^7$
Cv (%)	11,60	11,66

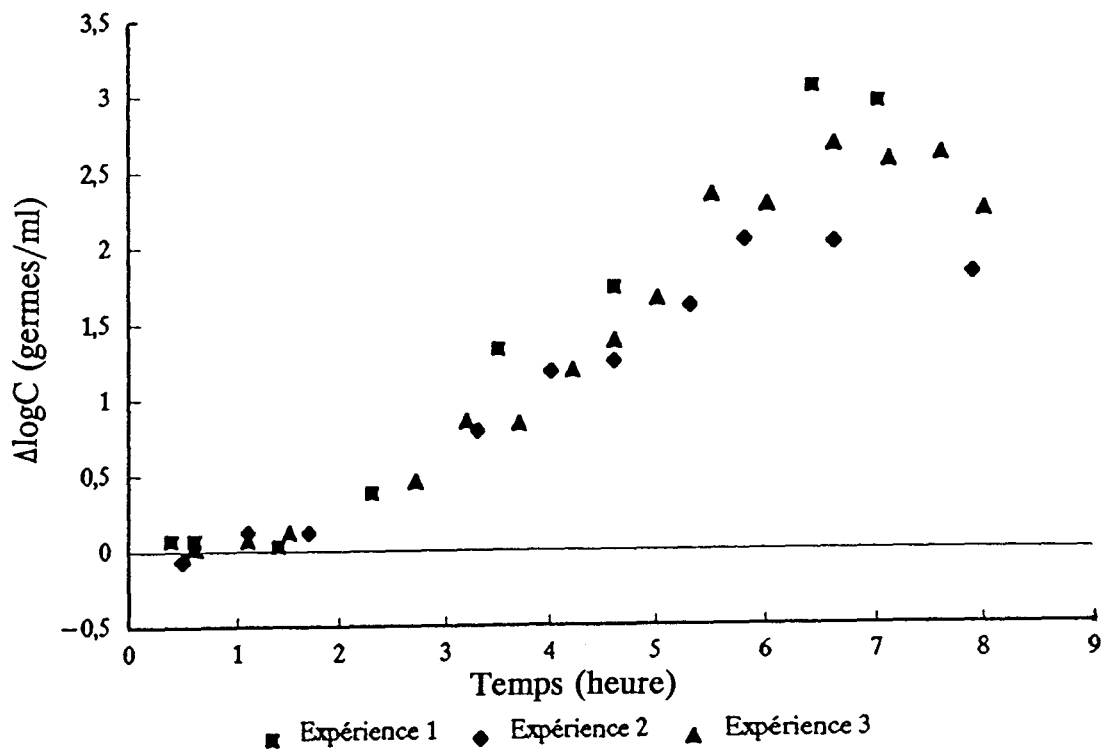


Figure 41. Suivi de l'activité d'un sérum anti RU 41740 sur la croissance de *K pneumoniae* par dénombrement sur boîtes de Petri.

Ainsi, les ΔT_d observés lors de l'analyse du pouvoir antibactérien du sérum anti RU 41740 sont bien le reflet d'une différence dans les concentrations bactériennes.

Cette étude dévoile également le caractère bactériostatique du sérum anti RU 41740. Aucune perte de charge bactérienne n'est observée en début de culture lorsque le sérum présent dans le milieu est un sérum anti RU 41740. La différence des concentrations observées plus tard dans la culture est probablement due à un ralentissement de la croissance bactérienne par le sérum anti RU 41740.

3-3) Présence d'anticorps anti RU 41740 et rôle du complément

Cette mise en évidence est réalisée par électrosynérèse : comme le montre la figure 42, un arc de précipitation contre une solution de Ti05 (mélange de différents lots de RU 41740 considéré comme référence standard) à 100 $\mu\text{g/ml}$ apparaît quand le sérum anti RU 41740 est pur ou dilué au cinquième. Parallèlement aux mêmes concentrations, pour le sérum témoin, il n'y a pas d'arc de précipitation. Le traitement administré aux souris provoque donc bien la synthèse d'anticorps anti RU 41740.

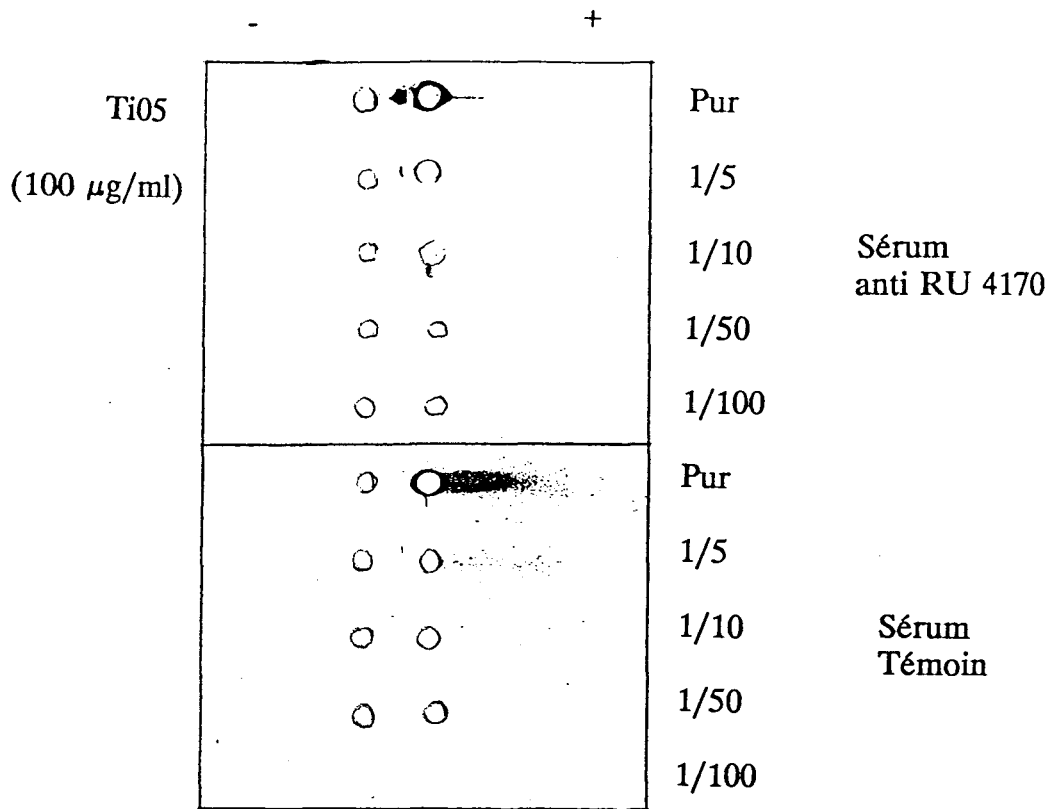


Figure 42. Electrosynérèse opposant une solution référence de RU 41740 (Ti05) aux sérums anti RU 41740 et témoin.

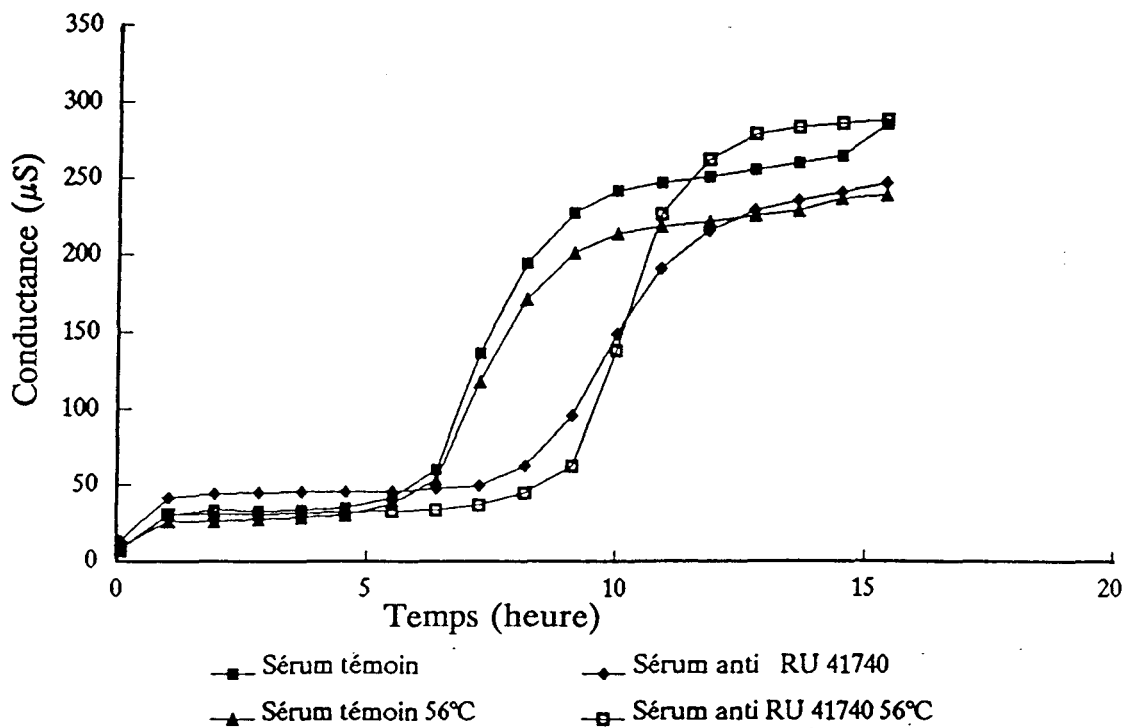


Figure 43. Rôle du complément dans l'activité du sérum anti RU 41740. Des sérums témoins et anti RU 41740 décomplémentés ou non sont mis en contact avec une suspension de *K. pneumoniae* ($C_f = 10^3$ germes/ml).

Pour connaître le rôle du complément dans l'activité antibactérienne mise en évidence par conductance-métrie, nous réalisons un test en présence de sérum décomplémenté (chauffage 56°C pendant 30 minutes). Comme le montre la figure 43, les courbes de conductance associées aux sérums normaux et décomplémentés sont superposables. La décomplémentation n'altère pas l'action du sérum sur la croissance. Le complément est un élément essentiel du système humoral. Composé d'une vingtaine de protéines circulantes, son activation aboutit à la lyse de cellules, bactéries, virus. La non intervention de cet élément dans l'activité antibactérienne confirme le caractère bactériostatique du sérum observé précédemment.

3-4) Etude de lots de faible activité

Le but de cette étude est d'apprécier la capacité du test à déceler une modification d'un principe actif. Le test de référence utilisé pour évaluer l'état des lots étudiés est l'immunonéphélométrie (IMN). C'est une technique très fine, qui nous renseigne sur le dosage et la conformation du produit. Les normes de conformité pour le RU 41740 sont :

- pente comprise entre 0,9 et 1,1,
- dosage compris entre 75 et 125 %.

Ne disposant pas de lot RU 41740 très faiblement dosé ou de conformation modifiée, nous analysons l'activité antibactérienne d'un stade du process de fabrication (rétentat) et de lots dégradés par la chaleur. Comme le montre le tableau 29, le rétentat possède en immunonéphélométrie une pente conforme et un dosage inférieur à la norme établie. Ce composé renferme donc du RU 41740 intact mais à un taux très faible. Le ΔT_d associé à cette fraction est faible ($\Delta T_d = 1,1$ heures). Il correspond à moins d'un logarithme de différence entre les deux groupes (Cf tableau 27). Le dosage de 17 % fait chuter la dose de principe actif administrée à moins de 5 mg/kg. Le faible ΔT_d associé à cette dose de RU 41740 confirme les résultats du tableau 22 qui indique que, par voie intrapéritonéale, la plus petite dose de principe actif engendrant une activité antibactérienne est comprise entre 1 et 10 mg/kg.

Tableau 29. Activité antibactérienne de sérums obtenus après un traitement des animaux par du RU 41740 de faible activité ou dégradé.

	Résultats				IMN	
	Td _{moyen} (h)	σ_{n-1}	Cv (%)	ΔTd (h)	Pente	Dosage (%)
Témoin	6,48	0,16	2,47			
Rétentat 1608	7,58	0,33	4,41	1,1	0,96	17
224 80°C 48 h	9,08	0,20	2,25	2,6	0,84	68
224 80°C 96 h	6,62	0,19	2,93	0,14	0,77	50

Afin de poursuivre l'étude, le lot 224* est dégradé par la chaleur pendant 48 et 96 heures à 80°C. L'analyse immunonéphélométrique révèle, dans les deux cas, une pente et un dosage "non conformes". La dégradation est d'autant plus importante que le traitement par la chaleur est long. L'analyse par le test antibactérien montre qu'après 48 heures à 80°C, le produit conserve une activité : $\Delta Td = 2,6$ heures. Au seuil de 5 %, elle n'appartient plus à l'intervalle $\bar{X} \pm 2\sigma_{n-1}$ où \bar{X} et σ_{n-1} sont respectivement la moyenne et l'écart type associés à l'étude de l'activité moyenne du lot 224* (Tableau 26). Après 96 heures, la pente et le dosage obtenu en immunonéphélométrie s'éloigne de plus en plus de la norme et le ΔTd chute à 0,14 heure. L'activité antibactérienne est nulle.

Dans cette étude, un changement dans la conformation et/ou une baisse de titre importante d'un principe actif se traduisent par une baisse significative des ΔTd observés.

L'homogénéité des lots RU 41740 issus de la production, ne nous permet pas de disposer de principe actif légèrement sous-dosé et, en conséquence, il nous est impossible d'apprécier l'effet de telle baisse de titre sur l'activité antibactérienne suivie par conductance-métrie.

4) Activité d'un sérum anti RU 41740 sur la croissance d'autres germes

De nombreux travaux (Zalish, 1983) montrent que le RU 41740 protège contre des infections dues à un grand nombre de germes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella*

typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, Virus de l'influenza. Ces travaux utilisent des infections expérimentales identiques au test antibactérien de routine, avec le calcul d'un pourcentage de protection ou d'un temps moyen de survie.

Nous étudions l'activité antibactérienne d'un sérum anti RU 41740 sur la croissance de : *Streptococcus pneumoniae* IP 69.2, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Candida albicans* CIP 884.65.

4-1) Recherche des différents milieux de culture

C. albicans et *S. typhimurium* sont détectés respectivement en milieu Sabouraud par conductance-métrie indirecte, en milieu Spye par conductance directe. Dans le cas de *S. pneumoniae*, aucune donnée n'est disponible. Deux types d'essais sont réalisés pour détecter la croissance de ce germe : essai en conductance-métrie indirecte et directe.

4-1-1) Conductance indirecte

Dans cette méthode, ce sont les variations électriques d'une solution d'hydroxyde de potassium qui permettent de suivre la croissance bactérienne. En conséquence, les milieux de culture classiques sont utilisables.

Le tableau 30 montre qu'il n'y a pas croissance lorsque l'on utilise le milieu Spécial pneumocoque seul. La présence de sérum est nécessaire à la croissance du germe. Dans les milieux Trypcase soja et Columbia avec ou sans sérum, une croissance du germe est observée. Les variations électriques de la solution de potasse sont inexploitable car non reproductibles.

4-1-2) Conductance directe

Par la méthode de conductance directe, nous testons deux milieux en présence de 5 % de sérum : Trypcase soja et Columbia. Après 18 heures de culture, une croissance est observée par apparition d'un trouble dans les deux milieux. Les courbes de conductance dans le milieu Trypcase soja sont inexploitable.

Tableau 30. Recherche d'un milieu de culture permettant la détection de la croissance de *S. pneumoniae* en conductance indirecte. Une croissance bactérienne est décelée par apparition d'un trouble dans la cellule Malthus.

Milieu	Présence d'un trouble après 18 heures	Observation ΔG
Spécial pneumocoque	-	ΔG hétéroclite
	-	
	-	
Spécial pneumocoque + 5% sérum	+	ΔG hétéroclite
Trypcase soja	+	ΔG hétéroclite
Trypcase soja + 5% sérum	+	
Columbia	+	
Columbia + 5% sérum	+	

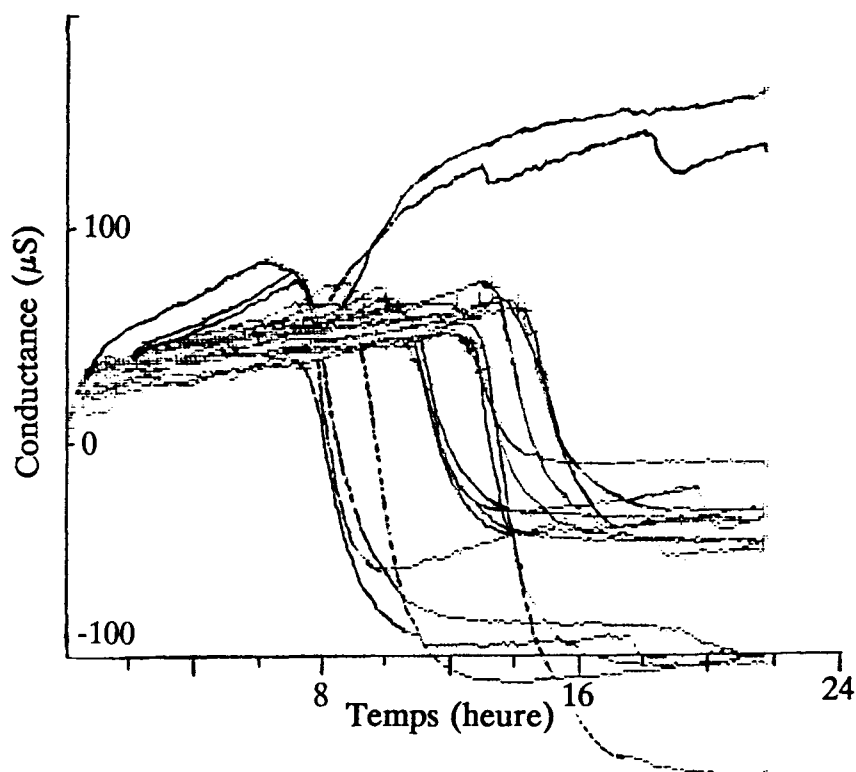


Figure 44. Courbes de conductance obtenues lors de la croissance de *S. pneumoniae* dans le milieu Columbia supplémenté en sérum. Cinq concentrations sont étudiées.

La figure 44 montre les courbes de conductance obtenues pour cinq dilutions différentes dans le milieu Columbia additionné de 5 % de sérum. Elles présentent des phases actives d'autant plus précoces que la concentration bactérienne est élevée. La variation de conductance observée est liée à la charge bactérienne.

Les courbes de conductance présentent un ΔG négatif sauf deux courbes de conductance qui présentent un ΔG positif. Ce changement de sens de variation n'a pas d'influence sur le temps de détection. C'est la première fois que l'on observe un sens de variation de la conductance non homogène pour une bactérie donnée dans un milieu défini. Lorsque l'on sait que la courbe de conductance est le reflet du métabolisme bactérien, on explique mal un tel phénomène pour une culture pure.

Ce milieu est retenu pour l'étude de la croissance de *S. pneumoniae*.

4-2) Recherche des droites de corrélation

Après définition des milieux indispensables à la croissance des trois germes, nous établissons les droites de corrélation. Ces droites sont établies dans les milieux cités plus haut additionnés de sérum témoin dilué 6,67 fois. Le tableau 31 indique les équations de ces droites, les coefficients de corrélation calculés (r), le nombre de valeurs utilisées pour leur calcul (n) et leur seuil de signification au risque de 5 % (r théorique).

Tableau 31. Coefficients de corrélation et équations des droites de régression pour les germes étudiés. $X = C$ (germes/ml).

	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>
	Détection directe		Détection indirecte
Milieu	Spye	Columbia	Sabouraud
n	20	26	14
r	-0,982	-0,995	-0,980
r théorique	0,4227	0,3809	0,4973
Equation	$Td = -0,941 \log X + 8,1$	$Td = -1,691 \log X + 15,073$	$Td = -5,605 \log X + 36,63$

4-3) Activité antibactérienne suivie par conductance-métrie

Le sérum utilisé est un sérum anti RU 41740 obtenu après un traitement classique c'est à dire une dose de 25 mg/kg à J-6 et J-2.

Comme le montre le tableau 32, la croissance de *S. typhimurium* est modifiée lorsque le sérum anti RU 41740 est dilué 2,5 fois. Un ΔTd important apparaît pour cette dilution. Au delà de celle-ci, aucune activité n'est décelée.

Dans le cas de *S. pneumoniae*, qu'elle que soit la dilution sérique, les ΔTd sont quasiment nuls.

Enfin, pour *C. albicans*, des ΔTd importants sont décelés pour deux concentrations sériques.

Tableau 32. Activité du sérum anti RU 41740 sur la croissance de *S. typhimurium*, *S. pneumoniae* et *C. albicans*. Trois dilutions sériques sont testées : 6,67, 5, 2,5. Les concentrations bactériennes sont toutes ajustées à 10^3 germes par millilitre.

	<i>S. typhimurium</i>			<i>S. pneumoniae</i>			<i>C. albicans</i>		
Facteur de dilution sérique	6,67	5	2,5	6,67	5	2,5	6,67	5	2,5
ΔTd	0,06	0,2	5,83	0,16	0,06	0,29	0,27	2,2	4,17
$\Delta \text{Log C}$ (germes/ml)	0,06	0,21	6,19	0,09	0,04	0,17	0,05	0,39	0,74

$\Delta \text{Log C}$ est calculé par la relation $\Delta Td/a$

Le tableau 32 rapporte également la différence entre les concentrations bactériennes des groupes traités et témoins. Cette différence ($\Delta \text{Log C}$) est calculée en divisant le ΔTd par le coefficient directeur (a) de la droite de corrélation du germe considéré.

Pour *S. typhimurium*, le calcul du $\Delta \text{Log C}$ indique une différence de 6,19 logarithmes et donc, la courbe de conductance correspond à celle d'un inoculum quasiment nul. Ainsi, un sérum anti RU 41740 dilué 2,5 fois ralentit la croissance de *S. typhimurium* et de *K. pneumoniae* de manière identique (Cf tableau 25, pour *K. pneumoniae* $\Delta \text{Log C} = 5,52$). Remarquons que cette valeur de $\Delta \text{Log C}$, pour les deux germes, est anormalement élevée puisque l'écart maximum possible entre les deux groupes est égal à la quantité bactérienne introduite à $t = 0$ soit environ

3 logarithmes. Ce $\Delta\text{Log C}$ aberrant s'explique de la manière suivante : les temps de détection donnés par l'automate pour les groupes traité et témoin sont respectivement 12,1 heures et 6,27 heures dans le cas de *S. typhimurium*. Le temps de détection affecté au groupe traité est supérieur à l'ordonnée à l'origine de la courbe de corrélation (Cf tableau 31), valeur que prend le temps de détection pour une concentration de un germe par millilitre. Nous sommes donc dans des concentrations bactériennes inférieures à un germe par millilitre et le temps de 12,1 heures n'a pas de signification. Le $\Delta\text{Log C}$ calculé doit être alors simplement considéré comme trois fois supérieur au coefficient directeur de la droite de corrélation.

C. albicans, se multiplie lentement et la pente de la droite de corrélation est élevée (Cf tableau 31). Ainsi, les ΔTd importants mis en évidence pour les dilutions sériques au 5^{ème} et au 2,5^{ème} correspondent à une différence de charge bactérienne de moins de 1 logarithme entre les deux groupes.

En conclusion, un sérum anti RU 41740 modifie la croissance de suspensions de *K. pneumoniae* (Cf tableau 26) et de *S. typhimurium* de 10^3 germes par millilitre. L'action contre la suspension de *S. typhimurium* est mise en évidence pour une seule dilution sérique (2,5^{ème}) alors qu'un sérum anti RU 41740 est actif sur la croissance de *K. pneumoniae* à des dilutions sériques plus faibles (6,67^{ème}, 5^{ème}). Enfin, une faible action peut être revendiquée contre *C. albicans*.

Le tableau 33 rapporte l'activité antibactérienne et antifongique du RU 41740 déterminée par le test des infections expérimentales.

Tableau 33. Activité protectrice du RU 41740 contre les infections bactériennes et fongiques (d'après Zalisz, 1983) IP = voie intrapéritonéale.

Organisme	Dose (mg/kg) et voie d'administration	Calendrier du traitement	Survie sur 20 jours	
<i>S. pneumoniae</i>	20 IP	J-7 et J-2	50 %	
<i>S. typhimurium</i>	5 IP	J-4 et J-2	80%	
<i>C. albicans</i>	1 IP	J-1	Temps moyen de survie sur 20 jours	
			RU 41740	Témoin
			8,3 ± 1,8	3,1 ± 2,5

En contrôle de routine, l'administration du RU 41740 par voie intrapéritonéale, à la dose de 10 µg/kg protège à 100 % les souris contre une infection à *K. pneumoniae*. Le tableau 33 indique que le RU 41740, à une dose plus élevée, protège de manière importante les animaux contre une infection à *S. typhimurium*. La protection vis à vis du germe *S. pneumoniae* est plus faible. Enfin, lors d'une infection à *C. albicans*, le RU 41740 ne retarde que la mort des animaux.

Comme lors du suivi de l'action d'un sérum anti RU 41740, les infections expérimentales révèlent une forte activité de protection du RU 41740 (pour des doses différentes) contre des infections à *K. pneumoniae* et *S. typhimurium*. L'action protectrice est moindre contre une infection à *C. albicans*. L'analyse des résultats de l'étude du pouvoir antibactérien du sérum anti RU 41740 par conductance-métrie semble aboutir à des conclusions similaires.

Pour le germe *S. pneumoniae*, les deux techniques divergent. Une protection est mise en évidence dans les infections expérimentales alors que le sérum anti RU 41740 n'a pas d'action sur la croissance de ce germe.

5) Conclusion

Nous avons étudié la possibilité de suivre l'activité antibactérienne du RU 41740 *in vitro*. Un sérum obtenu après traitement au RU 41740 (25 mg/kg), dilué 6,67 fois est actif contre une suspension de *K. pneumoniae*. Le ΔTd moyen observé contre une suspension de concentration finale de 10³ germes par millilitre est de 4,18 heures. Cette différence se traduit bien dans les faits par une différence de concentration en germes dans la cellule Malthus. Nulle dans les deux premières heures, elle augmente ensuite pour atteindre un maximum après six heures de culture. Enfin, elle diminue pour s'annuler au terme des 18 heures de croissance. L'absence de perte de charge bactérienne dans les deux premières heures, dévoile le caractère bactériostatique du sérum. Cette propriété est visible par conductance-métrie car le ralentissement du métabolisme bactérien limite la libération de composés ionisés lesquels font varier plus lentement la conductance du milieu. La conductance-métrie, à côté de son rôle de dénombrement, représente un outil d'étude du métabolisme bactérien.

Paxton Cady (1975) suggère que les anticorps dirigés contre des antigènes de surface bactériens influencent de manière importante, au moins initialement, le transport des métabolites à travers la membrane cellulaire. Il remarque que cette action est courte et non complément dépendante. La brièveté du phénomène s'explique par la croissance du germe qui, bien que lente, augmente progressivement le nombre de sites antigéniques submergeant ainsi finalement les anticorps présents dans la suspension. Ceci est bien en accord avec les variations du ΔT_d observées en fonction de la dilution sérique et de la concentration bactérienne. Cady envisage également la production d'enzymes protéolytiques bactériens venant annuler l'effet sérique. Enfin, l'action sérique mise en évidence contre d'autres germes suggère, si le mécanisme proposé est correct, une identité de certains déterminants antigéniques chez *K. pneumoniae* et *S. typhimurium* et à un degré moindre avec *C. albicans*.

Dans ce test, c'est la capacité des anticorps anti RU 41740 à combattre la croissance bactérienne qui est étudiée c'est à dire la reconnaissance par les anticorps anti RU 41740 des déterminants antigéniques membranaires de *K. pneumoniae*. Cette ressemblance anticorps produits et antigènes membranaires de *K. pneumoniae* est garante de la conformation du principe actif.

V-II) Autres études

A) Analyse de la composition du RU 41740

1) Dosages colorimétriques

Les monosaccharides neutres du RU 41740 sont dosés par la technique à l'orcinol sulfurique et les acides uroniques par la technique au carbazol sulfurique. L'interférence des hexoses neutres sur le dosage des acides uroniques et l'interférence des acides uroniques sur le dosage des hexoses neutres sont éliminées par correction des résultats selon le protocole préconisé par Montreuil et Spik (1963). Le tableau 34 répertorie les résultats obtenus sur six lots de RU 41740 issus de la production.

Tableau 34. Composition glucidique (%) de six principes actifs RU 41710 déterminée par colorimétrie.

Lots	297	299	300	301	302	303	Moyenne
Hexoses neutres	53,54	53,72	51,92	51,07	52,30	48,67	51,87 ± 1,86 (3,59 %)
Acides uroniques	8,13	9,90	9,34	8,61	9,61	9,59	9,20 ± 0,68 (7,41 %)
Total	61,67	63,62	61,26	59,68	61,91	58,26	61,07 ± 1,86 (3,05 %)

Le principe actif RU 41740 est composé majoritairement de glucides. Il renferme environ 61 % de glucides totaux qui se décomposent en 52 % d'hexoses neutres et 9 % d'acides uroniques. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par Bruvier (1983).

Le tableau 35 indique la teneur en protéines des six mêmes lots. Elle est, en moyenne, de 25 % et se situe en limite supérieure de la norme interne des Laboratoires Cassenne (15 à 25 %).

Tableau 35. Teneur en protéines (%) de six principes actifs RU 41740.

Lots	297	299	300	301	302	303	Moyenne
Protéines	25,11	24,97	26,04	25,26	22,74	24,22	24,72 ± 1,13 (4,58 %)

2) Analyse par chromatographie en phase gazeuse

Pour connaître les rapports molaires existant entre les monosaccharides principaux du RU 41740, nous analysons des méthylglycosides triméthylsilylés par chromatographie en phase gazeuse. Le chromatogramme obtenu lors de l'analyse du lot 224^e est présenté (Figure 45) et le tableau 36 rapporte les rapports molaires obtenus.

Le glucose (Glc) est le monosaccharide majoritaire. On trouve ensuite, le galactose (Gal) et le mannose (Man) à un taux équivalent et finalement l'acide glucuronique (GlcUA). Ces résultats divergent avec les travaux de Bruvier (1983) qui rapportent un taux de galactose environ deux fois supérieur à celui du mannose.

Signalons que l'analyse par chromatographie en phase gazeuse ne révèle la présence que de 24,33 % de monosaccharides dans notre échantillon. De plus, l'acide glucuronique est quantifié par défaut puisque le RU 41740 renferme, en théorie, une quantité équivalente de mannose et d'acide glucuronique.

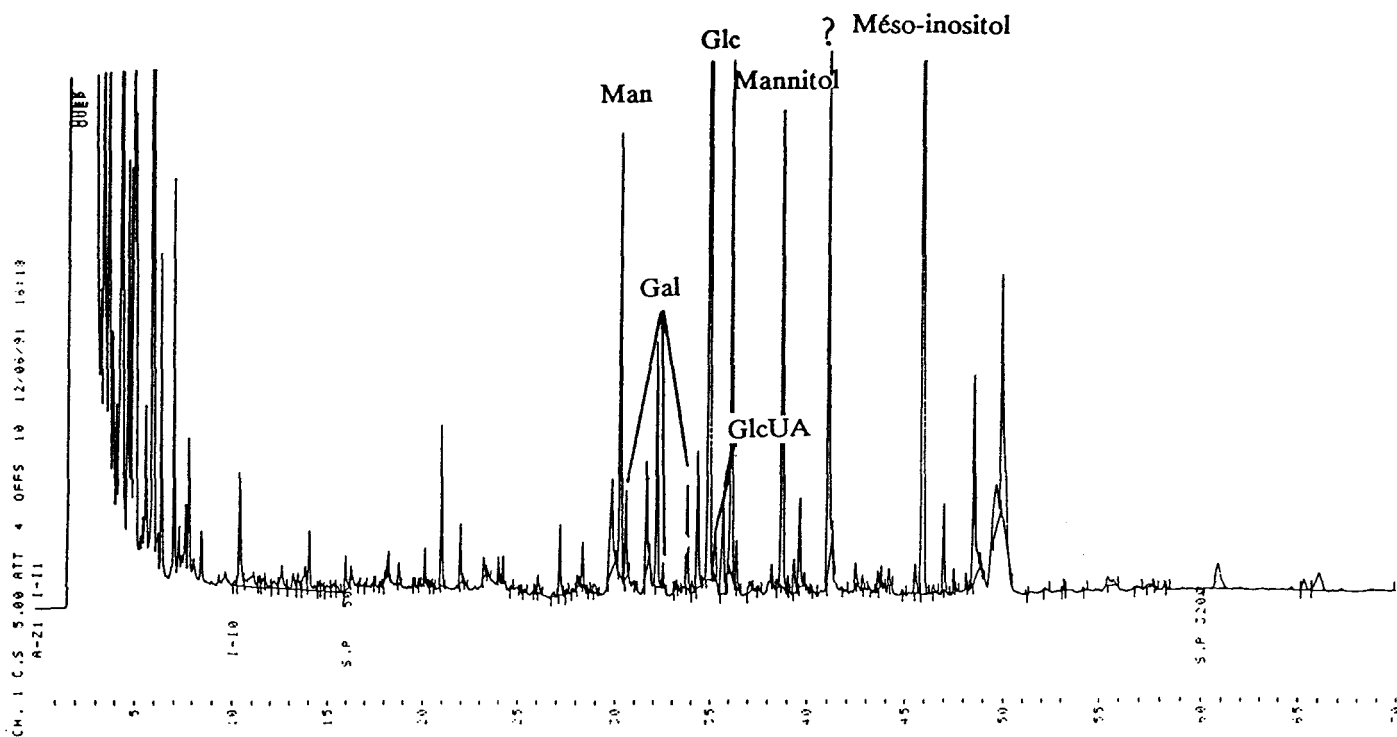


Figure 45. Analyse des monosaccharides principaux du RU 41740 par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et triméthylsilylation.

Tableau 36. Rapports molaires des monosaccharides principaux du RU 41740 déterminés par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats sont exprimés pour deux résidus de glucose.

	Gal	Glc	Man	GlcUA
Rapport molaire	0,47	2	0,51	0,28
Rapport molaire (Bruvier, 1983)	1,06	2	0,57	++

++ signifie que l'acide glucuronique est détecté mais non dosé

3) Analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

L'objectif de ces travaux est l'élaboration d'une méthode permettant de doser, de façon rapide, les monosaccharides du RU 41740.

3-1) Analyse des monosaccharides du RU 41740 après hydrolyse acide

3-1-1) Travaux sur Aminex HPX 87H

3-1-1-1) Séparation des monosaccharides du RU 41740

Le tableau 37 rassemble les temps de rétention obtenus pour les différents monosaccharides du RU 41740 et celui de la lactone de l'acide glucuronique. La séparation des monosaccharides acides et neutres est satisfaisante. Toutefois, le galactose et le mannose possèdent des temps de rétention voisins et la séparation de ces deux composés est impossible lorsqu'ils sont présents dans le même échantillon.

Tableau 37. Temps de rétention (Tr) des différents monosaccharides du RU 41740.

	GlcUA	Glc	Man	Gal	Glucuronolactone
Tr (min)	7,63	8,77	9,29	9,36	10,52

3-1-1-2) Choix de l'étalon interne

Différents composés sont testés.

Tableau 38. Temps de rétention de différents étalons internes.

Etalon	Mannitol	Ribitol	Arabitol	Xylitol
Tr (min)	9,79	10,35	10,65	10,89

L'étalon interne choisi est le xylitol (Tableau 38) : il est bien séparé des monosaccharides constituant le RU 41740 (Cf tableau 37).

L'hydrolyse acide d'une solution contenant les quatre monosaccharides principaux du RU 41740 et l'étalon interne permet de définir les coefficients de réponse (Tableau 39).

Tableau 39. Coefficients de réponse (C_R) des différentes espèces vis à vis du xylitol.

	GlcUA	Glc	Gal + Man	Xylitol
C_R	0,15	1,18	1,13	1

Le coefficient de réponse de l'acide glucuronique est très faible. Or, l'analyse d'une solution équimolaire d'acide glucuronique et de glucose indique un rapport acide glucuronique/glucose de 0,63 et l'on devrait, après l'hydrolyse, obtenir un rapport acide glucuronique/xylitol de 0,74. En conséquence, 80 % de l'acide a disparu. Il est retrouvé, en partie, sous sa forme lactone mais la majeure partie est détruite par l'hydrolyse acide.

3-1-1-3) Temps d'hydrolyse

Les liaisons hexose neutre-acide uronique sont plus stables que les liaisons hexose neutre-hexose neutre. En conséquence, nous étudions l'influence du temps d'hydrolyse sur la rupture de la liaison mannose acide glucuronique. Le rapport (Gal + Man) / Glc est déterminé pour deux temps d'hydrolyse. Comme le montre le tableau 40, ce rapport n'est pas modifié par un temps d'hydrolyse augmenté. Le taux de rupture de la liaison mannose-acide glucuronique reste inchangé.

Tableau 40. Influence du temps d'hydrolyse sur la rupture de la liaison mannose-acide glucuronique.

	(Gal+ Man)/Glc
4 h	0,73
6 h	0,73

3-1-1-4) Analyse des monosaccharides du RU 41740

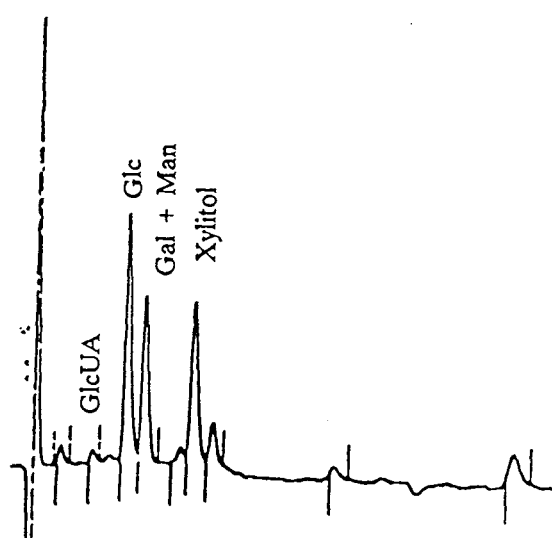
Un chromatogramme, après l'hydrolyse acide du RU 41740, est présenté figure 46. La présence de glucose et d'acide glucuronique est détectée. Une espèce éluée au temps de rétention du galactose et du mannose est mise en évidence.

Tableau 41. Composition glucidique du RU 41740 (lot 224^{*}).

	Glc	Man + Gal	GlcUA	Xylitol
Aire	89457	65370	3793	67722
Aire corrigée	75811	57850	25287	67722
Masse (μg)	111,94	85,42	37,34	100
Pourcentage (%)	22,39	17,08	7,47	—
Rapport molaire	2	1,53	0,62	

Comme le montre le tableau 41, 500 μg du lot 224^{*} contiennent 234,70 μg d'hexoses soit 46,94 %. Ils se répartissent en 39,47 % d'hexoses neutres et 7,47 % d'acide glucuronique. Les rapports molaires donnent, pour deux résidus de glucose, 1,53 résidus de galactose et mannose. Ces résultats sont différents de ceux obtenus en chromatographie en phase gazeuse.

Cette méthode ne peut être retenue pour doser la fraction glucidique du principe actif RU 41740. Elle ne permet pas de différencier tous les monosaccharides qui le composent.



Colonne Aminex HPX 87 H, T = 60°C
Phase mobile : acide sulfurique 0,01 N
Débit : 0,6 ml/min
Détection par réfractométrie différentielle

Figure 46. Analyse de la composition glucidique du RU 41740 (lot 224^{*}) après hydrolyse acide.

3-1-2) Travaux sur Aminex HPX 87P

3-1-2-1) Séparation des monosaccharides du RU 41740

Une solution de glucose, de galactose, de mannose, d'acide glucuronique et de méso-inositol (étalon interne) est soumise au même traitement que l'échantillon et analysée. Comme le montre la figure 47, les monosaccharides sont élués dans l'ordre suivant : glucose, galactose, mannose. Les coefficients de réponse sont indiqués dans le tableau 42.

Dans ce système, l'acide glucuronique n'est pas détecté. Chargé négativement, il est élué au volume mort de la colonne. Ainsi, cette méthode permet uniquement le dosage des monosaccharides neutres du RU 41740.

Tableau 42. Coefficients de réponse (C_R) des différents monosaccharides du RU 41740.

	Glc	Gal	Man	Méso-inositol
C_R	0,72	0,64	0,56	1

3-1-2-2) Analyse des monosaccharides du RU 41740

La figure 48 montre le chromatogramme obtenu lors de l'analyse du lot 224*. Le tableau 43 rassemble les résultats de quatre analyses.

Tableau 43. Composition glucidique du RU 41740 (lot 224*).

	Pourcentage				Rapport molaire		
	Total	Glc	Gal	Man	Glc	Gal	Man
1	42,28	21,28	7,08	13,92	2	0,66	1,31
2	41,81	21,68	7,08	13,05	2	0,65	1,2
3	40,89	21,58	6,78	12,52	2	0,63	1,16
4	38,68	20,58	6,39	11,71	2	0,62	1,14
Moyenne	40,91	21,28	6,83	12,8	2	0,64	1,20
σ_{n-1}	1,6	0,5	0,33	0,93	-	0,02	0,07
Cv (%)	3,9	2,33	4,79	7,25	-	2,85	6,32

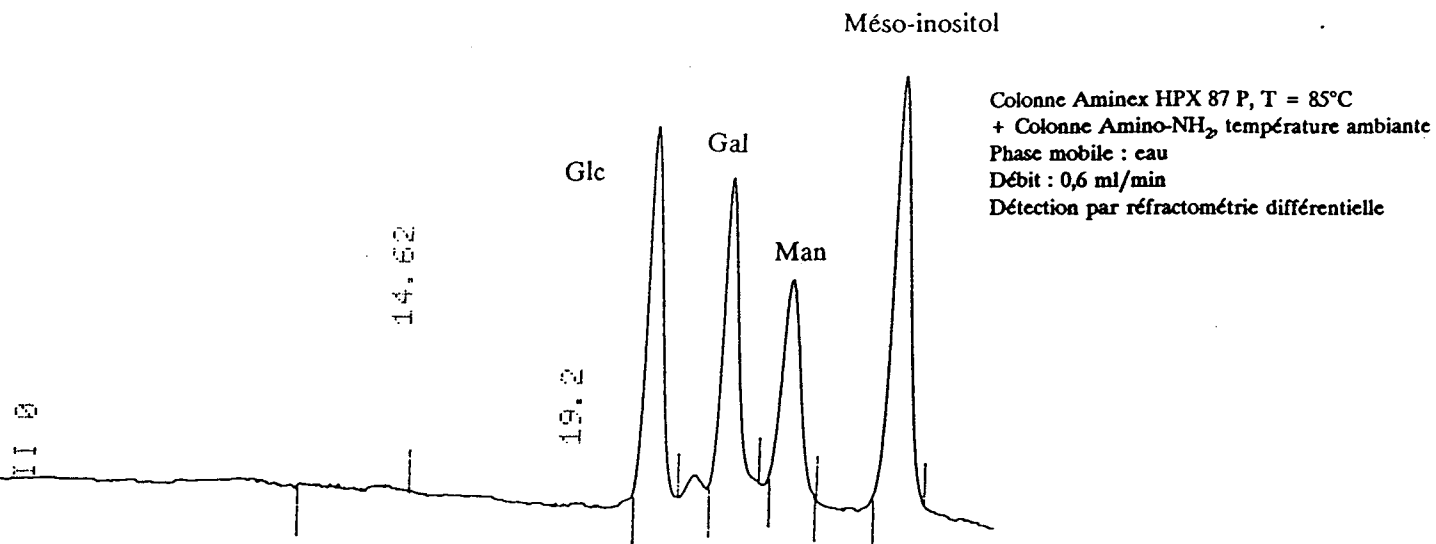


Figure 47. Analyse d'une solution de glucose, galactose, mannose, acide glucuronique et méso-inositol après simulation d'une hydrolyse acide.

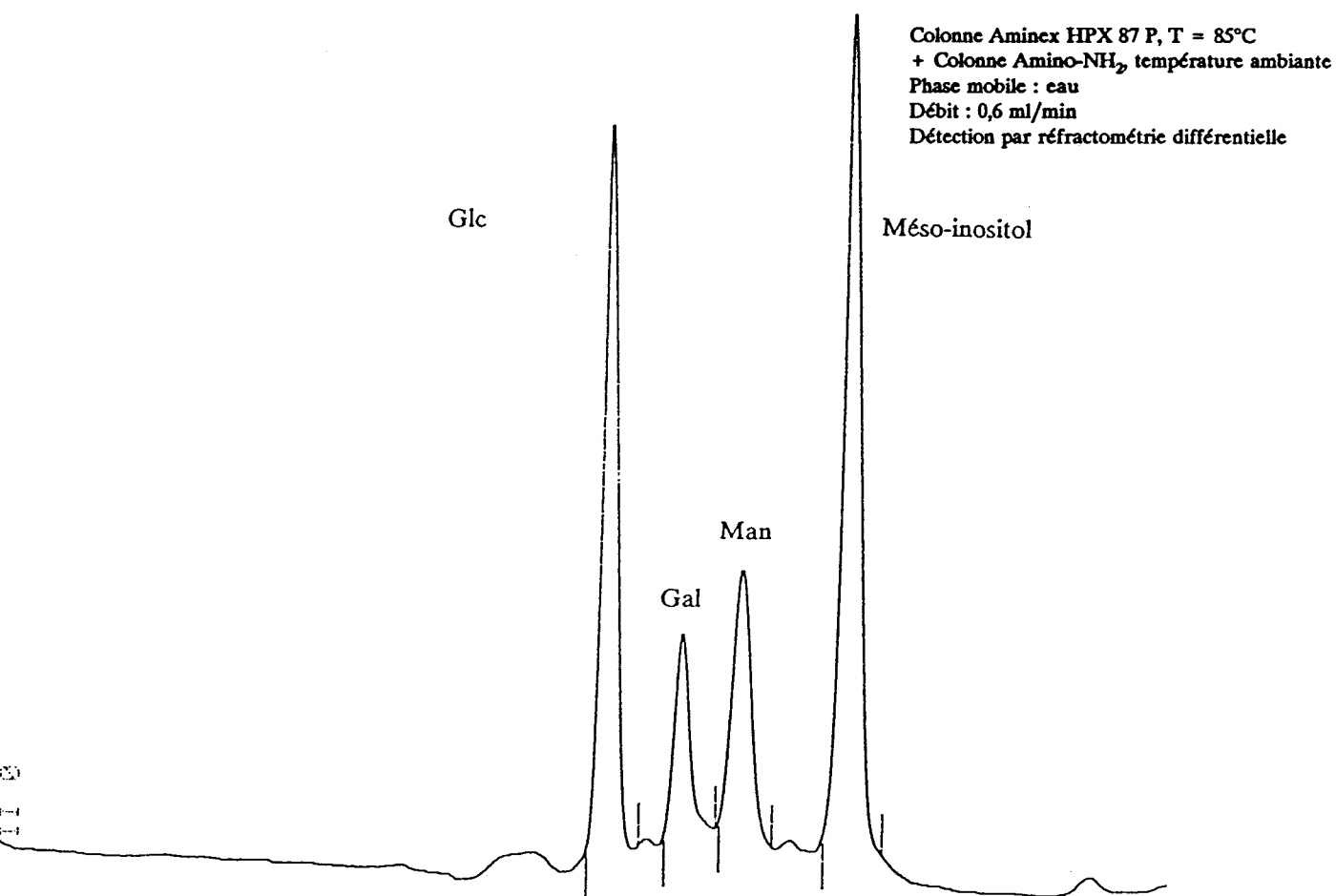


Figure 48. Analyse de la composition glucidique de RU 41740 (lot 224*) après hydrolyse acide.

Le RU 41740 contient donc, en moyenne 40,91 % de monosaccharides neutres qui se répartissent en 21,28 % de glucose, 6,83 % de galactose et 12,8 % de mannose. Les rapports molaires calculés sont, pour deux résidus de glucose, 0,64 galactose et 1,2 résidus de mannose. Dans cette étude, le rapport galactose/mannose s'inverse par rapport aux travaux de Bruvier (1983) (Cf tableau 36).

Par cette technique, des dosages systématiques des monosaccharides neutres des lots RU 41740 ont été entrepris. Ils n'ont pu être poursuivis car, sur certains chromatogrammes, un composé est élué au temps de rétention du mannose et perturbe la quantification.

3-2) Analyse des monosaccharides du RU 41740 après méthanolyse

L'analyse des méthylglycosides formés après méthanolyse est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse après dérivation.

Dans ce travail, nous développons une méthode CLHP simple permettant de doser, en une seule étape, tous les monosaccharides principaux du RU 41740.

3-2-1) Séparation des monosaccharides du RU 41740

La méthanolyse d'un monosaccharide donne naissance à différents méthylglycosides (isomères). Dans notre étude, ceux formés à partir des hexoses neutres du RU 41740 se présentent majoritairement sous une seule forme utilisée pour le dosage. Elle représente 77,47 %, 100 %, 91,29 % des méthylglycosides produits respectivement à partir du galactose, du glucose et du mannose. Le taux d'acide glucuronique du RU 41740 est déterminé sur deux de ses isomères majoritaires qui représentent plus de 60 % des méthylglycosides formés à partir de cette espèce.

Les méthylglycosides formés à partir des hexoses neutres sont élués dans les huit premières minutes. Les deux méthylglycosides qui permettent le dosage de l'acide glucuronique sont les plus retenus sur la colonne. Ils sont élués au delà de quinze minutes et doublent le temps d'analyse de l'échantillon.

L'utilisation de méthylglycosides standards permet l'identification de certains des isomères impliqués dans le dosage. Les méthylglycosides obtenus à partir du galactose

et du glucose sont de forme pyranique. Les conditions d'analyse ne permettent pas la différenciation des anoméries α ou β de ces isomères. Le méthylglycoside formé à partir du mannose est élué au même temps de rétention que l' α méthylmannopyranoside (le temps de rétention de la forme β n'a pas été déterminé). Enfin, les méthylglycosides de l'acide glucuronique utilisé pour le dosage sont différents du β méthylglucuronopyranoside.

La méthanolyse du RU 41740 produit un grand nombre de méthylglycosides et des chevauchements entre les méthylglycosides majoritaires impliqués dans le dosage et des isomères minoritaires d'autres espèces sont observés. Ces chevauchements existent, de la même façon, dans la solution témoin (mélange des quatre monosaccharides principaux du RU 41740) et ne perturbent pas l'analyse.

3-2-2) Essais

Pour apprécier les résultats donnés par cette technique, nous analysons des solutions de compositions définies. 250 μg de mélibiose, disaccharide composé de manière équimolaire de glucose et de galactose sont méthanolysés. Un chromatogramme est présenté dans la figure 49.

L'analyse (Tableau 44) indique que le composé étudié renferme 99,72 % de glucides équimolairement réparti en glucose et galactose. Le galactose apparaît légèrement surdosé.

Tableau 44. Composition glucidique du mélibiose.

	Gal	Glc
Masse (μg)	126,4	122,9
Rapport molaire	2,05	2

Nous analysons également des mélanges définis, constitués des quatre monosaccharides du RU 41740. La quantité totale de monosaccharide méthanolysée est toujours de 250 μg et nous faisons varier les quantités de chaque monosaccharide autour de la quantité présente dans le principe actif. Cinq mélanges différents sont analysés et les résultats obtenus par CLHP sont indiqués dans le tableau 45.

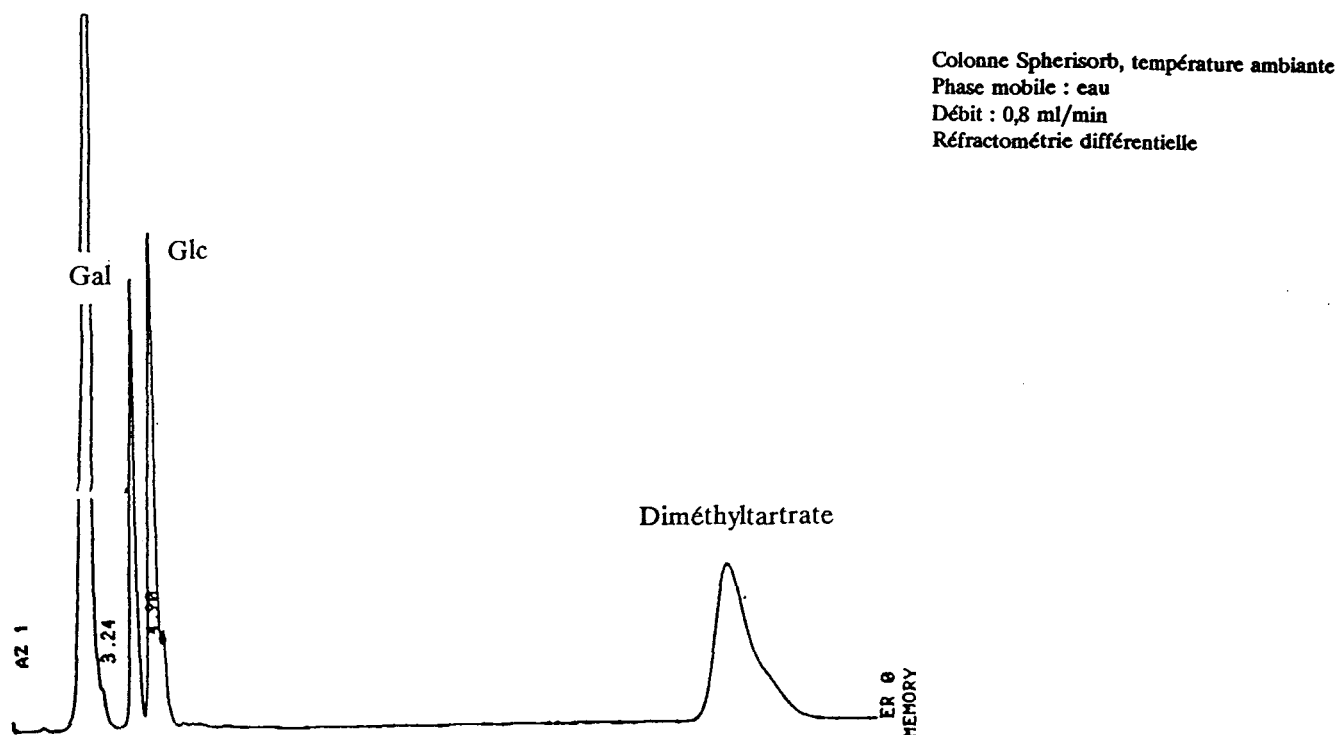


Figure 49. Analyse de la composition glucidique du mélibiose.

Tableau 45. Analyse de la composition de mélanges définis de monosaccharides. La composition des mélanges glucidiques méthanolysés et les quantités retrouvées, pour chaque espèce, après analyse (résultats) sont exprimées en microgrammes.

	Gal	Glc	Man	GlcUA
Mélange 1	0	50	100	100
Résultats	0	67,14	99,18	90,15
Mélange 2	25	75	75	75
Résultats	34,66	71,76	75,79	81,02
Mélange 3	50	100	50	50
Résultats	50,37	99,23	49,99	48,68
Mélange 4	75	125	25	25
Résultats	52,91	118,14	28,38	29,96
Mélange 5	100	50	50	50
Résultats	79,21	51,37	51,90	54,28

C'est pour le galactose que l'on observe la plus grande variation par rapport à la théorie. C'est l'espèce élue la plus rapidement et des interactions variables avec des composés élus au volume mort pourraient expliquer l'imprécision du dosage de cette espèce. Pour les autres monosaccharides, les résultats se rapprochent de la théorie de manière satisfaisante. Le dosage du mannose apparaît le plus fiable. Il ne dévie, en moyenne, que de 3,84 % par rapport à la théorie. Ces résultats nous conduisent à exprimer, dans les futures analyses, les rapports molaires, non plus en fonction du glucose, mais du mannose. Enfin, nous remarquons que les résultats sont "conformes" à la théorie, et ce pour toutes les espèces considérées, quand la solution analysée est de même composition que celle de la solution témoin. Ainsi, lors du dosage du RU 41740, nous réduisons les erreurs potentielles, en respectant, dans la solution témoin, les proportions de monosaccharides "normalement" présentes dans le principe actif. Elle comprend, en plus d'un témoin interne (diméthyl-L-tartrate), 250 µg de glucides qui se décomposent en 100 µg de glucose et 50 µg de chacune des autres espèces.

Un chromatogramme obtenu après méthanolyse du RU 41740 est présenté figure 50 et les résultats du dosage sont reportés dans le tableau 46. Cette étude révèle que le RU 41740 contient 42,49 % de glucides. Il est constitué majoritairement de glucose (22,50 %) et l'on trouve ensuite à des pourcentages inférieurs à 10 %, le galactose, le mannose et l'acide glucuronique.

Tableau 46. Analyse de la composition glucidique du RU 41740 (lot 297').

	Gal	Glc	Man	GlcUA	Diméthyl-L-tartrate
Aire	69456	242475	71015	39425	303774
Aire corrigée	229474	341784	189992	187697	303774
Masse (µg)	37,77	112,51	31,27	30,89	-
Pourcentage	7,55	22,50	6,25	6,18	-
Rapport molaire	1,21	3,60	1	0,92	-

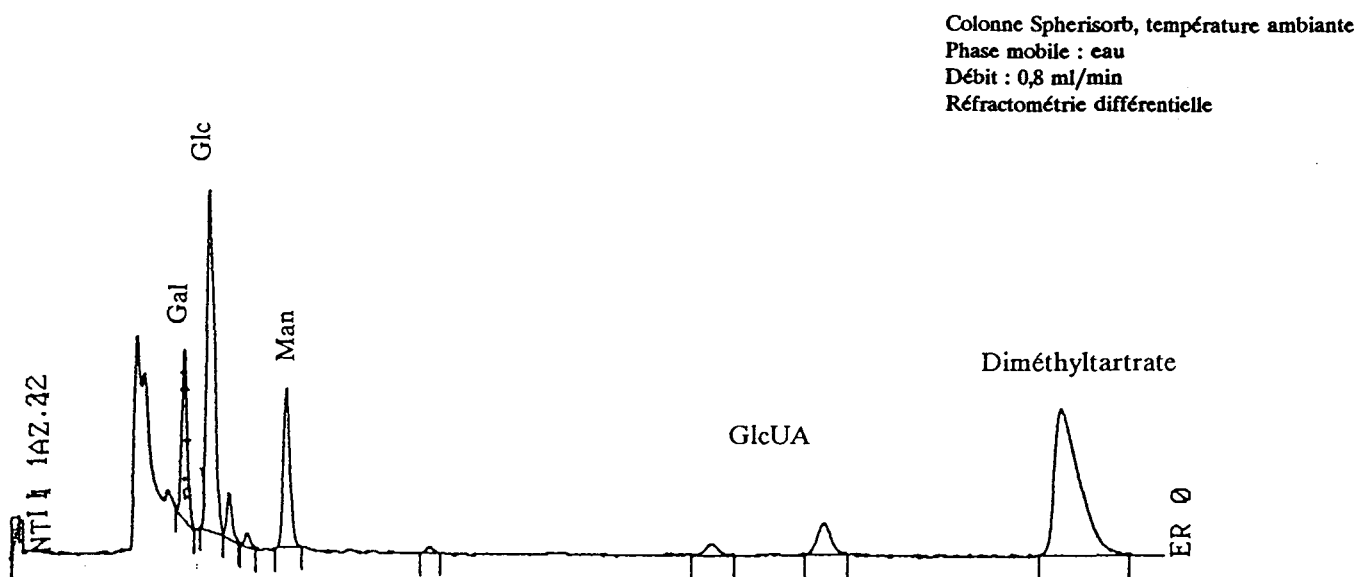


Figure 50. Analyse d'une solution de RU 41740 (lot 297').

Le tableau 47 rassemble les résultats de la composition glucidique du RU 41740 déterminée par différentes techniques chromatographiques.

Le pourcentage de la fraction glucidique du RU 41740 déterminée par différentes techniques CLHP est homogène. Il renferme entre 40 et 47 % de monosaccharides. Ces résultats sont inférieurs à ceux déterminés par colorimétrie (Cf tableau 34). Le taux de recouvrement des glucides n'atteint que 70 % si les résultats colorimétriques sont considérés comme référence.

L'étude des rapports molaires indique :

un taux de galactose variable. Les résultats de 1993 et de 1983 sont différents,

un taux de mannose bien conservé si l'on élimine les résultats obtenus sur Aminex HPX 87P (taux de mannose surestimé).

Tableau 47. Composition glucidique du RU 41740 obtenue par différentes techniques chromatographiques. Les rapports molaires sont exprimés pour deux résidus de glucose. N.D. signifie que la donnée n'est pas disponible.* Le pourcentage indiqué est celui des hexoses neutres. CPG = chromatographie en phase gazeuse.

Méthode	% totaux	Rapport molaire			
		Gal	Man	Glc	GlcUA
CPG, 1983	N.D.	1,06	0,57	2	++
CPG, 1993	24,33 %	0,47	0,51	2	0,28
HPX 87H	46,94%	1,53		2	0,62
HPX 87P	40,91 %*	0,64	1,20	2	N.D.
Sphérisorb	42,49 %	0,67	0,56	2	0,51

Enfin, l'analyse des méthylglycosides par CLHP est la seule technique qui permette, en une seule étape, le dosage de toutes les espèces du RU 41740. Les hexoses neutres sont séparés et l'acide glucuronique peut être quantifié. Notons que pour cette technique, les rapports molaires du mannose et de l'acide glucuronique sont équivalents. Ces résultats sont conformes à la structure de la fraction P1 qui comprend un résidu d'acide glucuronique pour un résidu de mannose.

3-2-3) Validation de la méthode

Elle comprend une analyse de la linéarité, la détermination des seuils de quantification et de détection et une étude de la fidélité de la méthode.

3-2-3-1) Linéarité

Elle se définit comme la capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en substance à analyser. Deux gammes sont réalisées :

une gamme avec la solution témoin (mélange des quatre composants principaux du RU 41740),

une gamme sur le principe actif RU 41740 (lot 224*).

Cinq échantillons contenant respectivement 60 %, 80 %, 100 %, 120 %, 140 % de la quantité théorique de principe actif ou de la solution témoin sont analysés. Cette opération est répétée trois fois pour chaque gamme.

L'étude sur la solution témoin nous permet d'étudier les linéarités individuelles de chaque espèce. Pour ce faire, les aires de chaque monosaccharide, moyennées sur les trois jours, sont corrélées avec les quantités méthanolysées et un coefficient de corrélation est calculé. Le tableau 48 présente les coefficients de corrélation obtenus. Toutes ces corrélations sont significatives au seuil de 5 % (pour $n = 5$, r doit être supérieur à 0,7545). Les coefficients de corrélation sont d'autant plus importants que l'espèce est éluee tardivement.

Tableau 48. Etude de linéarité des monosaccharides principaux constituant le RU 41740. Les coefficients de corrélation (r) obtenus pour chaque étude de linéarité sont présentés.

	Gal	Glc	Man	GlcUA
$r (n = 5)$	0,967	0,972	0,991	0,996

La figure 51 présente les droites de corrélation obtenues pour le principe actif RU 41740 et pour la solution témoin. Le tableau 49 résume l'analyse statistique de ces deux droites de corrélation.

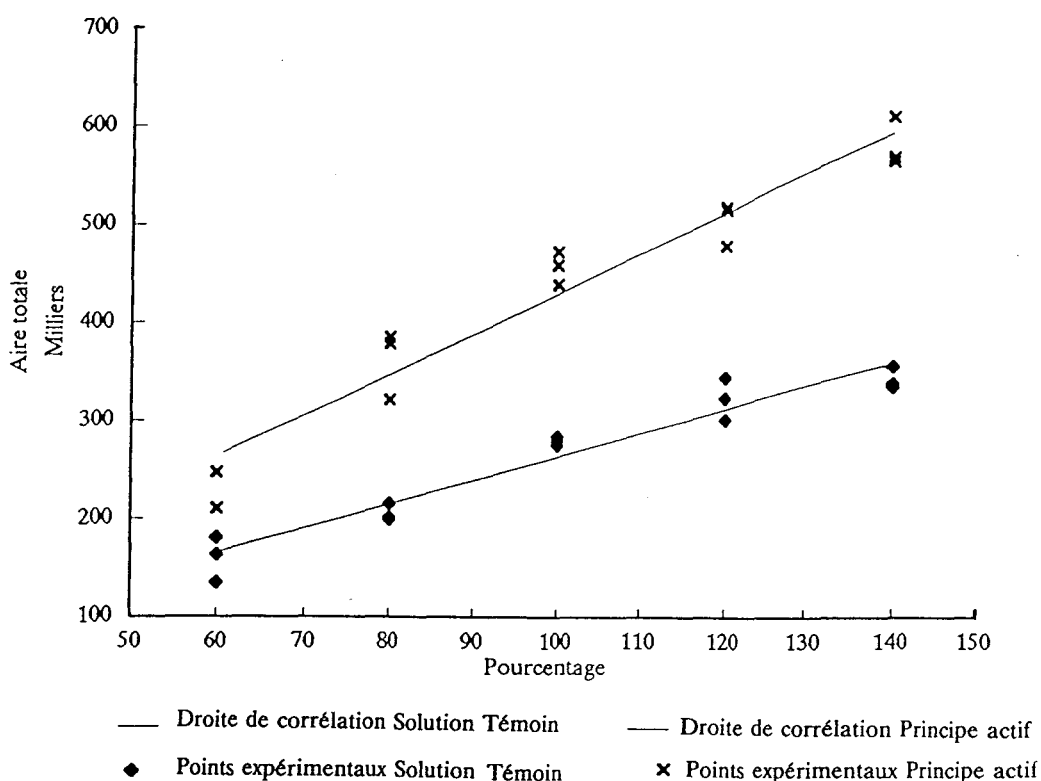


Figure 51. Etude de linéarité entre l'aire observée et la quantité analysée. Les droites de corrélation obtenues pour le principe actif RU 41740 et la solution témoin sont présentées. Les aires sont calculées en sommant les aires des quatre principales espèces constituant le RU 41740.

Tableau 49. Linéarité : Analyse statistique des droites de corrélation. NS : valeur non significative. HS : valeur hautement significative. Les valeurs calculées doivent être inférieures aux valeurs théoriques sauf pour les tests 3 et 6.

	Mélange témoin	Principe actif	Valeurs statistiques au risque de 5 %
1) Pentes des droites	970,55	821,59	
2) Ordonnées à l'origine	19983,60	17933,20	
3) Coefficients de corrélation	0,968 (HS) (n = 15)	0,967 (HS) (n = 14)	(n = 14) r = 0,4973 (n = 15) r = 0,4821
4) Test de comparaison des ordonnées à l'origine avec 0	1,1 (NS)	0,53 (NS)	t(0,05 ; 13) = 2,16 t(0,05 ; 12) = 2,179
5) Test d'homogénéité des variances (Cochran)	0,48 (NS)	0,37 (NS)	C(0,05 ; 3 ; 5) = 0,7071
6) Test de l'existence des pentes (Fisher)	192 (HS)	172 (HS)	F (0,05 ; 1 ; 13) = 4,67 F (0,05 ; 1 ; 12) = 4,75
7) Validité des ajustements (Fisher)	3,03 (NS)	3,03 (NS)	F (0,05 ; 3 ; 10) = 3,71 F (0,05 ; 3 ; 9) = 3,86
8) Test de comparaison des ordonnées à l'origine (test t)	0,054 (NS)		t (0,05 ; 25) = 2,06
9) Test de comparaison des droites d'ajustement (test t)	1,59 (NS)		

Dans les deux études, les variances des résultats obtenus les trois jours de manipulation sont homogènes (Tableau 49 (5)).

Les valeurs calculées pour les coefficients de corrélation sont significatives au risque de 5 % (Tableau 49 (3)).

Les ordonnées à l'origine des deux droites de régression ne sont pas significativement différentes de 0 au risque de 5 % (Tableau 49 (4)).

Pour les deux gammes d'étalonnage, en utilisant un test de Fisher, nous pouvons conclure à :

- l'existence d'une pente au risque de 5 % (Tableau 49 (6)),
- la validité de l'ajustement au risque de 5 % (Tableau 49 (7)).

Ces résultats confirment, pour les deux études, l'existence d'une dépendance linéaire entre l'aire observée et la quantité de substance analysée au seuil de probabilité de 5 %.

Enfin, nous comparons les deux droites de corrélation entre elles (Tableau 49 (8) et (9)) :

- Les ordonnées à l'origine et les pentes des deux droites ne sont pas significativement différentes au risque de 5 %.

3-2-3-2) Détermination des seuils de détection et de quantification

Le seuil de détection se définit comme la plus petite quantité détectable et le seuil de quantification comme la plus petite quantité d'une substance pouvant être dosée.

Ces deux valeurs sont déterminées en analysant des séries de 40 %, 20 %, 10 %, 0 % des quantités de chaque monosaccharide présentes dans le RU 41740. Les seuils de détection c'est à dire les plus petites quantités méthanolysées détectables, pour chaque monosaccharide, sont :

Galactose	$\leq 5 \mu\text{g}$,
Glucose	$\leq 10 \mu\text{g}$,
Mannose	$\leq 5 \mu\text{g}$,
Acide glucuronique	$\leq 5 \mu\text{g}$.

Des données plus précises pourraient être obtenues en analysant des séries comprises entre 10 et 0%.

Le tableau 50 rapporte les résultats de l'analyse du seuil de quantification pour chaque monosaccharide. Pour des proportions environ dix fois inférieures aux quantités présentes dans le RU 41740 soit 10 μg pour le glucose et 5 μg pour les autres monosaccharides, les erreurs d'analyses s'échelonnent de 9,64 % à 35,80 %. Elles diminuent ensuite régulièrement à mesure que la quantité de monosaccharide méthanolysée augmente. Notons que pour le glucose, la quantification est proche de la théorie pour vingt microgrammes puis s'écarte pour la dose supérieure.

Tableau 50. Analyse du seuil de quantification. L'aire théorique est calculée en utilisant les droites de corrélation déterminées pour chaque monosaccharide dans l'étude de linéarité. La quantité retrouvée est calculée en transformant l'aire du chromatogramme (aire pratique) par les droites de corrélation. Les seuils de quantification sont indicés par un astérisque (*).

	Quantité méthanolysée	Aire théorique	Aire pratique	Quantité retrouvée	Ecart en % / théorie
Gal	5 µg	8438	8000 ± 2941 (36,76 %) (n = 3)	4,52 µg	- 9,64 %
	10 µg	12983	12373 ± 2057 (16,62 %) (n = 2)	9,33 µg	- 6,70 %
	20 µg*	22073	21742 ± 2181 (10,03 %) (n = 2)	19,64 µg	- 1,82 %
Glc	10 µg	11831	13197 ± 2531 (19,18 %) (n = 2)	11,07 µg	+ 10,71 %
	20 µg*	24575	24367 ± 1402 (5,76 %) (n = 3)	19,84 µg	- 0,81 %
	40 µg	50061	41992 ± 5600 (13,34 %) (n = 2)	33,67 µg	- 15,83 %
Man	5 µg	6798	5476 ± 152 (2,77 %) (n = 3)	3,75 µg	- 25,04 %
	10 µg	10277	10854 ± 59 (0,54 %) (n = 3)	8,84 µg	- 11,58 %
	20 µg*	22635	22643 ± 1674 (7,39 %) (n = 3)	20,01 µg	+ 0,04 %
GlcUA	5 µg	1607	515 ± 891 (173,09 %) (n = 3)	3,21 µg	- 35,80 %
	10 µg*	4660	4802 ± 595 (12,40 %) (n = 2)	10,23 µg	+ 2,32 %
	20 µg	10766	11097 ± 1114 (10,04 %) (n = 3)	20,54 µg	+ 2,71 %

3-2-3-3) Fidélité de la méthode

Les essais effectués sur des produits identiques, dans des conditions expérimentales présumées stables, ne conduisent généralement pas aux mêmes résultats. Cela est dû à l'existence d'erreurs à caractère aléatoire, inhérentes à toute méthode d'essai. La connaissance de la variabilité d'une méthode est indispensable à l'interprétation future de résultats et elle est estimée par l'analyse de la répétabilité et de la reproductibilité.

3-2-3-3-1) Répétabilité

La répétabilité est estimée par des analyses successives d'un même composé dans des conditions les plus stables possibles. Elle mesure la variabilité minimale des résultats. Nous analysons dix-huit fois la composition du lot 297* à raison de six analyses par jour. Le tableau 51 rapporte les résultats de cette étude de répétabilité.

Le test de Cochran révèle, au risque de 5 %, que les variances des résultats de la teneur glucidique du RU 41740 obtenus les trois jours de manipulation sont homogènes. Le lot 297* renferme, en moyenne, 41,14 % \pm 1,60 (3,90 %) de glucides. Nous calculons les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité qui rendent compte respectivement de la variabilité intra-groupe et inter-groupe. Dans notre étude, la variabilité intra-groupe traduit la dispersion d'analyses réalisées le même jour. La variabilité inter-groupe traduit la dispersion d'analyses identiques réalisées à des jours différents.

La composition glucidique globale du RU 41740 est peu sensible aux variations. La variation intra-groupe est de 4,84 %. La variation inter-groupe s'élève légèrement pour atteindre 5,90 %.

L'analyse du pourcentage des différentes espèces révèle que la variation intra-groupe du galactose est la plus importante alors que la variation inter-groupe est plus importante pour le glucose.

L'analyse des rapports molaires montre que la variation intra-groupe est équivalente quelque soit l'espèce considérée. C'est le rapport glucose/mannose qui varie le plus si l'on compare les résultats des trois jours d'analyse.

Tableau 51. Etude de répétabilité. Chaque jour (J1, J2, J3) la composition glucidique du principe actif RU 41740 (lot 297*) est déterminée six fois. Les coefficients de variation de répétabilité (CVr) et de reproductibilité (CVR) sont calculés.

	Pourcentage					Rapport molaire			
	Total	Gal	Glc	Man	GlcUA	Gal	Glc	Man	GlcUA
J1 (n = 6)	41,36 ± 1,74 (4,20 %)	7,35 ± 0,44 (5,96 %)	21,92 ± 1,08 (4,92 %)	6,24 ± 0,28 (4,54 %)	5,72 ± 0,37 (6,44 %)	1,18 ± 0,05 (4,41 %)	3,52 ± 0,19 (5,44 %)	1	0,84 ± 0,06 (7,64 %)
J2 (n = 6)	42,63 ± 1,74 (4,07 %)	7,54 ± 0,66 (8,74 %)	23,06 ± 0,76 (3,32 %)	6,04 ± 0,35 (5,82 %)	5,98 ± 0,25 (4,20 %)	1,25 ± 0,08 (6,24 %)	3,83 ± 0,21 (5,61 %)	1	0,92 ± 0,02 (2,61 %)
J3 (n = 6)	39,44 ± 2,42 (6,12 %)	7,44 ± 0,56 (7,46 %)	19,21 ± 1,37 (7,11 %)	6,57 ± 0,38 (5,73 %)	6,22 ± 0,33 (5,25 %)	1,13 ± 0,04 (3,97 %)	2,93 ± 0,06 (2,03 %)	1	0,88 ± 0,05 (5,28 %)
Moyenne (n = 3)	41,14 ± 1,60 (3,90 %)	7,44 ± 0,10 (1,28 %)	21,40 ± 1,98 (9,24 %)	6,28 ± 0,27 (4,26 %)	5,97 ± 0,25 (4,19 %)	1,19 ± 0,06 (5,07 %)	3,42 ± 0,46 (13,37 %)	1	0,88 ± 0,04 (4,54 %)
CVr (%)	4,84	7,53	5,13	5,39	5,36	4,98	4,87	-	5,28
CVR (%)	5,90	7,53	10,36	6,51	6,44	6,82	14,06	-	6,63

3-2-3-3-2) Reproductibilité

La reproductibilité mesure la variabilité maximale des résultats et elle est déterminée par l'analyse de la composition de six lots distincts de RU 41740. Cette étude est réalisée trois fois. Le tableau 52 rapporte les résultats de cette étude de reproductibilité.

Le test de Cochran révèle, qu'au risque de 5 %, les variances sur le pourcentage glucidique total moyen calculé sur les six lots de RU 41740 sont homogènes sur les trois jours d'analyse. Le RU 41740 renferme, en moyenne, de 41,16 % \pm 1,35 (3,28 %) de glucides. La variabilité intra-groupe est de 4,03 %. Les variabilités intra-groupes des pourcentages et des rapports molaires des différents monosaccharides sont comprises entre 3 et 6 % à l'exception du galactose pour lequel elles avoisinent 8 à 10 %.

Les variabilités inter-groupes sont légèrement plus élevées. C'est pour le galactose que la variabilité inter-groupe est plus importante.

4) Conclusion

Le RU 41740 est un complexe glycoprotéique issu d'un lysat de *K. pneumoniae*. Cet immunomodulateur est composé principalement de glucides. Les études réalisées, sur une dizaine d'années, par le laboratoire du Professeur Fournet ont élucidé la structure du principe actif. Il est composé de deux fractions. La fraction F1 correspond au lipopolysaccharide de *K. pneumoniae* dont l'antigène O est constitué d'un polymère de galactose lié en 1,3. La fraction P1, d'origine capsulaire, est un polymère dont l'unité de répétition est constituée de glucose, de mannose et d'un acide uronique, l'acide glucuronique.

Il est intéressant pour les Laboratoires Cassenne de pouvoir contrôler la structure de tous les lots RU 41740 issus de la production et, dans ce travail, nous recherchons une technique permettant le dosage, d'une manière rapide, de ses constituants majoritaires.

Deux types de rupture des liaisons O glycosidiques sont envisagées : l'hydrolyse acide par l'acide trifluoroacétique et la méthanolyse par le méthanol chlorhydrique.

Les deux méthodes de séparation des monosaccharides libérés après hydrolyse acide ne sont pas adaptées à notre étude car elles ne permettent pas le dosage de la totalité des

Tableau 52. Etude de reproductibilité. Chaque jour (J1, J2, J3) la composition glucidique de six principes actifs RU 41740 est déterminée. Les coefficients de variation de répétabilité (CvR) et de reproductibilité (CVR) sont calculés.

	Pourcentage					Rapport molaire			
	Total	Gal	Glc	Man	GlcUA	Gal	Glc	Man	GlcUA
J1 (n = 6)	40,23 ± 1,64 (4,07 %)	6,79 ± 0,42 (6,19 %)	21,90 ± 0,98 (4,47 %)	6,26 ± 0,29 (4,63 %)	5,28 ± 0,16 (3,03 %)	1,09 ± 0,07 (6,42 %)	3,50 ± 0,09 (2,57 %)	1	0,79 ± 0,03 (3,80 %)
J2 (n = 6)	40,54 ± 1,88 (4,62 %)	7,27 ± 0,76 (10,43 %)	21,36 ± 0,67 (3,12 %)	5,96 ± 0,43 (7,25 %)	6,02 ± 0,39 (6,53 %)	1,25 ± 0,14 (11,51 %)	3,60 ± 0,23 (6,35 %)	1	0,93 ± 0,03 (2,84 %)
J3 (n = 6)	42,71 ± 1,43 (3,34 %)	7,45 ± 0,68 (9,12 %)	23,29 ± 0,89 (3,81 %)	6,35 ± 0,32 (5,02 %)	5,61 ± 0,22 (3,89 %)	1,18 ± 0,12 (10,11 %)	3,67 ± 0,08 (2,08 %)	1	0,82 ± 0,07 (7,99 %)
Moyenne (n = 3)	41,16 ± 1,35 (3,28 %)	7,17 ± 0,34 (4,76 %)	22,18 ± 0,10 (4,49 %)	6,19 ± 0,20 (3,30 %)	5,64 ± 0,37 (6,57 %)	1,17 ± 0,08 (6,85 %)	3,59 ± 0,09 (2,38 %)	1	0,85 ± 0,07 (8,67 %)
Cvr (%)	4,03	8,88	3,86	5,68	4,87	9,70	4,15	-	5,58
CvR (%)	5,93	9,40	5,71	6,14	7,94	11,19	4,47	-	10,09

monosaccharides du principe actif. Tous les hexoses neutres ne sont pas séparés dans la première méthode et l'acide glucuronique n'est pas détecté quand la séparation est réalisée sur une colonne Aminex HPX 87P.

Après méthanolyse du principe actif, nous séparons les méthylglycosides libérés sur une colonne Sphérisorb. Les quatre composants principaux du RU 41740 peuvent être alors dosés simultanément.

Les méthylglycosides formés, à partir de chaque monosaccharide sont multiples et nous réalisons le dosage en considérant l'importance des isomères formés et leurs degrés de séparation vis à vis des autres méthylglycosides. Le diméthyl-L-tartrate, bien qu'il augmente le temps d'analyse, est utilisé comme étalon interne. Les étalons internes classiques comme le méso-inositol sont mal séparés des espèces étudiées.

L'ordre d'élution des monosaccharides constituant le RU 41740 est le suivant : galactose, glucose, mannose, acide glucuronique. Les deux premiers monosaccharides sont élués très rapidement. Le galactose est élué au volume mort et le glucose est très faiblement retenu sur la colonne. Cela n'est pas sans conséquence sur le dosage, puisque, comme nous l'indiquons dans la discussion, les linéarités sont moins significatives et les coefficients de variation de reproductibilité et de répétabilité calculés dans l'étude de fidélité sont plus élevés pour ces deux espèces. Ceci est flagrant pour le galactose, et dans certains cas, son dosage apparaît peu fiable.

Par cette méthode, le RU 41740 renferme en moyenne 41,16 % de glucides qui se décomposent en 22,18 % de glucose, 7,17 % de galactose, 6,19 % de mannose et 5,64 % d'acide glucuronique.

Cette méthode réalise le dosage de monosaccharides neutres et acides en une seule étape. Par cette technique, il est également possible d'identifier et de quantifier les pentoses et les monosaccharides aminés (Taverna, 1990) et elle représente, en conséquence, un outil analytique permettant l'étude de la composition d'un grand nombre de polysaccharides ou de glycoprotéines.

Dans le cadre de notre étude, il est sûrement possible d'améliorer les performances de cette méthode en :

évitant l'élution du galactose dans le volume mort par l'ajout d'une précolonne ou d'une colonne,

remplaçant la réfractométrie par la diffraction de la lumière pour augmenter la sensibilité de la méthode,

standardisant la lyophilisation des produits à méthanolyser.

B) Etude d'autres immunomodulateurs

1) Galactanne

Le galactanne est un immunomodulateur en développement au sein des Laboratoires Cassenne. C'est un composé d'origine bactérienne, obtenu à partir d'une souche de *K. pneumoniae* non capsulée. Il possède un poids moléculaire de 7000 daltons.

Les techniques de dosage des hexoses par colorimétrie indiquent que le galactanne renferme 86,75 % d'hexoses neutres et qu'il ne contient pas d'acide uronique. La fraction glucidique de ce composé est plus importante que celle du RU 41740 (Cf tableau 34) mais de nature différente.

La composition glucidique du galactanne est déterminée par CLHP après méthanolyse (Figure 52). Nous ne détectons pas d'acide glucuronique ce qui confirme les résultats colorimétriques. Le galactose et le glucose sont les seuls hexoses neutres identifiés et ils représentent, en moyenne, 98,50 % du principe actif. Le galactose est le glucide majoritaire (Tableau 53).

Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle la fraction P1 du RU 41740 serait d'origine capsulaire. Le mannose et l'acide glucuronique ne sont pas retrouvés dans le galactanne qui provient d'une souche non capsulée.

Par analogie avec la fraction F1 du RU 41740, le galactanne est probablement constitué d'un polymère de galactose qui correspond à la chaîne latérale du LPS bactérien.

Tableau 53. Composition glucidique du galactanne (lot RC 3565).

	Pourcentage			Rapport molaire	
	Total	Gal	Glc	Gal	Glc
1	102,35	93,21	9,14	20,40	2
2	96,59	89,11	7,48	23,83	2
3	98,92	91,31	7,61	24	2
Moyenne	98,50	90,43	8,08	22,74	2
σ_{n-1}	1,74	1,16	0,92	2,03	-
Cv (%)	1,77	1,29	11,42	8,93	-

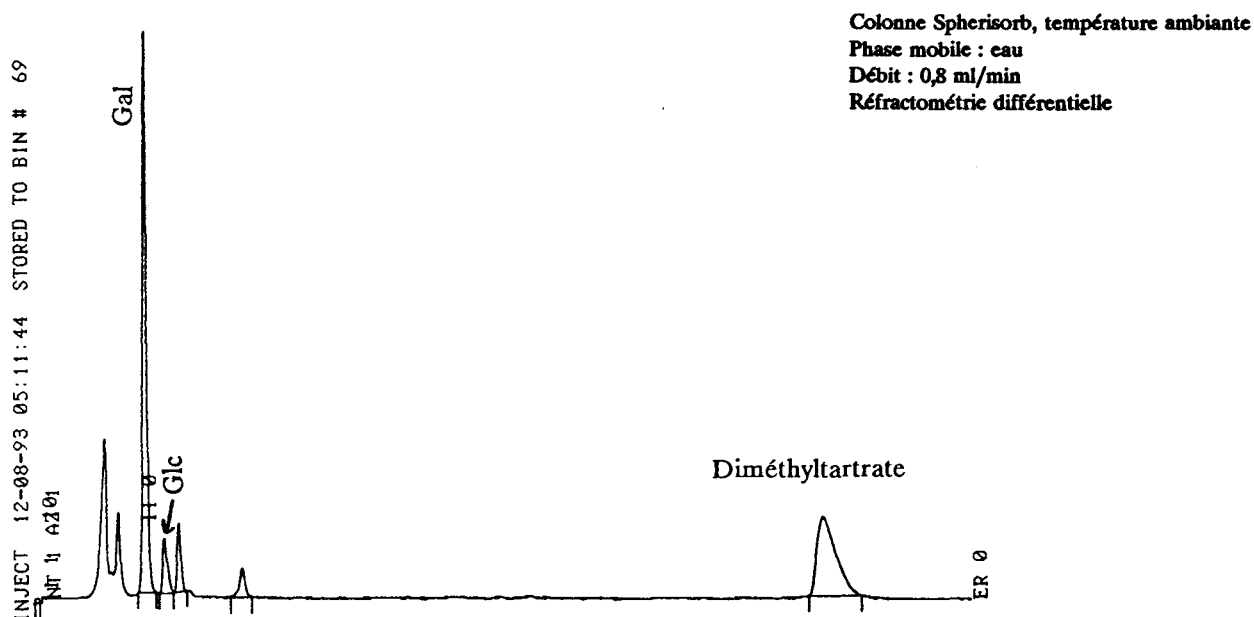


Figure 52. Composition glucidique du galactanne (lot RC 3565).

2) RU 41740 nouvelle lyse

Le RU 41740 est obtenu après lyse d'une culture de *K. pneumoniae* en fin de phase exponentielle. Le cocktail d'agents lysants contient, entre autre, un composé renfermant du mercure, le mercurothiolate de sodium. Bien que les traces de mercure, dans le principe actif, soient très faibles et non dangereuses en terme de santé humaine, les Laboratoires Cassenne cherchent à éliminer ce métal toxique du process de fabrication. Nous étudions l'impact de nouveaux cocktails d'agents lysants sur la structure et les activités biologiques du RU 41740.

2-1) Etude de trois nouvelles lyses

Nous testons trois lyses différentes : une lyse trypsique (1488), une lyse mécanique (1489) et une lyse lysozyme (1491). Les process de ces trois types de lyse sont présentés en annexe 1. Dans ces trois essais, la lyse de la culture bactérienne est réalisée après élimination du milieu de culture par centrifugation.

Tableau 54. Composition glucidique (monosaccharides neutres et acides) et protéique, exprimées en pourcentage, des lots RU 41740 nouvelle lyse déterminées par colorimétrie. Les écarts, exprimés en pourcentage, avec les compositions glucidique et protéique du RU 41740 classique (Cf tableau 34 et 35) sont indiqués en caractère gras.

	1488		1489		1491		RU 41740
Glucides	45,62	-25,30	30,26	-50,45	41,29	-32,39	61,07
Protéines	16,2	-34,47	24	-2,91	20	-19,09	24,72
Total	61,82	-27,94	54,26	-36,71	61,29	-28,56	85,79

Comme le montre le tableau 54, ces trois lots renferment une fraction glucidique plus faible que celle du RU 41740 classique. Le principe actif obtenu par la lyse mécanique comprend un taux de glucides diminué de 50,45 %. La lyse trypsique et lysozyme de la culture de *K. pneumoniae* permettent la récupération d'une fraction glucidique plus importante mais elle est toujours inférieure à celle du principe actif classique.

La fraction protéique des trois lots étudiés est comprise entre 15 et 25 % et elle est conforme à la norme interne des Laboratoires Cassenne. Elle est comparable à celle du RU 41740 classique. Notons que cette fraction est d'autant plus importante que la composition glucidique totale est faible.

Enfin, le tableau 54 indique que la somme des fractions glucidique et protéique de ces trois lots est nettement inférieure à celle du RU 41740. Une diminution moyenne d'environ 30 % est mise en évidence. Rappelons que les pourcentages de glucides sont calculés sans tenir compte des pourcentages d'humidité des différents lots.

Une étude de la fraction glucidique de ces trois lots est effectuée par CLHP après méthanolyse (Tableau 55). Les lots 1488, 1489, 1491 possèdent les mêmes monosaccharides majoritaires que le RU 41740 classique : du galactose, du glucose, du mannose et de l'acide glucuronique sont détectés.

Les résultats CLHP indiquent que :

la composition glucidique des trois lots est plus faible que celle du RU 41740. Les écarts de composition entre ces trois lots et le RU 41740 classique s'échelonnent entre -23,71 % pour le lot 1488 et -53,47 % pour le lot 1489. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par colorimétrie.

Le tableau 55 rapporte également les pourcentages des différents monosaccharides. Nous remarquons que les monosaccharides peuvent être séparés en deux groupes : le premier groupe comprend le glucose, le mannose et l'acide glucuronique dont les écarts de composition glucidique par rapport au RU 41740 sont du même ordre de grandeur entre eux et pour chaque lot. Dans le second groupe se trouve le galactose dont l'écart avec le RU 41740 classique n'est pas lié aux trois autres espèces. Ces résultats sont conformes à la structure classique du RU 41740 c'est à dire une fraction P1 composée de glucose, de mannose et d'acide glucuronique et une fraction F1 qui est un polymère de galactose. Enfin, la perte de la charge glucidique se réalise par une perte plus importante de la fraction P1. Rappelons que cette fraction est largement majoritaire (environ 70 %) dans le principe actif.

Tableau 55. Détermination de la composition glucidique de trois lots RU 41740 nouvelle lyse. Les pourcentages totaux et les pourcentages des monosaccharides principaux sont reportés. Les écarts, exprimés en pourcentage, avec la composition glucidique du RU 41740 classique (Cf tableau 52) sont indiqués en caractère gras.

	POURCENTAGE				
	Total	Gal	Glc	Man	GlcUA
1488 (n = 2)	31,40 ± 0,83 (2,66 %) -23,71 %	7,39 ± 0,21 (2,87 %) +3,07 %	15,71 ± 0,44 (2,79 %) -29,17 %	4,22 ± 0,23 (5,36 %) -31,82 %	4,08 ± 0,06 (1,39 %) -27,66 %
1489 (n = 2)	19,15 ± 2,09 (10,93 %) -53,47 %	4,91 ± 1,68 (34,27 %) -31,52 %	9,685 ± 0,63 (6,50 %) -56,33 %	2,53 ± 0,10 (3,91 %) -59,13 %	2,03 ± 0,33 (16,02 %) -64,01 %
1491 (n = 2)	27,43 ± 0,20 (0,72 %) -33,36 %	5,59 ± 0,31 (5,57 %) -22,04 %	14,65 ± 0,38 (2,61 %) -33,95 %	3,635 ± 0,46 (12,64 %) -41,27 %	3,55 ± 0,33 (9,16 %) -37,06 %
RU 41740	41,16 ± 1,35 (3,28 %)	7,17 ± 0,34 (4,76 %)	22,18 ± 0,10 (4,49 %)	6,19 ± 0,20 (3,30 %)	5,64 ± 0,37 (6,57 %)

2-2) Etude de la lyse lysozyme

Les Laboratoires Cassenne étudient les propriétés biologiques des trois lyses précédentes en terme d'activité anti-inflammatoire (AI), d'activité antibactérienne (AB) et d'activité stimulatrice du système réticulo-endothélial (SRE).

Ils étudient également leurs propriétés biochimiques en terme de composition protéique, de profil électrophorétique et de réponse immunonéphélométrique contre un sérum de lapin anti RU 41740 classique.

Compte tenu des résultats obtenus, les Laboratoires CASSENNE poursuivent l'étude d'une seule lyse, la lyse lysozyme, car elle permet l'obtention d'un principe actif dont les propriétés biologiques et biochimiques sont les plus proches du RU 41740 actuellement commercialisé.

La composition glucidique de six lots obtenus après une lyse lysozyme d'une culture de *K. pneumoniae* est déterminée par CLHP après méthanolyse. Elle est, en moyenne, de $28,49 \% \pm 5,46$ (19,19 %). Elle s'écarte de la composition classique du RU 41740 de 10 à 50 %. Comme dans l'étude précédente, les différences de composition en glucose, mannose et acide glucuronique évoluent de la même façon (Figure 53) indiquant que les lots essais semblent de structure identique à celle du RU 41740. Enfin, ces résultats montrent également que la fraction P1 est majoritaire dans le principe actif. Les écarts de composition des trois monosaccharides qu'elle renferme sont équivalents à ceux observés pour la totalité de la fraction glucidique.

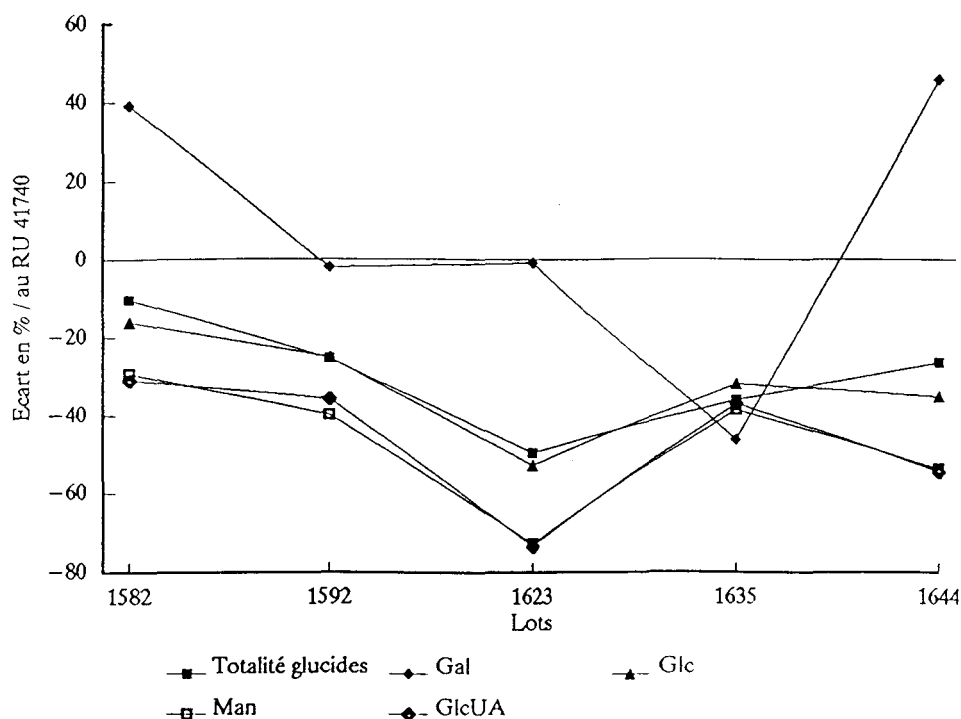


Figure 53. Composition glucidique totale et des monosaccharides principaux du RU 41740. Les écarts par rapport à la composition classique du RU 41740 (Cf tableau 52) sont présentés.

Tableau 56. Résultats des contrôles effectués sur les six lots essais. La norme de conformité établie pour le RU 41740 classique est indiquée (> = supérieur à), (N.D. = donnée non disponible).

Lots	Protéines (%)	AI Pourcentage de régression de l'œdème podal	AB Pourcentage de protection	SRE Malthus ΔTd (h)	IMN	
					Dosage	Pente
1581	41,36	74,5 %	100 %	3	46 %	1,06
1582	25,01	79,6 %	100 %	2,93	93,5 %	1,14
1592	27,18	76,1 %	100 %	2,55	74,33 %	1,10
1623	41,01	N.D.	100 %	3,14	48,5 %	1,03
1635	27,81	73,8 %	80 %	3,36	64 %	0,98
1644	30,16	84 %	100%	3,51	55 %	0,97
Moyenne	32,08 \pm 7,24 (22,55 %)	77,6 \pm 4,22 (5,44 %)	96,67 \pm 8,16 (8,45 %)	3,08 \pm 0,34 (11,03 %)	63,56 \pm 18,01 (28,33 %)	1,04 \pm 0,07 (6,52 %)
Norme	20 % \pm 5 %	\geq 50 %	\geq 60 %	> 1,5 h	100 % \pm 25 %	1 \pm 0,1

Le tableau 56 rapporte les résultats d'autres tests effectués sur ces six lots essais.

Nous observons :

qu'ils renferment une importante fraction protéique. Elle est, en moyenne, de 32,09 % et la dispersion autour de cette moyenne est équivalente à celle mise en évidence pour la composition glucidique totale déterminée par CLHP.

que les trois activités biologiques testées sont "conformes" aux normes établies pour le RU 41740. Les pourcentages de variation de ces activités sont faibles.

pour l'étude immunonéphélométrique, une pente généralement "conforme" (le lot 1582 est en limite supérieure) et un dosage très variable ($Cv = 28,33 \%$). Ces six lots essais apparaissent, en conséquence, de conformation identique au RU 41740 classique mais globalement sous dosés (les écarts, par rapport au RU 41740, sont de -10 % à -50 %).

La figure 54 présente les résultats des dosages glucidique et immunonéphélométrique de ces six essais. Nous observons qu'ils évoluent de façon quasiment identique. C'est la première fois que l'on parvient à lier le dosage IMN du RU 41740 avec une de ses caractéristiques biochimiques. Il semble, en effet, que le dosage immunonéphélométrique soit lié à la teneur glucidique du principe actif analysé.



Figure 54. Dosages immunonéphélométrique et glucidique sur les six lots essais nouvelle lyse.

L'immunonéphélométrie est une technique basée sur la réaction antigène-anticorps. Compte tenu des résultats présentés, il semble que les chaînons polysaccharidiques du RU 41740 appartiennent aux sites antigéniques reconnus par les immunoglobulines du sérum.

La mise en évidence d'une éventuelle corrélation entre le dosage glucidique et le dosage immunonéphélométrique, ici observée pour six valeurs, reste à confirmer et à approfondir.

Nous ne savons pas, par exemple, si la différence de composition glucidique observée dans le dosage CLHP se traduit par un nombre plus faible de chaînons polysaccharidiques de structure identique à ceux du RU 41740 ou s'ils existent en nombre équivalent avec un plus petit nombre d'unités de répétition et selon le cas, comment se traduit cette modification de structure du principe actif sur l'organisation tridimensionnelle du complexe glycoprotéique et sur la reconnaissance antigène-anticorps.

Enfin, les différentes lyses testées dans cette étude produisent des composés dont la composition glucidique est inférieure à celle du RU 41740 classique. Nous ne connaissons pas l'action précise des agents lysants sur les constituants membranaires et capsulaires de *K. pneumoniae* et il est difficile, avec les techniques dont nous disposons, d'analyser, au niveau moléculaire, l'impact des nouvelles lyses étudiées. Elles engendrent probablement d'autres ruptures de liaisons qui produisent des fragments de masse moléculaire différente dont certains peuvent disparaître du principe actif final après les étapes de purification. Ces différences de composition glucidique ne semblent pas avoir un impact important sur l'activité biologique du principe actif final. Les activités antibactérienne, antiinflammatoire et l'activité stimulatrice du système réticulo-endothélial sont comparables à celles induite par le RU 41740 classique. On imagine alors plus, au niveau cellulaire, une réaction qualifiée "du tout ou rien" pour que les cellules immunocompétentes soient stimulées.

VI - Conclusion

L'immunothérapie est une des spécialités des Laboratoires CASSENNE. Ils participent à la lutte anti-infectieuse en développant des vaccins et des immunomodulateurs.

Ce travail s'est intéressé au Biostim, immunostimulant prescrit dans le traitement prophylactique des surinfections des bronchopathies chroniques. Obtenu après lyse d'une culture de *K. pneumoniae*, c'est un complexe glycoprotéique qui renferme des éléments membranaires et capsulaires de la bactérie. Ce principe actif présente des activités sur toutes les cellules immunocompétentes, cellules phagocytaires et lymphocytaires et sur le système hématopoïétique. *In vivo*, il protège les animaux contre un grand nombre d'infections qu'elles soient bactériennes, fongiques ou virales.

Dans ce travail, nous développons deux tests qui mettent en évidence des propriétés biologiques du principe actif. Ces travaux utilisent une technique automatisée de dénombrement bactérien : la conductance-métrie.

Nous mettons en place un test d'épuration bactérienne qui démontre la stimulation du système réticulo-endothélial induite par le RU 41740. Cette méthode est validée et remplace désormais, au sein des Laboratoires CASSENNE, le test d'épuration de particules de carbone décrit par Biozzi *et al.* en 1955.

Dans un deuxième temps, nous étudions l'effet d'un sérum anti RU 41740 sur la croissance bactérienne. Cette étude révèle qu'un tel sérum modifie significativement la croissance de *K. pneumoniae* et de *S. typhimurium*. Ces travaux doivent se poursuivre pour déterminer dans quelle mesure l'activité observée par conductance-métrie participe aux propriétés antibactériennes du principe actif *in vivo*.

Ces deux types de travaux confirment que la conductance-métrie est une technique alternative fiable au comptage sur boîtes de Petri mais aussi un outil d'investigation du métabolisme bactérien. Cela permet d'envisager d'autres applications susceptibles d'intéresser l'industrie pharmaceutique comme, par exemple, l'étude des activités antibiotiques.

Enfin, nous analysons la composition glucidique du RU 41740 en développant une technique permettant le dosage, en une seule étape, des monosaccharides principaux du principe actif. Cette technique est simple et présente une certaine universalité car elle permet l'identification, la séparation et la quantification, à la fois, des hexoses neutres, des pentoses, des hexosamines et des acides uroniques. Elle est appliquée à l'étude

d'immunomodulateurs en développement au sein des Laboratoires CASSENNE et représente un outil indispensable à l'optimisation et à la comparaison des process de fabrication actuellement à l'étude.

La totalité de ces travaux participent et s'inscrivent dans un projet plus ambitieux des Laboratoires CASSENNE : définir les constituants du RU 41740 responsables de l'activité immunomodulatrice, identifier les cibles précises du principe actif et les mécanismes cellulaires impliqués dans l'immunostimulation, dans l'espoir de mettre au point, dans le futur, des composés hautement purifiés aux activités biologiques hautement définies.

VII - Références Bibliographiques

Adam, A. (1985), Synthetic adjuvants. In *Modern Concepts in Immunology*. (Edited by Bona C.A.) Vol. 1. John Wiley.

Andreux, J.P., Smets, P., Renard, M., Andreux M.H. and Yagello, M. (1985), Treatment with RU 41740 induces colony stimulating activity and stimulates granulopoiesis in mice. *Farmaci & terapia*, II, 1.

Andreux, J.P., Renard M., Andreux, M.H. and Smets P. (1986), Modulation of murine hemopoiesis by repeated injections of a glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Immunopharmac.* 8, 2, 147-154.

Anthoine, D., Blaive, B., Cabanieu, G., Chrétien, J., Danrigal, A., Ducreuzet, C., Dusser, D., Leophonte, P., Miguères, J., Muir, J. and Ollagnier, C. (1985), Etude en double aveugle du RU 41740 dans la prévention des surinfections des patients atteints de bronchopathie chronique. *Rev. Pneumol. Clin.* 41, 213-217.

Audibert, F., Leclerc, Ch. and Chedid, L. (1985), Muramyl peptides as immunopharmacological response modifiers. In "*Biological Response Modifiers*" Academic Press, 307-327.

Auriault, C., Joseph, M., Tartar, A., Bout, D., Tonnel, B. and Capron, A. (1985), *Int. J. Pharmacol.* 7, 73.

Azuma, I. (1992), Review : Inducer of cytokines *in vivo* : overview of field and romurtide experience. *Int. J. Immunopharmac.* 14, 3, 487-496.

Banchereau, J. (1990), Interleukine 5. *Medecine/sciences* 6, 954-957.

Banchereau, J. (1993), The cytokine club. *Biofutur* 3, 21-29.

Bicker, U. (1984), Immunopharmacological properties of 2-Cyranaziridine derivatives. In : Fenichel RL and Chirigos MA, Eds. *Immuno modulation agents and their mechanisms*. New York Marcel Dekker. 25, 447-473.

Billian, A.F., Schonke, L., Eyekmans, L. and Sooner, P. (1970), Interferon induction and resistance to virus infections in mice infected with *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 2, 698-704.

Biozzi, G., Benacerraf, B. and Halpern, B.N. (1955), The effect of *Salmonella Typhi* and its endotoxin on the phagocytic activity of the reticuloendothelial system in mice. *British Journal of Experimental Pathology* 36, 226-235.

Blomgren, H. (1982), Immunomodulation by bestatin in the human. *Int. J. Immunopharmac.* 4, 160.

Blomgren, H. and Viland, H. (1991), Responsiveness of human monocytes to RU 41740 (Biostim). Influence of preincubation *in vitro*. *Anticancer Research* 11, 1849-1854.

Bona, C. (1979), Modulation of immune response by nocardia immunostimulants ; In Kallos, Waksman, de Weck, *Prog. Allergy* 26, 97 (Karger, Basel).

Borel, J.F. and Kis, Z.L. (1991), The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune). *Transplant Proc* 23, 1867-1874.

Bouvier, J.B. Prévention des récurrences dans les infections de l'arbre respiratoire : intérêt de l'administration du BIOSTIM dès le début de l'épisode aigu.

Briend-Sutren, M.M., Le Maho, S., Rommain, M. and Lambré, C.R. (1990), Glycosidase activities in alveolar macrophages from guinea pigs stimulated with a glycoprotein complex extracted from *Klebsiella pneumoniae*. *Agents and actions* 31, 3/4.

Brossard, C., Smets, P., Zalisz, R. and Edelstein, R. (1983), Synergism between the immunopotentiator RU 41740 and ampicillin in lethal *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcal aureus* infections in mice. *Proceeding of International Congress of Chemotherapy, 13th*, Vienna, Spitzky K.H. et al. (eds) 2, 91/6-91/11.

Bruvier, C., Fournet, B., Montreuil, J., Zalisz, R., Salles, M.F. (1980), Study of a glycoprotein possessing an anti-bacterial activity isolated from *Klebsiella pneumoniae*. In : Preud'homme J.L., Hawken, K.A.L., eds. Abstracts of the 4th International Congress of immunology, Paris, July 21-26th, Abstract 17.7.09.

Bruvier C. (1983), Etude d'un immunomodulateur bactérien extrait d'un lysat de *Klebsiella pneumoniae* O1K2. Thèse de 3ème cycle.

Cady, P. (1975), Rapid automated bacterial identification of micro-organisms. In *New approaches to the identification of micro-organism*. Edited by Heden, C.G. and Illeni, T., John Wiley, 74-99.

Capsoni F., Minonzio F., Venegoni E., Ongari A.M., Guidi G., Zanussi C. (1988a), *In vitro* modulation of polymorphonuclear leukocyte functions by a glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae* RU 41740 : Correction of corticosteroid-induced defects of phagocytosis and adherence. *Int. J. Immunotherapy* IV, 2, 107-115.

Capsoni, F., Minonzio, F., Venegoni, E., Ongari, A.M., Meroni, P.L., Guidi, G. and Zanussi C. (1988b), *In vitro* and *ex vivo* effect of RU 41740 on human polymorphonuclear leukocyte function. *Int. J. Immunopharmac.* 10, 2, 121-133.

Capsoni, F., Minonzio, F., Ongari, A.M., Guidi, G. and Zanussi C. (1991), Increased expression of C3b and C3bi receptors on human neutrophils and monocytes induced by a glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Immunopharmac.* 13, 2/3 227-233.

Chedid, L. (1981), Immunomodulation by BCG and synthetic bacterial-like adjuvants ; In Friedman, Klein, Szentivanyi, *Immunomodulation by bacteria and their products*, pp. 151-163 (Plenum press, New York).

Chichara, G., Maeda, Y.Y., Hamuro, J., Sasaki, T., and Fukuoka, F. (1969), *Nature*, 222, 687.

Chirigos, M.A. (1990), Antiviral efficacy of Imexon in the Rauscher Murine Retrovirus AIDS model. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 12, 1, 1-21.

Crawford, J., Ozer, H. and Stoller, R. (1991), Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 325, 164-170.

Dean, J.H., Cornacoff, J.B., Thomas, A.B., Gosset, K.A. and Labrie, T. (1992), Pre-clinical toxicity of IL-4 : a model for studying protein therapeutics. *Int. J. Immunopharmacol.* 14, 3, 391-397.

Dische, Z. (1947), *J. Biol. Chem.* 167, 189.

Dodet, B. (1993), Le choix des armes. *Biofutur* 3, 30-42.

Dumont, F.J., Staruch, M.J., Koprak, S.L., Melino, M.R. and Sigal, N.H. (1990), Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J. Immunol.* 144, 251-258.

Durandy, A., Smets, P., Zalisz, R. and Griscelli, C. (1988), The effect of RU 41740 on the *in vitro* maturation of human B cells. *Int. J. Immunotherapy* 10, 7, 851-854.

Durant, S., Homo-Delarche, F., Duval, D. and Smets, P. (1985a), Modulation of prostaglandin production and fibroblast proliferation *in vitro* by two agents having opposite actions on wound healing *in vivo*. International conference on : *Leukotrienes and prostanoids* In health and disease.

Durant, S., Homo-Delarche, F., Duval, D., Papiernik, M. and Smets, P. (1985b), Opposite effects of a glucocorticoid and a immunostimulating agent on prostaglandin production by different cell types. *Int. J. Tiss. Reac.* VII, 2, 117-122.

Durant, S., Homo-Delarche, F., Duval, D. and Smets, P. (1986a), Effect of the immunomodulator RU 41740 on the proliferation of culture mouse embryo fibroblasts. In "*Marker proteins in inflammation*", Vol 3. Walter de Gruyter & Co., Berlin. New York-Printed in Germany 621-624.

Durant, S., Homo-Delarche, F., Duval, D. and Smets, P. (1986b), Effects of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory and immunostimulatory agents on fibroblast proliferation and prostaglandin production *in vitro*. *2ème conference on inflammation, analgesics & immunomodulators* Montecarlo, 18-22 mars.

Durum, S.K., Schmidt, J.A. and Oppenheim, J.J. (1985), Interleukin 1: an immunological perspective. *Ann. Rev. Immun.* 3, 263-287.

El Abbouyi, A., Paul, J.L., Roch-Arveiller, M., Sarfati, G., Giroud, J.P. and Raichvarg, D. (1989), Comparative effects of F1 and P1 fractions obtained from a *Klebsiella pneumoniae* glycoproteic extract (RU 41740) on polymorphonuclear leukocytes. *Journal of biological response modifiers* 8, 656-664.

Ellouz, F., Adam, A., Ciorbaru, R. and Lederer E. (1974), Minimal structure requirements derived for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59, 1317-1325.

Eng, C.P., Sehgal, S.N. and Vezina, C. (1984), Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J. Antibiot.* 32, 1231-1237.

Falkoff, R.J.M., Butler, J.L., Dinarello, C.A. and Fauci, A.S. (1984), Direct effects of a monoclonal B cell differentiation factor and of purified interleukin 1 on B cell differentiation. *J. Immunol.* 133, 692-696.

Fauci, A.S. (1987), Immunomodulators in clinical medicine. *Ann. Intern. Med.* 106, 421-433.

Fidler, I.J., Sone, S., Fogler, W.E., and Barnes, Z.L. (1981), Eradication of spontaneous metastases and activation of alveolar macrophages by intravenous injection of liposomes containing muramyl dipeptide. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 78, 1680-1684.

Fietta, A., Bersani, C., de Rose, V., Mangiarotti, P., Merlini, C., Ucelli, M., Guidi, G. and Gialdroni Grassi, G. (1988), Double-Blind Trial RU 41740 vs. placebo : Immunological and clinical effects in a group of patients with chronic bronchitis. *Respiration* 54, 145-152.

Fietta, A.M., Merlini, C., Ucelli, M., Gialdroni Grassi, G. and Grassi, C. (1992), Immunological and clinical effect of long-term oral treatment with RU 41740 in patients with chronic bronchitis. Double-Blind Trial long-term versus Standard Dose regimen. *Respiration* 59, 253-258.

Fischer, G., Wittmann, L.B., Lang, K., Kiefhaber, T. and Schmid, F.X. (1989), Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337, 476-478.

Fischer-Szafarz, B., Rommain, M., Brossard, C. and Smets, P. (1988), Hyaluronic acid-degrading enzymes in rat alveolar macrophages and in alveolar fluid : stimulation of enzyme activity after oral treatment with the immunomodulator RU 41740. *Biology of the cell* 63, 355-360.

Forrester J.V. and Balasz E. A. (1980), Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology* 40, 435-446.

Fortier, M., Bonfils, A., Zalisz, R., Heyman, M. and P. Smets (1989), Pharmacokinetic profile of RU 41740 a bacterial immunomodulator in mice, rats and monkeys. *International Journal of Pharmaceutics* 52, 27-36.

Freund, J. (1956), The mode of action of immunological adjuvants. *Adv. Tubercul. Res.* 1, 130-148.

Friedman, J. and Weismann, I. (1991), Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin : one in the presence and one in the absence of CsA. *Cell* 66, 799-806.

Fudenberg, H.H. and Whitten, H.D. (1984), Immunostimulation : synthetic and biological modulators of immunity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24, 147-174.

Ghaffar, A., Paul, R.D., Sigel, M.M., Lichter, W. and Wellham, L.L. and Chedid, L. (1981), Immunomodulation by *Corynebacterium parvum*. In Friedman, Klein, Szentivanyi, *Immunomodulation by bacteria and their products*, pp. 136-149 (Plenum press, New york).

Greenberg, L. and Fleming, D. (1947), Increased efficiency of diphtheria toxoid when combined with pertussis vaccine. *Can. J. Publ. Hlth* 38, 279-282.

Greenblatt, J.J., Boackle, R.J. and Schawb, J.H. (1978), Activation of the alternative complement pathway by peptidoglycan from streptococcal cell wall. *Infect. Immun.* 19, 296-303.

Griscelli, C., Gros-pierre, B., Montreuil, J., Fournet, B., Bruvier, C., Lang, J.M., Marchiani, C., Zalisz, R. and Edelstein, R. (1982), Immunomodulation induced by glycoprotein fractions isolated by *Klebsiella pneumoniae*. In : *Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds*. Yamamura, Y., Kotani, S. (eds), Excerpta Medica, Amsterdam, 261-265.

Guenounou, M., Smets, P. and Agneray, J. (1984), Activation des lymphocytes B de souris par le RU 41740, un extrait glycoprotéique de *Klebsiella pneumoniae*. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. 298, Série III, 6.

Guenounou, M., Vacheron, F., Nauciel, C. and Agneray, J. (1985), Induction of interleukin 1 secretion by murine macrophages and human monocytes after stimulation by RU 41740, a bacterial immunomodulator. *Int. J. Immunopharmac.* 7, 2, 287-290.

Guenounou, M., Perin, S., Vacheron, F. and Smets, P. (1987), Oral administration of glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae* (RU 41740) enhances serum IL-1 activity. International Symposium immunomodulators : Biology and Therapeutic Applications. Rio de Janeiro April 26-29.

Halpern, B. (1975), *Corynebacterium parvum* : applications in experimental and clinical oncology. (Plenum Press, New York).

Henderson, B. and Blake (1992). *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 145-152.

Heremans, H. and Bilian, A. (1989), The potential role of interferons and interferon antagonists in inflammatory disease. *Drugs* 6, 957-972.

Herman, J., Dinarello, C.A., Kew, M.C. and Rabson, A.R. (1985), The role of interleukin 1 (IL-1) in tumor-NK cell interactions : correction of defective NK cell activity in cancer patients by treating target cells with IL-1. *J. Immunol.* 135, 2882-2886.

Herman, J., Kew, M.C. and Rabson, A.R. (1986), The effect of RU 41740 on the production of interleukin-1 by monocytes and enriched large granular lymphocytes in normals and patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 21, 26-30.

Heymer, B. and Rietschel, E.T. (1977), Biological properties of peptidoglycans. In *Schlessingen, Microbiology*, pp. 344-349 (American Society for Microbiology, Washington).

Homo-delarche, F., Duval, D., Deray G. and Smets P. (1986), Pharmacological modulation of prostaglandin production by phagocytic cells of the thymic reticulum in relation to immunoregulation. *Prostaglandins* 32, 1, 92-96.

Horohov, DW. and Siegel, JP. (1987), Lymphokines. Progress and promise. *Drugs* 33, 289-295.

Howard, J.G., Biozzi, G., Halpern, B.N., Sviffel, C., Mounon, D. (1959), The effect of mycobacterium tuberculosis (BCG) infection on the resistance of mice to bacterial endotoxins and Salmonella enteri infections. *Br. J. exp. Path.* 40, 281-291.

Hozumi, N. (1992), B lymphocyte, antigen processing and presentation. In "*Encyclopedia of immunology*" Roitt, J.M. & Delves, P.J. Academic Press 1, 235-236.

International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group (1991), A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. *N. Engl J. Med.* 324, 509-516.

Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957), Virus interference the interferons. *Pro. R. Soc. Lond.* 147,258-67.

Isawa, M., Kashima, S., Hayami, T., Akimaya, Y., Mitsugi, K., Hamuro, J., Shiio, T. and Yugari, T. (1981), Antitumor polysaccharide "lentinan"- its immune responses and immunological characteristics. In *Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds*. Yamamura, Y., Kotani, S. (eds) Excerpta Medica, Amsterdam, 423-426.

Jacobs, D.M. and Morisson, D.C. (1977), Inhibition of the mitogenic response to lipopolysaccharide (LPS) in mouse spleen cells by polymyxin B. *J. Immunol.* 118, 21-26.

Kahan, B.D., Gibbons, S., Tejpal, N., Stepkowski, S.M. and Chou, T.C. (1991), Synergistic interactions of cyclosporine and rapamycin to inhibit immune performances of normal human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Transplantation* 51, 232-239.

Kaklamani, E., Koumantaki, Y., Demetris, K., Rommain, M., Smets, P., Kaklamanis, P., Blackwell, C.C. and Weir, D.R. (1991), *Klebsiella pneumoniae* glycoprotein RU 41740 enhances resistance of mice against *Mycoplasma arthritidis*-induced arthritis. *FEMS Microbiology Immunology* 76, 205-210.

Kamamatsu, T. (1982), The radiation sensitizing effect of PSK in the treatment for the cervical cancer patients. In *Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds*. Yamamura, Y., Kotani, S. (eds) Excerpta Medica, Amsterdam, 463-466.

Karakawa, W.W. and Young, D.A. (1979), Immunological specificity of heat stable opsonins in immune and non-immune sera and their interaction with nonencapsulated strains of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 25, 175-186.

Kimura, I., Ohnoshi, T., Yasuhara, S. (1976), *Cancer*, 37, 2201.

Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H. and Imanaka, H. (1987), FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I- Fermentation, isolation, physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot.* 40, 1249-1255.

Klein, T., Benjamin, W., Winters, A. and Friedman, H. (1981), Pertussis induced immunomodulation. In Friedman, Klein, Szintivanyi, *Immunomodulation by bacteria and their products*, 275-292 (plenum Press, New York).

Kol, O., Montreuil, J., Fournet B. and Zalisz R. and Smets P. (1987), Purification of the lipopolysaccharide fraction from *Klebsiella pneumoniae* O1 K2 by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 396, 281-286.

Kol, O., Montreuil, J., Fournet B. and Zalisz R. and Smets P. (1989), Separation by high performance chromatography of oligosaccharides obtained after mild acid hydrolysis of *Klebsiella pneumoniae* O1 K2 (NCTC 5055) lipopolysaccharides. *Journal of Chromatography* 474, 452-456.

Kol, O., Wieruszkeski, J.M., Strecker, G., Fournet B., Zalisz R. and Smets P. (1992), Structure of the O-specific polysaccharide chain of *Klebsiella pneumoniae* O1 K2 (NCTC 5055) lipopolysaccharide. A complementary elucidation. *Carbohydrate Research* 236, 339-344.

Komatsu, N., Okubo, S., Kikimoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sakai, S. (1969), *Gann.* 60,137.

Krönke, M., Leonard, W.J., Depper, J.M., Arya, S.K., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., Waldman, T.A., Greene, W.C. (1984), Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5214-5218.

Kronvall, G. and Gewurz, H. (1970), Activation and inhibition of IgG-mediated complement fixation by staphylococcal protein A. *Clin. Exp. Immunol.* 7, 211-220.

Lamotte, F. (1992), Développement de la conductance-métrie pour les contrôles microbiologiques dans une industrie pharmaceutique. Thèse de 3^{ème} cycle.

Lang, J.M., Giron, C., Oberling, F., Marchiani, C. and Zalisz, R. (1980), Conversion of skin test in cancer patients after a short course of treatment with a new immunomodulating compound. *Cancer Immunol. Immunother.*, 687-690.

Lang, J.M., Gastaut, J.A., Sotto, J.J., Troncy, J. and Marchiani, C. (1986), Enhancement of delayed cutaneous hypersensitivity by oral administration of RU 41740 (Biostim) in lymphoma patients - a randomized double blind multicentric trial. *Int. J. Immunopharmacol.* 8, 687-690.

Laval, A., Rommain, M., Fortier, M., Zalisz, R. Dahan, R. and Smets, P. (1985), Immunomodulating effects of orally administered RU 41740 in the swine. *Advances in the biosciences* 68, 103-109.

Lederer, E. (1980), Recent progress in the study of natural and synthetic immunomodulators derived from bacterial cell walls. In *Immunology* 80, 1194-1211 Academic Press.

Le Garrec, Y., Morin, A. and Chedid, L. (1985), Modifications of natural killer activity in the mouse by MDP and various muramyl peptides : relationship with adjuvant or anti-infectious properties. *Int. J. Immunopharmacol.* 7, 343.

Lenoir, G., Sommelet Olive, D., Derelle, J., Chazalette, J.P., Jehanne, M., Douchain, F., Loeuil M., and Ounis, I. (1991), A double-Blind comparison of RU 41740 and placebo in recurrent Upper respiratory Tract Infections in Children with Cystic Fibrosis. *Drug Invest* 3, 2, 76-81.

Liu, J., Farmer, J.D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I. and Schreiber, S.L. (1991), Calcineurin is a common target of cyclophilin involved in the immunosuppressive and nephrotoxic mechanism of action of cyclosporin A. *J Exp Med* 173, 619-628.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951), *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Lüderitz, O., Galanos, C., Risse, H.J., Ruschmann, E., Schecht, S., Schmidt, G., Schulte-Holthausen, H., Wheat, R., Westphal, O. and Schlosshardt, J. (1966), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 133, 349.

Lüderitz, O., Galanos, C., Lehman, V., Mayer, H., Rietschel, E.T. and Weckesser, J. 1978, *Naturwissenschaften* 67, 578.

Maestroni, J.M. and Losa, G.A. (1984), Clinical and immunobiological effects of an orally administered bacterial extract. *Int. J. Immunopharmacol.* 6, 111-117.

Martinez-Maza, O., Wood, C.D. and Britton, S. (1985), Immunoglobulin M and Immunoglobulin G secretion by human B cells exposed to RU 41740, a glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae*. *Cellular Immunology* 90, 569-576.

Mathé, G. (1976), Cancer active immunotherapy. *Immunoprophylaxis and immunorestitution* (Springer, Berlin).

McIntyre, W.J. and Tami, J.A. (1992), Introduction to Immunology. *Pharmacotherapy*, 12, 2S-10S.

Messerli, C., Michetti, F., Hauser-Hall, P., Staübli, C., Taddei, M., Weiss, S., Farine, J.C. and Fux, Th. (1981), Effet d'un lysat bactérien (Broncho-Vaxon) dans le traitement de la bronchite chronique : essai clinique en double-aveugle multicentre. *Revue méd. Suisse romande* 101, 143.

Metcalf, D. (1989), Haemopoietic growth factors 2, clinical applications. *Lancet* 1, 885-887.

Migliorati, G., Guidi, G., Cannarile L. and Riccardi C. (1989), Effect of BIOSTIM on natural killer cell generation from bone marrow precursors. *Int. J. Immunopharmac.* 11, 1, 77-82.

Miller, J.F. (1961), Immunological function of the thymus. *Lancet*, 2, 748-749.

Minonzio, F., Ongari, A.M., Palmieri, R., Bochicchio, D., Guidi, G. and Capsoni, F. (1989), Immunostimulation of neutrophil phagocytic function by RU 41740 in elderly subjects. *Immunol. Clin.*, VIII, 2, 87-95.

Mitani, M., Anka, T. and Kikichi (1982), Antitumor activity of Schizophyllan against syngeneic murine tumors and its potentiation of the therapeutic response induced by antitumor agents or chemically modified tumor cell vaccines. In *Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds*. Yamamura, Y., Kotani, S. (eds) Excerpta Medica, Amsterdam, 136-149.

Montreuil, J. and Spik, G. (1963), Microdosage des glucides Fasc. 1 : *Méthodes colorimétriques des dosages des glucides* totaux, Laboratoire de chimie biologique. Fac. Sci., eds, Lille.

Morales, A., Eidinger, D. and Bruce, A.W. (1976), Intracavitary Bacillus Calmette Guérin in the Treatment of Superficial Bladder Tumours. *J. Urol.*, 116 : 180-183.

Morton, D.L., Eilber, F.R., Joseph, W.L., Wood, W.C., Trahan, E. and Ketcham, H.S. (1970), Immunological factors in human sarcoma and melanoma. *Ann. Surg.*, 172, 740-747.

Najjar, V.A. (1978), Molecular basis of familial and acquired phagocytosis deficiency involving the tetrapeptide, Tufsin. *Exp. Cell. Biol.* 46, 114-126.

Nanjo, M., Moriya, Y., Hashimoto, S., Katooka, M., Saito, M., Yoshida, T. and Ishida, N. (1991), Analysis of antitumor effect of OK 432 against syngeneic mouse fibrosarcoma : Combination effect of OK 432 and recombinant lymphokines. *Int. J. Immunopharmac.* 13, 2/3, 205-215.

Nathan, C.F., Horowitz, C.R. and De La Harpe, J. (1985), Administration of recombinant interferon gamma to cancer patients enhances monocyte secretion of hydrogen peroxide *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 8686-8690.

Nielsen, H. (1986), Augmentation of human blood monocyte microbicidal activity by RU 41740, a glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae*. *Eur. J. Pharmacol.*, 30, 99-104.

Oppenheim, J.J., Kovacs, E.J., Matsushima, K. and Durum, S.K. (1986), There is more than one interleukin.1 *Immunol Today* 7, 45-56.

Parant, M. and Chedid, L. (1984), Stimulation of non specific resistance to infections by synthetic immunoregulatory agents. *Infection* 12, 230-234.

Petrov, R. (1992), Immune Response Regulation. In "*Encyclopedia of immunology*" Roitt, J.M. & Delves, P.J. Academic Press 2, 766-771.

Pettipher, E.R. and Whittle, B.J.R. (1992), Prostaglandins. In "*Encyclopedia of immunology*" Roitt, J.M. & Delves, P.J. Academic Press 3, 1279-1282.

Pompidou, A., Renoux, M., Guillaumin, J.M., Mace, B., Coutance, F. and Renoux, G. (1984), Kinetics of the histological changes in lymphoid organs and of the T cell inducing capacity of serum in mice treated with immuthiol (sodium diethylthiocarbamate). *Int. Archs. Allergy appl. Immun.*, 74, 172-177.

Rajagopalan, P., Dournon, E., Vildé, J.L. and Pocardalo, J.J. (1987), Direct activation of human monocyte-derived macrophages by a bacterial glycoprotein extract inhibits the intracellular multiplication of virulent *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Infect. Immun.* 55, 9, 2234-2239.

Renoux, G. and Renoux, M. (1971), Immunologie : effect immunostimulant d'un imidothiazole dans l'immunisation des souris contre l'infection par *Brucella abortus*. *Cr. Acad. Sci. Paris* 272, 349-350.

Renoux, G. and Renoux, M. (1972a), Action du phenylimidothiazole (tétramisole) sur la réaction du greffon contre l'hôte. Rôle des macrophages. *Cr. Acad. Sci. Paris*, 274, 3320-3323.

Renoux, G. and Renoux, M. (1972b), Immunologie : action immunostimulante du dérivé du phenylimidothiazole sur les cellules spléniques formatrices d'anticorps. *Cr. Acad. Sci. Paris* 274, 756-757.

Rezzoug, F., Touraine, J.L. and Smets, P. (1988), Effect of BIOSTIM on hemopoietic reconstitution in mice after sublethal irradiation. *Advances in the Biosciences* 68, 387-391.

Rezzoug, F., Touraine, J.L., Zalisz, R. and Smets P. (1990), Effect of RU 41740 on autologous hemopoietic reconstitution of sublethally irradiation. *Int. J. Immunopharmac.* 12, 5, 491-496.

Rimington, C. (1931), *Biochem. J.* 1062-1071.

Roch-Arveiller, M., El Abbouyi, A., Paul, J.L., Smets, P., Raichvarg, D. and Giroud, J.P. (1987), Effect of RU 41740 on polymorphonuclear responsiveness after burn injury. *Int. J. Immunopharmac.* 9, 4, 417-424.

Rommain, M., Brossard, C., Bruvier, C., Yagello, M. and Smets, P. (1985), Enhanced phagocytosis induced by oral administration of RU 41740 in non-elicited rat peritoneal macrophages. *Farmacologia & terapia* II, 1.

Roitt, J.M. and Delves, P.J. (1992), In "*Encyclopedia of immunology*" Academic Press volume 1-3.

Rosenberg, S. (1990), Contre le cancer : l'immunothérapie adoptive. *Pour la science* 153, 26-34.

Rowley, D. (1956), Rapidly induced changes in the level of non-specific immunity in laboratory animals. *Br. J. Exp. Path.* 37, 223.

Rudent, A., Zalisz, R., Quero, A.M. and P. Smets (1985), Enhanced resistance of mice against Influenza virus infection after local administration of glycoprotein extracts from *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Immunopharmac.* 7, 4, 525-531.

Sakai, A., Kawanon and Kuramoto, A. (1991), Interleukin-6 produced by renal-cell, carcinoma cells and progression of multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 324, 1893-1894.

Schultz, R.M., Pavlidis, D.N. and Chirigos, M.A. (1978), Macrophage involvement in the antitumor activity of *Brucella abortus* ether extract against experimental lung carcinoma metastases. *Cancer Res.* 38, 3427-3431.

Sehgal, S.N., Baker, H. and Vezina, C. (1975), Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* 28, 727-732.

Smets, P., Salles, M.F., Rommain, M., Zalisz, R., Yagello, M. and Guenounou, M. (1987), RU 41740 (*K. pneumoniae* glycoprotein) enhances resistance to experimental candidiasis and stimulates phagocytic functions. *Ann. Immunol. Inst. Pasteur* 138, 425-436.

Smets, P., Zalisz, R. and Boisnic, F. (1988), Biostim (RU 41740) immune functions and infection. *Advances in the Biosciences* 68, 85-102.

Sozzani, S., Luini, W., Braceschi, L. and Spreafico, F. (1986), The effect of BIOSTIM (RU 41740) on natural killer activity in different mouse organs. *Int. J. Immunopharmac.* 8, 845-853.

Sozzani, S., D'alessandro, F., Capsoni, F., Luini, W., Barcellini, W., Guidi, G. and Spreafico, F. (1988), In vitro modulation of human monocytes functions by RU 41740 (BIOSTIM). *Int. J. Immunopharmac.* 10, 2, 93-102.

Stewart, T.H.M., Hollinshead, A., Harris, J., Raman, S., Belanger, R., Crepeau, A., Crook, A., Hirte, W., Hooper, D., Klaassen, D., Rapp, E., Sachs, H. (1977), Survival study of specific active immunochemotherapy in lung cancer. In *Neoplasm immunity : Solid Tumor Therapy*, ed. R.G. Crispen, 37-48. Philadelphia : Franklin Institute Press

Stinebring, W.R. and Youngner, J.S. (1964), Patterns of interferon appearance in mice injected with bacteria or bacterial endotoxin. *Nature*, 204, 702.

Suzuki, S., Hatsukaiwa, H., Sunayam, H., Uchimaya, M., Fukuoka, F., Nakanishi, M., and Akiya, S. (1969), *Gann.* 60, 65.

Symoems, J. and Rosenthal, M. (1977), Levamisole in the modulation of the immune response : The current experimental and clinical state. *J. Reticuloendothel. Soc.* 21, 175-221.

Taguchi, T., Furue, H., Hattori, T., Kondo, T., Kimura, T., Itoh, I. and Ogawa, N.T. (1982), Clinical trials on lentinan (polysaccharide). In *Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds*. Yamamura, Y., Kotani, S. (eds) Excerpta Medica, Amsterdam, 467-475.

Takada, H., Tsujimoto, M., Ogawa, T., Ishihara, Y., Kawasaki, A., Kotani, S., Tanaka, A., Nagao, S., Kushima, K., Fujiki, T.F. and Kato, A. (1982), Immunomodulating activities of Biostim. Immunomodulating activities of Biostim. In : *Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds*. Yamamura, Y., Kotani, S. (eds), Excerpta Medica, Amsterdam, 266-269.

Takx-Köhlen, B.C.M.J. (1992), Immunomodulators. Future Prospects. *Pharm. Weekbl (Sci)* 14(4A), 245-252.

Tanaka, A., Nagao, S., Nagao, R., Kotani, S., Shiba, T. and Kusumoto, S. (1979), Stimulation of the reticuloendothelial system of mice by muramyl dipeptide. *Infect. Immun.* 24, 2, 302-307.

Taverna, M., Baillet, A.E. and Baylocq-Ferrier, D. (1990), Identification of monosaccharides by high performance chromatography using methanolysis and a light-scattering detector. *J. of Chromatography* 514, 70-79.

Thompson, R.C., Dripps, D.J. and Eisenberg, S.P. (1992), Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) as a probe and as a treatment for IL-1 mediated disease. *Int. J. Immunopharmac.* 14, 3, 475-480.

Tillmans, J. and Philippi, K. (1929), *Biochem. Z.* 215, 36.

Timonen, T., Ortaldo, J.R. and Herberman, R.B. (1982), Analysis by a single cell cytotoxicity assay of natural killer (NK) cell frequencies among human large granular lymphocytes and of the effects of interferon on their activity. *J. Immunol.* 128, 2514-2521.

Tissot, M., Mathieu, J., Mirossay, L., Thuret, A. and Giroud, J.P. (1991), Polyphosphoinositide metabolism in polymorphonuclear cells from healthy and thermally injured rats : Effect of the immunomodulator RU 41740. *Journal of leukocyte biology* 50, 607-614.

Tocci, M.J., Matkovich, D.A., Collier, K.A., Kwok, P., Dumont, F., Lin, S., Degudicibus, S., Siekierka, J.J., Chin, J. and Hutchinson, N.I. (1989), The immunosuppressant FK 506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes *J. Immunol.* 143, 718-726.

Tripodi, D., Parks, L.C. and Brugmans, J. (1973), Drug-induced restoration of cutaneous delayed hypersensitivity in anergic patients with cancer. *New England J. Med.* 289, 354-357.

Uchida, A., Micksche, M. and Hoshino, T. (1981), Effect of OK 432 on the natural killer activity of mononuclear cells in circulating blood and carcinomatous pleural effusion. In *Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds*. Yamamura, Y., Kotani, S. (eds) Excerpta Medica, Amsterdam, 446-449.

Umezawa, H. (1980), *Biotechnol. Bioeng.* 22, Suppl. 1, 99.

Unkless, J.C. and Wright, S.D. (1988), Phagocytic cells : Fc gamma and complement receptors. In *Inflammation : Basic principles and clinical correlates* (eds Gallin, J.I., Goldstein, I.M. and Snyderman, R.) pp. 343-362. Raven Press, New York.

Vacheron, F., Périn, S., Kodari, E., Smets, P., Zalisz, R. and Guenounou, M. (1989), Immunological activities of RU 41740, a glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae*. III role of LPS-like and LPS-non-Related molecules. *Res. Immunol.* 140, 159-172.

Vezina, C., Kudelski, A. and Sehgal, S.N. (1975), Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.* 28, 721-726.

Viallat, J.R., Costantini, D., Boutin, C., and Farisse, P. (1983), Etude en double aveugle d'un immunomodulateur d'origine bactérienne (BIOSTIM) dans la prévention des épisodes infectieux chez le bronchitique chronique. *Poumon coeur* 39, 53-57.

Viland, H. and Blomgren, H. (1987a), Augmentation of spontaneous cytotoxicity of human lymphocytes by RU 41740, a glycoprotein extract of *Klebsiella pneumoniae*. *Anticancer Research* 7, 17-22.

Viland, H. and Blomgren, H. (1987b), Augmentation of spontaneous cytotoxicity of human lymphocytes by RU 41740 is due to monocytes-derived factors distinct from interleukin 2, interferon alpha et gamma. *Anticancer Research* 7, 23-28.

Viland, H. and Blomgren, H. (1988), Human monocytes exposed to BIOSTIM (RU 41740) alter lymphocyte mitogenesis : Mechanisms of action. *Int. J. Immunopharmac.* 10, 7, 879-887.

Wang, J.M., Bersani, L. and Mantovani, A. (1987), Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Immun.* 138, 1469-1474.

Waters, R.V. and Ferraresi R.W. (1980), Muramyl dipeptide stimulation of particles clearance in several animal species. *Journal of reticuloendothelial society.* 28, 5, 457-471.

Webb, D.R., Devens, B.H. (1992), Suppressor T lymphocytes. In "*Encyclopedia of immunology*" Roitt, J.M. & Delves, P.J. Academic Press 3, 1409-1412.

Werner, H.G. (1987), Clinical applications of thymic peptides. *Immunol. lett.* 16, 363.

Westphal, O., Westphal, U. and Sommer, T. (1977), In "*Microbiology-1977*" pp. 221-238. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.

Wilson, ME. (1985), Effects of bacterial endotoxins on neutrophil function. *Rev. Infect. Dis.*, 7, 404-418.

Wood, C.D. and Möller, G. (1985), Influence of RU 41740, a glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae*, on the murine immune system. II- RU 41740 facilitates the response to ConA in otherwise unresponsive T-enriched cells. *The Journal of Immunology* 135, 131-136.

Wybran, J. and Fudenberg, H.H. (1973), Thymus-derived rosette forming cells in various human disease states : cancer lymphoma, bacterial and viral infections, and others diseases. *Clin. Invest.* 52, 1026-1032.

Zalisz, R., Salles, M.F., Smets, P., Brossard, C., Rudent, A. and Edelstein, R. (1983), Immunoprophylaxis with RU 41740 increases survival of mice to experimental bacterial, viral and fungal infections. *Proceeding of International Congres of Chemotherapy, 13th*, Vienna, Spitzky K.H. et al. (eds) 2, 91/16-91/20.

VIII - Annexe

Annexe 1

RP 1488 : Essai de lyse trypsique

- Culture en fermenteur de 100 l
- Centrifugation des germes : élimination du milieu de culture et lavage du culot par NaCl 9 ‰

- Lyse trypsique :

- Chauffage 15 min à 75 °C,
 - Descente à 45 °C,
 - Introduction de trypsine (10 µg/ml),
 - 15 min à 45 °C,
 - pH ajusté à 11 avec NaOH 10 N,
 - 15 min à 45 °C,
 - Retour à 37 °C.
- Lyse effective à T + 6 jours. Livré à T + 10 jours
 - Ajustage du pH à 8,13 avec H₃PO₄ dilué au demi
 - Lyophilisation du surnageant
 - Extraction acétone
 - Extraction méthanol

A ce stade trois opérations de purification sont réalisées sur trois fois 100 g d'extrait méthanol.

- Mise en solution
- Centrifugation
- Ultrafiltration
- Centrifugation
- Filtration sur 1,2 µm
- Lyophilisation
- Mélange et homogénéisation des trois parties

RP 1489 : Essai de lyse mécanique

- Culture en fermenteur de 100 l
- Centrifugation des germes : élimination du milieu de culture et lavage du culot par NaCl 9 ‰
- Lyse Manton Gaulin (trois passages successifs)
- Ajustage du pH à 11 avec NaOH 10 N
- Lyse effective à T + 7 jours
- Ajustage du pH à 8,18 avec H₃PO₄ dilué au demi
- Lyophilisation du surnageant
- Extraction acétone
- Extraction méthanol

A ce stade deux opérations de purification sont réalisées sur deux fois 100 g d'extrait méthanol.

- Mise en solution
- Centrifugation
- Ultrafiltration
- Centrifugation
- Filtration sur 1,2 µm
- Lyophilisation
- Mélange et homogénéisation des deux parties

RP 1491 : Essai de lyse lysozyme

- Culture en fermenteur de 100 l
- Centrifugation des germes : élimination du milieu de culture et lavage du culot par NaCl 9 ‰

- Lyse lysozyme :

- Chauffage 15 min à 52 °C,
 - Introduction des agents lysants :
 - Polysorbate 80,
 - EDTA,
 - Lysozyme.
 - 1 h à 52 °C,
 - pH ajusté à 11 avec NaOH 10 N,
 - 15 min à 52 °C,
 - Retour à 37 °C.
-
- Lyse effective à T + 5 jours. Livré à T + 9 jours
 - Ajustage du pH à 7,9 avec H₃PO₄ dilué au demi
 - Lyophilisation du surnageant
 - Extraction acétone
 - Extraction méthanol

A ce stade trois opérations de purification sont réalisées sur trois fois 100 g d'extrait méthanol.

- Mise en solution
- Centrifugation
- Ultrafiltration
- Centrifugation
- Filtration sur 1,2 µm
- Lyophilisation
- Mélange et homogénéisation des trois parties