

ÉTUDES IMMUNOCHIMIQUES DE DEUX POLYSACCHARIDES EXTRAITS DE *Salmonella johannesburg* 5.58 SOUCHE SAUVAGE ET DE *Salmonella johannesburg* 5.58 CONVERTIE PAR LE PHAGE φ 1(40)*

ROBERT GIRARD ET ANNE-MARIE STAUB

Service des Antigènes Bactériens, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15
(France).

(Reçu le 5 avril 1974; accepté le 3 mai 1974)

ABSTRACT

Three antigenic determinants (40a, 40b, and 40c) have been found on the polysaccharide R⁻ of the wild type strain of *Salmonella johannesburg* 5.58. The immunodominant sugars are: 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose for 40a and 40b, and 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose for 40c. Most of the rabbits (5/7) synthesized antibodies (IgG) only against 40a and 40b. All these determinants are found on the same molecule of polysaccharide R⁻. Inhibition studies with oligosaccharides isolated from the polysaccharide R⁻ suggest that 40a is the hexasaccharide →4)-[D-GalNAc-(1→6)]-D-GalNAc-(1→3)-D-Man-(1→4)-D-Glc-(1→4)-[D-GalNAc-(1→6)]-D-GalNAc having (1→6)-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose residues as the immunodominant sugars for the determinant 40a. The 2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucose residue (the immunodominant sugar of 40c) also branches from the main polysaccharide chain. 2-Acetamido-2-deoxy-D-galactose, the immunodominant sugar of determinant 40b, occurs in Man-(1→4)-Glc-(1→4)-GalNAc, which is a part of the main chain.

Transformation by phage φ 1(40) gives polysaccharide R⁺, which contains α-D-glucose residues linked to C-6 of the 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose residues of determinant 40a. The α-D-glucose residues are the immunodominant sugar of a new determinant I_H. A second determinant appearing after transformation and specific to polysaccharide R⁺ (I₄₀) has 2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucose as the immunodominant sugar. Since no difference in the position nor in the linkage of 2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucose residues is found between R⁺ and R⁻, the specificity I₄₀ may result from an alteration of the conformation of antigenic determinant 40c after the addition of the α-D-glucose residues, and may be called "conformational determinant".

SOMMAIRE

L'étude des bases chimiques des spécificités 1 et 40 des polyosides extraits de *Salmonella johannesburg* 5.58 sauvage (40) et convertie (1,40) montre que la spécificité

*Dedicated to the memory of Professor W. Z. Hassid.

40b commune aux deux polyosides est portée par la chaîne principale et comporte le 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose comme sucre immunodominant. On a détecté en outre deux autres spécificités propres à la souche sauvage : les spécificités 40a, rattachées au résidu latéral de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose, et 40c rattachées au résidu latéral de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. La majorité des anticorps sont formés, chez tous les lapins, contre le facteur 40b présent sur la chaîne principale, dont la structure partielle correspond à Man-(1→4)-Glc-(1→4)-GalNAc ; certains lapins font en outre surtout des anticorps anti-40a, d'autres surtout des anticorps anti-40c. Ces trois spécificités se retrouvent toutes dans la molécule du polyoside R⁻. Des études d'inhibition à l'aide de différents oligosides isolés du polyoside R⁻ suggèrent que la spécificité 40c est due à l'hexaoside →4-[D-GalNAc-(1→6)]-D-GalNAc-(1→3)-D-Man-(1→4)-D-Glc-(1→4)-[D-GalNAc-(1→6)]-D-GalNAc.

La conversion par le phage φ 1(40), qui ajoute un résidu d'α-D-glucose en C-6 du résidu latéral de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose (polyoside R⁺), fait apparaître corrélativement deux spécificités nouvelles : une spécificité I_H, commune à d'autres *Salmonella* et reliée à une partie du nouveau dioside O-α-D-glucosyl-(1→6)-2-acétamido-2-désoxy-D-galactose, et une spécificité I₄₀ propre à *S. johannesburg* convertie. Cette nouvelle spécificité comporte le 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose comme sucre immunodominant, bien que la conversion ne modifie ni la position anomérique ni la liaison de ce sucre à la chaîne principale ; sa position spatiale doit pourtant être modifiée par suite de la nouvelle structure de la deuxième chaîne latérale. Nous proposons le terme « conformationnel » pour désigner ce type de déterminant antigénique polyosidique.

INTRODUCTION

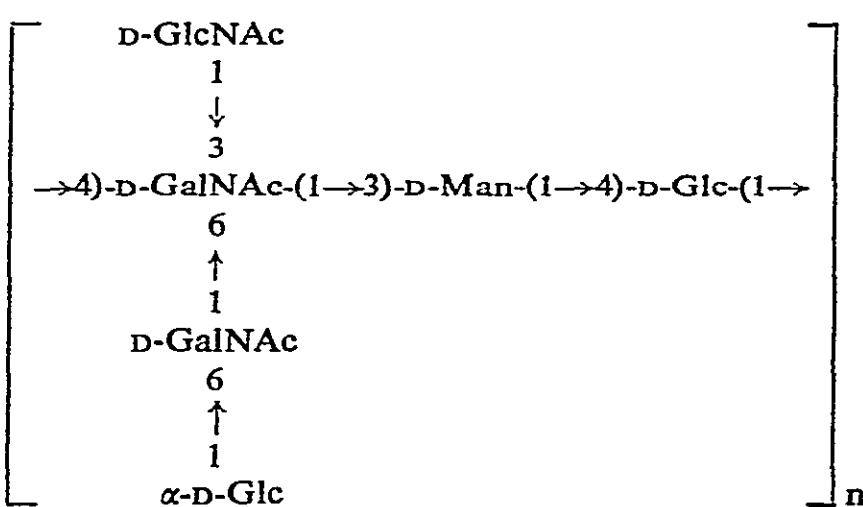
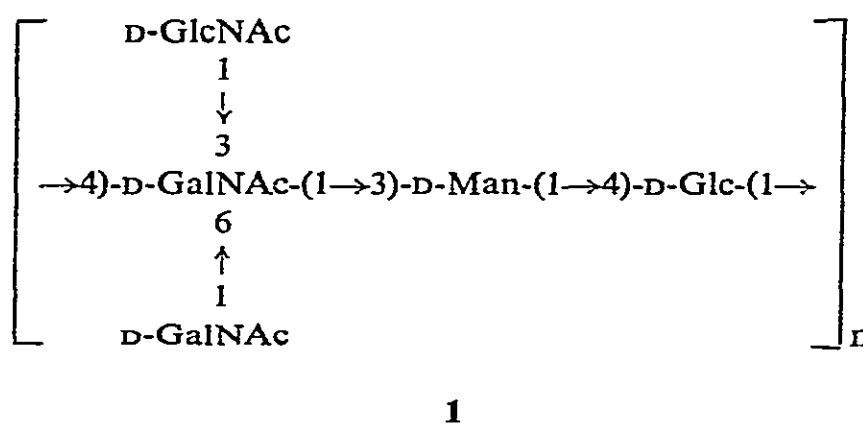
La paroi des *Salmonella* (*Enterobacteriaceae* à Gram-) est le support des antigènes O responsables, entre autre, de l'agglutination des germes par les sérumns antibactériens. Un catalogue de ces déterminants antigéniques est fourni par le tableau de Kauffman-White¹. C'est un composé macromoléculaire de nature lipopolysaccharidique (LPS), constituant important de la paroi des germes à Gram-, qui porte les déterminants O-antigéniques. Deux revues détaillées des travaux immunochimiques se rapportant à ces déterminants ont été publiées^{2,3}. Dans certains cas, il a été possible de relier les spécificités sérologiques à des structures définies des lipopolysaccharides. Ainsi le déterminant antigénique I correspond au dioside O-α-D-glucosyl-(1→6)-D-galactose dans les groupes B et E₄. En général, l'acquisition du facteur I s'accompagne de lysogénisation par un phage convertisseur. Dans les groupes A, B et D des *Salmonella* l'apparition du facteur I est liée à la conversion⁴ par le phage P 22. Dans les groupes G, R et T, le facteur I est lié à la présence des phages φ 1(37), φ 1(40) et φ 1(42) respectivement^{5,6}. Il faut toutefois signaler que dans le groupe E₄ la présence de prophage n'a pas été détectée.

Les études sérologiques des déterminants antigéniques I portés par des *Salmonella* appartenant à des groupes différents, réalisées en utilisant la technique de

saturation croisée des agglutinines⁶, ont révélé la complexité de ce déterminant désigné de façon unique dans le tableau de Kauffman-White. Ces déterminants 1 de chaque groupe contiennent une fraction propre à chaque groupe, une fraction commune à tous les groupes et une partie commune à plusieurs groupes. Parmi les déterminants 1 étudiés par Le Minor^{5,6}, celui qui apparaît sur *S. johannesburg* 5.58 (groupe R portant le déterminant antigénique 40) après conversion par le phage φ 1(40) donne une réaction croisée particulièrement faible avec le déterminant 1 des groupes A, B, D et E₄. Ainsi l'immunsérum anti-*S. typhimurium* (1, 4, 5, 12) agglutine au 1/3200 la suspension de *S. paratyphi* A (1, 2, 12), au 1/800 les suspensions de *S. senftenberg* (1, 3, 19), mais seulement au 1/200 les suspensions de *S. johannesburg* convertie (1, 40).

Puisque le facteur 1 commun à *S. senftenberg* et *S. typhimurium* est déjà limité au dioside *O*- α -D-glucosyl-(1 \rightarrow 6)-D-galactose⁷, il était probable que celui présent sur *S. johannesburg* était encore plus petit et que son étude permettrait de délimiter la taille minimum d'un site antigénique avec lequel peuvent réagir les anticorps de lapin. L'étude de ce dernier facteur 1(40) semblait donc particulièrement intéressante dans le cadre de l'immunochimie.

L'analyse chimique des polyosides portant les déterminants antigéniques O, extraits de *S. johannesburg* 5.58 souche sauvage (R⁻) et de *S. johannesburg* 5.58 souche convertie (R⁺) a permis de proposer⁸ les structures 1 et 2 pour R⁻ et R⁺, respectivement. On voit que les chaînes latérales de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose présentes



sur le polyoside R⁻ sont substituées en C-6 par un résidu d' α -D-glucose dans le polyoside R⁺. Ceci laissait déjà prévoir que le facteur 1, présent seulement sur R⁺, était limité dans ce groupe à la partie du dioside α -D-Glc-(1 \rightarrow 6)-D-GalNAc commun avec le dioside α -D-Glc-(1 \rightarrow 6)-D-Gal. Dans le présent travail, nous avons donc tenté de localiser sur ces structures chimiques les spécificités 1 et 40 déterminées par agglutination des bactéries correspondantes.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Matériel**. — L'obtention et la purification des polyosides R⁺ et R⁻ et des divers oligosides utilisés dans ce travail ont été décrites⁸. L'oligoside de synthèse O- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-galactose et le p-aminophénol-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranoside nous ont été aimablement fournis par le Pr. Sinaÿ. Les autres polyosides avaient été préparés antérieurement dans le service.

Les souches bactériennes appartiennent au groupe sérologique R du tableau de Kauffmann-White¹ et nous ont été fournies par le Service du Dr. Le Minor : *S. johannesburg* souche sauvage 5.58 portant le déterminant antigénique 40 (SJ 40), *S. johannesburg* souche 5.58 convertie par le phage φ 1(40) et portant les déterminants antigéniques 1 et 40 (SJ 1,40). La souche *S. johannesburg* 7.58 a fourni le phage de conversion φ 1(40); cette souche porte les déterminants antigéniques 1 et 40.

Les immunsérum de lapins et de chevaux ont été obtenus en injectant dans la veine des animaux des suspensions bactériennes de *S. johannesburg* tuées au préalable par un chauffage de 2 h à 100°. Les conditions d'injection (séries d'injections coupées par des périodes de 3 à 4 semaines de repos) ont été décrites en détail⁹.

Techniques immunochimiques. — La richesse de ces immunsérum en anticorps précipitants anti-O a été évaluée en utilisant la technique de précipitation en milieu liquide¹⁰. Les dosages des précipités spécifiques ont été effectués selon la méthode de Lowry¹¹. La diffusion double en cuve en milieu gélifié a été effectuée selon la méthode de Oudin^{12,13}.

RÉSULTATS

*Recherche des spécificités antigéniques établies par agglutination des *Salmonella* sur les polyosides R⁻ et R⁺*. — La réaction croisée obtenue entre l'immunsérum de lapin 603 (2^{ème} immunisation) anti-40 et le polyoside R⁺ (Fig. 1B) indique clairement qu'il existe un déterminant antigénique commun aux deux polyosides R⁺ et R⁻ et un déterminant antigénique 40 propre au polyoside R⁻. La réaction croisée correspond à environ 75% de la réaction homologue.

La réaction croisée obtenue entre l'immunsérum de lapin anti-1,40 et le polyoside R⁻ correspond à environ 70% de la réaction homologue (Fig. 1A). L'élimination

*Abréviations : SJ 40 = *Salmonella johannesburg* 5.58 portant la spécificité 40; SJ 1,40 = *Salmonella johannesburg* 5.58 convertie portant les spécificités 1 et 40; IS = immunsérum; IS^L ou IS^C = immunsérum de lapin ou de cheval; IS^{L603} = immunsérum prélevé sur le lapin 603; IS^{L603}₄₀ = immunsérum anti-SJ 40 prélevé sur le lapin 603; FPS R⁻ = polysaccharide extrait de SJ 40; FPS R⁺ = polysaccharide extrait de SJ 1,40; immunsérum anti-40 = anti-SJ 40, anti-1,40 = anti-SJ 1,40.

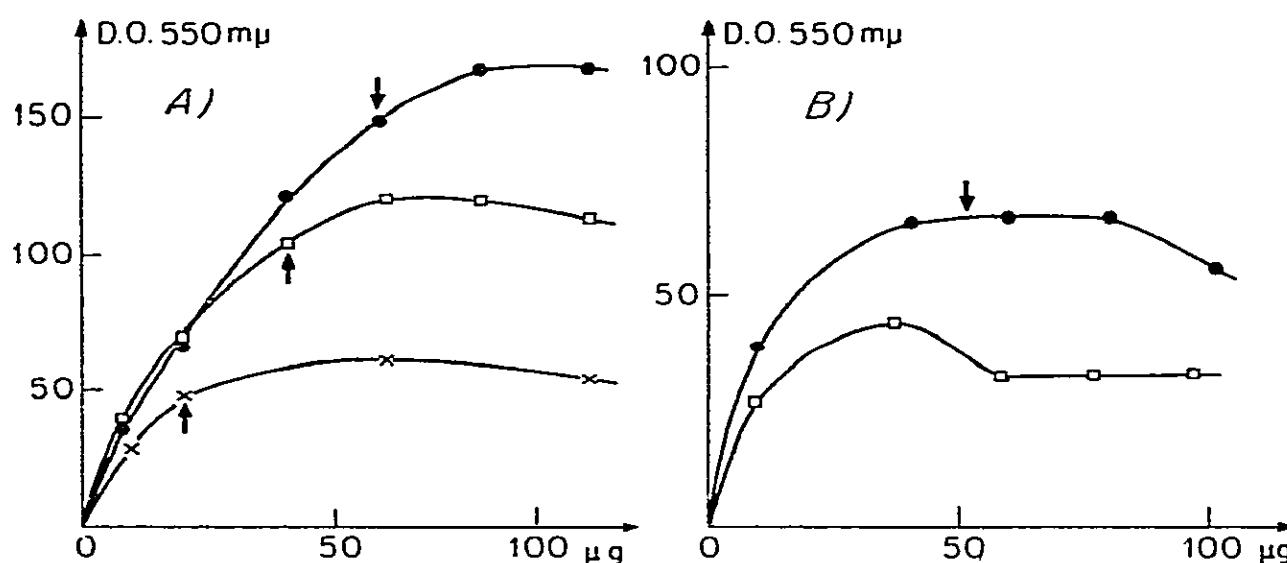


Fig. 1. Mise en évidence des facteurs propres à la souche sauvage et à la souche convertie sur les polyosides R^- et R^+ : A. Immunsérum de lapin anti-*S. johannesburg* 1,40 précipité par le polyoside R^+ (-●-●-●-) et par le polyoside R^- (-□-□-□-). Immunsérum de lapin anti-*S. johannesburg* 1,40 épousé en anticorps 40 par le polyoside R^- et précipité par le polyoside R^+ (-×-×-×-). B. Immunsérum de lapin anti-*S. johannesburg* 40 précipité par le polyoside R^- (-●-●-●-) et par le polyoside R^+ (-□-□-□-).

de ces anticorps (après précipitation de l'immunsérum par le polyoside R^-) laisse des anticorps qui ne réagissent plus avec le polyoside R^- , mais qui réagissent encore avec le polyoside R^+ . Ils sont donc dirigés contre les nouvelles structures propres au polyoside R^+ . Ces anticorps seront appelés anticorps anti-1₄₀ et l'immunsérum correspondant IS_{1₄₀}^L. Un hydrolysat partiel du FPS R^+ inhibe à 93 % la réaction de précipitation IS_{1₄₀}^L-FPS R^+ , alors que la même quantité d'un hydrolysat partiel du FPS R^- n'inhibe pas du tout cette réaction. Donc l'hydrolysat partiel du polyoside R^+ renferme les structures spécifiques du déterminant 1₄₀ qui sont absentes du polyoside R^- . L'immunsérum de cheval anti-1,40 donne également une réaction croisée très importante ($\approx 83,3\%$ de la réaction homologue) (Fig. 2). Les 17 % propres à la réaction homologue correspondent donc à l'intervention d'anticorps strictement adaptés aux déterminants antigéniques spécifiques du polyoside R^+ . Cet immunsérum de cheval anti-1,40 donne une réaction croisée de précipitation avec des polyosides extraits de *Salmonella* appartenant à d'autres groupes sérologiques et portant la spécificité antigénique 1 (Fig. 2 et Tableau I). Quantitativement, ces réactions hétérologues représentent environ 5 % de la réaction homologue. Donc 12 % (17 moins 5) des anticorps impliqués dans la réaction homologue correspondent aux déterminants antigéniques 1₄₀ et 5 % à des déterminants antigéniques que nous appellerons 1_H (1 hétérologue). L'immunsérum de lapin anti-1,40 ne précipite pas avec ces divers polyosides hétérologues alors qu'il agglutine *S. senftenberg* 1,3,19. Par contre, une réaction de précipitation a été obtenue avec le lipopolysaccharide de *S. senftenberg* 1,3,19. L'explication la plus simple de ces faits est d'admettre que le nombre de déterminants 1_H sur le polyoside 1,3,19 est trop faible pour entraîner la formation d'un réseau de précipitation, alors que sur le lipopolysaccharide (LPS) ce nombre est suffisant. La valence de l'antigène (nombre de déterminants antigéniques sur la molécule d'antigène) joue un rôle important dans la formation du réseau de précipitation

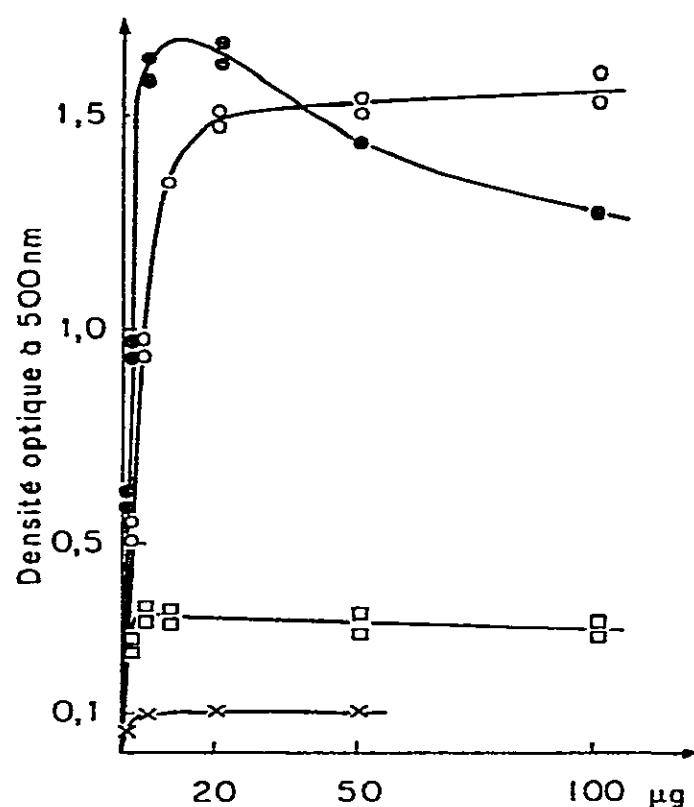


Fig. 2. Courbes de précipitation de l'immunsérum de cheval anti-*S. johannesburg* 1,40 avec différents polyosides : Précipitation par le polyoside R⁺ (-●-●-●-), par le polyoside R⁻ (40) (-○-○-○-), par le polyoside *S. senftenberg* (1,3,19) (-×-×-×-) et par le polyoside R⁺ après élimination des anticorps anti-40 précipités par R⁻ (-□-□-□-).

TABLEAU I

RÉACTIONS CROISÉES OBSERVÉES AVEC LE SÉRUM DE CHEVAL ANTI-*S. johannesburg* (1,40) ET DIVERS POLYOSIDES

Groupe sérologique	Polyoside	Azote (μg) dans les anticorps ^a
D ₁	<i>S. typhi</i> T ₂ (φ 27, P22) 1,27	3,0
A	<i>S. paratyphi</i> A 1,2,12	4,3
B	<i>S. bredeney</i> 1,4,12,27	6,0
E ₄	<i>S. senftenberg</i> 1,3,19	4,4
D ₃	<i>S. zuerich</i> 1,9,12,(46),27	4,0
G ₂	<i>S. durham</i> 1,13,23,36,37	+

^aPrécipités du sérum IS_{1,40}^{C702} (0,3 ml).

et dans la quantité d'anticorps précipités comme l'ont montré Atsumi *et al.*¹⁴ avec des antigènes artificiels.

En conclusion, on retrouve bien sur les polyosides les sites antigéniques correspondant aux spécificités 1 et 40 attribuées aux bactéries par les bactériologistes. Cette étude a permis en outre de subdiviser ces deux spécificités : le polyoside R⁻ porte un déterminant antigénique commun aux deux polyosides R⁺ et R⁻ que nous appellerons 40b et il possède en outre un déterminant antigénique 40a spécifique du polyoside R⁻. Le polyoside R⁺ porte, outre le déterminant 40b commun à R⁻ et à R⁺, deux déterminants antigéniques 1₄₀ et 1_H propres à ce polyoside.

Tentatives d'isolement des différents sites antigéniques sur des molécules distinctes.

— Les 4 spécificités dénombrées dans l'étude précédente peuvent être soit portées par la même molécule, soit par des molécules distinctes. L'étude des réactions de précipitation en milieu gélifié, par la technique de diffusion double en cuve à faces parallèles, a montré que les polyosides R^+ et R^- donnaient au moins deux lignes de précipitation (*cf.* Fig. 3 pour R^+) et possédaient donc au moins deux espèces moléculaires. Néanmoins, puisqu'on retrouve ces deux lignes aussi bien avec les anticorps 40 qu'avec les

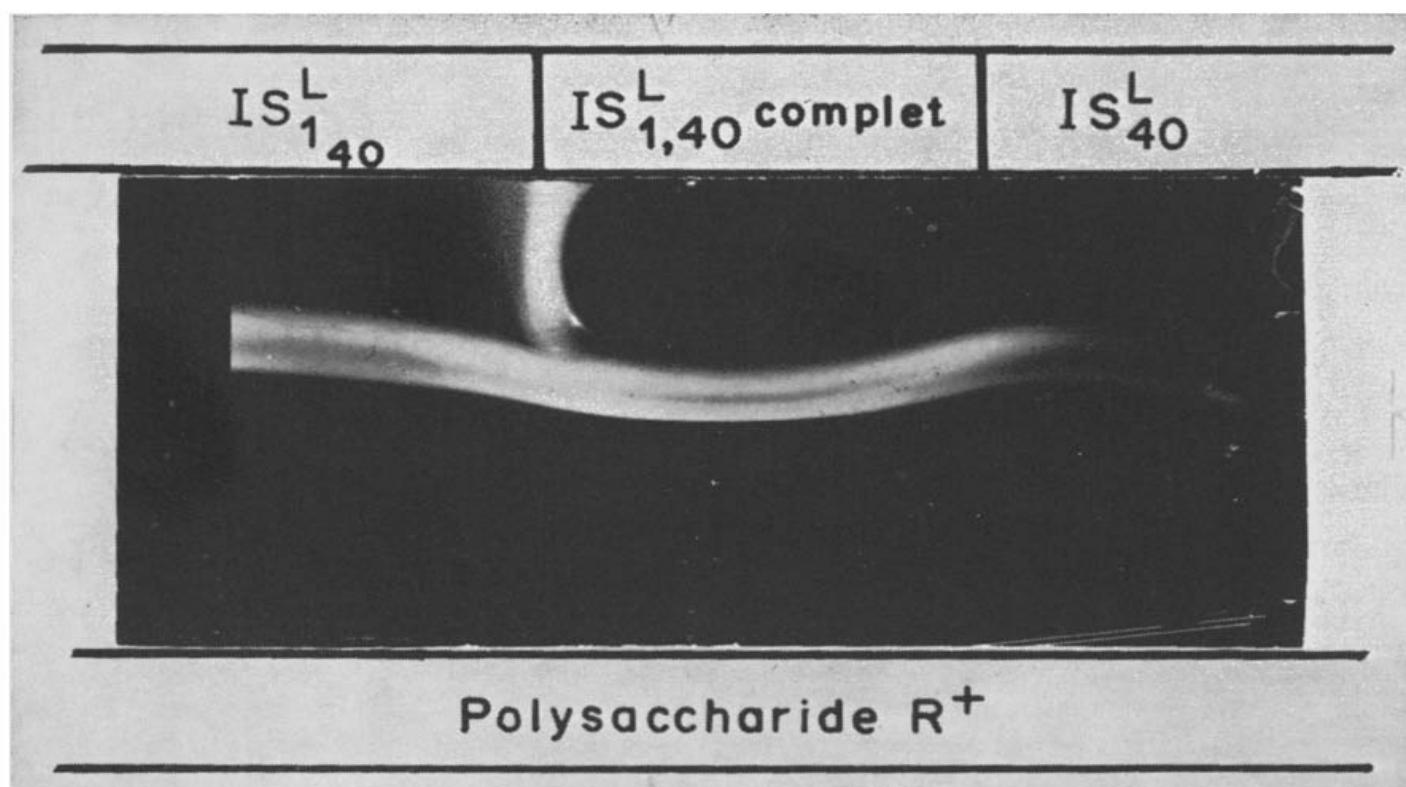


Fig. 3. Précipitation en cuve à faces parallèles de divers sérums par le polyoside R^+ (1,40) : $IS_{1,40}^L$ complet (sérum de lapin anti-1,40), IS_{40}^L (sérum de lapin anti-40) et $IS_{1,40}^L$ [sérum $IS_{1,40}^L$ épuisé par R^- (40)].

anticorps 1_{40} (propres au polyoside R^+), il n'est pas possible de distinguer des molécules porteuses ou non du facteur 1_{40} . Pour mieux les analyser, nous avons tenté de séparer ces différentes molécules par filtration sur Sephadex G200 et G100. Les polyosides R^+ et R^- sont des mélanges de molécules de poids différents pouvant être classées en 3 groupes principaux : Fractions 1 (p. mol. $\simeq 10^5$), 2 (p. mol. $\simeq 4 \cdot 10^4$), 3 (p. mol. $\simeq 3 \cdot 10^3$) pour le polyoside R^+ (Fig. 4); Fractions I (p. mol. $\simeq 10^5$), II (p. mol. $4\text{--}5 \cdot 10^3$), III (p. mol. $\simeq 10^3$) pour le polyoside R^- (Fig. 5).

La Fraction 1 du polyoside R^+ précipite les sérums anti-40, anti-1,40, anti- 1_{40} (anti-1,40 épuisé en anticorps précipitants 40), et, contrairement au polyoside original, elle précipite les sérums de lapin anti-*S. senftenberg* et anti-*S. paratyphi* A. La Fraction 2 précipite les anticorps 40 et 1_{40} mais ne précipite que très faiblement, ou pas du tout, les sérums hétérologues de lapin. Par contre, elle précipite les sérums de cheval hétérologues. Quant à la Fraction 3, elle ne précipite aucun sérum et n'inhibe que très peu la précipitation du sérum anti-1,40 par la Fraction 1 (10%) et 2 (30%). On peut

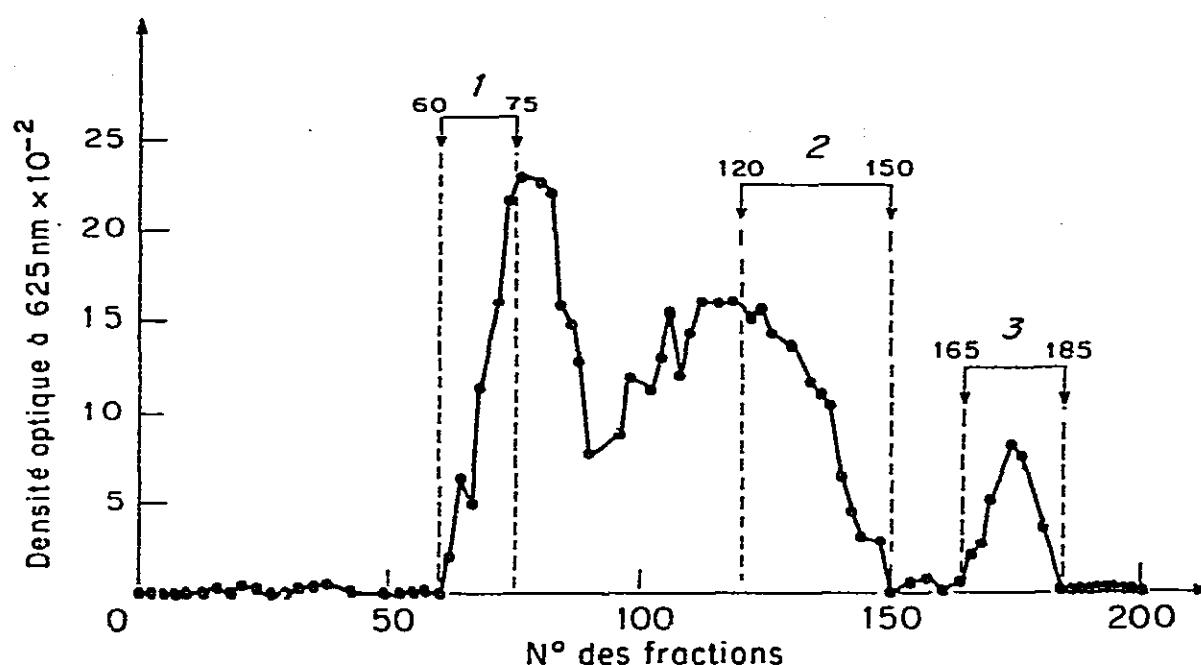


Fig. 4. Fractionnement du polyoside R^+ sur colonne (hauteur, 80,5 cm; diamètre, 2,5 cm) de Sephadex G 200 (40–120 μ), par élution avec de l'eau bidistillée renfermant de l'azide de sodium 0,02 % (p/v); volume des fractions recueillies : 2 ml; débit de la colonne : 1 ml en 12,5 min. En abscisses, résultats des dosages à l'anthrone²⁰ des sucres présents dans les tubes.

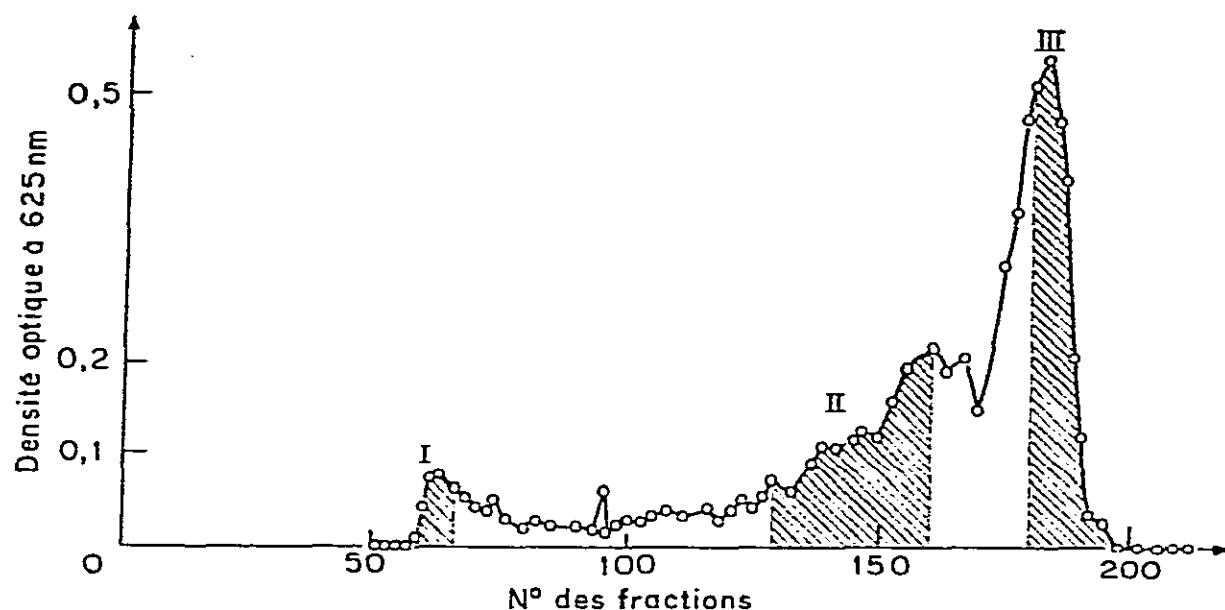


Fig. 5. Fractionnement du polyoside R^- sur colonne (hauteur, 80,5 cm; diamètre, 2,5 cm) de Sephadex G 100 (40–120 μ) par élution avec de l'eau bidistillée renfermant de l'azide de sodium 0,02 % (p/v); volume des fractions recueillies : 2 ml; débit de la colonne : 1 ml en 12,5 min. En abscisses, résultats des dosages à l'anthrone²⁰ des sucres présents dans les tubes.

donc conclure que les 3 sites 40b, 1₄₀ et 1_H sont présents sur les Fractions 1 et 2, bien que les derniers ne se trouvent qu'en très petit nombre sur la Fraction 2.

Seule la Fraction I (p. mol. $\simeq 10^5$) du polyoside R^- précipite un immunosérum de lapin anti-40, ainsi d'ailleurs que les sérums anti-1,40; elle ne précipite évidemment pas les sérums hétérologues anti-1. La Fraction II ne précipite que le sérum de cheval, elle inhibe à 100 % la réaction de précipitation de l'immunosérum de lapin anti-40 avec la Fraction I, alors que la Fraction III, n'inhibe qu'à 30 % cette même réaction.

TABLEAU II

PRÉCIPITATION DES DIVERS SÉRUMS PAR LES FRACTIONS OBTENUES APRÈS CHROMATOGRAPHIE DE R⁻ ET R⁺ SUR COLONNES DE SEPHADEX

Sérum	Polyoside R ⁺ original	Fractions du polyoside R ⁺			Polyoside R ⁻ original	Fractions du polyoside R ⁻		
		I	II	III		I	II	III
Lapin anti-40	+	+	+	-	+	+	-	-
Lapin anti-1,40	+	+	+	-	+	+	-	-
Lapin anti-1 ₄₀ ^a	+	+	+	-	-	-	-	-
Lapin anti- <i>S. senftenberg</i> (1,3,19)	-	+	-	-	-	-	-	-
Lapin anti- <i>S. paratyphi A</i> (1,2,12)	-	+	±	-				
Cheval anti-1,40	+	+	+		+	+	+	+
Cheval anti- <i>S. senftenberg</i>	+	+	+					
Cheval anti- <i>S. paratyphi A</i>	+	+	+					

^aSérum anti-1,40 épuisé en anticorps précipitants anti-40.

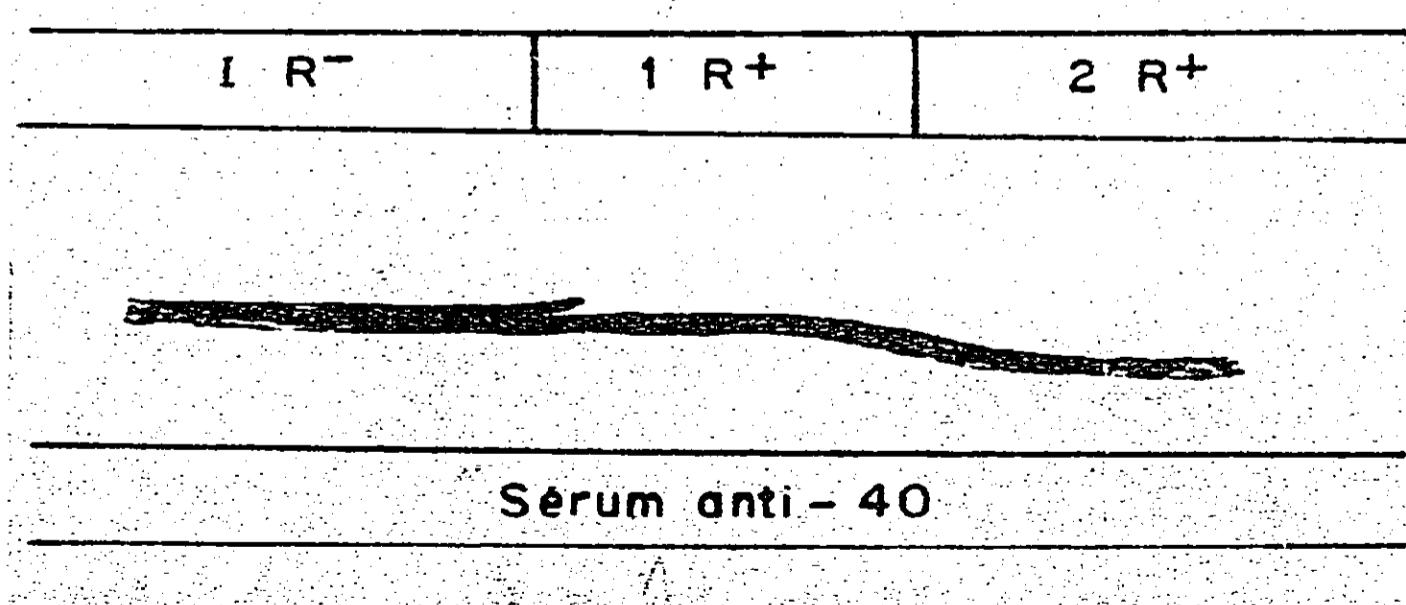


Fig. 6. Mise en évidence de la spécificité 40a (propre à R⁻) dans la Fraction I de R⁻ par double diffusion en cuve de Oudin. Concentration des fractions : I (R⁻) 50 µg/ml; 1 (R⁺) 100 µg/ml; 2 (R⁺) 107 µg/ml.

L'analyse des réactions de précipitation en milieu gélifié (Fig. 6) de l'immunsérum de lapin 603 anti-40 avec la Fraction I de R⁻ et les Fractions 1 et 2 de R⁺ indique l'existence du déterminant antigénique 40b commun sur ces 3 fractions et du déterminant antigénique 40a propre à R⁻ sur la Fraction I. Celui-ci est révélé par la présence de l'éperon à concavité tournée vers le compartiment contenant l'antigène.

En conclusion, il n'est plus possible de séparer les sites antigéniques 40a et 40b sur R⁻ que les déterminants 1₄₀, 1_H et 40b sur R⁺.

Localisation des déterminants antigéniques sur le polyoside R⁻. — L'étude de l'inhibition des réactions de précipitation des 7 immunséums de lapin anti-40 par le polyoside R⁻ au moyen des oses constitutifs du polyoside R⁻ a permis de montrer que, dans la plupart des cas (5 immunséums sur 7), le sucre immunodominant est le 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose. Dans un cas, le 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose est le sucre immunodominant (cas de l'IS₄₀^{L606}) et, dans un dernier cas, les deux N-acétylosamines sont immunodominantes et inhibent de façon semblable (environ 50%) la réaction de précipitation (Fig. 7).

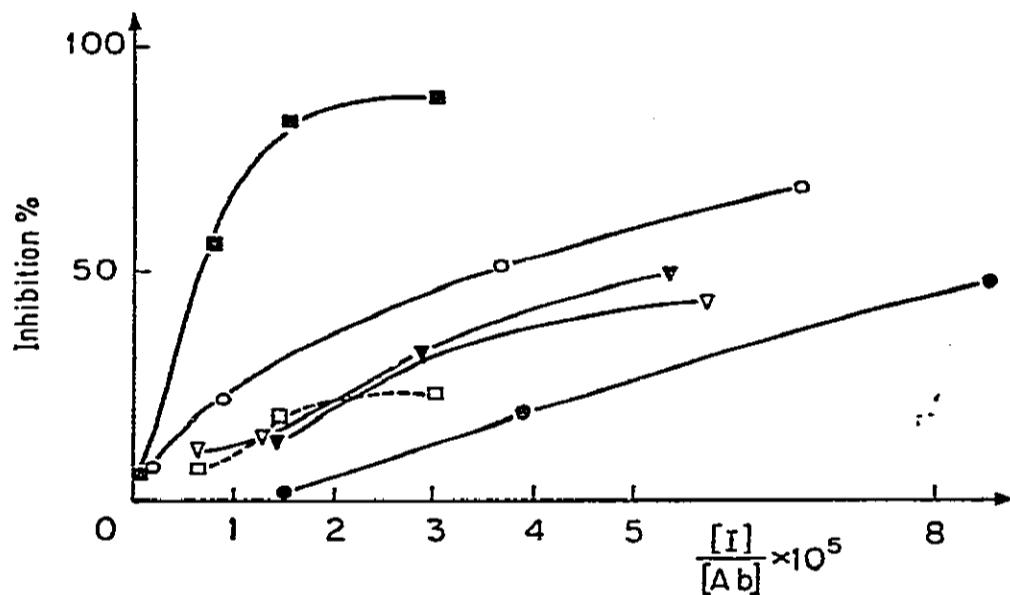


Fig. 7. Détermination du sucre immunodominant du polyoside R⁻ au moyen de divers séums de lapin anti-40. Inhibition de la précipitation par le polyoside R⁻ au moyen de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose et de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose : sérum 603, GalNAc (-■-■-■-), GlcNAc (-□-□-□-); sérum 616, GalNAc (-▼-▼-▼-), GlcNAc (-▽-▽-▽-); sérum 606, GalNAc (-●-●-●-), GlcNAc (-○-○-○-). I/Ab, µg d'inhibiteur par µg d'anticorps.

Dans l'étude des sites 40a, les anticorps de l'immunsérum de lapin 603 (anti-40) non précipités par la Fraction 1 de R⁺ et réagissant avec la Fraction I de R⁻ sont inhibés par le 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose. La très forte inhibition obtenue avec l'oligoside⁸ (A_{XII}¹)₂ (3) (0,3 µmole entraîne environ 80% d'inhibition) (Tableau III) peut faire admettre que ce déterminant 40a est constitué par la totalité ou par une fraction de cet oligoside. En comparant avec l'inhibition de 17% donnée par l'oligo-
side A_{XII}² (4) (Tableau III), il semblerait que l'apport de deux molécules de N-acétyl-
osamine (ou d'une seule) joue un rôle prépondérant dans la constitution même du
déterminant antigénique 40a. Au cours de l'immunisation prolongée du lapin 603,

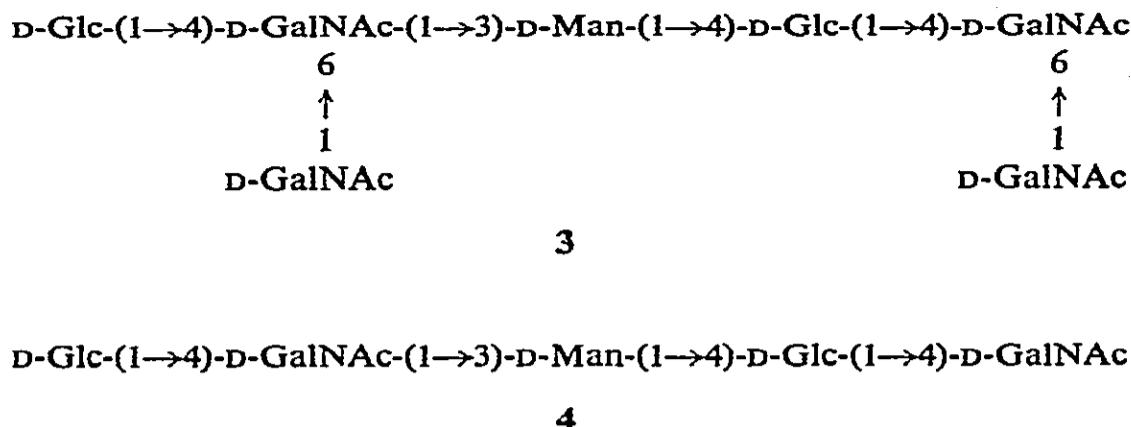


TABLEAU III

INHIBITION DE LA PRÉCIPITATION DES ANTICORPS ANTI-40 DE LAPIN PAR LES OLIGOSIDES EXTRAITS DU POLYOSIDE R⁻

<i>Oligoside</i>	<i>Structure</i>	<i>Inhibiteur/polyoside^a</i> (mole/mole)	<i>Inhibition (%)</i>
$(A_{XII}^1)_2$ (3)	D-Glc-(1→4)-[D-GalNAc-(1→6)]-D-GalNAc-(1→3)- D-Man-(1→4)-D-Glc-(1→4)-[D-GalNAc-(1→6)]- D-GalNAc	544	74
A_{XII}^2 (4)	D-Glc-(1→4)-D-GalNAc-(1→3)-D-Man-(1→4)-D-Glc-(1→4)-D-GalNAc	305	16,7
A_{XII}^3 (5)	D-GalNAc-(1→3)-D-Man-(1→4)-D-Glc-(1→4)-D-GalNAc	750	15,6
A_{VI}^2 (6)	D-Man-(1→4)-D-Glc-(1→4)-D-GalNAc	1020	10
A_{III}^5 (7)	D-Glc-(1→4)-[D-GlcNAc-(1→3)]-D-GalNAc	1960	3,6

^aLe poids moléculaire du polyoside a été fixé arbitrairement à $4 \cdot 10^4$.

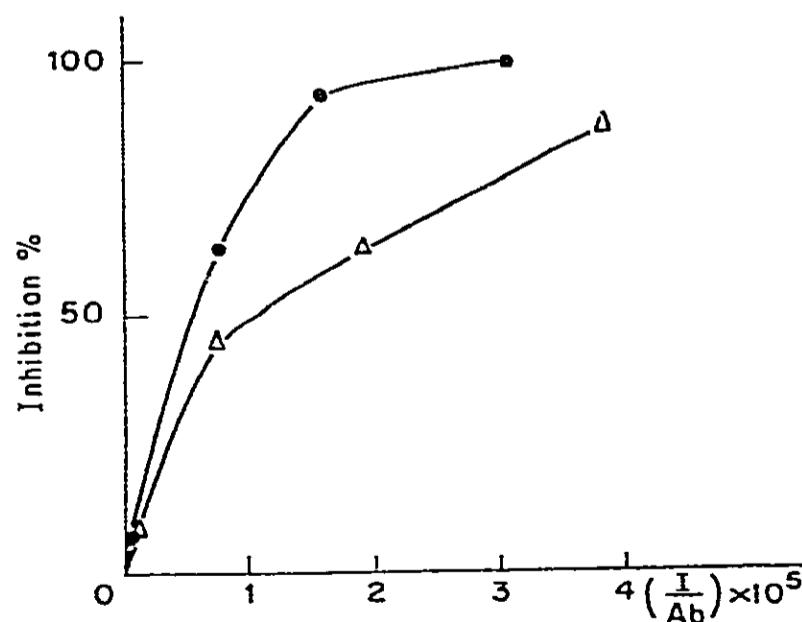
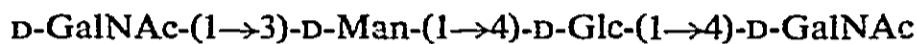


Fig. 8. Inhibition de la réaction de précipitation par le polyoside du sérum de lapin 603 anti-40, au moyen de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose en fonction du temps d'immunisation : saignées pratiquées chez le lapin le 20.3.1970 (-●-●-●-) et le 15.9.1969 (-Δ-Δ-Δ-); I/Ab, µg d'inhibiteur par µg d'anticorps.

le 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose reste le sucre immunodominant du site propre au polyoside R⁻ et l'on observe une augmentation de la pente des courbes d'inhibition par cet ose (Fig. 8), ce qui peut traduire une augmentation de l'affinité du site anticorps pour ce sucre.

Dans l'étude des sites 40b, l'inhibition de la précipitation du sérum IS^{L603}₄₀ par la Fraction 1 de R⁺ montre que le 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose est encore le sucre immunodominant. La Fraction III de R⁻ inhibe à 100% cette réaction hétérologue alors qu'elle n'inhibe qu'à 30% la réaction homologue. Cette Fraction III de R⁻ possède donc les déterminants antigéniques correspondant aux sites 40b spécifiques de la population d'anticorps anti-40 capables de réagir avec la Fraction 1 de R⁺. Le trioside A²_{VI} (6) inhibe à 49-50% cette réaction hétérologue, alors que ce même trioside n'inhibe qu'à 10% la réaction homologue (Tableau III). On peut donc penser que les anticorps anti-40b croisant avec la Fraction 1 de R⁺ réagissent au niveau d'une structure osidique appartenant à l'axe polyosidique. Les déterminants



5



6

antigéniques 40b communs aux deux polyosides R⁺ et R⁻ seraient constitués d'une partie de cet axe comprenant au moins le trioside D-Man-(1→4)-D-Glc-(1→4)-D-GalNAc dont le 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose joue le rôle de sucre immunodominant, puisque ce sucre inhibe moins bien que le trioside mais mieux que les deux autres sucres.

Le déterminant antigénique ayant le 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose comme sucre immunodominant sera appelé 40c. La meilleure inhibition obtenue avec le *p*-aminophénol-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranoside est en faveur de la forme anomérique β de ce sucre immunodominant sur le polyoside R⁻. Il aurait été intéressant de connaître le pouvoir inhibiteur de l'oligoside A⁵_{III} (7) vis-à-vis de



7

l'immunsérum de lapin ayant répondu préférentiellement au 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. Ayant à notre disposition une quantité trop faible de cet oligoside pour effectuer cette étude, pour le moment notre connaissance du site 40c se résume à la nature de son ose immunodominant.

Localisation des déterminants antigéniques sur le polyoside R⁺. — Dans l'étude du site 1₄₀, les inhibitions par les oses constitutifs du polyoside R⁺ des systèmes précipitants IS^L_{1₄₀}-polyoside R⁺ et IS^{C702}_{1₄₀}-polyoside R⁺ montrent que le 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose sous la forme anomérique β est le meilleur inhibiteur, donc le sucre immunodominant. Dans le cas de l'immunsérum de cheval, le D-glucose et le 2-acé-

tamido-2-désoxy-D-glucose inhibent à peu près également (40 et 50%), et la courbe d'inhibition obtenue avec un mélange de ces deux oses dans les proportions molaires 1:1 (\approx 90% d'inhibition) laisse penser que ces deux oses appartiennent à deux sites antigéniques distincts. Les essais d'inhibition à l'aide d'oligosides extraits du polyoside R⁺ sont rapportés dans le Tableau IV. L'oligoside (a₅¹)₂ (8) (p. mol. 1316) inhibe à 100% la précipitation des anticorps de lapin anti-R⁺. On peut donc penser que cet oligoside entre, dans sa totalité ou en partie, dans la constitution du déterminant 1₄₀.

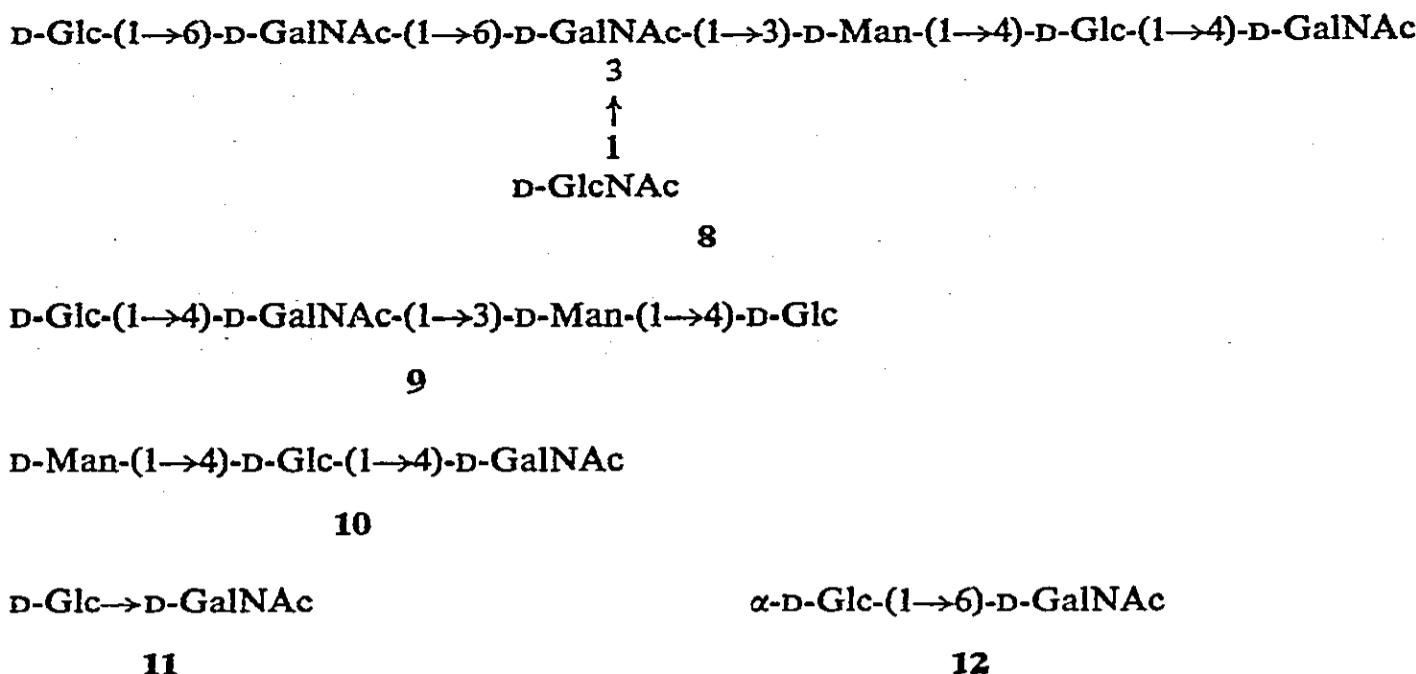
TABLEAU IV

INHIBITION DE LA PRÉCIPITATION DES ANTICORPS ANTI-1₄₀ DE LAPIN PAR DES OLIGOSIDES EXTRAITS DU POLYOSIDE R⁺

Oligoside	Structure	Inhibiteur/polyoside ^a (mole/mole)	Inhibition (%)
(a ₅ ¹) ₂ (8)	D-Glc-(1 \rightarrow 6)-D-GalNAc-(1 \rightarrow 6)-[D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)]-D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)-D-Man-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-(1 \rightarrow 4)-D-GalNAc	800	78
		1600	100
a ₅ ² (9)	D-Glc-(1 \rightarrow 4)-D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)-D-Man-(1 \rightarrow 4)-D-Glc	750	16-17
a ₅ ³ = a ₄ ² (10)	D-Man-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-(1 \rightarrow 4)-D-GalNAc	1000	5-6
a ₂ ³ (12)	α -D-Glc-(1 \rightarrow 6)-D-GalNAc	200	0
		1000	0
		1000	0
Hydrolysat partiel de FPS R ⁺		b	93
Hydrolysat partiel de FPS R ⁻		b	<5

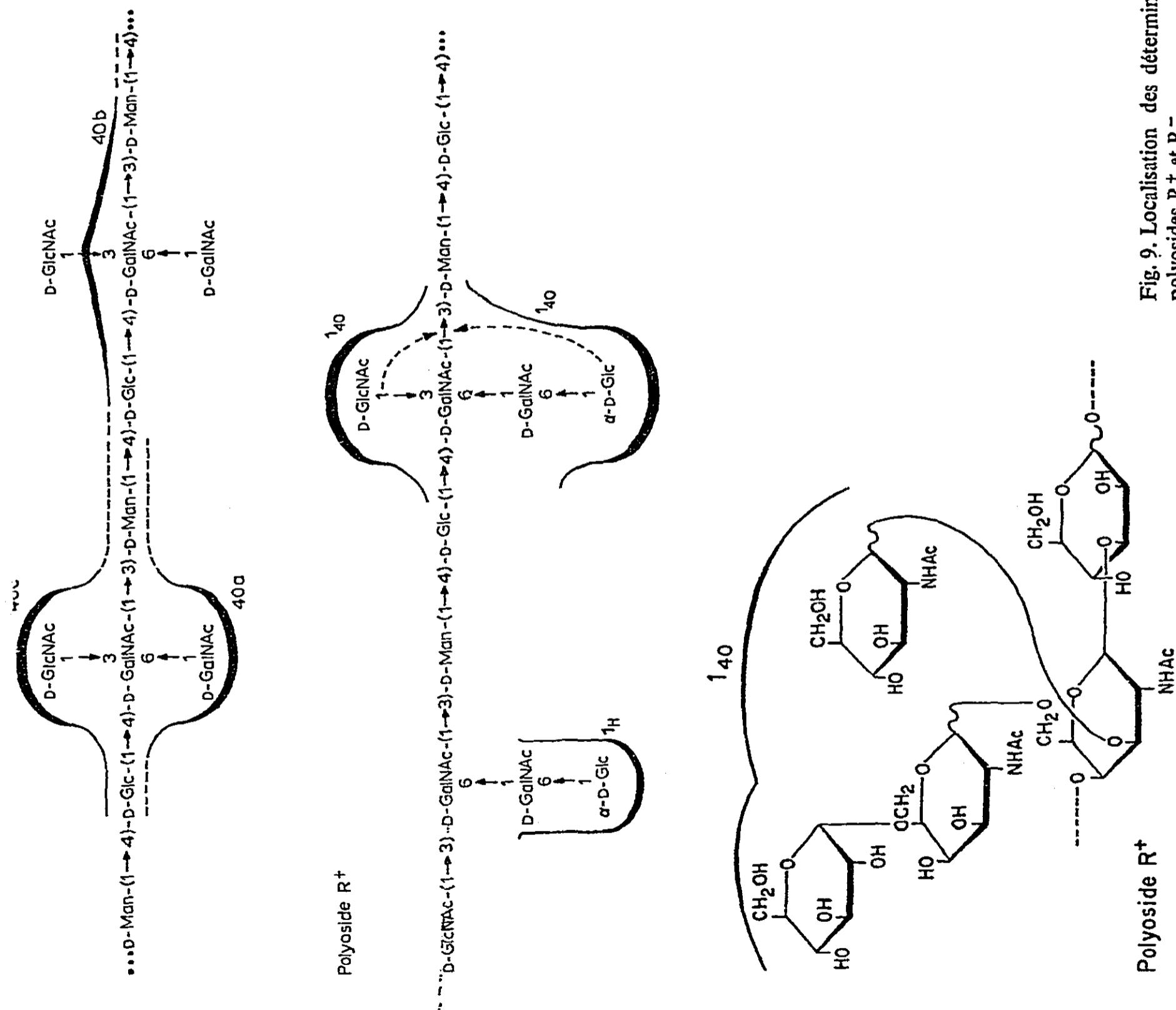
^aLe poids moléculaire du polyoside a été fixé arbitrairement à $4 \cdot 10^4$. ^bQuantité utilisée : $\approx 11,0$ mg.

Dans l'étude du site 1_H, l'inhibition, par les oses constitutifs du polysaccharide R⁺, des systèmes précipitants hétérologues IS_{1₄₀}^{C702}-polyoside 1,3,19, IS_{1,40}^L-lipopolysaccharide 1,3,19 et IS_{1,2,12}^L-Fraction 1 de R⁺ montre que le sucre immuno-dominant dans les trois cas est l' α -D-glucose. Les immunsérum de cheval et de lapin renferment donc une très petite population d'anticorps (\approx 5% de la population totale) capables de réagir avec des extrémités de chaînes latérales α -D-Glc-(1 \rightarrow qui sont aussi présentes sur le polyoside *S. senftenberg* 1,3,19 et le polyoside *S. paratyphi* A 1,2,12. Le dioside a₂³ (12) inhibe à 70-80% cette réaction hétérologue alors que la même quantité de méthyl- α -D-glucopyranoside donne 12 à 13% d'inhibition. On peut donc penser que ces anticorps sont adaptés à une fraction du dioside 12. La région du substituant N-acétyle au niveau de C-2 ne doit certainement pas intervenir, car, d'une part, le polyoside *S. senftenberg* ne possède pas de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose dans ses chaînes O-spécifiques, et d'autre part l'inhibition obtenue avec le dioside α -D-Glc-(1 \rightarrow 6)-D-Gal est semblable à celle obtenue avec le dioside 12.



DISCUSSION

Les études immunochimiques effectuées sur les deux polyosides extraits de *S. johannesburg* sauvage (R^-) et de *S. johannesburg* convertie (R^+) ont conduit à identifier les déterminants antigéniques suivants : 40a, 40b et 40c sur R^- ; 1₄₀, 40b et 1_H sur R^+ . L'ose immunodominant est le résidu latéral de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose pour 40a, le résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose de l'axe osidique pour 40b, le résidu de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose pour 40c et 1₄₀ et le résidu latéral d' α -D-glucose pour 1_H (Fig. 9). Dans le cas des sites antigéniques propres au polyoside R^- (40a, 40c), les deux osamines, 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose et 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose peuvent jouer, plus ou moins fortement, suivant l'individu, le rôle de sucre immunodominant dans les systèmes précipitants homologues. L'emplacement de ces deux *N*-acétylosamines à l'extrémité de deux chaînes latérales sur le polyoside R^- (Fig. 9) est en parfait accord avec ces faits immunologiques. Il semble donc que les individus ne reconnaissent pas tous, et de la même façon, à la surface d'une macromolécule antigénique tous les déterminants antigéniques constituant le motif antigénique. Cette situation rappelle les expériences de Sela et collaborateurs¹⁵ faites avec des souris immunisées et des polypeptides de synthèse, où ils montrent l'existence de souches répondeuses à tel déterminant polypeptidique et d'autres souches répondeuses à d'autres déterminants portés par la même molécule. Seules des expériences de croisement entre lapins répondeurs à la galactosamine et lapins répondeurs à la glucosamine pourraient permettre de conclure à l'existence d'un contrôle génétique sur la reconnaissance de ces deux déterminants antigéniques portés par le même oligoside. L'augmentation au cours du temps d'immunisation du pouvoir inhibiteur du 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose vis-à-vis des anticorps anti-40a peut correspondre à une biosynthèse d'anticorps anti-40a dont le site est dirigé contre une région de plus en plus restreinte du déterminant 40a. Benjamini *et al.*^{16,17} travaillant avec une protéine capsidale du virus de la mosaïque du tabac ont trouvé que tous les lapins immunisés par cette protéine (TMVP) ont répondu contre un déter-



minant antigénique de cette molécule correspondant à l'eicosapeptide 93–112. Ils ont montré que les anticorps synthétisés par un lapin au cours de l'immunisation s'adaptaient à des régions de plus en plus restreintes de cet eicosapeptide. Dans l'étude du système anti-*S. johannesburg*, il est curieux de constater que la majorité (70 à 80 %) des anticorps présents dans les sérum de lapin et de cheval que nous avons étudiés correspondent au motif 40b, commun aux polyosides R⁻ et R⁺, porté par la chaîne principale et non aux motifs portés par les chaînes latérales des deux polyosides.

Dans le cas des déterminants antigéniques propres au polyoside R⁺, le déterminant antigénique 1_H apparaissant ici après conversion de *S. johannesburg* et détecté par des réactions hétérologues correspond à une partie du dioside α -D-Glc-(1→6)-D-GalNAc (**12**) qui apparaît sur le polyoside R⁻ après lysogénisation par le phage φ 1(40). Cette situation rappelle celle trouvée dans d'autres systèmes avec d'autres phages convertisseurs qui font apparaître une chaîne latérale de glucose nouvelle, greffée sur le polyoside de la souche sauvage³. Toutefois, dans ce cas, la réaction hétérologue, découverte par agglutination des bactéries, ne peut être mise en évidence par précipitation qu'au moyen de grosses molécules (Fraction 1 du polyoside R⁺, lipopolyoside *S. senftenberg*). Ceci laisse supposer que bien que tous les résidus latéraux de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose de R⁺ soient substitués par un résidu de D-glucose terminal (comme l'indique l'analyse chimique⁸), une toute petite fraction seulement des chaînes latérales α -D-Glc-(1→6)-D-GalNAc sont accessibles aux anticorps anti-1_H. On peut donc penser que seuls interviennent les motifs présents aux extrémités nonréductrices des chaînes O-spécifiques, les autres résidus d' α -D-glucose n'étant pas « disponibles » pour cette réaction du fait de leur emplacement interne sur les chaînes. Le fait que le déterminant antigénique 1_H ne correspond qu'à la partie du dioside α -D-Glc-(1→6)-D-GalNAc (**12**) qui est semblable au dioside α -D-Glc-(1→6)-D-Gal montre qu'il existe chez le lapin des anticorps dont le site spécifique est adapté à un site antigénique plus petit qu'un dioside. Ceci confirme les résultats obtenus avec un sucre acétylé lié à une protéine : contrairement à l'antigène préparé avec le sucre non acétylé, cet antigène provoque chez le lapin la production d'anticorps capables de réagir avec un polysaccharide portant ce sucre acétylé sur une chaîne latérale¹⁸.

Le fait que le 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose soit l'ose immunodominant du facteur 1₄₀, apparaissant après la conversion phagique, est en faveur d'une position spatiale de cette N-acétyl-osamine sur le polyoside R⁺ différente de celle qu'elle occupait sur le polyoside R⁻. En effet, dans les deux polyosides, cette osamine possède une configuration anomérique β et est liée à C-3 du 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose de l'axe polyosidique. Si donc l'environnement spatial du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose était le même dans les deux polyosides, l'épuisement de l'immunsérum de lapin anti-1,40 par le polyoside R⁻ devrait enlever tous les anticorps dont le site spécifique est dirigé contre cette osamine. Or, après épuisement, on retrouve dans l'IS_{1,40}^L une population d'anticorps dont le site spécifique est dirigé contre le 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose. Cette nouvelle position du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose dans l'espace avait déjà été envisagée⁸ à l'issue de l'analyse chimique des

polyosides R⁺ et R⁻ pour expliquer la difficulté à oxyder les résidus de 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyles de R⁺ contrairement à ceux de R⁻. Il se pourrait que les deux oses, α -D-glucose et 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucose, appartenant à des chaînes latérales, interviennent dans la constitution du site 1₄₀ (*cf.* schéma de la Fig. 9). Ceci rappellerait la spécificité Le^b des groupes sanguins qui est rapportée à la proximité de deux chaînes latérales de L-fucose¹⁹. Mais on peut également penser que le greffage d'un résidu d' α -D-glucose sur la chaîne latérale de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose entraîne seulement un déplacement spatial du 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose qui devient, seul, l'ose immunodominant du déterminant 1₄₀. Aucun autre changement (type de liaison, position anomérique des sucres) n'a pu en effet être détecté jusqu'à présent entre R⁻ et R⁺ qui pourrait expliquer un changement dans la position spatiale de ce résidu de 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyle^{8,9}. Dans ce système, la spécificité 1₄₀ apparue après lysogénisation par le phage φ 1(40) ne se rattache à aucun des types de modification survenant lors des phénomènes de conversion analysés jusqu'à présent³. Cette spécificité 1₄₀ semble résulter d'un changement de la conformation stérique d'un site antigénique (ici 40c) à la suite d'une modification chimique survenant au niveau d'un autre site antigénique (ici 40a). Ce type de déterminant antigénique rattaché à une structure spatiale, peu fréquent chez les polyosides, rappelle les déterminants « conformationnels » rencontrés très souvent chez les protéines et quelques gros polypeptides, que Sela et collaborateurs²¹ opposent aux déterminants « séquentiels » dont la spécificité dépend uniquement de la structure primaire de la molécule (polyoside ou polypeptide). L'apparition du nouveau site 1₄₀ rappellerait donc ce que Faust et Tengerdy²² ont observé avec l'ovotransferrine sur laquelle la liaison avec le fer fait apparaître de nouveaux déterminants antigéniques par suite d'un changement de conformation de la protéine, qui devient plus compacte, bien que sa structure primaire soit la même que celle de la protéine dépourvue de fer.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été en partie subventionné par des crédits du C.N.R.S. (ERA 223). Nous remercions le Professeur P. Sinaÿ pour le dioside et le *p*-aminophényl-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranoside, et tout particulièrement M^{me} E. Duflot dont l'aide technique a été très précieuse pour la réalisation de ce travail.

RÉFÉRENCES

- 1 F. KAUFFMANN, *Die Bakteriologie der Salmonella species*, Munksgaard, Copenhague, 1961.
- 2 O. LÜDERITZ, A. M. STAUB ET O. WESTPHAL, *Bact. Rev.*, 30 (1966) 192-255.
- 3 O. LÜDERITZ, O. WESTPHAL, A.-M. STAUB ET H. NIKAIDO, dans *Bacterial Endotoxins (Microbial Toxins)*, Vol. 4, Academic Press, New-York, 1971, pp. 145-233.
- 4 S. ISEKI ET T. SAKAI, *Proc. Jap. Acad.*, 31 (1955) 558-563.
- 5 L. LE MINOR, H. W. ACKERMANN ET P. NICOLLE, *Ann. Inst. Pasteur*, 104 (1963) 469-476.
- 6 L. LE MINOR, *Ann. Inst. Pasteur*, 105 (1963) 879-896.
- 7 A.-M. STAUB ET R. GIRARD, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 1245-1268.
- 8 R. GIRARD ET A.-M. STAUB, *Carbohydr. Res.*, 24 (1972) 457-478.
- 9 R. GIRARD, *Thèse de Doctorat d'Etat*, Université de Paris, 1973.

- 10 E. A. KABAT ET M. M. MAYER, *Experimental Immunochemistry*, Charles C. Thomas, Springfield (U. S. A.), 2ème édition, 1961, pp. 22-96.
- 11 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275.
- 12 J. OUDIN, *C. R. Acad. Sci., Paris*, 222 (1946) 115-116.
- 13 J. OUDIN, *Ann. Inst. Pasteur*, 89 (1955) 531-555.
- 14 T. ATSUMI, K. NISHIDA, Y. KINOSHITA ET Y. HORIUCHI, *Immunochemistry*, 8 (1971) 271-279.
- 15 E. MOZES, H. O. McDEVITT, J. C. JATON ET M. SELA, *J. Exp. Med.*, 130 (1969) 1263-1278.
- 16 E. BENJAMINI, M. SHIMIZU, J. D. YOUNG ET C. Y. LEUNG, *Biochemistry*, 7 (1968) 1253-1260.
- 17 E. BENJAMINI, M. SHIMIZU, J. D. YOUNG ET C. Y. LEUNG, *Biochemistry*, 8 (1969) 2242-2246.
- 18 K. STELLNER, O. LÜDERITZ, O. WESTPHAL, A.-M. STAUB, B. LELUC, C. COYNAULT ET L. LE MINOR, *Ann. Inst. Pasteur*, 123 (1972) 43-54.
- 19 A. M. S. MARR, A. S. R. DONALD, W. M. WATKINS ET W. T. J. MORGAN, *Nature*, 215 (1967) 1345-1349.
- 20 R. SHIELDS ET W. BURNETT, *Anal. Chem.*, 32 (1960) 885-886.
- 21 A. CONWAY-JACOBS, B. SCHECHTER ET M. SELA, *Eur. J. Biochem.*, 20 (1971) 325-329.
- 22 C. H. FAUST, JR ET R. P. TENDERDY, *Immunochemistry*, 8 (1971) 211-223.