

COMPLEXE ACIDE TÉICHOIQUE-MUCOPEPTIDE DES PAROIS CELLULAIRES DE *BACILLUS MEGATERIUM* KM

J. M. GHUYSEN

Université de Liège, Service de Bactériologie, Liège (Belgique)

(Reçu le 25 novembre 1960)

SUMMARY

Teichoic acid-mucopeptide complex of cell walls of Bacillus megaterium KM

Walls of a batch of *Bacillus megaterium* KM contain a polyol phosphate compound which, in contrast with BADDILEY's teichoic acids, is not extracted by cold trichloroacetic acid.

It has been isolated by paper electrophoresis from the non-dialysable fraction obtained after incubation of the walls by lysozyme.

Owing to the chemical analysis, it is associated with mucopeptide residues and the whole complex represents 40 %, dry weight, of the walls.

The degradation of this complex by two *Streptomyces* enzymes enables the identification of three fragments: a teichoic fragment of polyol phosphate, glucose and N-acetylglucosamine; a mucopeptide fragment of amino acids and N-acetylmuramic acid; a disaccharide fragment 6-O- β -N-acetylglucosaminyl-N-acetyl-muramic acid. It is believed that the latter represents an unit of a poly-N-acetylhexosamine backbone of the basal mucopeptide of the wall.

The teichoic fragment is liberated from the whole complex under the action of both *Streptomyces* enzymic preparations F1 or F2B. It can also be obtained by incubating directly the walls with each of those preparations. The disaccharide fragment is liberated under the action of the F2B amidase.

Approx. 6 %, dry weight, of the walls consist of glucose (probably a polyglucose) non associated with the teichoic acid-mucopeptide complex.

N-acetylmuramic acid and various oligosaccharides consisting of N-acetylglucosamine alone or of both N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid, give, on paper, a pink coloration with the diphenylamine-trichloroacetic reagent which allows them to be distinguished from N-acetylglucosamine.

INTRODUCTION

Les acides téichoïques que BADDILEY *et al.*¹ ont isolés à partir d'extraits trichloroacétiques des parois cellulaires de *Lactobacillus arabinosus*, de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* sont des polymères de phosphates de polyol dont certaines fonctions hydroxyles sont condensées avec une molécule de glucose ou une molécule de N-acetylglucosamine, elles-mêmes associées à un résidu D-alanyle par une liaison α -amino ester. L'acide téichoïque extrait des parois de *B. subtilis* a été plus parti-

culièrement étudié². Il est constitué d'une chaîne de neuf unités D-alanyle-4-O- β -D-gluco-pyranosyle-D-ribitol-5-phosphate.

Ces acides téichoïques extraits par l'acide trichloracétique froid seraient associés au reste de la paroi bactérienne par des liaisons ioniques. Cependant, la quantité d'acide téichoïque extraite est toujours inférieure à celle prévue par le contenu en phosphore des parois. Selon les bactéries examinées et les conditions dans lesquelles celles-ci ont été cultivées, le rendement de l'extraction varie de 0 à 80 %. Ainsi, ARMSTRONG *et al.*² ont observé que l'extrait trichloracétique des cellules de *B. subtilis* cultivées en présence de quantité assez élevée de glucose (2 %) (au lieu de peptone-NaCl) ne contient pas d'acide téichoïque.

De même, il a été observé que la totalité des acides téichoïques d'une préparation de parois cellulaires de *Bacillus megaterium* KM résiste à l'extraction par une solution d'acide trichloracétique à 10 % (0°). La présente recherche a eu pour objet la constitution de ces acides téichoïques et la façon dont ils s'intègrent dans la structure des parois. Elle a consisté dans la séparation et l'analyse d'un certain nombre de produits de dégradation, obtenus par l'hydrolyse partielle, enzymatique et chimique, des parois de *B. megaterium* KM.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Parois cellulaires

B. megaterium KM a été cultivé en milieu peptoné 5 %, à 25°, avec aération forcée. Les parois ont été préparées par le procédé de SALTON ET HORNE³.

Enzymes

Outre le lysozyme du blanc d'oeuf (Armour), deux autres préparations enzymatiques – F1 et F2B – obtenues par fractionnement du filtrat de culture d'un *Streptomyces*⁴⁻⁸ ont été utilisées. Les conditions d'incubation à 37° ont été: Enzyme/Substrat = 0.01 pour F1 et le lysozyme; 0.02 pour F2B; tampon acétate ammonique, 0.05 M pour F1 et le lysozyme; 0.005 M pour F2B.

Chromatographie et électrorhéophorèse

Les chromatographies ont été réalisées sur papier Whatman No 1 et les électrorhéophorèses sur papier Whatman 3 MM, au moyen de l'appareil Electrorhéophor Pleuger (Anvers, Belgique), d'un cadre utile de 40 cm/40 cm et aux pH 2.5 (acide acétique 0.1 N), 4 (acide acétique-pyridine-eau (9:2:1000, v/v/v)) et 5.5 (acide (acide acétique-pyridine-eau (2:4:1000, v/v/v))).

Identifications sur papier

Les acides aminés et les hexosamines ont été détectés par la ninhydrine (0.2 % en acétone), les hexosamines par le réactif de PARTRIDGE ET WESTALL⁹, les N-acétyl-hexosamines par celui de SALTON¹⁰, les sucres par le phthalate d'aniline et le glucose par la glucose oxydase (Worthington Bioch. Corp.)²¹.

Le réactif de HOUGH *et al.*¹¹ (2 % diphenylamine en *n*-butanol-méthanol (1:1, v/v) contenant 5 % d'acide trichloracétique) (chauffage 10 min à 100°) a également été utilisé. Il a permis de différencier l'acide N-acétylmuramique (coloration rose) et la N-acétylglucosamine (coloration gris-vertâtre). Par contre, les disaccharides β (1-4) di-N-acétylglucosamine ou β (1-6) N-acétylglucosaminyle-acide N-acétylmuramique (AG-AAM) ainsi que leurs dimères respectifs, le β (1-4) tétra-N-acétyl-

glucosamine et le tétrasaccharide AG-AAM-AG-AAM⁷ sont tous, sur papier, colorés en rose par ce réactif. En particulier, 10 μ g du disaccharide AG-AAM sont encore décelables après chromatographie en *n*-butanol-acide acétique-eau (3:1:1, v/v/v). Par rapport à ce standard, la sensibilité de la méthode est comparable à celle de SALTON¹⁰ à la *p*-diméthylaminobenzaldéhyde. Le mécanisme de la réaction n'a pas été étudié. On sait cependant que la déacétylation du groupe aminé de l'acide N-acétylmuramique supprime la coloration.

Les polyols ont été détectés par le réactif de Schiff après oxydation periodique en utilisant soit le procédé de BUCHANAN *et al.*¹², soit, le plus souvent, les réactifs proposés par la firme Spinco¹³ pour la révélation des glycoprotéines du sérum. Dans ce dernier cas, on a opéré comme suit: Les papiers sont vaporisés par la solution alcoolique d'acide periodique, maintenus 10 min dans un courant d'air, suspendus dans une atmosphère de SO₂ (destruction de l'excès de réactif), vaporisés par la solution de fuchsine réduite (Basic Fuchsin Dye Spinco ou Fuchsin Diamant-, Grose Krisralle. Lot 1538. E. Merck), puis maintenus dans un courant d'air (20-40 min), enfin ré-introduits en atmosphère de SO₂. Le ribitol et le mannitol apparaissent, après quelques minutes, colorés en violet pourpre. L'anhydroribitol, obtenu par hydrolyse acide du ribitol, apparaît en bleu de même qu'un second produit de décomposition, le dianhydroribitol probablement¹⁴. L'hydrolyse acide du mannitol donne naissance à deux produits de décomposition: l'un apparaît immédiatement en jaune virant plus tard au vert bleu, l'autre se révèle plus tardivement coloré en bleu.

Dosages

Les acides aminés ont été dosés (après hydrolyse de l'échantillon par HCl 6 N, 16 h) en extrayant des chromatogrammes, les taches ninhydrine positives par le mélange acétone-eau (3:1, v/v) et en mesurant à 570 m μ la densité optique des solutions obtenues. Le phosphore a été dosé (après hydrolyse perchlorique) par le procédé de KING¹⁵; les hexosamines (après hydrolyse par HCl 6 N, 16 h) par le procédé de NEUHAUER ET LETZRING¹⁶ en utilisant le rapport⁵ densité optique glucosamine/densité optique acide muramique = 2,30; le disaccharide AG-AAM (sans hydrolyse préalable) par le procédé de REISSIG *et al.*¹⁷ modifié selon GHUYSEN ET SALTON⁵.

Pour le dosage des groupes hydroxyles, on chauffe à 100°, pendant 3 h, en ampoules scellées, l'échantillon sec en présence du réactif d'acétylation de WILSON ET HUGHES¹⁸ (1 mg/ml de mélange: anhydride acétique-pyridine (24:235, v/v)). Les solutions sont ensuite évaporées sous vide et les groupes O-acétyles dosés par le test d'HESTRIN en utilisant le procédé de MCCOMBE ET MCCREADY¹⁹ adapté comme suit: les résidus secs, dissous dans 0.7 ml d'eau sont traités pendant 15 min en bain de glace, par 0.28 ml du mélange NaOH-hydroxylamine·HCl. On ajoute ensuite 0.7 ml de la solution d'acide perchlorique en méthanol puis 1.82 ml de la solution diluée de perchlorate de fer. Les densités optiques sont mesurées à 520 m μ . Le procédé a été appliqué au ribitol, au mannitol et au glycérophosphate de soude utilisés comme substances de référence. La Fig. 1 montre que la densité optique à 520 m μ des solutions finales ne dépend que du nombre de fonctions hydroxyles mises en oeuvre quelle que soit la substance utilisée pour le test.

Le glucose a été dosé soit par la méthode à la glucose oxydase (après hydrolyse par HCl 2 N, 3 h), soit par la réaction de DISCHE (sans hydrolyse préalable) modifiée comme suit: à 1 ml de la solution (ou suspension de parois cellulaires) à tester, on

ajoute 3 ml d'une solution à 0.75 % de diphenylamine dans un mélange acide acétique-acide sulfurique ($d, 1.8$)-acide chlorhydrique ($d, 1.19$) (9:1:5, v/v/v) et on chauffe 1 h au bain-marie bouillant. Après un repos d'une nuit, la densité optique de la solution est mesurée à 525 et 625 $m\mu$ et on se rapporte à une courbe d'étalonnage obtenue à partir de quantités connues de glucose.

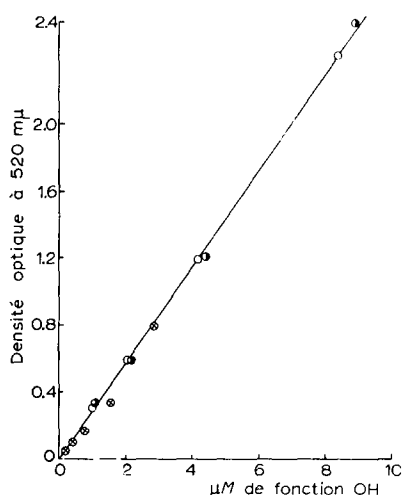


Fig. 1.

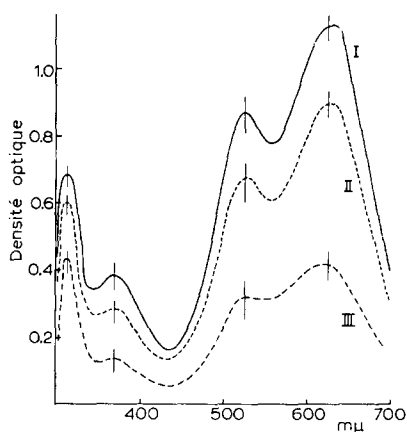


Fig. 2.

Fig. 1. Dosage des fonctions hydroxyles du ribitol, du mannitol et du glycérophosphate sodique, par application du test d'Hestrin après acétylation en anhydride acétique-pyridine. ●—●, ribitol; ○—○, mannitol; ⊗—⊗, glycérophosphate sodique.

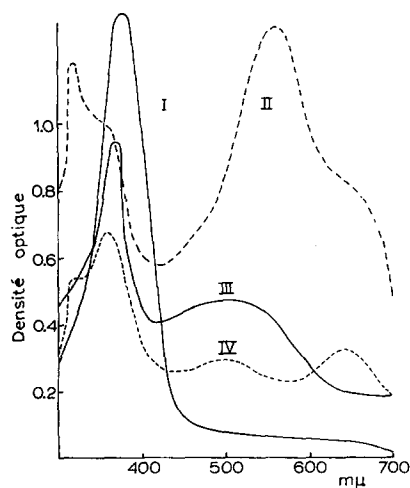


Fig. 3.

Fig. 2. Spectres d'absorption du glucose et de fractions obtenues par traitement enzymatique des parois cellulaires de *B. megaterium* KM, après réaction avec la diphenylamine. I, glucose, 100 μg ; II, fraction non dialysable obtenue en incubant les parois cellulaires par le lysozyme (fraction KM·Lys·ND) 500 μg ; III, complexe Schiff positif, isolé de la fraction non dialysable obtenue en incubant les parois cellulaires par F2B (fraction KM·F2B·ND) 100 μg . Les spectres ont été obtenus après un chauffage au BM bouillant de 60 min et repos d'une nuit à la température du laboratoire.

Fig. 3. Spectres d'absorption de divers hydrates de carbone après réaction avec la diphenylamine. I, rhamnose 200 μg ; II, anhydro sédoheptulose 200 μg ; III, acide galacturonique 400 μg ; IV, ribose 200 μg . Les spectres ont été obtenus après un chauffage au BM bouillant de 30 min et repos d'une nuit à la température du laboratoire.

La méthode chimique donne des résultats supérieurs de 30 à 50 % à ceux obtenus par la méthode enzymatique. Or, au cours de l'hydrolyse acide qui précède l'application du test enzymatique, une certaine quantité de glucose libéré au début du chauffage peut être ultérieurement détruite. De plus, une chromatographie du matériel obtenu après 3 h d'hydrolyse a montré qu'une certaine quantité de glucose était

toujours engagée dans différents complexes et échappait par conséquent au dosage.

Par contre, la méthode chimique peut ne pas être spécifique. Tous les hexoses donnent une coloration bleue intense dont le spectre est identique à celui donné par le glucose (Fig. 2, courbe I). La sensibilité varie cependant selon la nature de l'hexose, dans l'ordre décroissant suivant: fructose > sorbose > mannose > glucose > galactose >. Pentoses, méthylpentoses, heptoses et acides hexuroniques donnent des spectres différents (Fig. 3), avec des maxima aux longueurs d'onde suivantes: 360, 580 et 640 m μ pour les pentoses (sensibilité: xylose et ribose > arabinose); 375 m μ pour les méthylpentoses (sensibilité: rhamnose > fucose); 320 et 560 m μ pour le sedoheptulose; 365 et 490 à 530 m μ pour les acides hexuroniques (sensibilité: acide galacturonique > acide glucuronique). La N-acétylglucosamine, l'acide N-acétylmuramique, leurs hexosamines respectives, le ribitol et le mannitol donnent des réactions négatives (de 100 à 400 μ g).

Dans le cas des parois de *B. megaterium* KM, la méthode chimique est cependant préférable à celle qui utilise la glucose oxydase. En effet, le glucose est le seul sucre non aminé qu'on y décèle. De plus, en appliquant la réaction de DISCHE modifiée aux diverses préparations solubles dérivant des parois de *B. megaterium* KM, les spectres des solutions obtenues sont identiques à celui donné par une solution de glucose (Fig. 2). Enfin, les densités optique à 525 et 625 m μ d'un mélange (glucose + préparation dérivant de parois) est la somme des densités optiques individuelles.

La méthode modifiée de DISCHE n'a cependant pu être appliquée aux fractions purifiées par électrorhéophorèse sur papier Whatman 3 MM que lorsque la quantité extraite à partir de 2 cm² environ de papier donnait une solution dont la densité optique à 625 m μ était au moins égale à 0.2. En effet, un extrait aqueux de 2, 4 et 6 cm² de ce papier a donné, après réaction dans les conditions décrites, des solutions dont les densités optique à 625 m μ sont respectivement de 0.020, 0.070 et 0.170.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Extraction des parois cellulaires de B. megaterium KM par l'acide trichloracétique

La technique utilisée par BADDILEY pour l'extraction des acides téichoïques a été appliquée à 1 g de parois de *B. megaterium* KM. Celles-ci ont été traitées, à 0°, pendant 24 h par une solution à 10 % d'acide trichloracétique (30 ml). L'extraction a été répétée deux fois et les extraits réunis ont été additionnés par 2 volumes d'acétone froid. Après un repos de 48 h à 0°, aucune substance insoluble n'est apparue. De plus, la teneur des parois en phosphore n'a pas été modifiée par ce traitement. Exprimée par poids sec de parois, elle était égale à 0.556 % avant traitement et à 0.567 % après traitement.

Digestion enzymatique des parois cellulaires de B. megaterium KM

Les parois cellulaires de *B. megaterium* KM ne sont pas également sensibles au lysozyme, à F1 et à F2B. A 37°, le trouble de leurs suspensions (1 mg poids sec/ml) est réduit à 50 % de sa valeur initiale en 20 min par 50 μ g/ml de lysozyme ou 5 μ g/ml de F1. Une réduction identique est obtenue par 10 μ g/ml de F2B en 10 h.

Ces vitesses de clarification ne traduisent cependant pas le degré de dégradation des parois cellulaires traitées par chacun des enzymes. La dégradation peut être

évaluée par la quantité de matériel non dialysable laissé inattaqué après une incubation de 18 h. Le Tableau I montre que l'action dégradante du lysozyme, de F₁ et de F₂B va respectivement croissant. En incubant successivement au moyen des trois préparations enzymatiques, d'abord les parois cellulaires elles-mêmes puis les diverses fractions non dialysables qui en dérivent, celle finalement obtenue représente environ 37 % en poids des parois initiales, quel que soit l'ordre selon lequel les enzymes ont été utilisés. Quelques rendements de ces diverses incubations sont donnés dans le Tableau I. Si l'ordre d'utilisation des enzymes est d'abord le lysozyme, puis F₁ et enfin F₂B, il est particulièrement évident qu'un enzyme donné n'a pas détruit le substrat sensible à l'enzyme utilisé immédiatement après lui et que ce substrat est chaque fois contenu dans la fraction non dialysable.

TABLEAU I

RENDEMENTS OBTENUS EN INCUBANT LES PAROIS CELLULAIRES DE *B. megaterium* KM PAR LE LYSOZYME, F₁ ET F₂B, UTILISÉS ISOLÉMENT OU SUCCESSIVEMENT

D, fraction dialysable; ND, fraction non dialysable. Les rendements sont exprimés en %, poids sec, des parois cellulaires originales.

Parois cellulaires + Lysozyme →		{ D: 28.3 % ND: 71.7 %	
{ 30.5 % D 41.2 % ND		← + F ₂ B	+ F ₁ → { D: 18.7 % ND: 53 %
+ F ₁ ↓			↓ + F ₂ B
{ 4.2 % D 37 % ND			→ { D: 17.7 % ND: 36.3 %
Parois cellulaires + F ₁ →		{ D: 45 % ND: 55 %	
Parois cellulaires + F ₂ B →		{ D: 59 % ND: 41 %	

Les fractions dialysables obtenues après ces hydrolyses enzymatiques, isolées ou successives, ont été analysées par chromatographie bi-dimensionnelle en pyridine-eau (8:2, v/v) et *n*-butanol-acide acétique-eau (3:1:1, v/v/v). Ces fractions contiennent soit des complexes de N-acétylhexosamines, en particulier le disaccharide AG-AAM (après incubation avec le lysozyme ou la préparation F₁), soit des peptides et de l'alanine libre (après incubation avec F₁ ou F₂B), mais sont toujours dépourvus de phosphates de polyol. Au contraire, ceux-ci ont chaque fois été décelés dans les diverses fractions non dialysables. Ces fractions non dialysables ont été désignées de la façon suivante; exemple: KM·Lys·ND; F₁·ND; F₂B·ND est la fraction non dialysable obtenue en ayant incubé avec F₂B la fraction KM·Lys·ND; F₁·ND. Celle-ci désigne la fraction non dialysable obtenue par incubation avec F₁ de la fraction KM·Lys·ND, qui, à son tour, représente la fraction non dialysable obtenue par incubation avec le lysozyme des parois cellulaires de *B. megaterium* KM.

Analyse électrorhéophorétique des fractions non dialysables

Les diverses fractions non dialysables (Tableau I) ont été examinées par électrorhéophorèse et les complexes téichoïques qu'elles contiennent ont pu être facilement détectés grâce à leur sensibilité au réactif de Schiff après oxydation périodique.

La fraction KM·Lys·ND a été examinée aux pH 2.5, 4 et 5.5. Dans chaque cas, on a déterminé la position d'équilibre* d'une substance à la fois décelable par la ninhydrine, le réactif des N-acétylhexosamines¹⁰ et celui de Schiff après oxydation périodique (Fig. 4). Cette substance présente, aux trois pH examinés, un étalement assez considérable et est immédiatement précédée dans sa migration vers l'anode par une autre substance ou groupe de substances, insensibles au réactif de Schiff mais toujours décelables par les deux autres réactifs mentionnés. Malgré un certain chevauchement,

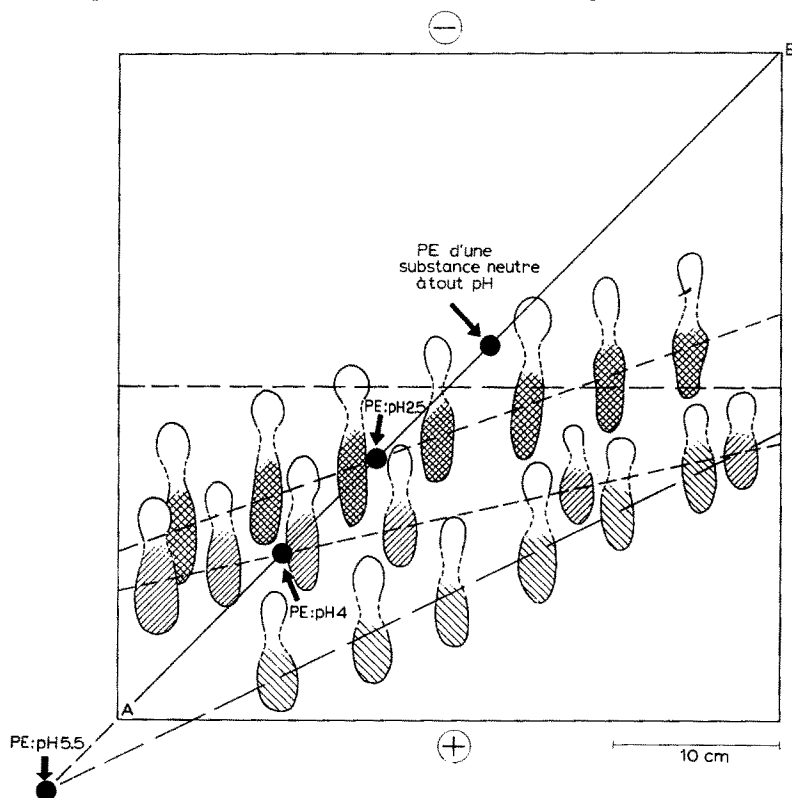


Fig. 4. Schéma des électrophorèses aux pH 2.5, 4 et 5.5 de la substance Schiff positive contenue dans la fraction non dialysable obtenue en traitant les parois cellulaires de *B. megaterium* KM par le lysozyme (fraction KM·Lys·ND). La fraction KM·Lys·ND a été déposée selon la diagonale AB. Après électrorhéophorèse (3 h, 20 V/cm), les papiers ont été révélés par la ninhydrine, le réactif des N-acétylhexosamines et le réactif de Schiff après oxydation périodique. Seules, les surfaces hachurées donnent une réaction positive avec ce dernier réactif. Le point d'intersection entre la diagonale AB et la droite tracée par le centre de chacune des surfaces hachurées est la position d'équilibre (PE), à un pH donné, de la substance Schiff positive. Par rapport à la position d'équilibre d'une substance neutre à tout pH, la position d'équilibre de la substance Schiff positive se situe à 6.5 (pH 2.5), 12 (pH 4) et 27 cm (pH 5.5) en direction de l'anode.

* Endroit du papier où la migration d'une substance donnée s'annule par suite d'un équilibre entre son transport dans un sens dû à sa charge électrique et celui dans le sens opposé dû à l'évaporation du solvant du papier.

la substance Schiff positive a été isolée de la fraction KM·Lys·ND par électrorhéophorèse à pH 4 de 30 mg de cette fraction (dépôt de 1 mg/cm au centre du papier, 20 V/cm pendant 4 h). Une bande de papier a été découpée de l'électrorhéophoréogramme de façon à exclure – avec une certaine perte de rendement – toute contamination par la substance Schiff négative. La substance Schiff positive ainsi purifiée s'est révélée homogène lors d'une nouvelle électrorhéophorèse (Fig. 5).

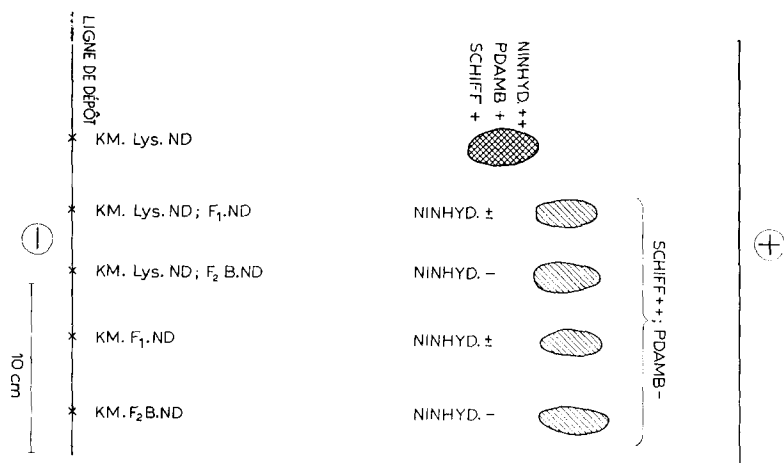


Fig. 5. Électrorhéophorèse (pH 4, 4 h, 20 V/cm) de 200 μ g des complexes Schiff positifs, isolés à partir de diverses fractions non dialysables obtenues par traitement enzymatique des parois cellulaires de *B. megaterium* KM. Les électrophoréogrammes ont été réalisés en triple et respectivement révélés par la ninhydrine (ninhyd.), le réactif des N-acétylhexosamines (PDAMB) et le réactif de Schiff après oxydation périodique.

Le même procédé de purification a été appliqué à toutes les fractions non dialysables reprises au Tableau I et a permis d'isoler la substance qui, dans chacune de ces fractions, est responsable de sa sensibilité au réactif de Schiff après oxydation périodique.

Les substances Schiff positive, isolées des fractions non dialysables qui, à un moment quelconque de leur préparation, ont subi une incubation soit avec F1 soit avec F2B, ont toutes les mêmes caractéristiques et se distinguent de la substance Schiff positive isolée à partir de la fraction KM·Lys·ND (Fig. 5). En effet, elles sont chargées plus négativement que cette dernière, ne sont plus révélées par le réactif des N-acétylhexosamines et ne sont que très peu sensibles à la ninhydrine.

Nature du polyol responsable de la réaction de Schiff après oxydation périodique

5 mg de la fraction KM·Lys·ND et 2 mg des substances Schiff positives isolées de la fraction KM·F2B·ND, de la fraction KM·Lys·ND; F2B·ND ou de la fraction KM·Lys·ND; F2B·ND; F1·ND ont subi une hydrolyse acide ménagée (2 mg/ml; HCl 2 N; 15 min à 100°) et l'hydrolysât lyophilisé a été chromatographié en butanol acétique. Le réactif de Schiff appliqué aux chromatogrammes n'a permis de mettre en évidence ni glycérol, ni ribitol, ni mannitol libres, ni aucun produit pouvant provenir de leur décomposition. Dans chaque cas cependant, une substance (R_F 0.13) a été décelée. Au simple examen visuel des chromatogrammes, elle représente la majeure partie du matériel Schiff positif contenu dans l'hydrolysât. Son isolement a été réalisé

de la façon suivante. 100 mg de la préparation KM·Lys·ND ont été hydrolysés dans les conditions décrites ci-haut. Après élimination de l'acide par lyophilisation, le résidu a été repris dans 10 ml d'eau et dialysé contre 50 ml d'eau distillée. La dialyse a été renouvelée trois fois. Les fractions dialysables ont été réunies et lyophilisées. Le résidu sec a été soumis à une électrorhéophorèse à pH 2.5 (dépôt sous forme d'une bande de 30 cm au centre du papier; 20 V/cm pendant 3 h) en même temps que du ribitol dont la révélation ultérieure a permis de situer la position de neutralité. Une bande de papier découpée dans l'électrorhéophoréogramme selon le sens de la migration, révèle la présence à ce niveau de substances sensibles au réactif des N-acétylhexosamines, à la glucose oxydase, ainsi qu'au réactif de Schiff après oxydation periodique. La zone de papier sensible à ce dernier réactif déborde cependant légèrement vers l'anode les zones révélées par les autres procédés. La bande de papier contenant l'ensemble des substances responsables des réactions précédentes, a été découpée de l'électrorhéophoréogramme et appliquée sur une nouvelle feuille de papier 3 MM, cette fois près de l'électrode négative. Après une nouvelle électrorhéophorèse à pH 5.5 (20 V/cm pendant 165 min), les substances, neutres ou pratiquement neutres à pH 2.5, se sont séparées en trois fractions ayant migré vers l'anode respectivement de 11 cm (fraction neutre: N), de 20 cm (fraction acide: A₂₀) et de 30 cm (fraction acide: A₃₀) (Tableau II).

TABLEAU II
FRACTIONNEMENT ÉLECTRORHÉOPHORÉTIQUE DE L'HYDROLYSAT ACIDE
PARTIEL DE LA FRACTION KM·Lys·ND

Comportement à pH		Fraction
2.5	5.5	
Neutre	Neutre	N
Neutre	Acide	A 20
Neutre	Très acide	A 30

Seule cette dernière fraction A₃₀ était décelable par le réactif de Schiff. Elle était de plus insensible à la ninhydrine et au réactif des N-acétylhexosamines. Eluée de la bande de papier correspondante, elle s'est comportée au cours d'une chromatographie en butanol acétique comme étant composée d'une seule substance migrant avec un R_F égal à 0.13. La fraction A₃₀ a été analysée sans avoir subi de purifications ultérieures, avec pour résultat, une proportion phosphore/fonction hydroxyle/glucose/hexosamine (exprimé sous forme de glucosamine)/acide aminé égale à 1/3.1/0.033/0.007/0.000.

Ces rapports indiquent que la fraction A₃₀ est presque exclusivement constituée par du phosphate de polyol. Celui-ci pourrait vraisemblablement s'identifier au ribitol puisque le rapport P/OH d'une chaîne de phosphates de ribitol (où les résidus de polyol sont unis par l'intermédiaire de liaisons phosphodiester) est compris entre 1/4 et 1/3 selon le degré de polymérisation.

La fraction A₃₀ présente cependant plusieurs propriétés imprévues. Son ionisation est très réduite à pH 2.5, ce qui exclut la présence d'un OH phosphorique primaire alors qu'une telle fonction semble être présente dans les complexes Schiff positifs isolés des diverses fractions non dialysables. En effet, ces complexes sont fortement chargés négativement à pH 2.5 ainsi qu'en témoigne leur comportement électrorhéophorétique (Fig. 4).

La fraction A30 ainsi que du ribitol et du mannitol ont été traités à 100° soit par HCl 2 N pendant 3 h soit par HCl 6 N pendant 16 h (ampoules scellées; 1 mg/ml) puis chromatographiés en butanol-acétique après lyophilisation. La fraction A30 n'est pratiquement pas affectée par ces divers traitements acides et migre toujours de façon homogène avec un R_F 0.13. Une trace d'anhydroribitol (R_F 0.54) semble cependant avoir été formée lorsque l'hydrolyse a été effectuée en présence de HCl 6 N pendant 16 h. La proportion P/OH a été redéterminée à partir de la fraction A30 ayant subi le même traitement et a été trouvée égale à 1/3.5.

La fraction A30 est donc très stable aux traitements acides. On notera cependant qu'après hydrolyse acide des parois intactes de *B. megaterium* KM on ne décèle pas, non plus, de polyol libre ou un de ses produits de dégradation.

La structure de la fraction A30 reste donc à déterminer. Cependant, sa composition chimique globale montre que les complexes Schiff positifs isolés des fractions non dialysables obtenues après digestion enzymatique des parois de *B. megaterium* KM sont constitués, au moins partiellement, de phosphate de polyol. Le terme d'acide téichoïque leur est donc applicable.

Composition chimique des acides téichoïques isolés des fractions non dialysables obtenues après traitement enzymatique des parois de B. megaterium KM

Les résultats des différents dosages, à l'exclusion du polyol dont la teneur n'a pas été déterminée, sont consignés dans le Tableau III et exprimés par unité de phosphore. Les teneurs renseignées en glucose sont celles obtenues par la méthode enzymatique et doivent être corrigées par un facteur compris entre 1.3 et 1.5 (voir MÉTHODES). L'acide téichoïque isolé de la fraction KM·Lys·ND a la composition suivante: phosphore₁·glucose_{2-2.3}·N-acetylglucosamine_{1.91}·acide N-acétylmuramique_{1.40}·glycine_{1.69}·acide α,ϵ -diaminopimélique_{1.69}·alanine_{2.85}·disaccharide AG-AAM_{0.40}.

Les acides téichoïques isolés des autres fractions non dialysables présentent une proportion P/glucose/N-acetylglucosamine identique à la précédente. Par contre, leur teneur en acide N-acétylmuramique, en disaccharide AG-AAM et en acides aminés est environ 4.5 fois plus petite lorsqu'ils ont été isolés des fractions obtenues par action de la préparation F1 et 13 fois plus petite lorsqu'ils ont été isolés des fractions obtenues par action de la préparation F2B.

TABLEAU III

COMPOSITION CHIMIQUE RELATIVE DES COMPLEXES SCHIFF POSITIFS ISOLÉS DES DIVERSES FRACTIONS NON DIALYSABLES OBTENUES PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES PAROIS DE *B. megaterium* KM

P, phosphore; AG, N-acétylglucosamine; AAM, acide N-acétylmuramique.

Fractions	P	Glucose	Disaccharide AG-AAM	AG**	AAM**	Ac. glutamique acide diaminopi- métique	Alanine
KM·Lys·ND	1	1.50	0.40	1.91	1.40	1.60	2.85
KM·F1·ND	1	1.40	0.09	1.31	0.28	0.33	0.54
KM·Lys·ND; F1·ND	1	1.50	0.15	2.50	0.30	0.40	0.69
KM·F2B·ND	1	1.52	0.04	1.63	0.11	0.10	0.21
KM·Lys·ND; F2B·ND	1	1.87	0.06	1.80	0.10	—	0.20
KM·Lys·ND; F2B·ND; F1·ND	1	1.50	0.04	1.94	0.10	—	0.17

* Dosé par la glucose oxydase.

** Soustraction faite de la quantité contenue dans le disaccharide AG-AAM.

Sensibilité enzymatique de l'acide téichoïque isolé de la fraction KM·Lys·ND

L'examen électrorhéophorétique des acides téichoïques isolés des diverses fractions non dialysables (Figs. 4 et 5), leur comportement vis-à-vis de la ninhydrine et du réactif des N-acétylhexosamines (Figs. 4 et 5) et enfin leur composition chimique respective (Tableau III) démontrent que l'acide téichoïque isolé de la fraction KM·Lys·ND est associé à des résidus mucopeptidiques. Au contraire, les acides téichoïques isolés des autres fractions en sont complètement ou presque complètement débarrassés, à la suite probablement du traitement par F1 et/ou F2B.

Cette hypothèse a été vérifiée en traitant par F1 ou par F2B des aliquots de 200 µg de l'acide téichoïque isolé de la fraction KM·Lys·ND. Après une incubation de 16 h, les mélanges ont été soumis à une électrorhéophorèse à pH 4 (dépôt au centre du papier; 20 V/cm; 4 h) ou à une chromatographie en butanol acétique. On a ainsi observé que F1 ou F2B dissocient effectivement ce complexe en: (a) une fraction hétérogène, Schiff négative, mais toujours sensible à la ninhydrine et au réactif des N-acétylhexosamines, et chargée plus positivement que le complexe original; (b) une substance à migration homogène, Schiff positive, insensible au réactif des N-acétylhexosamines et chargée plus négativement que la substance originale. Sa sensibilité à la ninhydrine est très faible après incubation avec F1 et nulle après incubation avec F2B. Sa vitesse de migration est indépendante de la nature de l'enzyme utilisé et est identique à celle des substances Schiff positives isolées des fractions non dialysables autres que la fraction KM·Lys·ND (Fig. 5).

De plus, la chromatographie, après incubation par F2B, a permis de détecter le disaccharide AG-AAM à l'état libre. Celui-ci a été estimé après élution d'un chromatogramme non révélé et représente environ 65 % de la quantité totale de disaccharide directement dosée à partir du complexe original.

L'ensemble des résultats précédents permet donc d'attribuer au complexe téichoïque-mucopéptide isolé de la fraction KM·Lys·ND, la constitution suivante, abstraction faite des proportions des constituants et de leur séquence dans les divers fragments considérés:

(phosphate de polyol; N-acétylglucosamine; glucose)⁽¹⁾(acide N-acétylmuramique; peptide)⁽²⁾(disaccharide AG-AAM).

La liaison (1) est sensible à un enzyme commun aux préparations F1 et F2B. Si les parois bactériennes sont directement traitées par l'une ou l'autre de ces préparations, le fragment constitué de phosphate de polyol, de N-acétylglucosamine et de glucose peut être décelé dans les fractions non dialysables correspondantes, pratiquement dépourvu de tout résidu mucopeptidique.

La liaison (2) est sensible à un second enzyme également présent dans la préparation F2B (mais absent de la préparation F1). Il est sans doute identifiable à l'amidase précédemment décrite^{6,8}. Le disaccharide AG-AAM est donc nécessairement en position terminale, uni au résidu peptidique par une liaison amidique entre la fonction COOH de l'acide N-acétylmuramique et une fonction α -NH₂ (probablement de l'alanine⁸) du peptide.

Hydrolyse acide partielle

Afin de préciser si possible certains détails structuraux des complexes téichoïques étudiés et en particulier, la position relative du glucose et des deux N-acétylhexos-

amines (autres que celles qui forment le disaccharide AG-AAM), un certain nombre de fragments libérés par hydrolyse acide partielle de la fraction KM·Lys·ND ont été isolés et caractérisés. Une hydrolyse de 15 min au bain-marie bouillant en présence de HCl 2 N (2 mg/ml) a été adoptée. En effet, 50 % environ du glucose présent dans les parois intactes sont libérés dans ces conditions. De plus, l'application des tests des hexosamines et des N-acétylhexosamines sur les électrorhéophoréogrammes réalisés à partir de ces hydrolysats montrent que la déacétylation des N-acétylhexosamines est négligeable.

L'hydrolysats de la préparation KM·Lys·ND a été séparé en trois fractions principales N, A₂₀, et A₃₀, en utilisant la technique déjà décrite (voir: *Nature du polyol responsable de la réaction de Schiff* et Tableau II). Il a été démontré que la fraction A₃₀ est uniquement constituée de phosphate de polyol. Le contenu des deux autres fractions a été analysé en chromatographiant des aliquots, correspondant environ à 8 mg de la fraction KM·Lys·ND, selon deux dimensions et chaque fois par méthode descendante, d'abord en butanol acétique, puis en *n*-butanol-pyridine-eau (6:4:1, v/v/v) (Fig. 6 et Tableau IV).

Cinq substances (I à V) ont été décelées dans la fraction N et deux substances (A et B) dans la fraction A₂₀. Eluées à partir de chromatogrammes identiques mais non révélés, elles ont été identifiées soit par cochromatographie avec des standards de référence, soit en examinant, par les procédés de dosage et de chromatographie appropriés, les produits résultant d'une hydrolyse acide supplémentaire.

Outre le glucose (III), la N-acétylglucosamine (IV) et l'acide N-acétylmuramique (B), divers complexes ont été mis en évidence.

Le complexe I, insensible à la glucose oxydase avant son hydrolyse est un polymère constitué de glucose uniquement. Sa coloration en gris brun par la diphenylamine-trichloracétique, de même que des cochromatographies avec le cellobiose, le maltose et le mélizitose ont montré qu'il s'agirait d'un tri-glucose plutôt que d'un glucosidoglucose.

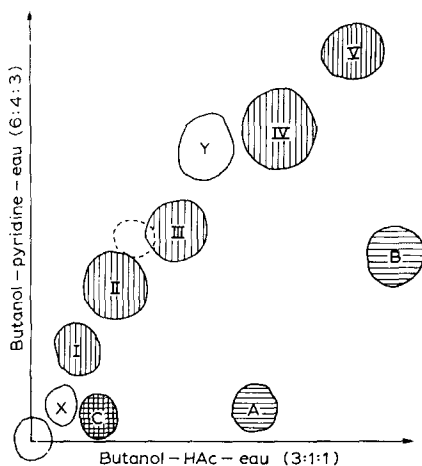


Fig. 6. Hydrolyse acide partielle des parois cellulaires de *B. megaterium* KM. Schéma des chromatogrammes obtenus à partir des fractions N (substances I à V), A₂₀ (substances A et B) et A₃₀ (substance C). X et Y, substances supplémentaires décelées dans l'hydrolysats partiel des acides téichoïques purifiés et soumis à la chromatographie sans fractionnement préalable.

TABLEAU IV

HYDROLYSE ACIDE PARTIELLE DES PAROIS CELLULAIRES DE *B. megaterium* KM

Colorations et composition qualitative des substances isolées par chromatographie.
 AG, N-acétylglucosamine; AAM, acide N-acétylmuramique; PDAMB, réactif des N-acétylhexosamines selon SALTON¹⁰.

Substance	Colorations				Composition
	PDAMB	Glucose oxydase	Diphénylamine-trichloracétique	Schiff	
Fraction N					
I	—	—	Gris-brun	+	Oligoglucose
II	+	—	—	±	Oligoglucose-AG
III	—	++	Gris-brun	+	Glucose
IV	++	—	Gris-verdâtre	±	AG
V	+	—	Gris-brun (trace)		Glucose-AAM
Fraction A 20					
A	+	—	—*		Glucose-AAM
B	++	—	Rose		AAM
Fraction A 30					
C	—	—	—	++	Phosphate de polyol
Hydrolysats partiel du complexe téichoïque purifié					
X		—	Rose		?
Y	+	—	—		(Glucose-AG)?

* Coloré en rose sur les chromatogrammes réalisés à partir des hydrolysats acides partiels de 2 mg des complexes téichoïques purifiés.

Le complexe II est constitué de glucose et de N-acétylglucosamine. Les proportions relatives ont varié, selon les analyses, de 2-3 glucoses pour 1 N-acétylglucosamine.

Les complexes V et A sont des disaccharides l'un et l'autre composés de glucose et d'acide N-acétylmuramique (ou d'une substance donnant par hydrolyse acide, une hexosamine dont les propriétés chromatographiques sont identiques à celles de l'acide muramique) et ne peuvent être distinguées du point de vue de leur composition chimique globale. Cependant, le complexe V est une substance neutre à pH 5.5, tandis que le complexe A est acide à ce pH, ce qui semble d'ailleurs confirmé par leur R_F respectivement élevé et nul en butanol-pyridine. La fonction COOH de l'acide N-acétylmuramique serait donc bloquée dans le complexe V. Si ce blocage n'est pas dû à la présence d'une substance basique non décelée à l'analyse, glucose et acide N-acétylmuramique doivent dans ce complexe être unis par une liaison ester. Enfin, le complexe V, contrairement au complexe acide A, n'est pas coloré en rose par la diphénylamine-trichloracétique. Il donne avec ce réactif une faible coloration gris-brune qui serait plutôt due à son résidu glucosidique que N-acétylmuramique.

Parmi les substances et les complexes libérés par hydrolyse ménagée de la fraction KM·Lys·ND, quels sont ceux qui proviennent de l'hydrolyse du "fragment" téichoïque qu'elle contient?

2 mg d'acides téichoïques purifiés (isolés de fractions non dialysables ayant subi une incubation avec F2B, supplémentairement ou non à une action du lysozyme et/ou de Fr) ont subi la même hydrolyse partielle que la fraction KM·Lys·ND, puis, sans aucun fractionnement préalable, ont été soumis directement à la chromatographie

bidimensionnelle en butanol-acétique et butanol-pyridine. Les chromatogrammes ainsi obtenus témoignent de la présence de la plupart des substances et complexes identifiés dans les trois fractions N, A₂₀, et A₃₀. Seuls l'acide N-acétylmuramique libre (B) et l'oligoglucose (I) ne sont plus décelables. Semblablement, le complexe oligoglucose-N-acétylglucosamine (II) semble n'être présent qu'en faible quantité. Inversement, deux substances nouvelles ont été décelées. L'une, Y, est située entre le glucose et la N-acétylglucosamine. Elle n'est pas colorée en rose par la diphénylamine-trichloracétique mais est sensible au réactif des N-acétylhexosamines. Sa localisation même sur les chromatogrammes suggère qu'il s'agit peut-être du disaccharide glucose-N-acétyl-glucosamine. L'autre, X, colorée en rose par la diphénylamine-trichloracétique et située près de l'origine peut vraisemblablement être considérée comme un produit d'hydrolyse encore très incomplète.

DISCUSSION

D'après les travaux récents de SALTON ET GHUYSEN⁷, de SALTON²⁰ et de GHUYSEN⁶⁻⁸, la structure de base des parois de *Micrococcus lysodeikticus* peut être représentée par un réseau de troncs poly-N-acétylhexosaminiques, auxquels sont associés des résidus peptidiques dont la taille et la séquence en acides aminés sont variables. Certains de ces résidus sont libres tandis que d'autres forment des ponts entre deux troncs polysaccharidiques voisins.

L'acide téichoïque, non extractible à l'acide trichloracétique froid et présent dans les parois de *B. megaterium* KM, est combiné par liaisons covalentes à la structure de base de ces parois. Il peut être considéré comme un polymère de phosphates de polyol auquel sont associés de petits résidus constitués de glucose, de N-acétylhexosamines et d'acides aminés. Ce complexe téichoïque-mucopeptide est uni à la structure de base de la paroi bactérienne par l'intermédiaire d'une liaison amidique entre un N-terminal de certains de ses résidus peptidiques et la fonction COOH d'un acide muramique d'un tronc poly-N-acétylhexosaminique.

En incubant les parois de *M. lysodeikticus* avec le lysozyme, on libère^{6,8} certains fragments disaccharidiques AG-AAM, toujours associés à des résidus peptidiques libres, ou encore des complexes constitués de deux fragments AG-AAM, supposés avoir appartenu à deux troncs poly-N-acétylhexosaminiques voisins, et toujours unis entre eux par un pont peptidique.

De même, en incubant les parois de *B. megaterium* KM avec le lysozyme, on libère des fragments disaccharidiques AG-AAM encore porteurs de tout le complexe téichoïque-mucopeptide.

Le complexe téichoïque-mucopeptide libéré des parois de *B. megaterium* KM par le lysozyme a un poids moléculaire minimal d'environ 2200 (le polyol étant supposé être du ribitol). Il contient 16 % de glucose et 1.4 % de phosphore. Comme la teneur en phosphore de la fraction dont il a été isolé (fraction KM·Lys·ND) est de 0.775 %, il représente, en poids, environ 55 % de cette fraction et 40 % des parois bactériennes.

La sensibilité du complexe téichoïque-mucopeptide à deux enzymes de *Streptomyces* (l'amidase de la préparation F2B et un second enzyme présent à la fois dans la préparation F1 et F2B) permet d'y distinguer trois fragments principaux. Ils sont respectivement constitués de phosphate de polyol, de glucose et de N-acétylglucosamine (fragment téichoïque), d'acide N-acétylmuramique et d'acides aminés (fragment

mucopeptide) et enfin du disaccharide AG-AAM (représentant un reste d'un tronc poly-N-acétylhexosaminique du mucopeptide de base).

La fréquence avec laquelle ce type de complexe téichoïque-mucopeptide est présent dans les parois bactériennes, intimement combiné à la structure de base de celles-ci, n'a pas été recherchée. Cependant, l'acide trichloracétique froid n'extrait jamais qu'une fraction des acides téichoïques totaux de la paroi bactérienne. Selon SALTON²³, un traitement par l'acide trichloracétique, à 100°, pendant 10 min, extrait pratiquement tout l'acide téichoïque présent dans les parois de *Staphylococcus aureus* et de *Lactobacillus arabinosus*. Mais les dosages des fonctions COOH et NH₂ terminales présentes dans les résidus insolubles ainsi obtenus, montrent que ces conditions expérimentales provoquent une hydrolyse des parois bactériennes. Deux fractions d'acide téichoïque pourraient donc exister dans les diverses parois bactériennes où des phosphates de polyol ont été décelés: une première fraction, étudiée par BADDILEY *et al.*, associée par liaisons ioniques au reste de la paroi et extractible par l'acide trichloracétique froid; une seconde, combinée par liaisons covalentes au mucopeptide de base de la paroi avec lequel elle forme un complexe non dissocié par l'acide trichloracétique froid.

La présence de toute trace d'acide téichoïque, associé par liaisons ioniques au mucopeptide de base, dans la préparation des parois de *B. megaterium* KM qui a été étudiée, ne peut d'ailleurs pas être absolument exclue. Les préparations F1 et F2B libèrent en effet 78 μ moles d'alanine libre à partir de 1 g de ces parois, mais n'en libèrent plus lorsque celles-ci ont été traitées par l'acide trichloracétique dans les conditions décrites. SALTON²⁰ a émis l'hypothèse que la préparation F2B pourrait contenir un enzyme hydrolysant la liaison amino ester qui unit les résidus alanyles au glucose ou à la N-acétylglucosamine dans les acides téichoïques décrits par BADDILEY *et al.* Si cette hypothèse était vérifiée et en admettant que l'alanine libéré sous l'action de F1 ou F2B avait pour origine un acide téichoïque identique à celui des parois de *B. subtilis*², le calcul montre que cet acide représenterait, en poids, moins de 4 % des parois de *B. megaterium* KM.

La structure du complexe acide téichoïque-mucopeptide isolé de la fraction non dialysable obtenue après traitement par le lysozyme des parois de *B. megaterium* KM ne peut, à l'heure actuelle, qu'être esquissée. En particulier, elle dépend de la nature exacte du polyol et de l'interprétation à donner aux résultats d'hydrolyse acide partielle.

Après hydrolyse acide partielle de la fraction KM·Lys·ND, quatre types de complexes, dans lesquels le glucose intervient, ont été isolés (Tableau IV). Un premier complexe est un oligoglucose. Il n'a pas été retrouvé dans l'hydrolysate des acides téichoïques purifiés. Or, les dosages indiquent que 8.8 %, en poids, de la fraction KM·Lys·ND sont constituées par du glucose non associé au complexe téichoïque. Ce glucose extra-téichoïque forme donc probablement dans les parois un polyglucose qui par hydrolyse acide ménagée donne naissance à l'oligoglucose décelé dans les chromatogrammes. Dans les autres types de complexes, le glucose est associé soit avec de la N-acétylglucosamine, soit avec de l'acide N-acétylmuramique. Ceci suggère que des complexes de N-acétylglucosamine, de glucose et d'acide N-acétylmuramique existent, dans lesquelles le glucose occupe une position intermédiaire aux deux N-acétylhexosamines. Enfin, deux types de liaisons glucose-acide N-acétylmuramique semblent possibles. L'une, glycosidique, laisserait la fonction COOH libre. L'autre, ester, bloquerait cette fonction, rendant ainsi le complexe neutre à tout pH.

L'un et l'autre de ces complexes glucose-acide N-acétylmuramique ont été retrouvés après l'hydrolyse acide partielle des fragments téichoïques (débarrassés de leurs résidus mucopeptidiques par action des préparations F1 et F2B). Or, il est certain que par ce traitement, la majeure partie de l'acide N-acétylmuramique a été éliminée en même temps que les résidus: peptide-(AG-AAM) (Tableau III, Fig. 5). Il est donc difficile de préciser la nature de la liaison sensible à l'enzyme commun aux préparations F1 et F2B. Deux possibilités peuvent être envisagées. A chacune correspond un schéma structurel du complexe téichoïque-mucopeptide. Ces schémas sont donnés dans la Fig. 7. Ils ont été construits en admettant que le polyol est du ribitol et en se basant sur la teneur relative des divers constituants du complexe téichoïque-mucopeptide (Tableau III). Selon le schéma 1, l'enzyme serait une estérase ou une glycosidase active sur la liaison Gluc-(AAM-peptide). Dans ces conditions, acide N-acétylmuramique et peptide seraient unis par une liaison α amino ester ou amidique.

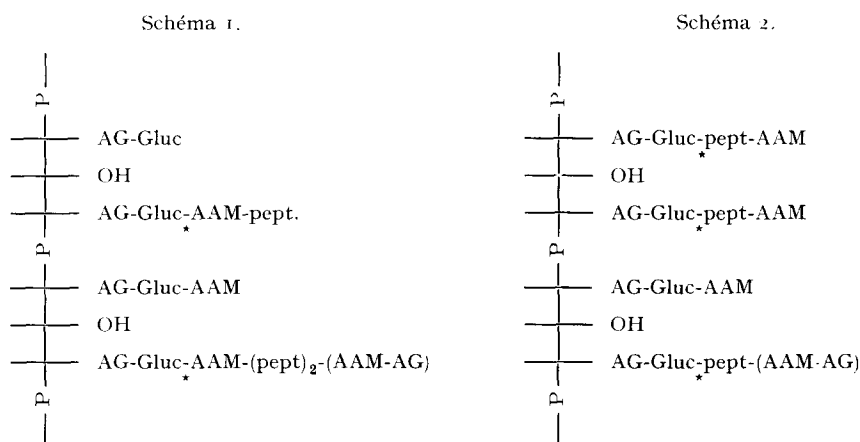


Fig. 7. Esquisses de la structure possible du complexe "acide téichoïque-mucopeptide" libéré des parois cellulaires de *B. megaterium* KM par traitement au lysozyme*.

Selon le schéma 2, l'enzyme serait une α -amino estérase active sur la liaison Gluc-peptide, celui-ci étant combiné, soit au disaccharide AG-AAM, soit à un reste N-acétylmuramique.

Dans l'un ou l'autre cas, la chaîne de phosphate de polyol porterait un petit nombre de résidus AG-Gluc-AAM. Ces résidus seraient insensibles à l'enzyme commun aux préparations F1 et F2B. Ils seraient responsables de la présence des disaccharides, neutre et acide, Gluc-AAM décelés dans l'hydrolysate acide partiel de la fraction KM. Lys·ND et des "fragments" téichoïques purifiés.

REMERCIEMENT

L'Auteur est Associé du Fonds National de la Recherche Scientifique de Belgique.

* Liaison sensible à un enzyme commun à F2B et à F1, mais distinct de l'amidase de F2B et de la N-acétylhexosaminidase de F1. Gluc, glucose; AG, N-acétylglucosamine; AAM, acide N-acétylmuramique; pept:acide glutamique; acide α,ϵ -diaminopimélique; alanine₂. La composition globale du complexe est P₁-ribitol-Gluc₂-AG₂-AAM_{1.5}-pept_{1.5}-AG-AAM_{0.5}.

RÉSUMÉ

Les phosphates de polyol présents dans une préparation de parois de *Bacillus megaterium* KM ne sont pas extraits par l'acide trichloracétique froid, contrairement aux acides téichoïques décrits par BADDILEY *et al.*

Ils ont été isolés par électrorhéophorèse de la fraction non dialysable obtenue après incubation des parois avec le lysozyme.

Leur analyse montre qu'ils sont combinés à des résidus mucopeptidiques. L'ensemble du complexe représente environ 40 % en poids des parois.

La dégradation de ce complexe par deux enzymes sécrétés par certains streptomycètes permet d'y distinguer trois fragments constitués de phosphate de polyol, glucose, N-acétylglucosamine (fragment téichoïque), d'acides aminés et d'acide N-acétylmuramique (fragment mucopeptidique), du dissaccharide: acide 6-O- β -N-acétylglucosaminyle-N-acétylmuramique (fragment représentant un reste d'une chaîne poly-N-acétylhexosaminique du mucopeptide de base de la paroi).

Le fragment téichoïque est libéré sous l'action des préparations, F1 ou F2B, d'exoenzymes de Streptomyces. Il peut être obtenu en incubant directement les parois par ces préparations. Le fragment disaccharidique est libéré sous l'action de l'amidase contenue dans la préparation F2B.

6 % environ, en poids, des parois sont constitués de glucose (probablement un polyglucose) étranger au complexe téichoïque-mucopeptide étudié.

L'acide N-acétylmuramique et divers oligosaccharides composés soit de N-acétylglucosamine soit de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique, donnent, sur papier, une coloration rose par la diphenylamine-trichloracétique qui permet de les différencier de la N-acétylglucosamine.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. BADDILEY, *Proc. Chem. Soc., London*, (1959) 177.
- ² J. J. ARMSTRONG, J. BADDILEY ET G. BUCHANAN, *Biochem. J.*, 76 (1960) 610.
- ³ M. R. J. SALTON ET R. W. HORNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 177.
- ⁴ J. M. GHUYSEN, *Arch. intern. physiol. et biochim.*, 65 (1957) 173.
- ⁵ J. M. GHUYSEN ET M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 462.
- ⁶ J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 473.
- ⁷ M. R. J. SALTON ET J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 45 (1960) 355.
- ⁸ J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.
- ⁹ S. M. PARTRIDGE ET R. G. WESTALL, *Biochem. J.*, 42 (1948) 238.
- ¹⁰ M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 308.
- ¹¹ L. HOUGH, J. K. N. JONES ET W. H. WADMAN, *J. Chem. Soc.*, (1950) 1702.
- ¹² J. G. BUCHANAN, C. A. DEKKER ET A. G. LONG, *J. Chem. Soc.*, (1950) 3162.
- ¹³ *Spinco Division Beckman Instrum., Inc.*, Palo Alto California, Technic. Bull. no TB 6046 B, April 1958.
- ¹⁴ M. R. J. SALTON ET J. G. PALVIK, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 398.
- ¹⁵ E. J. KING, *Biochem. J.*, 26 (1932) 292.
- ¹⁶ O. W. NEUHAUER ET M. LETZRING, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1230.
- ¹⁷ J. L. REISSIG, J. L. STROMINGER ET L. F. LELOIR, *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 1959.
- ¹⁸ N. H. WILSON ET W. C. HUGHES, *J. Soc. Chem. Ind., Japan*, 58 (1939) 74.
- ¹⁹ E. A. MCCOMB ET R. M. MCCREADY, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 819.
- ²⁰ M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.