



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

① CH 660 557 A5

⑤ Int. Cl.: A 61 K 37/00
C 07 H 3/06

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

<p>⑲ Numéro de la demande: 5136/84</p> <p>⑳ Date de dépôt: 26.10.1984</p> <p>㉑ Brevet délivré le: 15.05.1987</p> <p>㉒ Fascicule du brevet publié le: 15.05.1987</p>	<p>㉓ Titulaire(s): Société des Produits Nestlé S.A., Vevey</p> <p>㉔ Inventeur(s): Neeser, Jean-Richard, Clarens Wuersch, Pierre, La Tour-de-Peilz</p>
---	---

⑤④ **Composition anti-bactérienne et procédé de préparation de ses constituants actifs.**

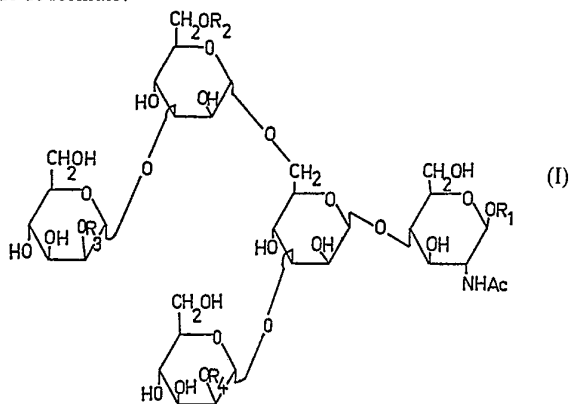
⑤⑦ L'adhérence de bactéries pathogènes pourvues de fimbriae de type I aux cellules animales est inhibée par des glycopeptides et/ou oligosaccharides préparés par voie enzymatique, de préférence à partir d'une fraction enrichie en glycoprotéine 7S du soya ou en glycoprotéine II du haricot.

Ces constituants actifs comportent une structure de base polymannosidique semblable à celles que présentent les cellules épithéliales et que reconnaissent les bactéries. Celles-ci sont neutralisées et n'adhèrent plus aux cellules.

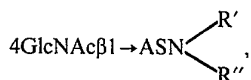
Les compositions sont utiles pour la prophylaxie, la thérapie et le diagnostic des maladies infectieuses, notamment celles provoquées par les bactéries coliformes et également pour la désinfection des surfaces.

REVENDEICATIONS

1. Composition antibactérienne relative à des bactéries pathogènes pourvues de fimbriae de type I, caractérisée par le fait qu'elle contient comme constituant actif un glycopeptide et/ou un oligosaccharide de formule:

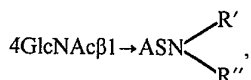


dans laquelle R_1 est un atome d'hydrogène, un résidu 4GlcNAc β 1 \rightarrow ASN, ou un résidu



dans lequel R' et R'' sont les mêmes ou différents et représentent des résidus d'acides aminés ou des chaînes polypeptidiques; R_2 , R_3 et R_4 sont les mêmes ou différents, et représentent des atomes d'hydrogène, des résidus de mannose ou des chaînes d'oligomannosides.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle contient comme constituant actif un composé de formule I, dans laquelle R_1 est un résidu 4GlcNAc β 1 \rightarrow ASN ou un résidu



dans lequel R' et R'' sont semblables ou différents et représentent des résidus d'acides aminés ou des chaînes polypeptidiques, R_3 et R_4 représentent des atomes d'hydrogène et R_2 est un atome d'hydrogène ou un résidu de mannose.

3. Composition selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle contient comme constituant actif le composé de formule I, dans laquelle R_1 , R_3 et R_4 sont des atomes d'hydrogène et R_2 est un atome d'hydrogène ou un résidu de mannose.

4. Composition selon la revendication 1 sous forme immobilisée, caractérisée par le fait qu'elle contient un glycopeptide de formule I dont la définition est indiquée dans la revendication 1 et dans laquelle R_1 est différent d'un atome d'hydrogène couplé de préférence par covalence à un support macromoléculaire.

5. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, sous la forme d'un produit diététique, de préférence sous la forme d'une poudre de lait.

6. Procédé de préparation de glycopeptides de formule I, dont la définition est indiquée dans la revendication 1 et R_1 est différent d'un atome d'hydrogène, caractérisé par le fait qu'on soumet une glycoprotéine d'origine végétale à une digestion par un enzyme protéolytique et que, lorsque R_2 , R_3 et R_4 représentent des atomes d'hydrogène ou des résidus de mannose, on soumet les glycopeptides obtenus à une digestion contrôlée par une exo- α -mannosidase de manière à cliver les liaisons α 1 \rightarrow 2 entre deux résidus de mannose.

7. Procédé de préparation d'oligosaccharides de formule I, dont la définition est indiquée dans la revendication 1 et R_1 est un atome d'hydrogène, caractérisée par le fait qu'on soumet une glycoprotéine d'origine végétale à une digestion par un enzyme protéolytique,

qu'on transforme les glycopeptides obtenus en oligosaccharides par l'action d'une endo- β -N-acétylglucosaminidase H puis, lorsque R_2 , R_3 et R_4 représentent des atomes d'hydrogène ou des résidus de mannose, on soumet les oligosaccharides obtenus à une digestion contrôlée par une exo- α -mannosidase de manière à cliver les liaisons α 1 \rightarrow 2 entre deux résidus de mannose.

8. Utilisation d'une composition selon la revendication 1 pour l'identification et/ou l'isolement de bactéries spécifiques pourvues de fimbriae de type I.

9. Utilisation d'une composition selon la revendication 1 pour la désinfection des surfaces.

L'invention concerne une composition antibactérienne relative à des bactéries pathogènes pourvues de fimbriae de type I, contenant comme constituants actifs des glycopeptides et/ou des oligosaccharides, ainsi qu'un procédé de préparation desdits constituants actifs.

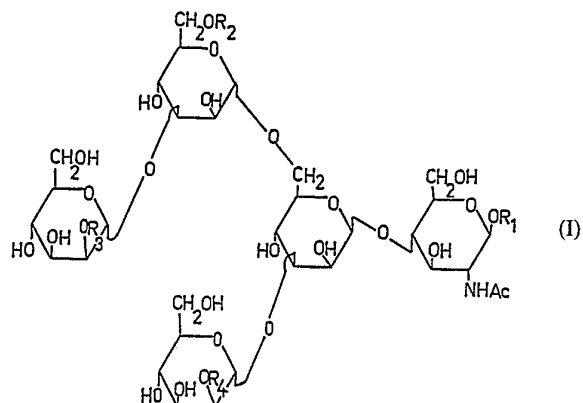
Il y a peu de doute que la plupart des infections naturelles débute par l'adhérence de l'agent pathogène aux cellules épithéliales des muqueuses, ce qui permet ensuite son implantation et la colonisation du tissu animal. Dans le processus d'infection par les bactéries pourvues de structures protéiques appelées «fimbriae de type I», bactéries dont l'adhérence aux cellules animales est dite «sensible au mannose», ces structures reconnaissent des récepteurs spécifiques qui sont des groupements glucidiques complexes, vraisemblablement des chaînes d'oligomannosides faisant partie des glycoconjugués présentés par la surface des membranes cellulaires.

On a montré récemment (réf. 1 ci-après) que le phénomène d'adhérence des bactéries pourvues de fimbriae de type I sur les cellules épithéliales ainsi que leur capacité à provoquer l'hémagglutination d'érythrocytes de cobaye, peuvent être inhibés en présence de certains oligosaccharides ressemblant à la structure spécifique des récepteurs membranaires, la bactérie étant ainsi leurrée en fixant préférentiellement les oligosaccharides en question. Ces oligosaccharides ont été soit obtenus par voie de synthèse, soit isolés à partir d'urines de patients présentant des déficiences enzymatiques.

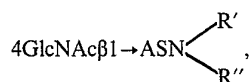
Dans le même ordre d'idées, la demande de brevet européen publiée N° 89940 par exemple, concerne une composition contenant la structure Gal α 1 \rightarrow 3Gal obtenue par voie chimique capable d'inhiber *in vitro* l'adhérence de *Escherichia Coli* K88 + sur les cellules intestinales des porcelets.

L'invention a pour but de fournir une composition contenant comme constituants actifs des glycopeptides et/ou oligosaccharides d'origine végétale ou animale obtenus par voie enzymatique ayant la capacité de remplacer le récepteur normal que reconnaissent les fimbriae de type I, et ainsi d'inhiber ou de renverser l'adhérence des bactéries pathogènes pourvues de ces fimbriae sur les cellules animales.

La composition selon l'invention est caractérisée par le fait qu'elle contient comme constituant actif un glycopeptide et/ou un oligosaccharide de formule



dans laquelle R_1 est un atome d'hydrogène, un résidu $4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{ASN}$, ou un résidu

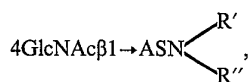


dans lequel R' et R'' sont les mêmes ou différents et représentent des résidus d'acides aminés ou des chaînes polypeptidiques; R_2 , R_3 et R_4 sont les mêmes ou différents, et représentent des atomes d'hydrogène, des résidus de mannose ou des chaînes d'oligomannosides.

Comme bactéries pathogènes pourvues de fimbriae de type I on peut citer par exemple des souches pathogènes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, etc.

Dans la formule I ci-dessus, $4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{ASN}$ signifie un cycle 2-désoxyglucose relié à la glucosamine terminale en position 4, portant un groupe acétylamino en position 2 et relié en position 1 avec la configuration β à l'asparagine, laquelle peut être substituée par des acides aminés ou des chaînes polypeptidiques.

Un groupe préféré, notamment pour son activité inhibitrice de l'adhérence des entérobactéries coliformes pathogènes, est constitué des glycopeptides de formule I ci-dessus dans laquelle R_1 est $4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{ASN}$ ou



R' et R'' ayant les significations ci-dessus, R_3 et R_4 sont des atomes d'hydrogène et R_2 est un atome d'hydrogène ou un résidu de mannose.

Un oligosaccharide préféré, notamment pour son activité inhibitrice de l'adhérence des entérobactéries coliformes pathogènes, est celui de formule I dans laquelle R_1 , R_3 et R_4 sont des atomes d'hydrogène et R_2 est un atome d'hydrogène ou un résidu de mannose.

L'invention concerne également un procédé de préparation des composés de formule I, caractérisé par le fait qu'on soumet une glycoprotéine d'origine végétale à une digestion par un enzyme protéolytique, qu'on transforme éventuellement les glycopeptides obtenus en oligosaccharides par l'action d'une endo- β -N-acétylglucosaminidase H, puis qu'on soumet éventuellement les glycopeptides ou les oligosaccharides obtenus à une digestion contrôlée par une exo- α -mannosidase de manière à cliver préférentiellement les liaisons $\alpha 1 \rightarrow 2$ entre deux résidus de mannose.

Toute farine de légumineuse connue pour contenir des glycoprotéines de réserve riches en oligomannosides peut servir de matériel de départ. On utilise avantageusement la farine dégraissée de soya ou de haricot.

De préférence, on utilise un isolat enrichi en glycoprotéine 7S de soya ou en glycoprotéine II de haricot, par extraction de la farine dégraissée à pH alcalin (8-9) puis précipitation sélective de la glycoprotéine à pH 4,5-5, par exemple de manière analogue à celle indiquée dans la littérature (réf. 2 et 4 ci-après).

Afin d'obtenir des glycopeptides, on soumet ensuite la fraction enrichie en glycoprotéine à une digestion par un enzyme protéolytique, par exemple de manière analogue à celle indiquée dans la littérature (réf. 3 ci-après).

La digestion enzymatique peut être effectuée à l'aide de n'importe quel enzyme protéolytique actif à pH acide, neutre ou alcalin. L'enzyme peut être d'origine fongique, microbienne (par exemple pronase, alcalase), végétale (par exemple broméline, ficine, papaïne) ou animale (par exemple trypsine, pepsine, pancréatine).

Selon une première forme d'exécution du procédé de l'invention, destinée à préparer des oligosaccharides à partir des glycopeptides, on traite le digestat ci-dessus par une endo- β -N-acétylglucosaminidase H, destinée à cliver sélectivement la liaison $\beta 1 \rightarrow 4$ entre les deux résidus N-acétylglucosamine de la formule I, transformant ainsi R_1 en H.

Selon une variante préférée du procédé selon la première forme d'exécution, destinée à raccourcir les chaînes d'oligomannosides des oligosaccharides ci-dessus afin d'augmenter leur activité, on traite ces derniers de manière contrôlée par une exo- α -mannosidase, enzyme clivant préférentiellement les liaisons $\alpha 1 \rightarrow 2$ entre deux résidus de mannose, par exemple de manière analogue à celle indiquée dans la littérature (réf. 5 ci-après).

Selon une seconde forme d'exécution du procédé de l'invention, qui est préférée car elle conduit à des produits dont l'activité est plus grande que les précédents, on raccourcit les chaînes d'oligomannosides en traitant les glycopeptides précédents de manière contrôlée par une exo- α -mannosidase. On peut en variante préparer ensuite les oligosaccharides correspondants ci-dessus en traitant ces glycopeptides par une endo H. Les compositions selon l'invention peuvent être utilisées pour la prophylaxie, la thérapie ou le diagnostic de maladies infectieuses causées par les bactéries pourvues de fimbriae de type I, notamment les maladies gastro-intestinales causées par les entérobactéries coliformes comme par exemple *Escherichia coli*, et se présenter sous une forme adaptée au mode d'administration.

Administré par exemple par voie orale ou entérale, le constituant actif peut se présenter sous forme de sirop, capsule, gélule, comprimé, dragée, solution, suspension, émulsion ou poudre reconstituable par addition d'un milieu aqueux, par exemple de préférence sous la forme d'un produit diététique, par exemple d'une poudre de lait.

Destiné à l'administration par voie parentérale, il peut se présenter sous la forme d'une solution ou suspension stabilisée physiquement, stérile et apyrogène.

L'administration par voie topique, par exemple pour une application ophtalmologique, peut être effectuée sous forme de solution, aérosol, pommade ou onguent.

Lorsque le constituant actif est destiné au diagnostic, à l'identification ou à l'isolement de bactéries pathogènes, il sera avantageusement couplé, de préférence par covalence à un support macromoléculaire.

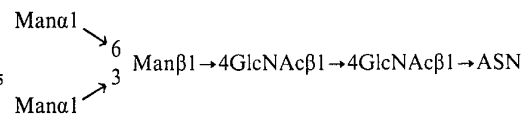
Enfin les compositions selon l'invention peuvent être utilisées pour la désinfection des surfaces, par exemple sous forme de solution ou d'émulsion pour le traitement des verres de contact.

Dans ces compositions, le constituant actif peut représenter 0,1 à 90% en poids.

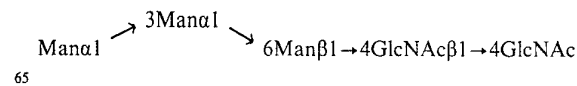
Les exemples suivants illustrent l'invention. Dans ceux-ci, les parties et pourcentages sont pondéraux, sauf indication contraire.

Dans les exemples 1 à 3 ci-après, la preuve de la structure des constituants actifs de formule I découle des caractéristiques suivantes:

a) l'analyse de la composition glucidique des glycoprotéines de départ ne révèle la présence que de deux constituants monosaccharidiques: le mannose et la glucosamine. Les oligosaccharides formés de ces deux constituants sont liés à la chaîne polypeptidique par l'azote d'une asparagine (liaison N-glycosidique), la partie «endo» de ces oligosaccharides correspondant alors à la structure:



b) Le fait que tous les substrats glycopeptidiques soient entièrement hydrolysés par l'endo- β -N-acétylglucosaminidase H (Endo H) prouve qu'ils correspondent tous à la structure minimum requise pour une telle digestion enzymatique (réf. 6 ci-après)



La superposition des deux structures ci-dessus conduit à l'élaboration de la structure générale proposée.

Exemple 1 :

a) *Glycoprotéine*: On prépare une fraction enrichie en glycoprotéine 7S à partir de farine de soya dégraissée par extraction à pH 8,0 avec une solution 0,5 molaire de Na_2SO_3 , précipitation à pH 5,7 permettant d'écarter une première fraction (riche en 11S) et une seconde précipitation à pH 4,5, suivie de deux lavages au même pH qui donne accès à la fraction enrichie en 7S.

b) *Glycopeptides*: On conduit la digestion enzymatique de la partie protéinique à partir de 30 g de protéine, dans deux litres de solution-tampon tris-HCl (0,05 molaire, pH 8,0), en présence de toluène, pendant 24 heures à 40° C à l'aide de 600 mg de pronase E (Merck AG), puis de 300 mg additionnels d'enzyme pendant 48 heures. On isole les glycopeptides après filtration de cette solution, passage de l'éluat sur résine Dowex 50W-X8[®] (forme H⁺), lavage de la résine à l'eau distillée jusqu'à disparition des glucides dans les eaux de lavage, et neutralisation des fractions combinées avec une résine Amberlite IRA 400[®] (forme CO_3^{--}). On concentre et on lyophilise la solution finale, et le produit peut être finalement purifié par fractionnement sur une colonne de Sephadex G-25[®]. Le rendement global du procédé est de 88% (basé sur la quantité de mannose finalement présent dans le mélange glycopeptidique). L'analyse de la composition glucidique du mélange obtenu ci-dessus (par la méthode décrite dans la réf. 7 ci-après) a révélé la présence d'une moyenne de 7,6 unités de mannose pour deux unités de N-acétyl-glucosamine.

c) *Oligosaccharides*: Les glycopeptides isolés ci-dessus se sont révélés complètement digestibles par l'endo- β -N-acétylglucosaminidase H (Endo H, Seikagaku Kogyo Co. Ltd.), cette dernière propriété fournissant la base du procédé utilisé pour l'obtention des oligosaccharides correspondants: on dissout un échantillon glycopeptidique contenant 7,5 mg d'oligomannoside dans 10 ml de solution-tampon citrate-phosphate (pH 6,0, 10 molaire) et on ajoute à cette solution 100 milliunités d'Endo H (unité définie par le fabricant) ainsi que 0,5 ml de toluène. Après une incubation de 24 heures à 37° C, on dénature l'enzyme par chauffage. L'hydrolysate ainsi obtenu peut être utilisé sous cette forme (brute) pour des tests d'hémagglutination (voir exemple 4 ci-après). Le même hydrolysate peut également être traité par une résine Amberlite MB 3[®] forme H⁺ et OH⁻, dans le but d'isoler les oligosaccharides ainsi libérés: après addition, agitation et décantation de la résine, on lave cette dernière à l'eau distillée jusqu'à disparition des glucides dans les eaux de lavage et on concentre les fractions combinées. L'analyse des oligosaccharides ainsi purifiés a révélé la présence de 7 à 8 unités de mannose par unité de N-acétylglucosamine, pour un produit contenant 85% de mannose, le rendement global de l'hydrolyse enzymatique et de l'isolement des oligosaccharides étant pratiquement quantitatif. L'analyse par chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC) du produit brut de la digestion à l'Endo H et du mélange des oligosaccharides purifiés conduit à des résultats similaires: l'enzyme libère trois produits différents correspondant aux structures GlcNAc-(Man)₆ (18%), GlcNAc-(Man)₇ (26%) et GlcNAc-(Man)₈ (56%) (Man signifiant un résidu de mannose), ces hydrates de carbone étant totalement libérés depuis les glycopeptides de départ.

Exemple 2 :

a) *Glycoprotéine*: On prépare une fraction enrichie en glycoprotéine II à partir de farine de haricot blanc (*Phaseolus vulgaris*) moulu dégraissée par extraction à pH 9,0 et dialysée contre l'eau acidifiée à pH 5,0 résultant en une précipitation de la fraction glycoprotéinique qui est séparée et à nouveau mise en solution à pH 8,0. Après deux centrifugations, et lyophilisation des surnageants combinés, on obtient la fraction riche en glycoprotéine II.

b) *Glycopeptides*: On conduit la digestion enzymatique de la partie protéinique exactement comme depuis la glycoprotéine 7S du soya (exemple 1b ci-dessus). L'analyse de la composition glucidique du mélange obtenu (réf. 7 ci-après) a révélé la présence d'une moyenne de 7,8 unités de mannose pour deux unités de N-acétyl-glucosamine.

c) *Oligosaccharides*: Les glycopeptides isolés ci-dessus se sont révélés complètement digestibles par l'Endo H. On conduit l'hydrolyse enzymatique et l'isolement des oligosaccharides exactement comme depuis les glycopeptides du soya (voir exemple 1c ci-dessus). L'analyse par HPTLC a révélé dans ce cas la libération de cinq produits différents, correspondant aux structures GlcNAc-(Man)₅ (5%), GlcNAc-(Man)₆ (10%), GlcNAc-(Man)₇ (26%), GlcNAc-(Man)₈ (15%) et GlcNAc-(Man)₉ (44%).

Exemple 3 :

Dans le but de générer des glycopeptides et des oligosaccharides à structure réduite à partir des produits des exemples 1 et 2, on tire profit de la propriété de l' α -mannosidase (de canavalia, *Canavalia*, Sigma Chemical Company) de cliver les liaisons Man α 1 \rightarrow 2Man préférentiellement aux liaisons Man α 1 \rightarrow 3Man.

On dissout un échantillon de glycopeptides contenant 350 mg d'oligomannoside provenant de la glycoprotéine 7S du soya (exemple 1b ci-dessus) dans 75 ml de solution-tampon citrate (0,01 molaire, pH 4,5) et on ajoute à cette solution 190 unités d' α -mannosidase (de canavalia, unité définie par le fabricant). Après une incubation de 1 h à 25° C, on ébouillante le mélange, on le refroidit et on le filtre. On lyophilise ensuite le filtrat. Le lyophilisat peut être utilisé comme tel (brut) pour des tests d'hémagglutination (voir exemple 4 ci-après). Il peut également être purifié sur colonne de Sephadex G-25[®], purification permettant la séparation effective du mélange glycopeptidique et du mannose libéré par l'enzyme.

L'analyse de la composition glucidique du produit (réf. 7 ci-après) a révélé la présence de 4,8 unités de mannose pour deux de N-acétylglucosamine.

L'analyse par HPTLC des produits obtenus comme ci-dessus, mais depuis les oligosaccharides d'origine végétale correspondants (exemples 1c et 2c ci-dessus), confirme qu'un composé correspondant à la formule GlcNAc-(Man)₅ est bien le constituant principal des mélanges obtenus.

Exemple 4 :

Inhibition d'hémagglutination des érythrocytes de cobaye par des souches adhérentes d'E. Coli, en présence de glycopeptides et d'oligosaccharides

Deux souches de bactéries adhérentes *E. Coli* ont été utilisées systématiquement dans les tests d'hémagglutination et d'inhibition d'hémagglutination: un isolat clinique d'*E. Coli* 16375 (Univ.-Klinik für Kinderheilkunde, Innsbruck) et la souche d'*E. Coli* 0119.K69.L74-30 (K69). Ces bactéries ont été lavées avec de l'eau saline (0,9% NaCl) et les suspensions ont été ajustées à une concentration de 10⁹ bactéries/ml (par mesure de densité optique).

Les érythrocytes de cobaye ont été suspendus à une concentration de 1% dans de l'eau saline.

Les tests d'hémagglutination et d'inhibition d'hémagglutination ont été effectués en mélangeant 25 μ l (microlitre) de la suspension bactérienne, 50 μ l de la suspension d'érythrocytes et 25 μ l d'une solution saline (respectivement ne contenant pas ou contenant un inhibiteur, dans ce dernier cas plusieurs concentrations différentes étant testées en série). Les lectures ont été effectuées après deux heures d'immobilisation à 4° C.

Les résultats sont présentés dans le tableau I ci-après:

Tableau I

Inhibition d'hémagglutination d'érythrocytes de cobaye

Inhibiteur	Concentration ^{a)} (ppm d'oligomannoside)		Concentration ^{b)} (μ-Molarité)		Activité relative à l'α-MM
	<i>E. Coli</i> 16375	<i>E. Coli</i> K 69	<i>E. Coli</i> 16375	<i>E. Coli</i> K 69	
Méthyl-α-D-mannoside (α-MM)	125	60	650	325	1
Glycopeptides Endo-H digestat (brut) Oligosaccharides purifiés	130/150	65/75	100	50	6,5
De la glycoprotéine 7S des graines de soya					
Glycopeptides Endo-H digestat (brut) Oligosaccharides purifiés	125	60	90	45	7
De la glycoprotéine II des graines de haricot					
Mélange des glycopeptides de l'ovalbumine ^{c)} GP IV GP V	40/60	20/30	70	35	10
	95	n.t.	90	n.t.	7,5
	10/15	5	12	6	60
Oligosaccharides (de la 7S du soya) digérés (1 h) à l'α-mannosidase	10/25	10/15	18	12	30
Oligosaccharides (de la glycopr. II du haricot) digérés (1 h) à l'α-mannosidase	10/25	10	18	12	30
Manα1→3Manβ1→4GlcNAc (d'origine synthétique) ^{d)}	7,5	5,5	20	15	25
Glycopeptides (de la 7S du soya) digérés (1 h) à l'α-mannosidase	12/18	6/9	15	7,5	40
Glycopeptides (de la glycopr. II du haricot) digérés (1 h) à l'α-mannosidase	12/18	6/9	15	7,5	40

Tableau I, légende:

a) Concentration minimum d'inhibiteur dans le mélange final, résultant en une inhibition complète de l'hémagglutination.

b) Expression calculée de la concentration de l'inhibiteur, depuis la formule (moyenne dans le cas de mélanges) déduite de l'analyse de la composition glucidique du produit.

c) Les produits nommés GP IV et V correspondent aux hydrates de carbone liés à une asparagine, obtenus, séparés et nommés conformément à la littérature (réf. 5 ci-après). Le mélange des glycopeptides de l'ovalbumine correspond à celui décrit (réf. 5 ci-après).

d) Produit synthétique aimablement offert par le Prof. Dr. Hans Paulsen (Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität, Hamburg).

n.t. signifie non testé

D'autres expériences ont montré que les glycopeptides végétaux inhibent de manière comparable l'hémagglutination des érythrocytes de cobaye provoquée par les souches entéropathogènes *E. Coli* 086.K61,B74-10 et 0111.K58,B75-44.

Exemple 5:

Adhérence et inhibition d'adhérence d' *E. Coli* entéropathogènes 16375 sur cellules buccales humaines

Des cellules ont été recueillies par frottis de la bouche d'un membre du personnel de laboratoire, lavées quatre fois avec une solution d'eau physiologique tamponnée au phosphate [NaCl 0,15 Molaire, phosphate 0,01 Molaire (PBS)], et finalement diluées jusqu'à une concentration de 10⁶ cellules/ml.

Les bactéries entéropathogènes *E. Coli* de l'isolat clinique 16375 ont été lavées deux fois au PBS et diluées jusqu'à une concentration de 2·10⁹ bactéries/ml.

Les incubations ont été effectuées en mélangeant 500 μl de la suspension cellulaire, 250 μl de la suspension bactérienne et 250 μl de PBS (pour la mesure de l'adhérence) ou d'inhibiteur (une série de concentrations différentes étant testées pour la mesure de l'inhibition). Les mélanges ont été effectués en rotation lente pendant 30

minutes à température ambiante. Quatre lavages au PBS (5 ml) ont alors précédé les collectes de frottis et les colorations au Gram. Le nombre de bactéries adhérentes par cellule a été compté sous microscope optique, 50 cellules par test étant analysées. Les résultats sont regroupés dans le tableau II ci-après:

Tableau II

Inhibiteur	Concentration (ppm équivalent mannoside)	% d'inhibition d'adhérence
Méthyl-α-D-mannoside:	100	70
	50	45
	10	35
Glycopeptides de la glycoprotéine 7S du soya (ex. 1b).	100	65
	50	30
	10	25
Glycopeptides de la 7S du soya, digérés (1 h) à l'α-mannosidase (ex. 3).	100	90
	25	77
	5	21

Exemple 6:

Immobilisation de glycopeptides sur support solide

Les glycopeptides produits par les digestions à la pronase (exemples 1b et 2b) peuvent être fixés sur gel de Sepharose, suivant la méthode ci-après: 2 g de Sepharose 6MB[®] activité au CNBr (Pharmacia Fine Chemicals) ont été lavés avec une solution d'HCl (1 molaire, 400 ml) et filtrés. Parallèlement, 63 mg (poids sec, contenant 25 mg d'oligomannoside) de glycopeptides provenant de la glycoprotéine II du haricot (exemple 2b) ont été dissous dans une solution-tampon NaHCO₃ (0,1 Molaire, pH 8,3) contenant du NaCl (0,5 Molaire). Le mélange de la solution glycopeptidique et du gel en suspension a été effectué en rotation lente pendant deux heures à

température ambiante. Des lavages successifs au tampon $\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$, à une solution d'éthanolamine (deux heures à température ambiante), à nouveau au tampon $\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$, avec une solution-tampon acétate (0,1 Molaire, pH 4,0) contenant du NaCl (0,5 Molaire) et finalement à nouveau au tampon $\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$, donnent accès au gel couplé aux glycopeptides. Le rendement de la réaction a été de 48% de fixation (basé sur le dosage du mannose).

Exemple 7:

Test de diagnostic pour l'identification de bactéries munies d'accepteurs spécifiques pour les structures des constituants actifs

a) Des bactéries sont mélangées avec des érythrocytes de cobaye pour un test d'hémagglutination, conformément à l'exemple 4. Parallèlement, on effectue un mélange similaire avec l'addition d'une solution d'un des produits biologiquement actifs (en concentration suffisante pour provoquer une inhibition complète, conformément au tableau I). Une lecture confirmant l'hémagglutination d'érythrocytes par la suspension bactérienne, ainsi que son inhibition par l'addition de l'un des constituants actifs, fournira la preuve que les bactéries possèdent des accepteurs spécifiques pour la structure de ce constituant.

b) Alternativement, un mélange d'une suspension bactérienne et du gel de Sepharose couplé aux glycopeptides (exemple 6) peut être effectué sur une plaque de microscope. Après 15 minutes d'incubation, l'analyse par microscopie optique révèle que si les bactéries possèdent les accepteurs spécifiques, elles couvrent les particules du gel, tandis que, dans le cas contraire, les mêmes particules ne fixent pas de bactéries.

Exemple 8:

Isolement de bactéries munies d'accepteurs spécifiques pour les structures des constituants actifs

Le gel de Sepharose couplé aux glycopeptides obtenu selon l'exemple 6 est chargé sur une colonne. Un mélange de bactéries est passé à travers cette colonne, les bactéries possédant des accepteurs spécifiques pour les glycopeptides couplés au gel étant retenues, tandis que les autres bactéries sont éluées directement. Après rinçage, un tampon contenant l'un des constituants actifs est utilisé pour éluer les bactéries munies des accepteurs spécifiques sous une forme pure.

Références

1. N. Firon, I. Ofek and N. Sharon, *Carbohydr. Res.* 120 (1983), 235-249.
2. M. Shemer, H.L. Creinin, R.E. McDonald and W.E. Irwin, *Cereal Chem.* 55 (1978), 383-391.
3. F. Yamauchi, M. Kawase, M. Kanbe and K. Shibasaki, *Agr. Biol. Chem.* 39 (1975), 873-878.
4. A. Pusztai and W.B. Watt, *Biochem. Biophys. Acta* 207 (1979), 413-431.
5. T. Tai, K. Yamashita, M. Ogata-Arakawa, N. Koide, T. Muramatsu, S. Iwashita, Y. Inoue and A. Kobata, *J. Biol. Chem.* 250 (1975), 8569-8575.
6. A. Tarentino, R.B. Trimble and F. Maley, *Methods in Enzymology* (V. Ginsburg, ed., Academic Press, New York), 50 (1978) 574-580.
7. J.R. Neeser and T.F. Schweizer, *Anal. Biochem.* (1984).