

PRÉCISIONS SUR LA STRUCTURE DES COMPLEXES  
 DISACCHARIDE-PEPTIDE LIBÉRÉS DES PAROIS  
 DE *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS*  
 SOUS L'ACTION DES  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) N-ACETYLHEXOSAMINIDASES

J. M. GHUYSEN

*Laboratoires de Microbiologie générale et médicale, Université de Liège (Belgique)*

(Reçu le 30 Juillet, 1960)

SUMMARY

*Details concerning the structure of disaccharide-peptide complexes liberated from the cell walls of *Micrococcus lysodeikticus* under the action of  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) N-Acetylhexosaminidases*

Two types of disaccharide-peptide complexes have been studied.

In a first type of complex, the fragment 6-O- $\beta$ -N-acetylglucosaminyl-N-acetyl-muraminy is joined to a peptide moiety consisting of 2 alanines, 1 glycine, 1 glutamic acid and 1 lysine, by an amide bond between the COOH of N-acetylmuramic acid and the NH<sub>2</sub> of one of the alanine residues of the peptide. The reaction with 1-fluoro-2,4 dinitrobenzene shows that the  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> group of lysine is free. The electrohophoretic properties suggest that the  $\gamma$ -COOH group of glutamic acid and an unspecified  $\alpha$ -COOH group are free too.

The second type of complex is a dimer of the former, joined by a peptide linkage between an  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> group of lysine and, very probably, an  $\alpha$ -COOH group.

The F<sub>2</sub>B amidase splits the amidic acetylmuramyl-alanine linkage. Consequently, the disaccharide is liberated and a new free  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> group of alanine appears in the peptide moiety.

INTRODUCTION

Le lysozyme et l'acétylhexosaminidase F<sub>1</sub> clarifient complètement les suspensions de parois de ML par rupture d'un certain nombre de liaisons  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) entre l'acide N-acetylmuramique et la N-acetylglucosamine des chaînes polysaccharidiques constitutives<sup>1-4</sup>. 25 % environ des produits de la digestion sont constitués par un mélange (a) du disaccharide  $\beta$  (1  $\rightarrow$  6) AG-AAM (b) de complexes disaccharide-peptide du tétrasaccharide O- $\beta$ -AG-(1  $\rightarrow$  6)-O- $\beta$ -AAM-(1  $\rightarrow$  4)-O- $\beta$ -AG-(1  $\rightarrow$  6)-O- $\beta$ -AAM

Abréviations: ML, *Micrococcus lysodeikticus*; AAM, acide N-acetylmuramique; AG, N-acetylglucosamine; DSP, complex disaccharide-peptide; NDL, fraction non dialysable obtenue après action du lysozyme sur les parois cellulaires de ML; Ala, alanine; Glu, acide glutamique; Lys, lysine; Gly, glycine; FDNB, 1-fluor-2,4-dinitrobenzène; DNP, dinitrophényle.

(c) de DSP<sup>3-4</sup>. Il a été suggéré<sup>4</sup> que, dans ces complexes, les résidus disaccharidiques et peptidiques seraient unis par une liaison amidique entre le carboxyle de l'AAM et une fonction aminée du résidu peptidique. C'est au niveau de cette liaison que l'amidase F<sub>2</sub>B agirait.

Les chaînes peptidiques des complexes DSP présentent une même composition globale en acides aminés, qui est d'ailleurs celle des parois cellulaires intactes. Certaines de leurs caractéristiques structurales ont été déterminées en étudiant la nature de leurs groupes N terminaux ainsi que de ceux éventuellement libérés par l'action de l'amidase F<sub>2</sub>B. Le même procédé a été appliqué à la fraction non dialysable obtenue après action du lysozyme sur les parois de ML (fraction NDL).

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Parois cellulaires et préparations enzymatiques sont celles précédemment utilisées<sup>3-4</sup>. La préparation des fractions dialysables et non dialysables des parois cellulaires digérées par le lysozyme ou l'acétylhexasaminidase F<sub>1</sub>, les conditions de chromatographie et d'électrophorèse ainsi que les procédés de révélation sur papier ont déjà été décrits<sup>3-4</sup>. Dans le présent travail, les électrorhéophorèses ont été effectuées au moyen de l'appareil Electrorhéophor Pleuger (Anvers, Belgique), d'un cadre utile de 40 × 40 cm, aux pH 2.5 (acide acétique 1 N) et 5.5 (acide acétique-pyridine-eau (2:4:1000)).

#### Complexes DSP

Quatre complexes ont été séparés des fractions dialysables obtenues après digestion enzymatique des parois cellulaires et ensuite purifiés, par les procédés chromatographique et électrorhéophorétique antérieurement décrits<sup>3-4</sup>. Selon que leur déplacement par chromatographie sur papier Whatman No. 1, en *n*-butanol-acide acétique-eau (3:1:1, v/v/v) est nul ou de 5 cm environ après 18 h, ils sont respectivement désignés<sup>3</sup> par DSPI et DSPII. Ces deux désignations sont suivies des suffixes L ou F<sub>1</sub> selon que l'enzyme utilisé pour la digestion des parois est le lysozyme ou l'acétylhexasaminidase F<sub>1</sub>. DSPIILA et DSPIILB sont deux complexes d'origine et de comportement identiques, mais préparés au cours de deux expériences séparées.

#### Analyse chimique des complexes DSP

Ala, Glu, Gly, Lys, acide muramique et glucosamine sont les seules substances décelées, par chromatographie bi-dimensionnelle en pyridine-eau (8:2, v/v) et butanol acétique, dans les hydrolysats acides (HCl 6 N, 18 h, 100°) des complexes DSP.

Le résidu disaccharidique a été titré (a) directement par la réaction des N-acétylhexasamines de Morgan-Elson, modifiée selon GHUYSEN ET SALTON<sup>3</sup> (chauffage de 30 min, 100°, en borax 0.05 M; coefficient molaire d'extinction: 4870 à 585 m $\mu$ ) (b) en appliquant la méthode de dosage des hexosamines de NEUHAUER ET LETZRING aux hydrolysats acides et en tenant compte<sup>3</sup> d'un rapport D.O. glucosamine/D.O. acide muramique égal à 2.30.

Les acides aminés ont été titrés en traitant, sous agitation, à 37°, pendant 4 h et à l'obscurité, 100  $\gamma$  des complexes DSP, préalablement hydrolysés, par 0.2 ml d'une solution alcoolique de FDNB (3 mg/ml) additionné d'un égal volume de tampon Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.08 M-NaHCO<sub>3</sub> 0.12 M. Après extraction de l'excès de FDNB par l'éther,

les solutions ont été additionnées de HCl ( $\rho$ , 1.19) jusqu'à une normalité finale de 3 N et les DNP-acides aminés en ont été retirés par une nouvelle extraction à l'éther. Cet extrait éthéré a été séché sous vide poussé ( $10^{-2}$  mm Hg) et chromatographié selon une première dimension avec le solvant: alcool amylique tertiaire-phthalate (pH 6) de BALCKBURN ET LOWTHER<sup>6</sup> et selon une seconde dimension avec le tampon phosphate 1.5 M de LÉVY<sup>7</sup>. La solution acide résiduelle, également évaporée à sec, a été chromatographiée en butanol acétique (recherche de l' $\epsilon$ -DNP-Lys). Les DNP-acides aminés ont été extraits du papier par 5 ml d'une solution  $\text{NaHCO}_3$  1 %. Les D.O. des solutions ont été mesurées à  $362 \mu\text{m}$  et transformées en  $\mu\text{M}$  d'acides aminés en les divisant par un coefficient approprié. Celui ci a été déterminé en traitant de façon identique un mélange synthétique d'acides aminés (0.2  $\mu\text{M}$ ) additionné de 0.2  $\mu\text{M}$  de glucosamine. Ces coefficients ont été trouvés égaux à 2.42 pour la di-DNP Lys, 1.90 pour le DNP-Glu, 1.81 pour la DNP-Gly et 1.85 pour le DNP-Ala. Dans les conditions décrites, la réaction au FDNB est complète. En effet, après extraction à l'éther, les solutions acides ne contiennent ni  $\epsilon$ -DNP-Lys, ni acides aminés non transformés.

#### Incubation avec l'amidase $F_2\text{B}$

1 mg de chaque complexe DSP a été placé pendant 18 h à 37°, avec 100  $\gamma$  de  $F_2\text{B}$ , dans 0.2 ml d'une solution d'acétate ammonique 0.005 M (une force ionique de 0.025 supprime l'action enzymatique). De même, 10 mg de la fraction NDL ont été placés en présence de 500  $\gamma$  de  $F_2\text{B}$ , dans un volume final de 0.5 ml, toutes autres conditions étant identiques. Enfin, des solutions témoins contenant le substrat seul ou l'enzyme seul ont été soumises aux mêmes traitements.

L'action de l'amidase  $F_2\text{B}$  a été estimée en dosant par le procédé GHUYSEN-SALTON<sup>8</sup>, la quantité de disaccharide libéré. Dans ce but, celui-ci a été préalablement séparé, par chromatographie en butanol acétique ou électrorhéophorèse (Fig. 1), du résidu peptidique ainsi que du complexe DSP intact ayant échappé à l'hydrolyse enzymatique.

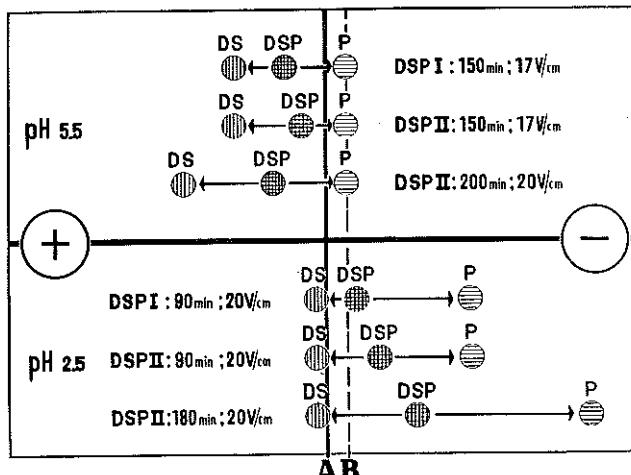


Fig. 1. Electrorhéophorèses, aux pH 5.5 et 2.5, des complexes DSP ainsi que de leurs résidus disaccharidique (DS) et peptidique (P) libérés sous l'action de  $F_2\text{B}$ . A, points de dépôt; B, position d'équilibre (neutralité).

### Détermination des groupes N terminaux

100  $\gamma$  de chaque complexe DSP (0.02 ml) et 2000  $\gamma$  de la fraction NDL (0.1 ml)—l'un et l'autre traités ou non par F<sub>2</sub>B—ainsi que des solutions témoins contenant une quantité équivalente de F<sub>2</sub>B, ont été traités (mêmes conditions que ci-dessus) par une solution alcoolique de FDNB (2 mg/ml) (0.1 ml pour les complexes DSP; 1 ml pour la fraction NDL) additionnée d'un égal volume du tampon carbonate. Après extraction à l'éther de l'excès de réactif, la solution a été acidifiée (HCl) jusqu'à 6 N, puis hydrolysée 18 h à 100°. L'hydrolysat a ensuite été dilué par un égal volume d'eau et extrait à l'éther. Extrait éthéré et solution aqueuse ont été traités comme décrit ci-dessus. L' $\epsilon$ -DNP-Lys a été titré en utilisant le même coefficient que celui expérimentalement trouvé pour la di-DNP-Lys. Le DNP-Ala a été titré en utilisant un coefficient de 1.30 qui tient compte de la perte provoquée par l'hydrolyse acide. Cette perte a été estimée en hydrolysant 0.1  $\mu M$  de DNP-Ala en présence de 100  $\gamma$  de complexe DSP.

### RÉSULTATS

#### Composition et caractéristiques des complexes DSP

Les quatre complexes ont une composition globale identique: (Ag-AAM)-(Ala<sub>2</sub>; Glu 1; Gly 1; Lys 1) (Tableau I). De même, le seul groupe N terminal décelé dans

TABLEAU I  
COMPOSITION DES COMPLEXES DSP ET ACTION DE L'ENZYME F<sub>2</sub>B  
Résultats exprimés en posant la lysine = 1.

Complexé DSP	Composition des complexes DSP non incubés avec F <sub>2</sub> B			Effet de l'incubation des complexes DSP avec l'enzyme F <sub>2</sub> B		
	Acides aminés		N terminal	Disaccharide libéré	N terminaux	R*
	A*	B*				
DSPI Fl	Lys: 1 Glu: 1.06 Gly: 0.9 Ala: 2	0.81	0.86	$\epsilon$ -Lys: 0.45	0.57	$\epsilon$ -Lys: 0.41 $\alpha$ -Ala: 0.41
DSPI L	Lys: 1 Glu: 1 Gly: 0.83 Ala: 1.88	+ **		$\epsilon$ -Lys: 0.58	+ **	$\epsilon$ -Lys: 0.50 $\alpha$ -Ala: + ***
DSPII LA	Lys: 1 Glu: 0.96 Gly: 1 Ala: 1.89	1.08	1.15	$\epsilon$ -Lys: 0.95	0.76	$\epsilon$ -Lys: 0.88 $\alpha$ -Ala: 0.66
DSPII LB	Lys: 1 Glu: 1.23 Gly: 1 Ala: 2.18	0.82	0.93	$\epsilon$ -Lys: 1.05	0.63	$\epsilon$ -Lys: 1 $\alpha$ -Ala: 0.50

\* A, disaccharide dosé par le procédé GHUYSEN-SALTON<sup>3</sup>; B, disaccharide dosé après hydrolyse acide, par la réaction des hexosamines<sup>6</sup>; R, rapport: fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> alanine/disaccharide, libérés sous l'action de F<sub>2</sub>B.

\*\* Non dosé: mais détecté sur les électrophoréogrammes.

\*\*\* Non dosé: mais détecté sur les chromatogrammes.

chaque cas est l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Lys. Cependant, celui-ci représente 100 % de la quantité totale de lysine des complexes DSPII, mais 50 % seulement de celle des complexes DSPI.

Les complexes DSPI et DSPII sont chargés négativement à pH 5.5 ou supérieur et positivement à pH 2.5 (Fig. 1). Les complexes DSPI ont toutefois, aux deux pH examinés, un excédent de charges négatives par rapport aux complexes DSPII. Après réaction au FDNB, le dérivé dinitrophénolique du complexe DSPIILA a été séparé par électrorhéophorèse à pH 2.5 (90 min à 20 V/cm). Pratiquement neutre à ce pH, il a été isolé par extraction du papier et hydrolysé. Acide muramique, 1; glucosamine, 1, Ala, 2; Gly, 1; Glu, 1; Lys, traces, ont été retrouvés par chromatographie bi-dimensionnelle en pyridine-butanol. Ils ont été estimés par élution en acétone-eau (3:1, v/v) des taches ninhydrine-positives et détermination de la D.O. des solutions à 570 m $\mu$ . Ce résultat, ainsi que le fait qu'aucune substance ninhydrine positive n'a pu être décelée sur l'électrorhéophoréogramme, montrent que la réaction au FDNB avec le complexe DSP a été complète.

#### Action de l'enzyme $F_2B$ sur les complexes DSP

Sous l'action de l'enzyme  $F_2B$ , 65 % environ du disaccharide sont libérés du résidu peptidique (Tableau I). La quantité d' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Lys libre n'est pas modifiée. Mais, dans chaque cas, une certaine quantité d' $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-Ala a été libérée. Les rapports  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-Ala/disaccharide, simultanément libérés sous l'action de  $F_2B$ , sont proches de l'unité.

A pH 2.5, les résidus peptidiques libres sont chargés beaucoup plus positivement que les complexes DSP originaux (Fig. 1). A pH 5.5, ils sont neutres. L'électrorhéophorèse à pH 2.5 (90 min, 20 V/cm) du complexe DSPIILA, traité par  $F_2B$  puis par le FDNB, n'a pas révélé la présence de substances ninhydrine positives. Ceci indique également une transformation complète en dérivé dinitrophénolique.

Chromatographiés en butanol acétique, les peptides PII et PI ont une migration très légèrement supérieure à celle des complexes DSP originaux respectifs, mais présentent toujours entre eux la même différence relative de  $R_F$  que celle observée pour ces derniers.

#### Action de l'enzyme $F_2B$ sur la fraction NDL

2 mg de la fraction NDL contiennent 0.03  $\mu$ mole d' $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-Ala terminal, 0.8  $\mu$ mole d' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Lys terminal et 0.225  $\mu$ mole de disaccharide combiné mais dosable par le procédé GHUYSEN-SALTON. Sous l'action de  $F_2B$ , 0.135  $\mu$ mole de disaccharide sont libérés. Simultanément, la teneur en  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-Ala terminal est augmentée de 0.135  $\mu$ mole et celle en  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Lys terminal de 0.4  $\mu$ mole.

Les électrorhéophorèses, réalisées avant et après incubation avec  $F_2B$ , ne se prêtent guère à l'analyse étant donné l'étalement considérable des substances. Il apparaît toutefois clairement que, simultanément à la libération du disaccharide par  $F_2B$ , les charges positives du matériel peptidique se sont accrues. De même, sa sensibilité à la ninhydrine a augmenté et celle au réactif des N-acétylhexosamines<sup>8</sup> a diminué.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Il découle des résultats précédents que les formules représentées dans la Fig. 2 peuvent provisoirement être attribuées aux complexes DSPI et DSPII. DSPII renferme un résidu O- $\beta$ -N-acétylglucosaminyle-(1  $\rightarrow$  6)-O- $\beta$ -acide N-acétylmuraminyyle uni à un reste peptidique constitué de: Ala 2 Gly 1 Glu 1 et Lys 1. AAM et Ala sont unis par la liaison amidique précédemment suspectée<sup>4</sup> et au niveau de laquelle agit l'amidase F<sub>2</sub>B.

DSPI est un dimère de DSPII grâce à une liaison peptidique entre l' $\varepsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lysine d'un premier monomère et un  $\alpha$ -COOH d'un acide aminé du second monomère.

La nature de la liaison ( $\varepsilon$  -  $\alpha$ )NH-CO de la liaison peptide-peptide dans le complexe DSPI, de même que la nature,  $\alpha$  ou  $\gamma$ , des fonctions COOH libres des complexes DSPI et DSPII ont été déduites des propriétés électrorhéophorétiques décrites ci-dessus. Celles-ci ont été comparées à celles que l'on peut prévoir en donnant aux diverses fonctions ionisables les valeurs de pK, supposées inchangées, des acides

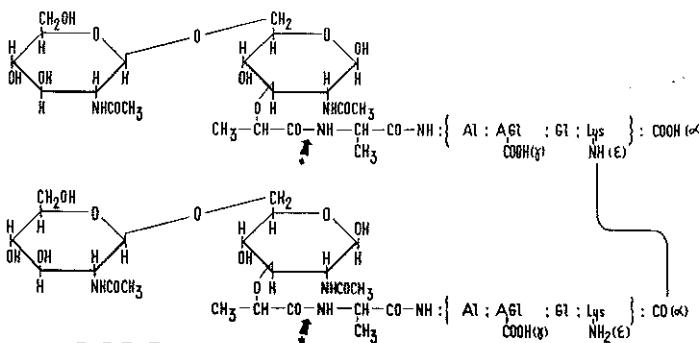
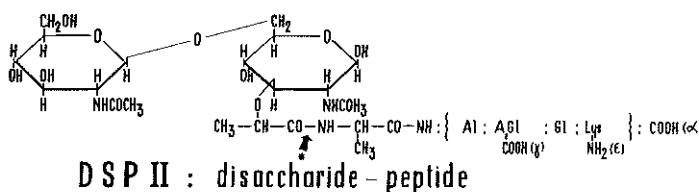


Fig. 2. Formules des complexes DSPI et DSPII. La séquence des acides aminés indiqués entre les parenthèses n'est pas connue.

\* →: Site de l'action de l'amidase F<sub>2</sub>B.

aminés correspondants (Tableau II). Les points isoélectriques ainsi calculés pour DSPII et DSPI se situent respectivement à pH 3.20 et 3. A pH inférieur à 3, DSPII et DSPI doivent être chargés positivement. A pH supérieur à 3.20, ils doivent être chargés négativement. La proportion de charges négatives doit toujours être plus grande dans DSPI que dans DSPII et cette différence ne peut s'annuler que par un abaissement considérable de pH (< 1). Les peptides libres PII et PI possèdent l'un et l'autre trois fonctions basiques et trois fonctions acides. Leur point isoélectrique calculé est identique et se situe à pH 5.5-6, auquel PII et PI doivent se comporter comme des substances neutres.

Ces déductions sont en bon accord avec les propriétés électrorhéophorétiques des complexes DSP et de leurs résidus peptidiques libres (Fig. 1). Au contraire, si les complexes DSP contenaient une fonction  $\alpha$ -COOH supplémentaire, soit en remplacement de la fonction  $\gamma$ -COOH de Glu, soit—pour DSPI—en admettant que la liaison peptide-peptide ne se fasse pas aux dépens d'une fonction  $\alpha$ -COOH, leur point isoelectrique calculé serait considérablement abaissé (pH 2.25 pour DSP II et inférieur pour DSPI). A pH 2.50, l'un et l'autre devraient toujours être chargés négativement.

TABLEAU II  
FONCTIONS IONISABLES DES COMPLEXES DSP  
Les valeurs des  $pK$  sont celles des acides aminés purs.

Complex	$\epsilon$ -NH <sub>2</sub> Lysine ( $pK$ : 10.53)	$\alpha$ -NH <sub>2</sub> Alanine ( $pK$ : 9.87)	$\gamma$ -COOH Acide glutamique ( $pK$ : 4.07)	$\alpha$ -COOH ( $pK$ $\approx$ 2.25)	$pK$ théorique
DSP II	1		1	1	3.20
DSPI	1		2	1	3
PII	1	1	1	1	5.5 - 6
PI	1	2	1	2	5.5 - 6

Les formules proposées pour les complexes DSP et leurs résidus peptidiques libres sont également en accord avec leur comportement chromatographique en butanol acétique. DSPII (P.M. 1,000) et PII se déplacent de quelque 5 cm. Leurs dimères DSPI et PI ont un  $R_F$  nul ou pratiquement nul. Elles permettent également de se rendre compte de l'existence de ponts peptidiques unissant dans les parois intactes de ML, deux chaînes polysaccharidiques (Ag-AAM-AG-AAM-...). *In situ*, DSPII serait un résidu peptidique terminal d'une chaîne polysaccharidique. Il en aurait été libéré sous l'action du lysozyme ou de l'acétylhexosaminidase F1, en emportant avec lui une unité disaccharidique. Grâce à ses deux fonctions aminées cependant, la lysine d'un tel résidu peptidique serait potentiellement bifonctionnelle. Dans certains cas, elle assurerait la dimérisation du peptide (par son  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>) avec, pour conséquence, l'apparition à l'autre bout de la nouvelle chaîne peptidique, d'un second groupe  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> libre de l'alanine. Celui-ci serait alors susceptible de se condenser avec une fonction carboxyle de l'acide N-acétylmuramique appartenant à une chaîne polysaccharidique voisine. *In situ*, DSPI serait un tel pont peptidique unissant deux chaînes polysaccharidiques. Il en aurait été libéré sous l'action des  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) acétylhexosaminidases, en emportant avec lui deux unités disaccharidiques.

Il est possible que l'un des deux alanines terminaux de certains dimères du type PI ait—toujours *in situ*—une fonction aminée libre. Ces doubles chaînes peptidiques pourraient expliquer la présence de cet N terminal dans la fraction NDL de même que dans les parois de ML, ainsi que l'ont observé antérieurement INGRAM ET SALTON<sup>9</sup>. De telles chaînes peptidiques doivent cependant être très peu fréquentes, la quantité d' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> alanine libre décelée étant inférieure à 5 moles par 100,000 g de parois cellulaires.

Il est évidemment frappant de constater l'analogie fonctionnelle que joue l'alanine dans les complexes DSP des parois de ML et dans les nucléotides de PARK<sup>10,11</sup>,

considérés comme des précurseurs des parois de staphylocoques. Dans l'un et l'autre cas, c'est cet acide aminé<sup>12</sup> qui assure la liaison acide N-acétylmuramique-peptide.

L'action de F<sub>2</sub>B sur la fraction NDL montre la présence dans celle-ci d'un certain nombre de résidus disaccharidiques unis à des chaînes peptidiques par la même liaison amidique que celle décrite dans les complexes DSP. Ces disaccharides terminaux trouvent leur origine dans la destruction par le lysozyme de chaînes polysaccharidiques plus importantes. L'augmentation, sous l'action de F<sub>2</sub>B, du nombre de fonctions  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Lys libres dans la fraction NDL n'est pas explicable à l'heure actuelle. Elle pourrait suggérer la présence dans la préparation F<sub>2</sub>B, encore fort impure, d'un enzyme distinct de l'amidase.

#### RÉSUMÉ

Dans un premier type de complexe disaccharide-peptide, le résidu 6-O- $\beta$ -N-acétyl-glucosaminyle-acide N-acétylmuraminylique est relié à un reste peptidique constitué de 2 alanines, 1 glycine, 1 acide glutamique et 1 lysine, par une liaison amidique entre le COOH de l'acide N-acétylmuramique et un NH<sub>2</sub> appartenant à un des résidus alanine du peptide. La réaction au 1-fluor-2,4-dinitrobenzène montre que le groupe  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lysine est libre. Les propriétés électrorhéophorétiques suggèrent que la fonction  $\gamma$ -COOH de l'acide glutamique ainsi qu'une fonction  $\alpha$ -COOH sont libres également.

Le second type de complexe est un dimère du premier réuni par une liaison peptidique entre la fonction  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lysine d'un premier monomère et vraisemblablement la fonction  $\alpha$ -COOH du second.

L'amidase F<sub>2</sub>B agit au niveau de la liaison amidique acétylmuraminylique-alanine avec, pour conséquences, la libération du disaccharide et l'apparition dans le résidu peptidique d'une nouvelle fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> alanine libre.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur J. M. DUMOULIN pour son aide technique. L'auteur est associé au Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. R. J. SALTON ET J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 36 (1959) 552.
- 2 M. R. J. SALTON ET J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 45 (1960) 364.
- 3 J. M. GHUYSEN ET M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 462.
- 4 J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 472.
- 5 O. W. NEUHAUER ET M. LETZRING, *Anal. Chem.*, 27, (1955), 959.
- 6 S. BLACKBURN ET A. G. LOWTHER, *Biochem. J.*, 48 (1951) 126.
- 7 A. L. LEVY, *Nature*, 174 (1954) 126.
- 8 M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 308.
- 9 V. INGRAM ET M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 9.
- 10 T. J. PARK, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 885 et 897.
- 11 J. T. PARK, *Federation Proc.*, 13 (1954) 271.
- 12 J. L. STROMINGER ET R. H. THRENN, *Biochim. Biophys. Acta*, 36 (1959) 92.