

STRUCTURE DES PAROIS DE *BACILLUS MEGATERIUM* KMI. ISOLEMENT DE L'AMIDASE ET D'UN ENZYME NOUVEAU SÉCRÉTÉS
PAR *STREPTOMYCES ALBUS* G ET ACTIFS SUR LES PAROIS
DE *BACILLUS MEGATERIUM* KM ET DE *MICROCOCCUS*
LYSODEIKTICUS

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 (Belgique)

(Reçu le 25 avril, 1962)

SUMMARY

*Structure of the cell walls of Bacillus megaterium KM**I. Isolation of amidase and of a newly found enzyme of Streptomyces albus G, working on the cell walls of Bacillus megaterium KM and Micrococcus lysodeikticus*

The *Streptomyces albus* G enzymic complex of the F2B preparation has been fractionated by zone electrophoresis in sucrose gradient. Five enzymes have been shown to be present and three of them have been fully separated. Three distinct enzymes make the casein no further precipitable by the trichloroacetic acid. They are likely not to have any action on *Bacillus megaterium* KM and on *Micrococcus lysodeikticus* cell walls. A fourth enzyme is the amidase previously studied which splits the muraminy-alanine linkages present in the bacterial walls. The amidase does not clarify by itself the wall suspensions so far examined but enhances the lytic activity of a fifth enzyme also present in the F2B preparation. As lysozyme and *Streptomyces* *N*-acetylhexosaminidase, this fifth enzyme seems to act at the level of the polysaccharide residues of the walls basal mucopeptide but, contrary to those enzymes, its hydrolyzing action does not induce the liberation of free oligosaccharides from *Micrococcus lysodeikticus* walls. This enzyme will be referred to as Enzyme "32".

INTRODUCTION

Le complexe enzymatique sécrété par *Streptomyces albus* G et actif sur certaines parois cellulaires bactériennes a d'abord été fractionné par adsorption sur Amberlite IRC-50 (voir refs. 1, 2). La fraction F1 ainsi obtenue contient principalement une *N*-acetylhexosaminidase. Cet enzyme a été, par après, complètement purifié par électrophorèse de zone en gradient de sucrose³. Une seconde fraction, F2B, est dépourvue de la *N*-acetylhexosaminidase présente dans F1, mais renferme une amidase active sur la

Abréviations: AAM, acide *N*-acétylmuramique; DAP, acide α,ϵ -diaminopimélique.

liaison muraminylo-alanine des complexes disaccharide-peptide obtenus par digestion des parois de *Micrococcus lysodeikticus* au moyen du lysozyme ou de la *N*-acétylhexosaminidase de *Streptomyces*.

Cette préparation F2B dégrade les parois de *Bacillus megaterium* KM plus profondément que ne le fait la préparation F1, ainsi que le démontre la quantité de matériel non-dialysable que l'on peut récupérer après une incubation prolongée en présence de l'une ou l'autre de ces deux préparations enzymatiques⁵. Afin de pouvoir décider si cette activité lytique était due à l'amidase seule ou à un ou plusieurs enzymes supplémentaires, la préparation F2B a été soumise à un fractionnement par électrophorèse de zone dans des conditions analogues à celles qui avaient été appliquées à la préparation F1.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Parois bactériennes

La plus grande partie du présent travail a été réalisée avec une préparation récente de parois de *B. megaterium* KM et de *M. lysodeikticus*.

Une préparation de parois de *B. megaterium* KM faite en 1961 a également été utilisée. Cette préparation et les fractions qui en dérivent sont affectées de la notation 1961.

Electrophorèse de zone

L'appareil utilisé est semblable à celui décrit précédemment³. Il présente les caractéristiques suivantes: longueur totale du tube en U: 150 cm; longueur utile de chacune des branches: 70 cm; diamètre interne: 3 cm; thermostatisation à $4^{\circ} \pm 0.03$. Chacune des branches est remplie par un tampon phosphate, pH 6.45, *I* 0.03, stabilisé par un gradient en sucrose variant de 56 à 0% (p/v). 10 mg de F2B sont injectés à un niveau correspondant à environ 20% en sucrose dans la branche dont la partie supérieure (0% en sucrose) constitue le compartiment anodique. Dans ces conditions, le lysozyme du blanc d'oeuf et la *N*-acétylhexosaminidase de F1 ont une mobilité, en direction de la cathode, de 0.71 et de 0.59 mm/h/V/cm, et le méthylorange une mobilité de 1.10 mm/h/V/cm en direction de l'anode. A la fin de l'électrophorèse, la branche de la colonne est vidée en recueillant des fractions successives de 7 ml, chacune correspondant à une tranche de 1 cm d'épaisseur de la veine liquide. Occasionnellement, des mobilités ont été déterminées au moyen de deux autres appareils présentant un diamètre interne de 2.5 cm et des longueurs totales respectivement égales à 130 et 75 cm.

Tests enzymatiques

Les tests suivants sont effectués sur un aliquot des diverses fractions recueillies après électrophorèse de la préparation F2B.

(1) Activité caséinolytique. 0.1 ml de chacune des fractions est incubé 15 minutes à 37° en présence de 0.5 ml d'une solution de caséine (0.2% en phosphate 0.05 *M*, pH 8), puis on ajoute 4.5 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 1%. Le trouble des suspensions est évalué au moyen du néphélomètre de Pulfrich.

(2) Lyse des parois cellulaires bactériennes. 0.75 ml de chacune des fractions, additionnés de 0.5 ml d'un tampon phosphate, *I* 0.03, pH 7, sont incubés à 37° en présence de 1.75 ml d'une suspension aqueuse de parois de *M. lysodeikticus* ou de *B.*

megaterium KM. Le trouble des suspensions est mesuré à intervalles réguliers au néphélomètre de Pulfrich.

(3) Activité amidasique. 0.01 ml de chacune des fractions est incubé 18 h à 37° en présence de 1 mg de la fraction non-dialysable obtenue en incubant les parois de *M. lysodeikticus* avec le lysozyme (fraction ML.Lys.ND) (volume final 0.10 ml; acétate d'ammonium: 0.005 M). Les diverses solutions sont ensuite chromatographiées par méthode descendante en *n*-butanol-acide acétique-eau (3:1:1; v/v/v) ainsi que 100 µg du disaccharide 6-*O*-β-*N*-acétylglucosamine-acide-*N*-acétylmuramique. La position du disaccharide témoin est déterminée par le réactif diphenylamine-trichloracétique⁵. La quantité de disaccharide éventuellement libéré du substrat ML.Lys.ND par les fractions de F2B est mesurée en découpant du chromatogramme les "spots" correspondants (et non révélés) et en leur appliquant la réaction de Morgan et Elson selon GHUYSEN ET SALTON¹. L'absorbance des solutions est mesurée à 580 mµ. Le reste du chromatogramme est enfin révélé à la ninhydrine. La libération du disaccharide sous l'action de l'amidase s'accompagne, en effet, d'une augmentation de la sensibilité à la ninhydrine du matériel resté près de l'origine^{2,4}.

(4) Activité sur la fraction non-dialysable obtenue après incubation des parois de *B. megaterium* KM avec le lysozyme (Fraction KM.Lys.ND). L'électrophorèse sur papier (4 h; 20 V/cm; pH 4; pyridine-acide acétique-eau (2:9:1000; v/v/v) dimension utile du papier Whatman 3MM: 40/40 cm; dépôt près de la cathode) de la fraction KM.Lys.ND permet d'en séparer deux fractions (Fig. 1a et 1b). La fraction KM.Lys.ND-(A) est chargée très négativement et est révéléable par la ninhydrine (faiblement)

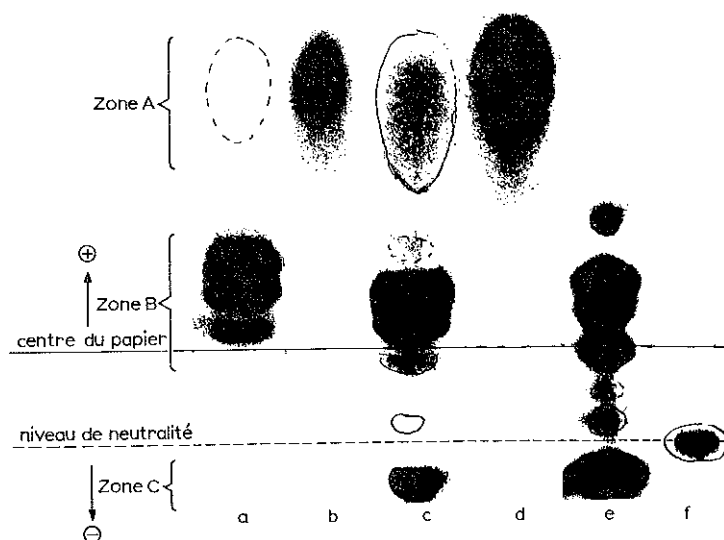


Fig. 1. Electrophorèse sur papier. 20 V/cm; 4 h; pH 4; pyridine-acide acétique-eau (2:9:1000; v/v/v) dépôt près de la cathode. a et b: Electrophorèse des fractions non-dialysables obtenues en traitant les parois de *Bacillus megaterium* KM avec le lysozyme. c et d: Electrophorèse des fractions non-dialysables obtenues en traitant les parois de *Bacillus megaterium* KM avec l'enzyme des fractions 31-33 (Fig. 2). e et f: Electrophorèse des fractions dialysables obtenues en traitant les parois de *Bacillus megaterium* KM avec l'enzyme des fractions 31-33 (Fig. 2). a, c et e: révélation à la ninhydrine; b, d et f: révélation au Schiff après oxydation périodique. La substance révélée sur f est du glucose ajouté volontairement comme substance standard permettant de déterminer la position de neutralité.

et par le réactif de Schiff après oxydation periodique⁵. La fraction KM.Lys.ND-(B) est peu chargée négativement. Elle est certainement hétérogène. Les substances qu'elle renferme sont révélabiles par la ninhydrine et sont insensibles au Schiff. 0.05 ml de chacune des fractions obtenues après électrophorèse de la préparation F2B est incubé 24 h à 37° en présence de 1000 µg de KM.Lys.ND-(A) ou de KM.Lys.ND-(B) (volume final 0.2 ml; acétate d'ammonium 0.025 M). Après incubation, toutes les solutions sont soumises à nouveau à une électrophorèse sur papier, dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus.

Dosage des groupe C et N terminaux

Les groupes N terminaux ont été dosés par traitement au 2,4-dinitrofluorobenzène (obscurité; 4 h; tampon NaHCO_3 0.12 M- Na_2CO_3 0.08 M additionné d'un volume égal de FDNB en solution alcoolique, 3 mg/ml) suivi d'une hydrolyse par HCl, 6 N, 100°, 16 h et du dosage des DNP acides aminés par les procédés chromatographiques classiques. Les groupes C terminaux ont été dosés par hydrazinolyse dans les conditions décrites par SALTON⁶ (hydrazine anhydre; 6 h; 100°). Les acides aminés ainsi libérés ont été identifiés par chromatographie bidimensionnelle en pyridine-eau (8:2; v/v) et butanol acétique et révélation par la ninhydrine. Ils ont été dosés en extrayant les taches ninhydrine positives par 5 ml du mélange acétone-eau (3:1; v/v) et en mesurant les absorbances à 570 mµ.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Fractionnement de la préparation F2B et propriétés enzymatiques des fractions obtenues

La Fig. 2 montre la distribution des activités caséinolytiques, de l'activité amidasique et de l'activité lytique à l'égard des parois de *B. megaterium* KM, dans les

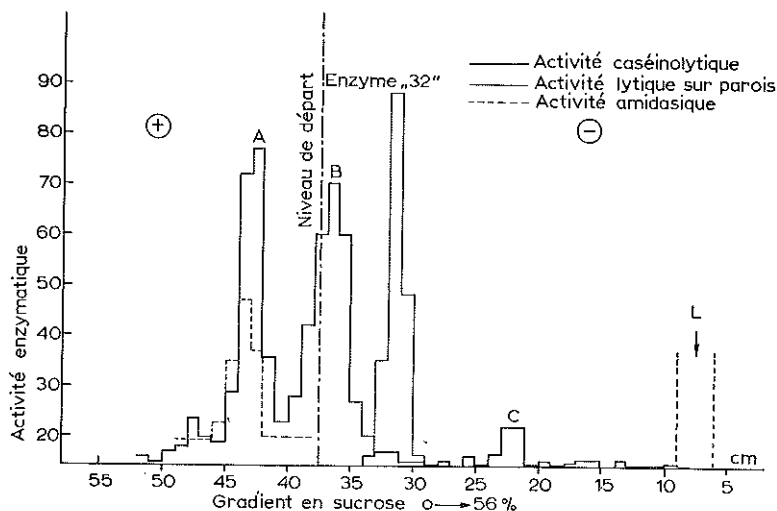


Fig. 2. Distribution des activités caséinolytiques, amidasique et lytique vis-à-vis des parois de *Bacillus megaterium* KM après électrophorèse de zone de 10 mg de F2B. Numéro d'ordre des fractions dont les activités sont maximales: caséinase A: 43; caséinase B: 37; caséinase C: 22-23; amidase: 44; lyse de *B. megaterium* KM: 32. L: migration du lysozyme du blanc d'oeuf dans des conditions électrophorétiques identiques.

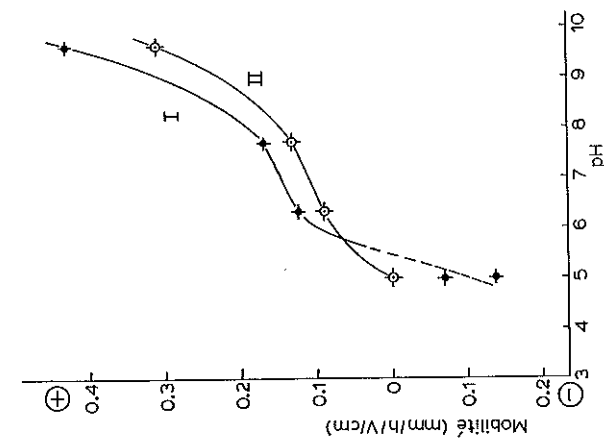


Fig. 3. Mobilités électrophorétiques de l'amidase (I) et de la caséinase A (II) à divers pH. À pH 5 l'amidase se dénature et ne migre plus sous forme d'un "pic" étroit.

Fig. 4. Electrophorèses sur papier de la fraction KM.Lys.ND-(A) après incubation avec chacune des fractions recueillies après électrophorèse de zone de 10 mg de F2B (Fig. 2). Conditions d'électrophorèse sur papier: voir Fig. 1; révélation à la ninhydrine. Remarque: dans des conditions de digestion complète de KM.Lys.ND-(A), seul le complexe le moins acide est décelable sur les électrophoréogrammes.

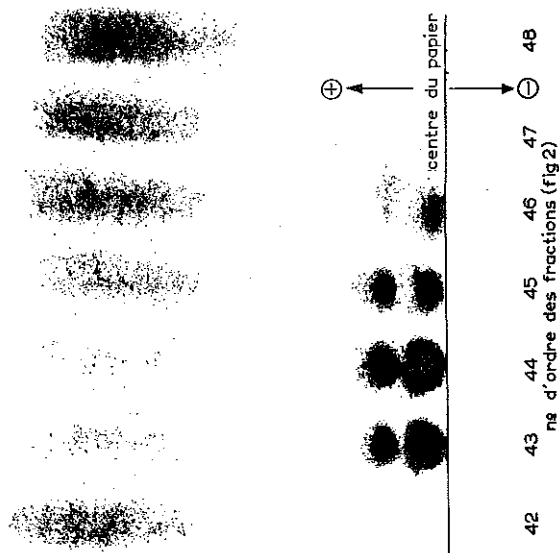
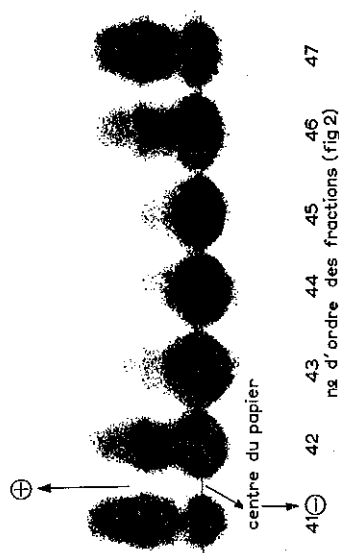


Fig. 5. Electrophorèse sur papier de la fraction KM.Lys.ND-(B) après incubation avec chacune des fractions recueillies après électrophorèse de zone de 10 mg de F2B (Fig. 2). Conditions d'électrophorèse sur papier: voir Fig. 1; révélation à la ninhydrine.



fractions obtenues après électrophorèse de zone de 10 mg de F2B (65 h; 1000 V, d.c; 16 mA)

(a) Trois caséinases distinctes sont séparées. Leur mobilité respective (en mm/h/V/cm et à pH 6.4) est égale à 0.12 en direction de l'anode (caséinase A; fractions 42-45), pratiquement nulle (caséinase B; fractions 35-39) et égale à 0.37 en direction de la cathode (caséinase C; fractions 22-23).

(b) L'amidase a une mobilité de 0.14 en direction de l'anode (fractions 43-45). Sa migration est donc très proche de celle de la caséinase A. On a toujours observé un même décalage entre les maxima de ces deux activités lors de nombreuses électrophorèses de zone identiques à celle illustrée par la Fig. 2. La Fig. 3 montre la mobilité à divers pH de l'amidase et de la caséinase A. De pH 6 à 9.5, les deux courbes sont pratiquement parallèles, l'amidase étant toujours chargée plus négativement que la caséinase A. À pH inférieur à 6, les deux courbes se coupent et à pH 5 l'amidase migre vers la cathode tandis que la caséinase A est à son point isoélectrique. À pH 5, la séparation des deux enzymes serait facilement réalisable. Malheureusement, à ce pH, l'amidase se dénature et ne peut pas être soumise à des électrophorèses de longue durée.

(c) La Fig. 4 montre la distribution dans les diverses fractions de F2B de l'activité vis-à-vis des substances ninhydrine-positives contenues dans la préparation KM.Lys.ND-(A) et la Fig. 5 vis-à-vis des substances ninhydrine-positives contenues dans la préparation KM.Lys.ND-(B). Seules, les fractions 43-45 sont actives, ce qui permet d'attribuer l'action observée, à l'amidase qu'elles contiennent. Lorsque la digestion de l'une et l'autre préparation est complète, une seule substance ninhydrine positive est décelée. Elle occupe la zone centrale des électrophoréogrammes.

(d) Quoique l'amidase soit active sur les fractions non-dialysables obtenues après traitement des parois de *B. megaterium* KM et de *M. lysodeikticus* par le lysozyme, elle est dépourvue d'activité lytique vis-à-vis de ces mêmes parois intactes (Fig. 2). Seules les fractions 31-33 clarifient les suspensions des parois de *B. megaterium* KM (Fig. 2) et de *M. lysodeikticus* (non représenté sur la Fig. 2). Ces deux types de parois ont été mis en suspension (0.2%, p/v) dans du tampon phosphate, I 0.015, pH 7 contenant 4% (v/v) de la fraction 32. Après 18 h d'incubation à 37°, 50% en poids des parois de *M. lysodeikticus* et 75% des parois de *B. megaterium* KM ont été solubilisés.

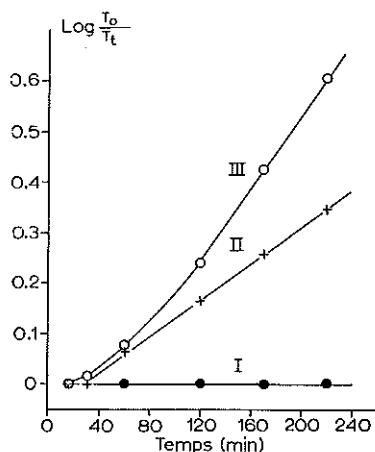


Fig. 6. Lyse des parois cellulaires de *Bacillus megaterium* KM par l'amidase (courbe I), l'enzyme des fractions 31-33 (Fig. 2) (courbe II) et par leur association (courbe III). Conditions expérimentales: 2 ml d'une suspension aqueuse de parois (1 mg/ml) sont ajoutés à: (1) 0.5 ml de la fraction 32 (Fig. 2) additionné de 0.5 ml de tampon phosphate I 0.03, pH 6.3; (2) 0.5 ml de la fraction 44 (Fig. 2) additionné de 0.5 ml du même tampon; (3) 0.5 ml de la fraction 32 additionné de 0.5 ml de la fraction 44. T_0 : trouble initial; T_t : trouble après le temps t ; température de l'incubation: 37°.

(e) Contrairement à l'amidase, l'enzyme des fractions 31-33 (Fig. 2) lyse les parois bactériennes intactes mais est dépourvu d'action sur les fractions KM.Lys.ND et ML.Lys.ND.

(f) L'amidase exalte l'activité lytique de l'enzyme des fractions 31-33 sur les parois de *B. megaterium* KM (Fig. 6).

(g) Une digestion préalable des parois de *B. megaterium* KM par le lysozyme ne détruit cependant pas nécessairement le substrat sensible à l'enzyme des fractions 31-32.

Une préparation de parois conservée depuis 1961 a été traitée par le lysozyme et la fraction KM.Lys.ND-(A) en a été purifiée par les procédés électrophorétiques décrits.

Cette fraction KM.Lys.ND-(A) (1961) donne, sur papier, une forte coloration à la ninhydrine et est sensible, non seulement à l'amidase, mais encore à l'enzyme des fractions 31-33 (Fig. 7). Cette propriété a permis de comparer l'activité de ces deux

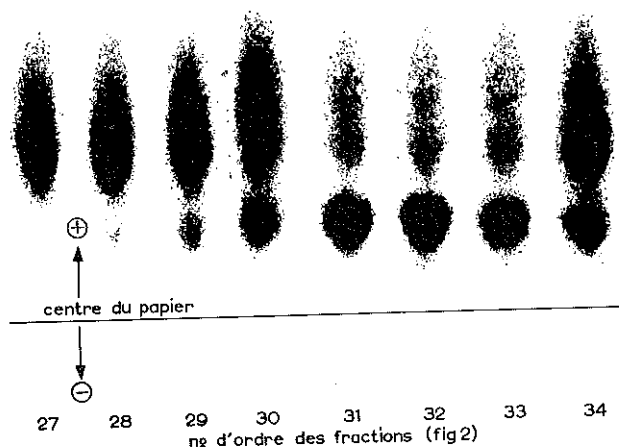


Fig. 7. Electrophorèses sur papier de la fraction KM.Lys.ND-(A) (1961) après incubation avec chacune des fractions recueillies après électrophorèse de zone de 10 mg de F2B (Fig. 2). Conditions d'électrophorèse: voir Fig. 1; révélation à la ninhydrine. Remarque: l'amidase (fractions 43-45, Fig. 4) est également active sur KM. Lys.ND-(A) (1961). Son action est comparable à celle qu'elle exerce sur la fraction KM.Lys.ND-(A), Fig. 4.

enzymes. A cet effet, les fractions 43-45 (amidase), d'une part, et 31-33, d'autre part, ont été dialysées et lyophilisées. Les résidus ont été remis en solution dans 0.5 ml d'eau. Enfin, 2 mg de la préparation KM.Lys.ND-(A) (1961) ont été traités ou non avec 0.04 ml de chacune des préparations enzymatiques concentrées (37°, 20 h, volume final 0.3 ml; acétate d'ammonium 0.01 M). La Fig. 8 montre le résultat d'une électrophorèse simultanée de la fraction KM.Lys.ND-(A) (1961) avant et après traitements enzymatiques. Le matériel présente toujours la même migration électrophorétique et conserve sa forte sensibilité au réactif de Schiff (non montré sur la Fig. 8). Par contre, il perd sa sensibilité à la ninhydrine. Les substances ninhydrine-positives ainsi dissociées du complexe original, migrent avec des vitesses différentes selon la nature de l'enzyme utilisé.

Produits de la digestion des parois cellulaires bactériennes par l'enzyme des fractions 31-33
30 mg de parois de *B. megaterium* KM et de *M. lysodeikticus* ont été séparément

incubés pendant 24 h à 37° avec l'enzyme des fractions 31-32 (dialysées et concentrées) ($I\ 0.010$) dans des conditions telles que la réduction maximale du trouble est obtenue en 8 h. Après une dialyse de 3 jours à 4°, fractions dialysables et non-dialysables ont été lyophilisées.

(a) Digestion des parois de *B. megaterium* KM. Les électrophoréogrammes (Fig. 1 c et d) de la fraction non-dialysable sont fort semblables à ceux de la préparation KM.Lys.ND (Fig. 1 a et b). Lysozyme et enzyme des fractions 31-33 fournissent d'ailleurs des préparations non-dialysables en quantité pondéralement presque équi-

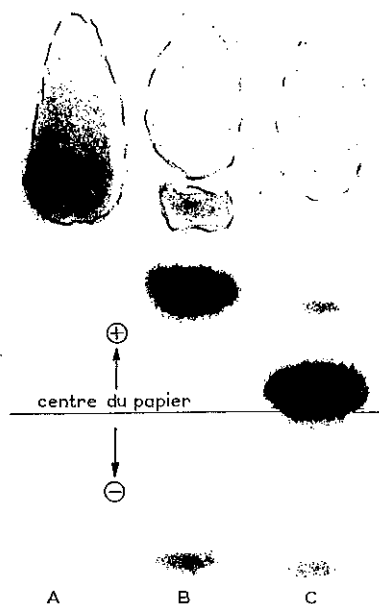


Fig. 8. Electrophorèses simultanées sur papier de la fraction KM.Lys.ND-(A) (1961) et de la même fraction incubée soit avec l'enzyme concentré des fractions 31-33 soit avec l'amidase concentrée. (A): avant traitement; (B): traitée par l'enzyme 31-33; (C): traitée par l'amidase. Conditions d'électrophorèse: voir Fig. 1; révélation à la ninhydrine.

valente (72% des parois mises en oeuvre après action du lysozyme; 67 % après action de l'enzyme des fractions 31-33). Ces rendements n'ont cependant pas toute la signification que l'on est tenté de leur accorder. En effet, la fraction dialysable des parois de *B. megaterium* KM digérées par l'enzyme des fractions 31-33 (Fig. 1 e et f) contient, quoique en proportions différentes, presque toutes les substances présentes dans les fractions non-dialysables obtenues après action du même enzyme (Fig. 1 c et d) ou après action du lysozyme (Fig. 1 a et b). Seul, le complexe révéable par le réactif de Schiff (zone A des électrophoréogrammes) est absent de la fraction dialysable. La zone C des électrophoréogrammes est occupée par de l'alanine libre identifiée par chromatographie bi-dimensionnelle et estimée à 75 $\mu\text{moles/g}$ de parois.

Les fractions dialysables obtenues après digestion des parois par le lysozyme, par l'enzyme des fractions 31-33 et par la préparation Fr (qui contient surtout la *N*-acétylhexosaminidase de *Streptomyces*)³ ont été examinées par chromatographie bidimensionnelle en pyridine-eau et butanol acétique. Seul le lysozyme libère du disaccharide

GlcNHAc $\xrightarrow{\beta (1 \rightarrow 6)}$ AAM. Aucun des trois enzymes utilisés ne libère du tétrasaccharide GlcNHAc $\xrightarrow{\beta (1 \rightarrow 6)}$ AAM $\xrightarrow{\beta (1 \rightarrow 4)}$ GlcNHAc $\xrightarrow{\beta (1 \rightarrow 6)}$ AAM.

(b) Digestion des parois de *M. lysodeikticus*. Le lysozyme et le *N*-acétylhexosaminidase de *Streptomyces* libèrent des parois de *M. lysodeikticus* les di- et tétrasaccharides mentionnés ci-haut³. L'enzyme des fractions 31-33 ne libère aucun de ces oligosaccharides. La fraction dialysable contient cependant une substance donnant sur papier la réaction des *N*-acétylhexosamines. Elle migre avec le front du solvant en pyridine-eau. Son R_F est nul en butanol acétique.

Action de l'amidase et de l'enzyme des fractions 31-33 sur les groupes C et N terminaux

2 mg de la préparation KM.Lys.ND-(A) (1961) ont été traités avec 0.04 ml des préparations enzymatiques dialysées et concentrées (conditions voir, Fig. 8). De façon identique, 5 mg de parois de *B. megaterium* KM ont été traités avec l'enzyme concentré des fractions 31-33. Le tableau I montre que l'amidase a pour effet d'augmenter spécifiquement le nombre des groupes *N*-alanine terminaux. Ceci est en parfait accord avec son mécanisme d'action.

L'enzyme des fractions 31-33 ne modifie pas la proportion des groupes C et N terminaux. L'alanine trouvée dans les fractions dialysables et non-dialysables (Fig. 1 c et e) de parois digérées par cet enzyme devait donc être présente à l'état libre dans la préparation des parois malgré les diverses purifications auxquelles celle-ci a été soumise. On remarque d'ailleurs que même après dissolution enzymatique des parois, l'alanine libre ne s'élimine qu'incomplètement par dialyse (Fig. 1c). En soustrayant du nombre des groupes C terminaux alanine des parois, le nombre des groupes N terminaux alanine, on obtient une proportion groupes C terminaux DAP/groupe C terminaux alanine égale à 10/4.30. Cette proportion est identique à celle trouvée antérieurement par SALTON⁶.

TABLEAU I

ACTION DE L'AMIDASE ET DES FRACTIONS 31-33 SUR LES GROUPES N ET C TERMINAUX DES PAROIS DE *Bacillus megaterium* KM ET DE CERTAINES DE SES PRÉPARATIONS SOLUBLES
Valeur absolue, μ moles/g, des groupes C terminaux DAP; parois, dissoutes par l'enzyme 31-33: 250; fraction KM.Lys.ND-(A) (1961): 149; parois, selon SALTON⁶: 154.

Substrat	Enzyme	Groupes C terminaux		Groupes N terminaux	
		DAP	Alanine	\approx DAP	Alanine
Parois	o	10	7.81	9	3.33
	31-33	10	7.40	9.36	3.28
Moyenne: soustraction faite de l'alanine libre*:		10	4.60	9.20	0.3
Fraction KM.Lys.ND-(A) (1961)	o	10	3.80	8	trace (?)
	31-33	10	4.56	10	trace (?)
	amidase	10	3.10	12.7	7
Moyenne:		10	3.82	10.2	
Parois (selon SALTON ⁶)		10	4.4	15	0.7

* 75 μ moles/g de parois ont été dosés après chromatographie du produit de la digestion des parois par l'enzyme des fractions 31-33.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Cinq enzymes distincts ont été mis en évidence dans la préparation F2B. Trois d'entre eux ont la propriété de rendre la caséine non-précipitable par l'acide trichloracétique. A pH 6.3, l'un (caséinase A) est chargé négativement, un second (caséinase B) est pratiquement neutre, le troisième (caséinase C) est chargé positivement. La nature enzymatique de ces trois caséinases n'a pas été étudiée. Elles paraissent être dépourvues d'action sur les parois cellulaires de *B. megaterium* KM et de *M. lysodeikticus*.

L'amidase dont la présence dans F2B avait été démontrée précédemment^{2,4} a un point isoélectrique proche de 5. A ce pH ou à des pH inférieurs, l'amidase se dénature. Sa migration électrophorétique est à tout pH très proche de celle de la caséinase A et la séparation de ces deux enzymes ne pourra être entreprise que lorsque l'on disposera de veines liquides suffisamment longues et de tensions suffisamment élevées.

Dans les conditions expérimentales décrites, l'amidase est incapable de clarifier les suspensions des parois cellulaires de *B. megaterium* KM et de *M. lysodeikticus*. Cependant elle est active sur certains produits provenant de la digestion de ces mêmes parois par le lysozyme et elle exalte l'activité lytique d'un enzyme supplémentaire auquel elle est associée dans la préparation F2B. Trois interprétations sont possibles: (1) les liaisons sensibles à l'amidase sont inaccessibles dans les parois intactes, (2) la liaison amidique muraminyle-alanine n'est pas le seul mode de liaison entre les ponts peptidiques et les troncs polysaccharidiques du mucopeptide de base (d'après ROGERS ET PERKINS⁸, des liaisons muraminyle-glycine seraient présentes); (3) les résidus polysaccharidiques forment un réseau propre dans lequel les ponts peptidiques ne sont que des points de renforcement accessoires.

La clarification des suspensions de parois de *B. megaterium* KM et de *M. lysodeikticus* par la préparation F2B est due, en ordre principal, à la présence d'un enzyme supplémentaire dont la présence n'avait pas encore été suspectée. C'est une protéine basique à pH 6.45 (mobilité: 0.17 mm/h/V/cm) quoique beaucoup plus faiblement que la *N*-acétylhexosaminidase précédemment étudiée (mobilité: 0.69 mm/h/V/cm dans les conditions actuelles). Sa nature précise reste encore à élucider. Cependant, cet enzyme ne modifie pas la proportion des groupes C et N terminaux. Il n'agit donc pas au niveau des résidus peptidiques de la paroi. En effet, il n'hydrolyse ni une liaison peptidique, ni une liaison amidique (ce qui libérerait un groupe N terminal), ni une liaison ester (ce qui libérerait un groupe C terminal) qui uniraient ces résidus peptidiques aux troncs polysaccharidiques. De plus, cet enzyme est sans action sur les fractions non-dialysables obtenues après digestion par le lysozyme des parois de *M. lysodeikticus* ou de certaines préparations de parois de *B. megaterium* KM. Enfin, les fragments obtenus par action de cet enzyme ou du lysozyme sur les parois de *B. megaterium* KM ont des propriétés électrophorétiques très semblables. L'enzyme isolé au cours du présent travail agirait donc au niveau des fragments polysaccharidiques de la paroi, comme le lysozyme et la *N*-acétylhexosaminidase de *Streptomyces*. Il se distingue de ceux-ci, cependant, par le fait que son action lytique sur les parois de *M. lysodeikticus* ne libère aucun des di- et tetra-saccharides qui sont les produits caractéristiques de la digestion de ces parois par le lysozyme ou la *N*-acétylhexosaminidase de *Streptomyces*³. En attendant que la spécificité de son action soit précisée, il sera désigné par Enzyme "32".

La digestion des parois de *B. megaterium* KM par l'enzyme "32" libère de l'ala-

nine. Le dosage des groupes C et N terminaux montre que cette alanine est présente à l'état libre, dans les parois intactes. Il avait déjà été signalé^{9,10} que certains acides aminés peuvent être accumulés dans les parois bactériennes qui peut-être fonctionnent comme réservoir¹¹ de certains métabolites. Lors des premières recherches¹² effectuées sur le mécanisme de la lyse des parois bactériennes par les enzymes de *Streptomyces*, il avait été observé que cette lyse s'accompagnait d'une libération d'alanine et/ou de glycine. Il pourrait donc s'agir, partiellement du moins, d'une "fausse libération" d'acides aminés présents à l'état libre dans les parois. Un cas d'association de polyphosphate inorganique aux parois de *Neurospora crassa* a également été décrit récemment¹³.

RÉSUMÉ

La préparation F2B obtenue par fractionnement sur Amberlite du filtrat de culture de *Streptomyces albus* G a été examinée par électrophorèse de zone en gradient de sucrose. Cinq enzymes ont été mis en évidence dont trois ont été isolés, les deux derniers restant associés. Trois enzymes distincts rendent la caséine non-précipitable par l'acide trichloracétique. Ils semblent dépourvus d'action sur les parois cellulaires de *Bacillus megaterium* KM et de *Micrococcus lysodeikticus*. Le quatrième enzyme est l'amidase, dont la présence dans F2B avait été précédemment démontrée. Cet enzyme hydrolyse les liaisons muraminylo-alanine présentes dans les parois cellulaires bactériennes. L'amidase isolée ne clarifie pas les suspensions des deux types de parois bactériennes étudiés mais exalte l'activité lytique du cinquième enzyme avec lequel elle est associée dans la préparation F2B. Ce cinquième enzyme semble agir comme le lysozyme et la *N*-acétylhexosaminidase de *Streptomyces* au niveau des fragments polysaccharidiques du mucopeptide de base des parois bactériennes. Il s'en distingue par le fait que son action dissolvante sur les parois de *Micrococcus lysodeikticus* ne s'accompagne pas d'une libération d'oligosaccharides. Il est dénommé: Enzyme "32".

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. M. GHUYSEN ET M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 462.
- ² J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 473.
- ³ L. DIERICKX ET J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 58 (1962) 7.
- ⁴ J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 47 (1961) 561.
- ⁵ J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 50 (1961) 413.
- ⁶ M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 329.
- ⁷ M. R. J. SALTON ET J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 45 (1960) 355.
- ⁸ J. ROGERS ET H. R. PERKINS, *Nature*, 189 (1959) 520.
- ⁹ P. GERHARDT, *Univ. Mich. Med. Bull.*, 25 (1959) 148.
- ¹⁰ J. A. V. BUTLER, A. R. CRATHORN ET G. D. HUNTER, *Biochem. J.*, 69 (1958) 544.
- ¹¹ E. WORK, *J. Gen. Microbiol.*, 25 (1961) 167.
- ¹² M. R. J. SALTON ET J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 160.
- ¹³ F. H. HAROLD, *Biochim. Biophys. Acta*, 57 (1962) 59.
- ¹⁴ J. M. GHUYSEN, M. LEYH-BOUILLE ET L. DIERICKX, *Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 297.