

BBA 3786

STRUCTURE DES PAROIS DE *BACILLUS MEGATERIUM* KM.II. ÉTUDE DES COMPLEXES MUCOPEPTIDIQUE ET PHOSPHO-  
MUCOPOLYSACCHARIDIQUE

J. M. GHUYSEN\*, MELINA LEYH-BOUILLE\* ET L. DIERICKX\*\*

*Service de Bactériologie\* et Centre National de Production et d'Etude des Substances  
d'origine microbienne\*\*, Université de Liège, Liège (Belgique)*

(Reçu le 25 avril, 1962)

## SUMMARY

*Structure of the cell walls of Bacillus megaterium KM.**II. Study of the mucopeptide and phosphomucopolysaccharide complexes*

*Bacillus megaterium* KM cell walls are composed of two distinct heteropolymers.

The first, referred as to X-teichoic acid, presents a molecular weight of about 11000. It consists of about 10 subunits containing P, glucose and GlcNHAc in the molar ratio 1/2/1.3 as well as a polyol compound. It does not play any role in maintaining the rigidity of the wall.

The second can be visualized as a three-dimensional network of structural subunits consisting of four mucopeptide residues with an average composition GlcNHAc<sub>1</sub>-(N-acetylmuramic acid)<sub>1</sub>-Ala<sub>2.20</sub>-Glu<sub>1</sub>-( $\alpha,\epsilon$ -diaminopimelic acid)<sub>1</sub>. They also contain glucose. This mucopeptide is the basal structure of the wall.

The two heteropolymers are present in equimolar proportions. They are covalently bound through glucosido-muraminy bridges branched on some of the alanine residues of the basal mucopeptide thanks to amidic linkages.

## INTRODUCTION

Des recherches antérieures<sup>1</sup> ont montré que les parois de *Bacillus megaterium* KM sont constituées par l'association de deux hétéropolymères chimiquement très différents: le premier est un complexe phosphomucopolysaccharidique (PMS); le deuxième est le complexe mucopeptidique présent dans toute paroi cellulaire bactérienne et souvent désigné, depuis la suggestion de WORK<sup>2</sup>, sous le nom de mucopeptide de base.

Le complexe PMS et les acides teichoïques que BADDILEY *et al.*<sup>3-5</sup> extraient par l'acide trichloracétique de parois d'autres bactéries gram-positives présentent beaucoup de propriétés communes. Le complexe PMS n'est cependant pas extractible par l'acide trichloracétique froid (10%; 4°; 3 jours). Il a été démontré<sup>1</sup> qu'il est covalentiellement associé au mucopeptide de base.

Abréviations: AAM, acide N-acétylmuramique; DAP, acide  $\alpha,\epsilon$  diaminopimélique; PMS, complexe phosphomucopolysaccharidique.

Dans ce travail, la structure des deux complexes constitutifs de la paroi de *B. megaterium* KM et leur mode d'association ont été précisés.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### *Parois de B. megaterium* KM

Voir l'article précédent<sup>6</sup>.

##### *Extraction du complexe PMS*

Le complexe PMS peut être extrait des parois bactériennes par procédé enzymatique ou par procédé chimique.

*Procédé enzymatique:* Le lysozyme, la *N*-acétylhexosaminidase de *Streptomyces*<sup>7</sup> et l'enzyme "32" (voir réf. 6) libèrent le complexe PMS en même temps qu'ils dissolvent les parois de *B. megaterium* KM (incubation 24 h, 37°, *I* 0.005 pour l'enzyme "32"; *I* compris entre 0.01 et 0.1 pour les hexosaminidases; tampon phosphate pH 7 ou acétate d'ammonium). Le complexe PMS peut être isolé du produit de la digestion par dialyse et électrophorèse sur papier de la fraction non-dialysable (condition d'électrophorèse: voir réf. 6, Fig. 1). Le complexe PMS occupe la zone A des électrophorogrammes. Il est très facilement révélablé par le réactif de Schiff après oxydation periodique.

*Procédé chimique:* 1 g de parois est traité pendant 20 min à 150° par 40 ml de formamide. Après refroidissement et addition de 40 ml d'eau, la suspension est centrifugée et le culot lavé deux fois à l'eau et séché sous vide. Le liquide surnageant et les eaux de lavage sont réunis et additionnés de 300 ml d'alcool. Un précipité blanchâtre apparaît et, après un séjour de 24 h à 4°, est recueilli par centrifugation, lavé à l'alcool et séché sous vide. Il est constitué par le complexe PMS qui est ultérieurement purifié par électrophorèse sur papier (voir procédé enzymatique).

##### *Composition chimique du complexe PMS*

Des aliquots, hydrolysés par HCl 6 *N*, 18 h, 100° ont été chromatographiés selon deux dimensions, en pyridine-eau (8:2, v/v) puis en *n* butanol-acide acétique-eau (3:1:1, v/v/v). Les acides aminés ont été dosés et la proportion relative GlcNHAc/AAM a été déterminée par révélation des chromatogrammes à la ninhydrine, extraction des taches dans le mélange acétone-eau (3:1, v/v) et détermination des absorbances à 570 m $\mu$ .

Les hexosamines ont été dosées par le procédé de NEUHAUER ET LETZRING<sup>8</sup> sur des aliquots également hydrolysés par HCl 6 *N*, 18 h, 100°. (Des hydrolyses de 18 h à 100° par HCl 2 *N* et 4 *N* libèrent du complexe extrait par la formamide des quantités d'hexosamines inférieures à celle libérée par HCl 6 *N*.) Les quantités respectives de glucosamine et d'acide muramique (exprimées en GlcNHAc et AAM) ont été calculées en se basant sur la proportion trouvée par extraction des taches ninhydrine-positives correspondantes des chromatogrammes et en utilisant un rapport  $A_{\text{glucosamine}}/A_{\text{acide muramique}}$  de 2.30 pour la réaction de coloration des hexosamines<sup>9</sup>.

Les acides aminés ont également été dosés par dinitrophénylation après hydrolyse par HCl 6 *N*, 18 h, 100° et les groupes C et N terminaux par les procédés déjà décrits (voir réf. 6).

Le glucose a été dosé par la glucose-oxydase après hydrolyse par HCl 2 *N*, 100°, 3 h (une hydrolyse de 5 h ne modifie pas la quantité de glucose libéré; après des hydro-

lyses plus prolongées, la quantité de glucose libre est moindre) ou par  $H_2SO_4$  0.5 N, 18 h, 100° ou encore, directement, par application de la réaction à la diphénylamine<sup>4</sup>.

Le phosphore a été dosé par le procédé de KING<sup>11</sup> après minéralisation perchlorique.

#### Ultracentrifugation du complexe PMS

Les ultracentrifugations ont été réalisées à la Spinco analytique à l'aide de la "synthetic boundary cell".

### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

#### Extraction du complexe PMS

La formamide extrait 42 %, poids sec, des parois bactériennes et 86 % du phosphore qu'elles contiennent. Le traitement à l'alcool de l'extrait précipite 75 % du phosphore solubilisé. Le rendement total en phosphore récupéré est de 65 % de la quantité initialement présente dans les parois. Extrait par la formamide, le complexe PMS n'est pas coloré, sur papier, par la ninhydrine. L'examen au microscope à contraste de phase du résidu de l'extraction montre la présence de structures de forme identique à celle des parois non traitées.

TABLEAU I

SENSIBILITÉ À LA NINHYDRINE DES COMPLEXES PMS EXTRAITS DES PAROIS DE *Bacillus megaterium* KM

| Mode de préparation  | Sensibilité |
|----------------------|-------------|
| Chimique (formamide) | o           |
| Enzymatique          |             |
| Préparation F2B      | o           |
| Lysozyme             | +           |
| Enzyme "32"          | ++          |

Le complexe PMS isolé du produit de la digestion enzymatique des parois bactériennes représente environ 40 % du poids de celles-ci. La sensibilité du complexe PMS à la ninhydrine varie selon la nature de l'enzyme utilisé (Tableau I). Outre les trois enzymes purs proposés dans MATÉRIEL ET MÉTHODES pour la dissolution des parois, on peut également utiliser la préparation F2B (voir réf. 6). La sensibilité à la ninhydrine du complexe PMS obtenu par l'intermédiaire de F2B est très faible ou même nulle si l'incubation est réalisée en présence de quantités suffisantes de F2B (24 h).

Tout le phosphore des parois de *B. megaterium* KM est engagé dans le complexe PMS. En effet, les parois extraites par la formamide contiennent encore 14 % du P présent dans les parois intactes. Ce P résiduel a été retrouvé sous forme de complexe PMS par électrophorèse sur papier du produit de la digestion par F2B des parois extraites par la formamide.

#### Composition chimique du complexe PMS (Tableau II)

Extrait par la formamide, le complexe PMS est constitué de P (1), de GlcNHAc (1.3) et de glucose (2.1). Il ne contient ni AAM ni acides aminés.

TABLEAU II

COMPOSITION CHIMIQUE DES PAROIS CELLULAIRES DE *Bacillus megaterium* KM

|                            | Complexes PMS    |                  |          |                                    | Mucopeptides | Complexes PMS* (1961) |          |
|----------------------------|------------------|------------------|----------|------------------------------------|--------------|-----------------------|----------|
|                            | Mode d'obtention |                  |          |                                    |              |                       |          |
|                            | Formamide        | F <sub>2</sub> B | Lysozyme | Enzyme "32"                        | Lysozyme     | F <sub>2</sub> B      | Lysozyme |
| P                          | 1                | 1                | 1        |                                    | 0            | 1                     | 1        |
| GlcNHAc                    | 1.31             | 1.39             | 1.34     | Fortement sensible à la ninhydrine | 1            | 1.67                  | 2.31     |
| AAM                        | 0                | 0.35             | 0.32     |                                    | 1            | 0.15                  | 1.80     |
| Glucose:                   |                  |                  |          |                                    |              |                       |          |
| Glucostat                  | 2.07             | 1.53             | 1.48     |                                    | 0.1          | 1.52                  | 1.50     |
| Diphénylamine              | 2.09             | 2.42             | 2.50     |                                    | 0.34         | ?                     | ?        |
| DAP                        | 0                | 0                | 0.18     |                                    | 1.1          | 0.10                  | 1.60     |
| Glu                        | trace            | trace            | 0.18     |                                    | 1            | 0.10                  | 1.60     |
| Ala                        | trace            | trace            | 0.39     |                                    | 2.20         | 0.21                  | 2.85     |
| Fonctions acides de pK < 2 |                  | +                |          |                                    |              |                       |          |

\* Valeurs reprises du Tableau III, réf. 1.

Isolé après digestion des parois par F<sub>2</sub>B, le complexe PMS contient en plus de l'AAM. La teneur en glucose est augmentée. On ne décèle que des traces d'acides aminés.

Isolé après digestion de parois par le lysozyme, le complexe PMS a une composition chimique proche de celle du précédent. Il contient cependant en plus des résidus peptidiques de composition moyenne DAP 1; Glu 1; Ala 2.20. La proportion P/peptide est égale à 1/0.18.

Isolé après digestion des parois par l'enzyme "32", le complexe PMS n'a pas été analysé. Sa forte sensibilité à la ninhydrine (réf. 6, Fig. 1c) témoigne de l'existence d'une proportion élevée de résidus peptidiques.

L'estimation de la teneur en glucose n'est indépendante du procédé de dosage que dans le cas du complexe PMS extrait à la formamide. Il est vraisemblable que, dans ce cas, la proportion glucose/P égale à 2.08 soit exacte. Dans les autres cas, la méthode à la glucose-oxydase donne des résultats inférieurs, non seulement à ceux obtenus par la diphénylamine, mais même à ceux obtenus par la glucose-oxydase à partir du complexe PMS extrait par la formamide. Il a été démontré<sup>1</sup> que l'hydrolyse acide qui précède le test enzymatique ne libère pas tout le glucose et que celui-ci reste partiellement engagé dans divers complexes isolables par chromatographie. Le dosage du glucose par la diphénylamine donne des résultats certainement plus exacts quoique entachés probablement eux aussi d'un certain déficit. En effet, 1 mg de paroi contient 13.5 µg de P et, d'après la méthode à la diphénylamine, 118 µg de glucose. Comme tout le P des parois est engagé dans le complexe PMS extrait par la formamide, 1 mg de paroi devrait contenir au minimum 160 µg de glucose.

#### Présence d'un polyol dans le complexe PMS

Après hydrolyse acide ménagée (2 mg/ml; HCl 2 N; 15 min; 100°) des complexes PMS, on peut séparer par électrophorèse sur papier (20 V/cm; 3 h; pH 5.5; acide-acétique-pyridine-eau (2:4:1000, v/v/v); départ près de la cathode) un composé chargé très négativement (migration: 31 cm vers l'anode) sensible au Schiff après

oxydation périodique, mais insensible à la ninhydrine, à la diphenylamine-acide trichloracétique<sup>1</sup> et à la *p*-diméthylbenzaldehyde<sup>10</sup>. Après élution de la bande (non-révélee) correspondante de l'électrophoréogramme, on constate que ce composé renferme 45 % du P contenu dans le complexe PMS soumis à l'hydrolyse. Chromatographié en butanol acétique, il se déplace de façon homogène avec un  $R_F$  de 0.13 (voir réf. 1). Soumis aux tests chimiques décrits dans MATÉRIEL ET MÉTHODES, il ne révèle ni glucose, ni hexosamines, ni acides aminés. Par contre, il donne un test d'Hestrin positif après acétylation en pyridine<sup>1</sup>. Le P du complexe PMS est donc combiné à une substance présentant les propriétés des polyols (réaction d'Hestrin après acétylation et réaction de Schiff après oxydation périodique). Sa nature exacte reste à préciser.

#### Electrophorèse du complexe PMS à pH 2.2

Le complexe PMS (extrait par F2B) et du ribitol ont été soumis à une électrophorèse sur papier en acide formique 0.1 N, 4 h en utilisant la technique déjà décrite<sup>1</sup> qui consiste à pratiquer le dépôt le long d'une diagonale de l'électrophoréogramme. La position d'équilibre du complexe PMS a été trouvée distante de 18 cm, en direction de l'anode, de celle du ribitol utilisé comme substance neutre standard. Le complexe PMS contient donc des fonctions acides encore fortement ionisées à pH 2.

#### Poids moléculaire du complexe PMS

L'ultracentrifugation du complexe PMS (obtenu au moyen de F2B) donne des "pics" homogènes et symétriques (Fig. 1) et un coefficient de sédimentation  $s_{20}^0 = 1.80$  S. En combinant cette valeur avec une estimation grossière de la constante de diffusion (calculée à partir des images d'ultracentrifugation; valeur comprise entre 10 et  $17 \cdot 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/sec), on obtient un poids moléculaire compris entre 10 000 et 15 000.

Ce complexe PMS a un poids moléculaire minimum de 1292 (en effet, 1292  $\mu$ g poids sec, renferment 31  $\mu$ g de P) et serait donc constitué d'environ 10 sous-unités.

La somme du contenu de ce complexe PMS en phosphore (compté comme H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), en GlcNHAc, en AAM et en glucose (d'après le procédé à la diphenylamine) ne représente qu'environ 70% du poids total. Le déficit s'explique par la présence du polyol

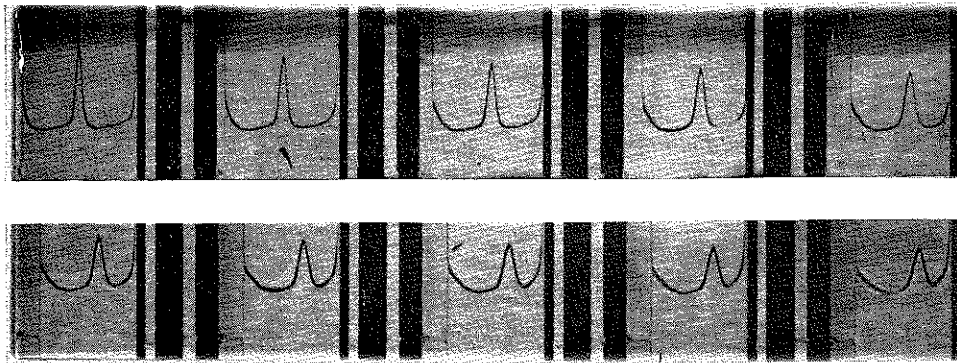


Fig. 1. Ultracentrifugation du complexe PMS isolé après digestion des parois de *Bacillus megaterium* KM par la préparation F2B. Concentration 0.5% (p/v); température 18–20°; rev./min: 59 780; tampon acide citrique-citrate sodique 0.1 M, pH 6; photos à intervalle de 4 minutes.  $s_{20}^0$ : à 0.5%:1.06; à 0.25%:1.345;  $s_{20}^0$ :1.80.

directement combiné au phosphore (et non-dosé), par une sous estimation éventuelle des teneurs en glucose et en *N*-acétylhexosamines (destruction partielle lors de l'hydrolyse).

En soustrayant du poids de ce complexe PMS son contenu en AAM ainsi que la quantité de glucose qu'il contient en excès par rapport à celle du complexe PMS extrait par la formamide, le poids moléculaire minimum de ce dernier est trouvé égal à environ 11000.

TABLEAU III

CARACTÉRISTIQUES DU COMPLEXE MUCOPEPTIDIQUE DES PAROIS DE *Bacillus megaterium* KM  
Valeur absolue,  $\mu$ moles/g, des groupes C terminaux DAP. Parois: 250; KM.Lys.ND: 172; PMS: 63;  
PMS (1961): 149.

| Substrats*   | Acides aminés totaux |           |        | Groupes C terminaux |       | Groupes N terminaux |       |
|--------------|----------------------|-----------|--------|---------------------|-------|---------------------|-------|
|              | DAP                  | Glu       | Ala    | DAP                 | Ala   | <i>e</i> -DAP       | Ala** |
| Parois       | 18                   | 19        | 36     | 10                  | 4.3   | 9.2                 | —     |
| KM.Lys.ND    |                      | non dosés |        | (10)                | (3)   | (10.5)              | (4.3) |
| Mucopeptides | (1.1)                | (1)       | (2.20) | non dosés           |       | non dosés           |       |
| PMS          | 17                   | 17        | 36     | 10                  | 4.4   | 7                   | 6     |
| Peptide      | (1)                  | (1)       | (2.28) | non dosés           |       | non dosés           |       |
| PMS (1961)   |                      | non dosés |        | (10)                | (3.8) | (10.2)              | (7)   |
| Moyenne      | 17.5                 | 17        | 36     | 10                  | 3.85  | 9.2                 | 5.7   |

\* Pour la signification des substrats: voir texte.

\*\* Libéré après incubation avec l'amidase. Avant traitement par cet enzyme, aucun groupe N Ala terminal n'est décelable.

#### Composition chimique du mucopeptide de base (Tableau II)

La zone B de l'électrophorogramme (réf. 6, Fig. 1a) de la fraction non-dialysable des parois de *B. megaterium* KM digérées par le lysozyme, est occupée par divers complexes mucopeptidiques dépourvus de P. L'ensemble de ces complexes présente une composition chimique moyenne qui est celle habituellement caractéristique du "mucopeptide de base". En particulier, la proportion GlcNHAc/AAM est égale à 1. Ces complexes contiennent également du glucose dont la teneur est donnée avec les mêmes réserves que précédemment.

#### Composition chimique du complexe PMS isolé après digestion enzymatique de la préparation 1961 des parois de *B. megaterium* KM (Tableau II)

Les valeurs sont reprises du Tableau III, réf. 1. Isolé après digestion des parois par F2B, le complexe PMS présente une proportion P-glucose-GlcNHAc-AAM assez semblable à celle du complexe PMS correspondant, étudié au cours du présent travail.

Au contraire, isolé après digestion des parois par le lysozyme, le complexe PMS (1961) reste associé à de très nombreux résidus mucopeptidiques.

#### Sensibilité enzymatique des complexes PMS obtenus par action du lysozyme

Le complexe PMS (1961) est sensible à l'amidase et à l'enzyme "32" (réf. 6, Fig. 8). Le complexe PMS préparé au cours des présentes recherches est insensible à

l'enzyme "32" mais est sensible à l'amidase (réf. 6, Fig. 4). Le matériel peptidique dissocié dans ces conditions et récupéré de la zone centrale de l'électrophoréogramme (réf. 6, Fig. 4, voir la remarque) donne par chromatographie en butanol acétique une tache unique mais de  $R_F$  nul.

*Caractéristiques du complexe mucopeptidique des parois de B. megaterium KM*

Aussi souvent que possible, les groupes C et N terminaux et les acides aminés totaux ont été dosés à partir (1) des parois intactes; (2) de la fraction non-dialysable obtenue par digestion des parois au moyen du lysozyme (KM.Lys.ND); (3) des complexes mucopeptidiques (zone B des électrophoréogrammes, réf. 6, Fig. 1 a et b) isolés de cette fraction); (4) du complexe PMS (zone A des électrophoréogrammes, réf. 6, Fig. 1 a et b) isolé de la même fraction); (5) du complexe peptidique séparé du complexe PMS précédent sous l'action de l'amidase; (6) du complexe PMS isolé de la fraction non-dialysable obtenu par digestion des parois 1961 au moyen du lysozyme (KM.Lys.ND) (1961). Les résultats sont consignés dans le Tableau III

DISCUSSION

*Le complexe phosphomucopolysaccharidique*

Après extraction du complexe PMS des parois de *B. megaterium* KM par la formamide chaude, le résidu, examiné au microscope à contraste de phase, présente une structure identique à celle des parois non-traitées. Le complexe PMS ne participe donc pas à la rigidité des parois bactériennes et ne leur confère pas leur forme particulière. Le complexe PMS est fortement acide (présence de fonctions acides ionisées à pH 2). Il a un poids moléculaire d'environ 11000 et est constitué d'environ 10 sous-unités contenant du P, du glucose et de la GlcNHAc dans les proportions molaires 1/2/1,30. Il renferme également une substance encore indéterminée mais présentant certaines propriétés chimiques des polyols. La formule chimique globale du complexe PMS serait:



Ces propriétés assimilent donc le complexe PMS des parois de *B. megaterium* KM aux acides ribitol teichoïques et glycérol teichoïques de BADDILEY. En attendant que la nature du polyol soit élucidée, il sera dénommé acide X-teichoïque.

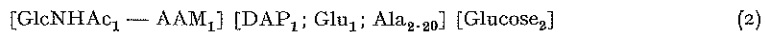
L'acide X-teichoïque n'est pas extrait des parois bactériennes par l'acide trichloracétique froid (3 jours, 4°, 10 %) quoique après son isolement (par la formamide ou par traitement enzymatique) il soit totalement soluble dans ce milieu. L'acide X-teichoïque est covalentiellement associé à la structure de base des parois. En effet, après digestion enzymatique de cette structure de base et, par voie de conséquence, après dissolution de la paroi, l'acide X-teichoïque peut être isolé. On le retrouve alors associé à des fragments de la structure de base, en quantités variables selon la nature de l'enzyme utilisé.

Il semble que dans certains cas, les acides glycérol et ribitol teichoïques soient également associés covalentiellement à la structure de base. Ce serait en particulier le cas de l'acide ribitol teichoïque des parois de *Staphylococcus aureus* Copenhagen<sup>12</sup>. De plus, un traitement prolongé à l'acide trichloracétique est parfois nécessaire pour

extraire ces acides teichoïques et il a été démontré par SALTON<sup>13</sup> que ces conditions sont hydrolytiques.

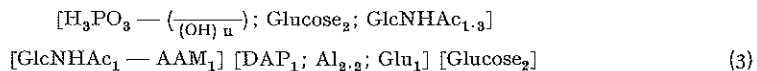
#### *Le complexe mucopeptidique de base*

Les complexes mucopeptidiques non associés à l'acide X-teichoïque et isolés de la fraction non-dialysable des parois digérées par le lysozyme, présentent une composition chimique moyenne égale à :



Ces proportions molaires des trois acides aminés ont été retrouvées à partir (1) des parois intactes; (2) du complexe PMS obtenu par l'action du lysozyme; (3) du peptide isolé du complexe PMS précédent sous l'action de l'amidase (Tableau III). Il semble donc que la Formule 2 puisse être considérée comme étant caractéristique d'une sous-unité structurale minimale. Celle-ci contient du glucose autre que celui présent dans l'acide X-teichoïque. La présence de glucose dans le mucopeptide de base n'est pas particulière aux parois de *B. megaterium* KM. Il entre peut-être dans la constitution du mucopeptide de la couche R des parois d'*Escherichia coli*<sup>14</sup>. Il semble bien faire partie aussi du mucopeptide des parois de *Micrococcus lysodeikticus*<sup>15</sup>.

2300 g de parois intactes renferment 31 g (ou 1 mol) de P et par conséquent environ 1100 g (c'est à dire 1 mole) d'acide X-teichoïque. Il est remarquable que les 1200 g restant coïncident presque parfaitement avec le poids moléculaire (1137) de la sous-unité de la Formule 2 pour laquelle on admettrait une proportion molaire en glucose égale à 1 (ce qui paraît bien être un maximum). Une sous-unité structurale minimale de l'ensemble de la paroi de *B. megaterium* KM aurait donc un poids moléculaire de 2300 environ et serait représentée par :



Une proportion équimoléculaire entre les deux hétéropolymères constitutifs des parois de *B. megaterium* KM est en bon accord avec la quantité d'acide X-teichoïque extrait (environ 40 %) et avec le contenu des parois en acides aminés totaux (valeurs théoriques en  $\mu\text{moles/g}$ : 435 DAP; 435 Glu; 980 Ala; valeurs expérimentales: 450 DAP; 480 Glu; 900 Ala).

La Formule 3 ne permet cependant pas d'expliquer la proportion expérimentalement trouvée entre les acides aminés totaux et les groupes C et N terminaux (Tableau III). D'après ces résultats, en effet, les fonctions COOH de 57 % du DAP total et de 11 % de l'alanine totale ainsi que les fonctions  $\varepsilon\text{-NH}_2$  de 52 % du DAP total sont libres. Des caractéristiques proches de ces dernières peuvent être retrouvées à partir d'une unité structurale telle que celle représentée par la Fig. 2 et obtenue par l'association de 4 sous-unités de Formule 2. Dans une telle unité structurale, les fonctions COOH de 50 % du DAP total et de 11 % de l'alanine totale ainsi que les fonctions  $\varepsilon\text{-NH}_2$  de 50 % du DAP total sont libres.

Dépourvu de tout résidu saccharidique, l'unité structurale de la Fig. 2 présente un rapport fonctions COOH/fonctions  $\text{NH}_2$  égal à 9/5. Or les divers fragments mucopeptidiques présents dans la fraction non-dialysable obtenue après digestion des parois



par le lysozyme, donnent, après traitement par l'amidase, un même complexe apparemment homogène et encore acide à pH 4 (réf. 6, Figs. 4 et 5; voir aussi texte). Le caractère plus acide des complexes mucopeptidiques non-traités par l'amidase résulterait du blocage des fonctions  $\alpha\text{-NH}_2\text{-Ala}$  par des résidus saccharidiques eux-mêmes éventuellement porteurs de fonctions COOH libres.

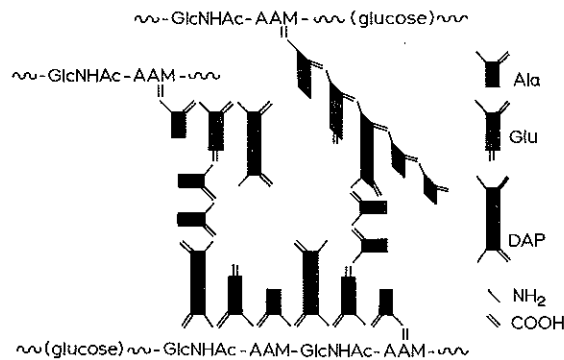


Fig. 2. Unité structurale des parois de *Bacillus megaterium* KM. Ala et Glu sont arbitrairement représentés sous leur forme L. DAP est arbitrairement représenté sous la forme méso. Pour certaines unités structurales, 1 ou 2 résidus saccharidiques sont remplacés par des ponts glucosido-muraminyles assurant la liaison avec l'acide X-teichoïque.

L'unité structurale de la Fig. 2 a un poids moléculaire d'environ 4500. Or, les fragments mucopeptidiques, hormis ceux associés à l'acide X-teichoïque, résultant de la digestion enzymatique des parois doivent avoir un poids moléculaire de quelques milliers (moins de 10000). En effet, ils ont la propriété de se distribuer par dialyse dans les deux fractions, dialysables et non-dialysables (réf. 6, Fig. 1).

La séquence des acides aminés de l'unité structurale de la Fig. 2 est différente de celle trouvée dans les précurseurs des parois d'*Escherichia coli*<sup>16</sup> (AAM-Ala-Glu-DAP-Ala-Ala) et de *Staphylococcus aureus*<sup>17</sup> (AAM-Ala-Glu-Lys-Ala-Ala). L'étude par SALTON<sup>18</sup> de la fréquence des groupes C et N terminaux présents dans 15 types de parois cellulaires bactériennes, montre que les parois de *B. megaterium* constituent un cas assez exceptionnel caractérisé par la présence de quantités fort élevées de groupes C terminaux DAP.

#### Mode d'association entre l'acide X-teichoïque et le mucopeptide de base

La composition chimique des acides X-teichoïques obtenus, d'une part, par extraction à la formamide et, d'autre part, par digestion enzymatique des parois bactériennes (Tableau II), montre que l'acide X-teichoïque et le mucopeptide de base sont associés par des ponts constitués de glucose et d'AAM. La nature de la liaison entre l'acide X-teichoïque et les ponts glucosido-muraminyles est encore inconnue. Elle est hydrolysée par la formamide à 150°. D'autre part, la liaison entre ces ponts et le mucopeptide de base est une liaison amidique entre le COOH de l'AAM du pont et un  $\alpha\text{-NH}_2$  alanine du mucopeptide. Elle est sensible à l'amidase de *Streptomyces*.

La teneur en acides aminés de l'acide X-teichoïque obtenu par action du lysozyme (Tableau II) montre que 22 P (soit approximativement 2 moles d'acide X-teichoïque)

sont associés à 1 unité structurelle à 4 résidus peptidiques du type de la Fig. 2. Une seule fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> alanine resterait donc disponible pour unir l'ensemble de ce complexe au mucopeptide de base. Ainsi, quoique les deux hétéropolymères soient présents dans les parois de *B. megaterium* KM en proportion équimoléculaire, certaines unités structurelles à 4 résidus peptidiques seraient associées à plus d'acide X-teichoïque que d'autres. Ce type de structure laisse entrevoir l'existence, à d'autres endroits du mucopeptide, de segments oligosaccharidiques (GlcNHAc-AAM) importants, non associés à des résidus peptidiques. Il permet ainsi d'interpréter la libération, sous l'action du lysozyme, d'unités disaccharidiques GlcNHAc $\beta$ 1-6AAM (voir réf. 6).

#### *Structure des troncs polysaccharidiques du mucopeptide de base*

Selon l'enzyme utilisé pour la digestion des troncs polysaccharidiques des parois de *B. megaterium* KM et selon la préparation de ces parois, l'acide X-teichoïque isolé est associé à des quantités plus ou moins importantes de résidus mucopeptidiques. Ceci indique que la fréquence et/ou la localisation des liaisons sensibles à chacun des enzymes est très différente dans une préparation de parois donnée et peut varier d'une préparation à l'autre. La structure fine des troncs polysaccharidiques est donc beaucoup moins simple que ne le laissait prévoir l'étude de ses produits de dégradation aux dépens des parois de *Micrococcus lysodeikticus*<sup>18,19</sup>. Il est évident qu'une répétition de GlcNHAc et d'AAM alternativement réunis par des liaisons  $\beta$ 1  $\rightarrow$  4 et  $\beta$ 1  $\rightarrow$  6 n'est présente que dans des segments limités des troncs polysaccharidiques. De plus, aucune donnée expérimentale ne permet encore de prévoir comment le glucose s'intègre dans cette structure.

#### REMERCIEMENT

Nous remercions le Dr. H. DIEU pour l'aide qu'il nous a apportée dans la détermination des constantes de sédimentation et de diffusion.

#### RÉSUMÉ

Les parois de *Bacillus megaterium* KM sont constituées de deux hétéropolymères distincts.

Le premier, dénommé acide X-teichoïque, a un poids moléculaire voisin de 11000. Il est constitué d'environ 10 sous-unités contenant du P, du glucose et de la GlcNHAc dans les proportions 1/2/1,3, ainsi qu'un polyol encore non précisé. Il ne participe pas à la rigidité de la paroi.

Le second apparaît comme un réseau tridimensionnel formé d'unités structurelles contenant quatre résidus mucopeptidiques de composition moyenne GlcNHAc<sub>1</sub>-AAM<sub>1</sub>-Al<sub>2,20</sub>-Glu<sub>1</sub>-DAP<sub>1</sub>. Ils renferment également du glucose. Ce mucopeptide constitue la structure de base de la paroi.

Les deux hétéropolymères sont présents en quantités équimoléculaires. Ils sont associés covalentiellement par l'intermédiaire de ponts glucosido-muraminyles dont l'union à certains résidus peptidiques du mucopeptide de base est réalisée par une liaison amidique.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1961) 413.
- <sup>2</sup> E. WORK, *Nature* 179 (1957) 841.
- <sup>3</sup> J. J. ARMSTRONG, J. BADDILEY AND J. G. BUCHANAN, *Biochem. J.*, 80 (1961) 254.
- <sup>4</sup> M. V. KELEMEN AND J. BADDILEY, *Biochem. J.*, 80 (1961) 246.
- <sup>5</sup> A. R. ARCHIBALD, J. BADDILEY ET J. G. BUCHANAN, *Biochem. J.* 81 (1961) 124.
- <sup>6</sup> J. M. GHUYSEN, M. LEYH-BOUILLE ET L. DIERICKX, *Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 286.
- <sup>7</sup> L. DIERICKX ET J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 58 (1962) 7.
- <sup>8</sup> O. W. NEUHAUER ET M. LETZRING, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1230.
- <sup>9</sup> J. M. GHUYSEN ET M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 462.
- <sup>10</sup> M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 308.
- <sup>11</sup> E. J. KING, *Biochem. J.*, 26 (1932), 292.
- <sup>12</sup> M. H. MANDELSTAM ET J. L. STROMINGER, *Biochem. Biophys. Research Commun.*, 5 (1961) 466.
- <sup>13</sup> M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 329.
- <sup>14</sup> J. PRIMOSIGH, H. PELZER, D. MAAS ET W. WEIDEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 46 (1960) 68.
- <sup>15</sup> L. COLOBERT ET G. DIRHEIMER, *Biochim. Biophys. Acta*, 54 (1961) 455.
- <sup>16</sup> J. L. STROMINGER, *Physiol. Revs.* 40 (1960) 55.
- <sup>17</sup> J. L. STROMINGER ET R. H. THRENN, *Biochim. Biophys. Acta*, 33 (1959) 280.
- <sup>18</sup> M. R. J. SALTON ET J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 45 (1960) 355.
- <sup>19</sup> J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 47 (1961) 561.

*Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 297-307

BBA 3689

## THE STRUCTURE OF CHITIN

G. N. RAMACHANDRAN AND C. RAMAKRISHNAN

*Department of Physics, University of Madras, Guindy, Madras (India)*

(Received January 24th, 1962)

## SUMMARY

The structure factors for the various reflections of  $\alpha$ -chitin have been calculated for both the structures of CARLSTRÖM and of DWELTZ. Comparison with observation does not indicate the definite superiority of one over the other, although CARLSTRÖM's structure seems to be better from stereochemical considerations.

## INTRODUCTION

In a recent communication, CARLSTRÖM has criticized the structures of  $\alpha$ -chitin and  $\beta$ -chitin proposed from this laboratory by DWELTZ<sup>2,3</sup>. The main criticism is that the polysaccharide chain configuration is stereochemically unsatisfactory and that it is necessary to buckle the chain, as in the structure of cellobiose<sup>4</sup>, in order to avoid certain short contacts, in particular the H...H contact between the hydrogen atoms attached to the carbon atoms adjacent to the bridge oxygen (Fig. 1a of CARLSTRÖM's paper).

*Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 307-309