

REFERENCES

- ¹ D. M. ZIEGLER, R. L. LESTER AND D. E. GREEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 80.
- ² D. E. GREEN, R. L. LESTER AND D. M. ZIEGLER, *Biochim. Biophys. Acta*, 23 (1957) 516.
- ³ F. M. HUENNEKENS AND D. E. GREEN, *Arch. Biochem.*, 27 (1950) 418.
- ⁴ F. M. HUENNEKENS AND D. E. GREEN, *Arch. Biochem.*, 27 (1950) 428.
- ⁵ F. E. HUNTER, JR., L. FORD AND J. F. LEVY, *Federation Proc.*, 14 (1955) 229.
- ⁶ F. E. HUNTER, JR., J. LEVY, J. DAVIS AND L. CARLAT, *Federation Proc.*, 15 (1956) 278.
- ⁷ K. B. JACOBSON, *Federation Proc.*, 15 (1956) 281.
- ⁸ T. E. FRIEDEMANN AND G. E. HAUGEN, *J. Biol. Chem.*, 147 (1943) 415.
- ⁹ P. K. STUMPF, K. ZARUDNAYA AND D. E. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 817.
- ¹⁰ J. M. LITTLEFIELD AND D. R. SANADI, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 65.
- ¹¹ D. R. SANADI AND J. W. LITTLEFIELD, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 103.
- ¹² E. ADLER, H. V. EULER, G. GÜNTHER AND M. PLASS, *Biochem. J.*, 33 (1939) 1028.
- ¹³ F. L. CRANE, J. L. GLENN AND D. E. GREEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 475.

Received October 2nd, 1956

ACTION DE L'ACTINOMYCETINE SUR LES PAROIS CELLULAIRES BACTERIENNES

M. R. J. SALTON ET J. M. GHUYSEN*,**

Department of Bacteriology, University of Manchester (England)

Depuis la mise au point de techniques adéquates d'isolement des parois cellulaires microbiennes, nos connaissances sur leur constitution physique et chimique se sont précisées et ont été récemment revues et discutées par l'un de nous^{1,2}.

L'étude de la structure macromoléculaire des parois cellulaires échappe évidemment à l'analyse chimique. Un des moyens d'investigation réside dans la caractérisation des fragments obtenus après digestion enzymatique. L'obtention d'enzymes actifs sur les parois cellulaires constitue donc un outil de recherche précieux et l'intérêt présenté par de telles substances deviendra éminent le jour où la paroi cellulaire d'un microorganisme déterminé pourra être digérée par plusieurs enzymes s'attaquant à des types de liaison spécifiquement différents.

Le lysozyme, découvert en 1922 par FLEMING³, dont le substrat type est représenté par les parois de *Micrococcus lysodeikticus*, et l'enzyme "streptolytique" isolé par McCARTY en 1952⁴ sont, à l'heure actuelle, les seuls enzymes bactériolytiques disponibles dans un état suffisamment pur pour autoriser une étude significative des produits de dégradation obtenus après action sur les parois cellulaires. L'un et l'autre de ces enzymes s'attaquent à un substrat de même nature générale mucoïde. Ils en libèrent des substances réductrices et sont certainement indifférents aux liaisons peptidiques qui forment certains chaînons structuraux des parois cellulaires.

LIESKE, en 1921⁵, et GRATIA ET DATH, en 1924⁶, mettaient indépendamment

* Laboratoire de Microbiologie générale et médicale, Université de Liège (Belgique) et Société des Laboratoires Labaz, Bruxelles (Belgique).

** Subsidé par l'Institut pour l'Encouragement de la Recherche scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture, Bruxelles (Belgique).

en évidence les activités bactériolytiques des actinomycètes. L'interprétation du mécanisme de cette action a depuis fait l'objet de nombreuses recherches⁷ et il est bien démontré que les filtrats actifs de culture de *Streptomyces* spp., désignés en 1937 par WELSCH⁸ sous le nom d'actinomycétine, digèrent les bactéries gram positives vivantes par l'intervention de divers enzymes spécifiques parmi lesquelles on connaît actuellement: (1) un principe streptolytique actif sur les streptocoques hémolytiques⁹, vraisemblablement identique à l'enzyme de McCARTY; (2) un complexe pneumolytique¹⁰ et (3) un système staphylolytique responsable de la lyse de *Micrococcus pyogenes*. Parmi ces enzymes bactériolytiques — par ailleurs distincts des nombreuses protéases spécifiques grâce auxquelles l'actinomycétine est également capable de clarifier les suspensions de bactéries gram-positives et gram-négatives préalablement tuées par chauffage¹¹, et de digérer divers substrats protéiniques tels que caséine, kératine, fibrine, fibrinogène, épidermine et mucine^{12, 13} — le système staphylolytique a été plus spécialement étudié. C'est un système complexe qui a été scindé en deux constituants F1 et F2, isolément faiblement actifs, mais pleinement lytiques lorsqu'ils sont associés¹⁴.

L'action éventuelle de ces deux agents au niveau des parois cellulaires microbiennes vient d'être examinée et fait l'objet du présent travail.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. *Actinomycétine*

L'actinomycétine a été préparée par culture du *Streptomyces albus* G⁷ en "shake flasks", dans un milieu spécialement adapté¹⁴ à la production de l'activité staphylolytique.

F1 et F2 ont été séparés par divers procédés chromatographiques et se présentent sous la forme d'une poudre respectivement blanche et légèrement brunâtre, solubles l'une et l'autre en présence d'électrolytes à pH supérieur à 5.

F1 est une protéine basique, dépourvue de F2 et de toute activité protéasique. Homogène à la chromatographie sur échangeurs cationiques et à l'électrophorèse sur papier, elle sédimente sous forme d'un pic unique ($S_{20}^{0,2.35}$ à pH 7.5), présentant toutefois une certaine asymétrie, indicatrice d'une contamination par des substances de faible constante de sédimentation¹⁴.

F2 est constitué par une préparation non complètement purifiée. Dépourvue de F1, elle reste contaminée par un certain nombre d'activités protéasiques. Dans un cas particulier, nous avons cependant utilisé une préparation F2 hautement purifiée, dépourvue d'activités protéasiques et homogène à la chromatographie sur échangeurs cationiques.

2. *Organismes et parois cellulaires*

(a) Nous avons étudié l'action de F1 et F2 sur les parois cellulaires d'un germe gram-négatif: *Escherichia coli* B et des germes gram-positifs suivants: *Staphylococcus aureus* H (S.H.), *Staphylococcus aureus* S (S.S.), *Sarcina lutea* (S.L.), *Sporosarcina ureae* (Delft) (S.U.), *Clostridium welchii* BW 21 (C.W.), *Micrococcus lysodeikticus* NCTC 2665 (M.L.), *Bacillus subtilis* 3610 (B.S.), *Bacillus megatherium* KM (B.M.) et *Bacillus cereus* (B.C.).

(b) *Préparation des parois cellulaires.* Après désintégration des cellules microbiennes dans l'appareil de Mickle, les parois sont purifiées par centrifugations différentielles dans NaCl et eau distillée (voir SALTON¹⁵). Sauf spécification contraire, les parois cellulaires ont été traitées par la trypsine (1 mg de trypsine brute/ml, pH 7.5, tampon phosphate, μ 0.10) pendant 2 heures à 37°. Les parois cellulaires isolées ont été conservées sous forme de suspension concentrée, en eau distillée.

3. *Parois cellulaires traitées au FDNB*

Les groupes aminés libres des parois cellulaires de S.S. et M.L. ont été transformés en dérivés dinitro-phényliques selon le procédé de SANGER¹⁶ modifié par INGRAM ET SALTON¹⁷. 50 mg de parois sont mis en suspension dans 5 ml d'eau contenant 500 mg de NaHCO₃. On ajoute 10 ml d'une solution alcoolique à 5 % (v/v) de 1-fluoro-2:4-dinitrobenzène et on agite pendant 5 heures à l'obscurité. Les parois sont lavées par centrifugations répétées: 4 fois à l'eau distillée, 4 fois à l'alcool, 4 fois à l'éther. On sèche.

4. Mesure de l'activité lytique de F1 et F2

3 ml d'une suspension de parois cellulaires (ou de parois traitées au FDNB ou de cellules microbiennes vivantes) sont mis en incubation à 37° en présence de 10 γ /ml F1, 10 γ /ml F2 ou 10 γ /ml F1 + 10 γ /ml F2 dans des tubes de 6 mm de diamètre. Les troubles sont mesurés au spectrophotomètre Unicam (modèle SP600) à 700 m μ et les résultats sont exprimés sous forme $\log \Delta_0/\Delta_t$ où Δ_0 et Δ_t sont les densités optiques aux temps zéro et t (exprimés en minutes). Les valeurs de Δ_0 sont voisines de 0.5, ce qui correspond à environ 1 mg de parois cellulaires (poids sec) par ml de suspension. Les suspensions sont faites en tampon KH_2PO_4 - K_2HPO_4 de pH 7¹⁸ et de μ variable (de 0.002 à 0.11). L'activité lytique du lysozyme sur les parois de *M.L.* a été mesurée dans les mêmes tampons. Enfin, l'activité du lysozyme sur les parois de *S.H.* et *S.S.* a été recherchée dans le tampon habituellement utilisé pour cet enzyme (pH 7; μ 0.1, NaCl - Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4)¹⁹. Le lysozyme utilisé était une préparation cristallisée (blanc d'oeuf) des Laboratoires Armour.

5. Constitution des parois cellulaires

10 à 15 mg de parois cellulaires ont été hydrolysés par 5 ml de HCl 6 *N* durant 24 heures à 105°. Après séparation de particules d'humine, l'hydrolysât lyophilisé sur H_2SO_4 , a été soumis aux essais chromatographiques suivants:

(a) *Recherche des hexosamines et identification des acides aminés.* Des chromatographies bi-dimensionnelles ont été réalisées, en double, en développant les chromatogrammes selon une première direction soit avec le phénol- NH_3 , soit avec le mélange pyridine-eau (8:2, v/v), et dans la seconde direction avec le solvant *n*-butanol-acide acétique-eau (6:1:2, v/v/v) (révélateur 0.2 % de ninhydrine en acétone).

(b) *Caractérisation des hexosamines.* Après révélation des chromatogrammes précédents, la tache correspondant aux hexosamines a été extraite à l'eau. Après concentration, les sucres provenant de la dégradation des hexosamines par action de la ninhydrine^{20, 21} ont été séparés par chromatographie au moyen du solvant de JERMYN ET ISHERWOOD²² (acétate d'éthyle-eau-pyridine: 2/2/1, v/v/v).

(c) *Identification spécifique de la glycine.* Nous avons utilisé le révélateur proposé par PATTON ET FOREMAN²³ (0.2 % d'o-phthalaldehyde en acétone).

6. Sucres, sucres aminés et acides aminés libérés par action de l'actinomycétine sur les parois cellulaires

50 mg de parois cellulaires ont été digérées à 37°, en 24 heures, dans 5 ml d'une solution d'acétate ammonique de μ optimale, contenant par ml (sauf spécification) 100 γ de F1 ou 100 γ de F2 ou 100 γ de F1 + 100 γ de F2. La solution clarifiée et centrifugée a été dialysée contre 50 ml d'eau pendant 48 heures. Dialysat et fraction non dialysable ont ensuite été lyophilisés sur H_2SO_4 . Les résidus dialysables, repris dans 0.2 ml d'eau, ont été soumis aux essais suivants:

(a) *Recherche qualitative.* Sucres et sucres aminés ont été recherchés en les séparant des acides aminés par chromatographie ascendante en pyridine-eau 8:2, v/v. L'expérience étant faite en double, les acides aminés (et petits peptides) ont été révélés à la ninhydrine, et les sucres aminés par le réactif de PARTRIDGE²⁴ (100 ml de *n*-butanol saturé d'eau + 1.66 g d'acide phthalique + 0.93 ml d'aniline).

(b) *Recherche des hexosamines et identification des acides aminés* (voir 5a et c).

(c) *Identification des DNP acides aminés.* Nous avons utilisé le procédé de BLACKBURN ET LOWTHER²⁵ (chromatographie ascendante sur papier tamponné au phthalate Na-K , 0.1 *M*, pH 6; solvant: alcool amylique saturé du même tampon).

(d) *Caractérisation de l'acide α, ϵ -diaminopimélique:* par chromatographie en méthanol-eau- HCl -pyridine (80:17.5:2.5:10, v/v/v) selon le procédé de RHULAND *et al.*²⁶.

(e) *Recherche de la D-alanine:* les chromatogrammes (voir 5a), séchés et non révélés, ont été vaporisés par une solution de D-aminoacide oxydase obtenue par extraction du rein de mouton au moyen d'un tampon pyrophosphate 0.06 *M* pH 8.3. Après une incubation de 2 heures à 37° en atmosphère humide, l'acide pyruvique éventuellement obtenu a été révélé par le 2:4-dinitro-phénylhydrazine (AUCLAIR ET PATTON²⁷).

7. Electrophorèse

Après lyophilisation, les résidus non dialysables de *S.H.*, *S.S.* et DNP *S.S.* repris dans 0.5 ml d'eau, ont été examinés par électrophorèse sur papier Whatman 3 MM à pH 7 (μ 0.1 ou 0.2; Na-phosphates; NaCl ; tampons de MILLER ET GOLDBER)¹⁹, à pH 9.2 (borax *M*/20) et pH 6.4 (pyridine, acide acétique, eau). Après migration, les divers composants ont été révélés soit à la ninhydrine, soit selon le procédé de RYDON ET SMITH²⁸ (suspension du papier séché en atmosphère de Cl_2 , et détection des N-chloropeptides par l'amidon ioduré).

8. Ultracentrifugation

Les mêmes fractions non dialysables ont été analysées dans une ultracentrifugeuse Spinco,

équipée du système optique de Philpot-Svensson, par la méthode de la "synthetic boundary", en tampon pH 7 de MILLER ET GOLDBER (μ 0.1) et à la concentration de 0.5 %.

9. Action de F1 sur les dipeptides

On a examiné l'action éventuelle de F1—après une incubation de 24 heures à 37° en tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{--K}_2\text{HPO}_4$, pH 7, μ variable—sur les dipeptides suivants: glycyl-glycine (GG); DL-alanyl-DL-alanine (AA); glycyl-DL-alanine (GA), et DL-alanyl-glycine (AG).

Cette recherche a été effectuée en mesurant l'intensité de la coloration à la ninhydrine selon le procédé de COCKING ET YEMM²⁹, après incubation de 30 γ /ml GG—60 γ /ml AA—30 γ /ml GA et 50 γ /ml AG en présence de 10 γ /ml de F1. Les concentrations en dipeptides sont telles qu'au temps zéro, le Δ_{600} de la coloration à 570 m μ est de 0.3. Les acides aminés éventuellement libérés après une incubation de 3000 γ /ml de chacun des dipeptides en présence de 100 γ /ml F1 ont également été recherchés par chromatographie sur papier Whatman No. 1 en phénol- NH_3 . Dans l'une ou l'autre des conditions précédentes, il est possible de déceler une attaque du substrat égale à 10 %.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. Lyse des parois cellulaires par F1, F2 et F1 + F2

La purification et le fractionnement de F1 et F2 ont été réalisés en se basant sur leur capacité de clarifier les suspensions aqueuses des cellules staphylococciques vivantes.

La vitesse de lyse—à pH optimal de 6 à 7—dépend de la force ionique du milieu dont l'optimum, compris entre 0.01 et 0.02 pour les cellules de *S.S.* et *S.H.*, est le même quels que soient les électrolytes utilisés³⁰, mais peut varier suivant la nature des cellules bactériennes. La Fig. 1 montre, par exemple, l'influence de la force ionique sur la lyse de *B. subtilis*, *B. megatherium* et *B. brevis* par 5 γ /ml de F1.

L'action directe de F2 sur les cellules de *Bacillus* spp.—de même que sur les cellules staphylococciques—est très faible. Néanmoins, dans ces deux cas, F2 exerce une action bactériolytique certaine. En effet, l'association F1 et F2 est synergique,

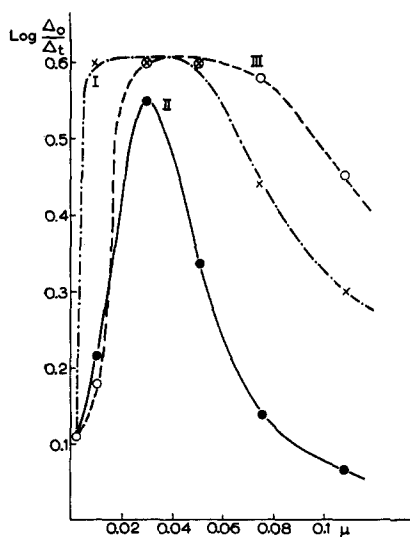


Fig. 1. Influence de la force ionique sur la lyse des cellules vivantes des *Bacillus* species incubées en présence de 5 γ /ml de F1 pendant 10 minutes (*B. subtilis*: courbe I), 30 minutes (*B. megatherium*: courbe III), et 60 minutes (*B. brevis*: courbe II).

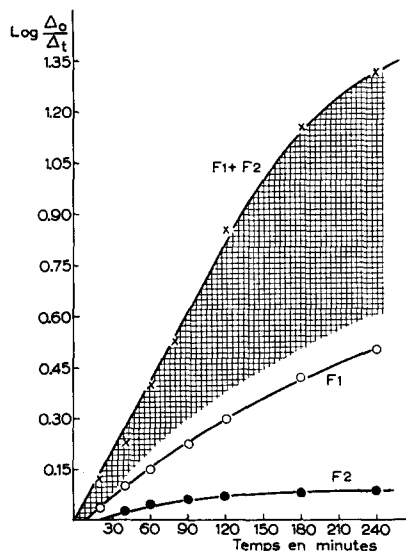


Fig. 2. Cinétique de la lyse des cellules vivantes de *S. aureus* H, incubées à μ 0.01, en présence de F1, F2 et F1 + F2 (10 γ /ml de chaque enzyme utilisé isolément ou en association). La surface hachurée représente l'effet synergique de l'association.

ainsi qu'en témoigne la Fig. 2 relative à la cinétique de la lyse des cellules *S.H.* par F_1 , F_2 et $F_1 + F_2$.

Influence de la force ionique et effet synergique se retrouvent, exactement, lors de la lyse des parois cellulaires purifiées des bactéries correspondantes.

Les diverses parois cellulaires examinées peuvent se classer en trois groupes distincts, selon que l'optimum de force ionique relatif à l'association $F_1 + F_2$ est le même que celui observé pour F_1 seul (groupe I) (Figs. 3 et 4), est compris entre ceux de F_1 et F_2 seuls (groupe II) (Fig. 5), est le même que celui observé pour F_2 seul (groupe III) (Fig. 6).

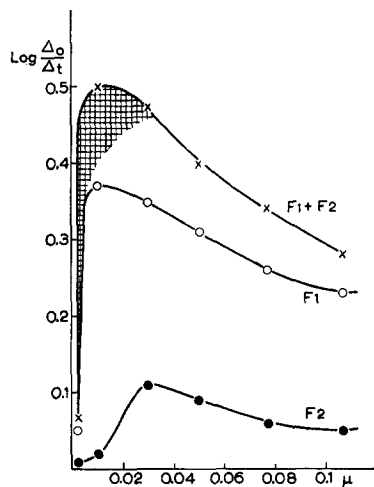


Fig. 3. Influence de la force ionique sur la lyse des parois cellulaires de *S. aureus* H., incubées en présence de F_1 , F_2 et $F_1 + F_2$ (10 γ /ml de chaque enzyme utilisé isolément ou en association) pendant 330 minutes. La surface hachurée représente l'effet synergique de l'association.

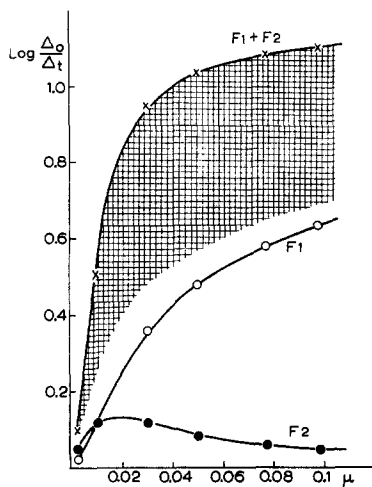


Fig. 4. Influence de la force ionique sur la lyse des parois cellulaires de *Sporosarcina ureae*, incubées en présence de F_1 , F_2 et $F_1 + F_2$ (10 γ /ml de chaque enzyme utilisé isolément ou en association) pendant 180 minutes. La surface hachurée représente l'effet synergique de l'association.

Le groupe I comprend les parois de *S.H.*, *S.S.*, *C.W.*, *B.C.*, *B.M.* et *S.U.* Ces parois sont peu sensibles à F_2 seul et facilement digérées par F_1 seul, avec un optimum de force ionique variable suivant la nature des parois. Il est égal à 0.01 pour *S.S.*, *S.H.* et *C.W.*, à 0.05 pour *B.C.*, compris entre 0.05 et 0.11 pour *B.M.*, et supérieur à 0.11 pour *S.U.* Ces diverses parois peuvent être classées par ordre de sensibilité en exprimant le temps de demi-lyse observé lors de leur incubation en présence de 10 γ F_1 /ml et à force ionique optimale. Le temps de demi-lyse exprime, en minutes, le temps après lequel $\log \Delta_0/\Delta_t$ est égal à 0.3. On obtient ainsi: *B.M.* (30'), *B.C.* et *S.U.* (100'), *S.S.* (135') et *S.H.* (240'). Enfin, le temps de demi-lyse observé pour *C.W.* est supérieur à 600', mais est sans signification; la suspension a en effet été réalisée au moyen de parois cellulaires lyophilisées, qui s'agglomèrent et sédimentent très rapidement.

Le groupe II comprend les parois de *M.L.* F_1 et F_2 ont, à leurs forces ioniques optimales et respectivement égales à 0.03 et 0.002 ou moins, une activité d'intensité comparable. Les temps de demi-lyse sont respectivement égaux à 180' et 300'.

Le groupe III comprend les parois de *S.L.* Dans ce cas, apparemment très particulier, la force ionique (de 0.002 à 0.11) est sans influence sur l'activité de *F1* (temps de demi-lyse supérieur à 500'). D'autre part, *F2*, utilisé à la force ionique optimale de 0.002, donne un temps de demi-lyse égal à 320' et a donc une activité supérieure à *F1*.

En passant du groupe I au groupe III, l'activité bactériolytique de *F2* devient prépondérante. Les Figs. 3 et 4 (*S.H.* et *S.U.*: groupe I), 5 (*M.L.*) et 6 (*S.L.*) illustrent les caractéristiques de chacun des groupes en montrant l'influence exercée par la force ionique, celle-ci étant due aux mélanges KH_2PO_4 - K_2HPO_4 . La Fig. 5 montre égale-

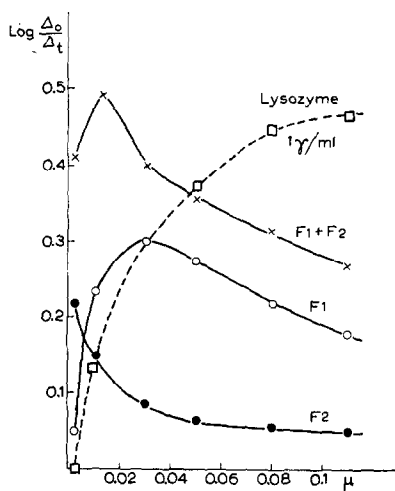


Fig. 5. Influence de la force ionique sur la lyse des parois cellulaires de *M. lysodeikticus* incubées en présence de (a) *F1*, *F2* et *F1* + *F2* pendant 180 minutes (10 γ/ml de chaque enzyme utilisé isolément ou en association); (b) lysozyme pendant 30 minutes (1 γ/ml).

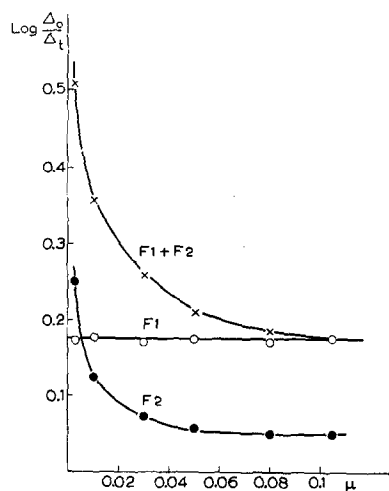


Fig. 6. Influence de la force ionique sur la lyse des parois cellulaires de *S. lutea* incubées en présence de *F1*, *F2* et *F1* + *F2* pendant 230 minutes (10 γ/ml de chaque enzyme utilisé isolément ou en association).

ment que les parois de *M.L.*—substrat type du lysozyme—sont, dans les mêmes tampons, digérés par cet enzyme à une force ionique optimale supérieure à 0.10, ce qui le différencie de *F1* et *F2*.

Signalons enfin que *F1* et *F2* sont pratiquement inactifs sur les parois des bactéries gram-négatives. C'est ainsi que, après une incubation de 24 heures des parois cellulaires de *E. coli* en présence de l'association *F1* + *F2* (10 γ/ml), le $\log \Delta_0/\Delta_t$ atteint seulement 0.150 dans les meilleures conditions de force ionique (0.05).

2. Effet synergique de l'association *F1* + *F2*

Quel que soit le groupe auquel appartiennent les parois cellulaires, l'association de *F1* et de *F2* provoque toujours un effet synergique sur la lyse de celles-ci. Cet effet présente diverses caractéristiques:

(a) Son intensité dépend de la nature des parois cellulaires; relativement faible dans le cas de *S.H.* (Fig. 3), il est très intense dans le cas de *S.U.* (Fig. 4).

(b) Il peut dépendre du traitement appliqué aux parois cellulaires lors de leur préparation, et, en particulier, d'une incubation préalable en présence de trypsine.

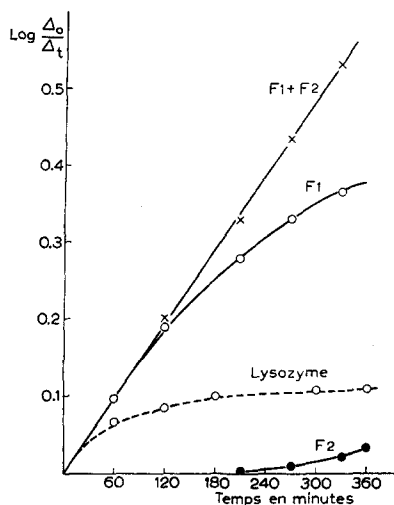


Fig. 7. Cinétique de la lyse des parois cellulaires de *S. aureus* H incubées en présence de (a) F1, F2 et F1 + F2 à μ 0.01 (10 γ /ml de chaque enzyme utilisé isolément ou en association); (b) lysozyme à μ 0.1 (tampon de MILLER ET GOLDER) (100 γ /ml).

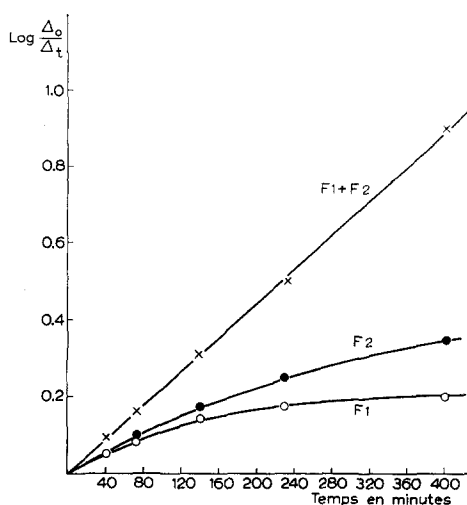


Fig. 8. Cinétique de la lyse des parois cellulaires de *S. lutea* incubées en présence de F1 à μ 0.0005-0.11, de F2 à 0.0005, de F1 + F2 à μ 0.001 (10 γ /ml de chaque enzyme utilisé isolément ou en association).

Dans le cas de *S.S.*, un tel traitement, tout en n'affectant pas la vitesse de lyse des parois par F1 et F2 séparément, diminue fortement l'effet synergique de l'association, sans toutefois le supprimer complètement (Tableau I).

TABLEAU I

INFLUENCE DU PRÉ-TRAITEMENT DES PAROIS CELLULAIRES PAR LA TRYPSINE SUR L'EFFET SYNERGIQUE DE L'ASSOCIATION F1 + F2

*Log Δ_0/Δ_t observé après incubation des parois cellulaires de *S. aureus* S. pendant 150 minutes, à 37°, pH 7, μ 0.03 en présence de F1, F2 et F1 + F2 (20 γ /ml).*

Enzyme	Parois non traitées à la trypsine	Parois traitées à la trypsine
F1 seul	0.4	0.4
F2 seul	0.2	0.2
F1 + F2	1.25	0.9
Effet synergique:	0.65	0.3

(c) L'effet synergique—quoique pouvant ne se manifester qu'après un certain temps de lyse—se traduit généralement par le maintien d'une réaction d'ordre 1. Ce phénomène est particulièrement typique dans le cas de la lyse des parois de *S.H.* et *S.L.* dont la cinétique de lyse est présentée par les Figs. 7 et 8. Notons ici que la Fig. 7 montre également la cinétique des parois de *S.H.* par le lysozyme utilisé à une concentration 10 fois supérieure à celle de F1 et dans le tampon μ 0.1 de MILLER ET GOLDER.

(d) L'effet synergique est-il réellement dû à l'association des deux enzymes bactériolytiques F1 et F2, ou est-il attribuable à un principe supplémentaire—une

des activités protéasiques contenues dans la préparation F2 non complètement purifiée par exemple—n'agissant que lorsque les deux premiers ont suffisamment modifié le substrat sensible? Nous n'avons pas résolu cette question pour chaque type de parois cellulaires. Toutefois, il semble bien que ce soit le même enzyme qui, d'une part, attaque, à lui seul, les parois cellulaires de *S.L.* (Figs. 6 et 8) et, d'autre part, provoque, en association avec F1, une action synergique sur la digestion des cellules staphylococciques vivantes (Fig. 2). En effet, ces deux types d'activité restent inséparables au cours des purifications ultérieures auxquelles la préparation F2 a été soumise¹⁴, et, en particulier, s'éluent sous forme de pics parfaitement superposables lors des chromatographies qui permettent d'éliminer les diverses activités protéasiques.

3. Charges électriques et sensibilité des parois cellulaires

La valeur de la force ionique optimale de lyse, de même que les caractères qui permettent de classer les divers substrats en trois groupes sont probablement la conséquence de la charge électrique de la paroi cellulaire. En effet, le remplacement, par traitement au fluorodinitrobenzène, des groupes libres NH_2 par $\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$ modifie profondément la sensibilité à nos enzymes ainsi que les valeurs des forces ioniques optimales.

Dans le cas des parois de *S.S.*, un tel traitement provoque une élévation de l'optimum de force ionique de 0.01 à 0.05. A cette dernière valeur de μ , les parois traitées au FDNB sont pratiquement aussi sensibles à F1 que l'étaient les parois originales à μ 0.01.

Dans le cas des parois de *M.L.*, la force ionique optimale relative à la lyse par F1, originellement égale à 0.03, est, après traitement, supérieure à 0.10 (Fig. 9). Par contre, F2 est devenu pratiquement inactif, si bien que les parois de *M.L.* traitées au FDNB, contrairement aux parois non traitées, se comportent comme un substrat du groupe I.

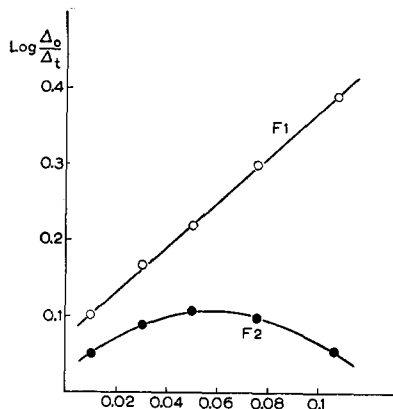


Fig. 9. Influence de la force ionique sur les DNP parois cellulaires de *M. lysodeikticus* incubées en présence de F1 pendant 60 minutes, et de F2 pendant 450 minutes (10 γ /ml de chaque préparation).

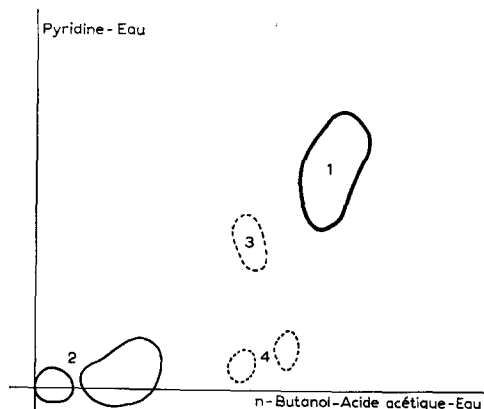


Fig. 10. Chromatogramme en pyridine:eau-butanol acétique de la fraction dialysable obtenue après digestion des parois cellulaires de *B. megatherium* par l'association F1 + F2 1:alanine; 2:matériel probablement constitué de petit(s) peptide(s) dialysable(s) présentant, dans le système utilisé, un R_F analogue à celui de l'acide diaminopimélique; 3 et 4: traces d'acides aminés d'origine indéterminée.

TABLEAU II
ACIDES AMINÉS PRINCIPAUX ET SUCRES AMINÉS
DÉTECTÉS DANS LES HYDROLYSATS ACIDES (HCl, 6N) DES PAROIS CELLULAIRES

Parois cellulaires de	Alanine	Acide glutamique	Glycine	Lysine	Acide diaminopimélique	Glucosamine	Sucre aminé inconnu
<i>Staph. aureus</i> S	+++	+++	+++	++	—	+	+
<i>Staph. aureus</i> H	+++	+++	+++	++	—	+	+
<i>Sp. ureae</i>	+++	+++	++	++	—	++	+
<i>M. lysodeikticus</i>	+++	++	++	++	—	++	+
<i>S. lutea</i>	+++	++	++	++	—	++	+
<i>Cl. welchii</i> **	+++	+++	++	—	+++*	++	+
<i>B. subtilis</i>	+++	+++	—	—	+++	++	+
<i>B. cereus</i>	+++	+++	—	—	+++	++	+
<i>B. megatherium</i>	+++	+++	—	—	+++	++	+

* L'acide diaminopimélique est l'isomère L L.

** Parmi le série des parois cellulaires examinées, seules les parois de *Cl. welchii* BW 21 contiennent un troisième sucre aminé: le galactosamine.

4. Constitution des parois cellulaires

La composition essentielle en acides aminés et sucres aminés des diverses parois cellulaires examinées dans le présent travail est résumée dans le Tableau II. Les résultats sont en bon accord avec les analyses rapportées antérieurement par SALTON^{15, 2}.

5. Analyse des fractions dialysables obtenues après digestion des parois cellulaires par F_I, F₂ et F_I + F₂

50 mg de parois cellulaires ont été soumis à l'action de nos enzymes (voir MATÉRIEL ET MÉTHODES). Dans certains cas, nous n'avons étudié que l'action de F_I; dans d'autres cas, nous avons étudié en outre l'action de F₂ et l'action de F_I + F₂.

La clarification était pratiquement complète excepté pour les parois de *B.S.* (20% d'insoluble après digestion par F_I) et de *S.L.* (40% d'insoluble après digestion par F_I et 25% après F₂; digestion complète par l'association F_I + F₂). Dans le cas de *M.L.* soumis à l'action de F₂, une addition supplémentaire de 100 γ/ml a été effectuée à la 15^{ème} heure de l'incubation.

On a utilisé des solutions mères contenant 2000 γ/ml de F_I ou de F₂ en tampon K₂HPO₄-KH₂PO₄ pH 7 μ 0.01. La concentration en phosphate dans la suspension de parois cellulaires donne donc une force ionique égale à 0.0005 ou 0.001, selon que l'on utilise un seul enzyme ou l'association des deux, le complément de force ionique étant apporté par addition d'acétate ammonique.

(1) La recherche chromatographique des sucres et sucres aminés (pyridine-eau) est négative sur les diverses fractions dialysables non concentrées. Après concentration (volume final de 0.2 ml pour 50 mg de parois digérées), il est possible de déceler la présence de traces de substances migrant avec un *R_F* comparable à celui du glucose ou de l'acétylglucosamine. Toutefois, la libération de telles substances est certainement très faible, comparée à celle produite par l'action du lysozyme sur les parois de *M.L.* par exemple, cas dans lequel une réaction nettement positive est obtenue à partir des fractions dialysables non concentrées.

(2) La recherche chromatographique (pyridine-eau) des substances réagissant

avec la ninhydrine est nettement positive même sans concentration des dialysats. Dans ce cas, on observe la présence de une ou deux substances—suivant les cas—migrant avec un R_F bien déterminé et se détachant sur une traînée de fond faiblement positive. La digestion des parois cellulaires par F1 et F2 s'accompagne donc de la libération d'acides aminés libres et, probablement, de peptides de faible poids moléculaire.

(3) Les acides aminés libérés par la digestion enzymatique ont été recherchés suivant les divers procédés chromatographiques exposés dans MATÉRIEL ET MÉTHODES. Leur identification précise a toutefois rencontré certaines difficultés. En effet: (a) Une disparition incomplète de l'acétate ammonique tamponnant le milieu d'incubation, peut provoquer l'apparition sur les chromatogrammes de faibles taches dues à l'ion NH_4^+ et réagissant à la ninhydrine.

(b) Les préparations enzymatiques F1 et F2, quoique dialysées jusqu'à disparition des électrolytes contenus dans les divers milieux ayant servi à leur purification, ne sont pas entièrement dépourvues d'acides aminés libres (traces de glycine, sérine, acide aspartique, alanine) et, probablement, de petits peptides ainsi, qu'en témoigne l'étalement vers les faibles poids moléculaires du pic d'ultracentrifugation de F1 par exemple.

(c) La présence dans les dialysats de petits peptides, libérés des parois cellulaires par l'action de F1 et F2, apporte parfois une certaine confusion dans l'interprétation des chromatogrammes. Un acide aminé déterminé ne peut donc être certainement identifié que s'il se retrouve correctement localisé dans plusieurs chromatogrammes développés au moyen de solvants différents. Par chromatographie en pyridine-eau et butanol-acide acétique-eau, on observe la présence, dans les dialysats de *B.S.* et *B.M.*, d'un composant réagissant fortement avec la ninhydrine et dont la position correspond à celle de l'acide diaminopimélique (Fig. 10). Il s'en distingue, toutefois, par une différence de coloration, ainsi que par un R_F distinct lorsque la chromatographie est réalisée dans le solvant "méthanol-HCl-eau-pyridine" proposé pour la séparation des isomères de l'acide α, ϵ -diaminopimélique²⁰. De même, par chromatographie unidimensionnelle des dialysats de *S.S.* et *S.H.* en butanol-acide acétique-eau et révélation à l'*o*-phthalaldéhyde—réactif proposé par PATTON ET FOREMAN comme spécifique de la glycine²³—il apparaît une tache d'une coloration verte intense et persistante. Mais le très faible déplacement de ce matériel le distingue nettement de la glycine. Il est possible qu'il soit constitué par un petit peptide dialysable contenant de la glycine en position terminale.

(d) Enfin, les préparations des parois cellulaires elles-mêmes peuvent être une source de contamination des fractions dialysables par des acides aminés et des petits peptides. Et si même un pré-traitement des parois par la trypsine contribue certainement—ainsi que nous l'avons vérifié—à diminuer cet inconvénient, aucune preuve n'existe de l'efficacité absolue du procédé.

On voit que les acides aminés trouvés dans les chromatogrammes à l'état de trace, ont une origine douteuse. Dans ces conditions, seuls les acides aminés libres, dont la concentration dans les fractions dialysables ne peut être expliquée par aucune des considérations précédentes, ont été considérés comme "certainement" libérés des parois cellulaires au cours de la digestion enzymatique.

(4) Le Tableau III donne la composition en acides aminés libres des divers dialysats. On constate que:

TABLEAU III

ACIDES AMINÉS "PRINCIPAUX" LIBÉRÉS PAR DIGESTION ENZYMATIQUE
DES PAROIS CELLULAIRES

Parois cellulaires	Enzyme utilisé	Alanine	Glycine
<i>Staph. aureus</i> H	F1 et F1 + F2	+++	---
<i>Staph. aureus</i> S	F1 et F1 + F2	+++	---
DNP <i>Staph. aureus</i> S	F1	+	++
<i>B. megatherium</i>	F1 + F2	++	---
<i>B. subtilis</i>	F1	+	---
<i>Cl. welchii</i>	F1	+	+++
<i>M. lysodeikticus</i>	F1, F2 et F1 + F2	---	++
DNP <i>M. lysodeikticus</i>	F1	+	++
<i>S. lutea</i>	F1, F2 et F1 + F2	---	++

(a) Alanine et glycine sont les seuls acides aminés certainement libérés.

(b) On n'observe aucune différence lorsque la digestion des parois est réalisée par F1 seul ou F2 seul, ou l'association F1 et F2.

(c) L'alanine, constamment identifiée dans les dialysats du groupe I, n'est pas décelée avec certitude dans ceux des groupes II et III. Il est de plus remarquable que les parois de *M.L.* (groupe II), transformées en DNP dérivés, semblent bien donner une libération d'alanine, et donc se comporter comme un substrat du groupe I, ainsi que les mesures turbidimétriques l'avaient laissé prévoir.

(5) Dans le cas des parois de *S.S.* et *M.L.*, les groupes NH_2 de la glycine et de l'alanine mises en évidence après la digestion enzymatique, ne sont pas libres dans la paroi cellulaire. En effet, ces acides aminés se retrouvent non transformés en DNP dérivés après digestion des parois traitées au FDNB, ainsi qu'il a été vérifié par chromatographie, selon le procédé de BLACKBURN ET LOWTHER²⁵, des dialysats concentrés correspondants.

(6) L'alanine libérée des parois de *S.S.* et *S.H.* par F1 ou l'association F1 + F2 est, au moins partiellement, sous forme D, ainsi qu'en témoigne sa transformation en acide pyruvique par incubation en présence de D-aminoacideoxydase. Faute de déterminations quantitatives, nous ignorons cependant si l'alanine libérée est entièrement sous forme D, ou est un mélange de formes D et L.

(7) Enfin F1, tout au moins, se comporte comme une endopeptidase stricte, car il ne nous a pas été possible de mettre en évidence une action quelconque de cet enzyme sur les dipeptides AA, GG, AG et GA.

6. Analyse des fractions non dialysables obtenues après digestion des parois cellulaires staphylococciques par F1, F2 et F1 + F2

(1) *Electrophorèse sur papier.* Après digestion des parois cellulaires de *S.S.*, par F1 ou l'association F1 + F2, il est possible de séparer, par électrophorèse sur papier, 3 fragments principaux non dialysables, soit à pH 7 (tampon phosphate de MILLER ET GOLDER, μ 0.1) après 3 heures sous 400 V (Fig. 11: rangées I et II), soit à pH 6.4 (tampon pyridine) après 1 heure sous 1000 V (Fig. 11: rangée III). L'intense coloration obtenue par nébulisation à la ninhydrine montre que ces composants sont riches en fonctions NH_2 libres. Toutefois, un seul composant possède un caractère neutre ou basique, des résidus acides devant conférer aux deux autres composants une charge

totale négative. Après digestion par F1 des parois de *S.S.* traitées au FDNB et électrophorèse de la fraction non dialysable concentrée (pH 6.4, pyridine, 1 heure, 1000 V, Fig. 11, rangée IV), on ne retrouve plus que des traces de composants à NH_2 libre. Ils étaient sans doute profondément situés dans les parois originales, ce qui leur permettait d'échapper à l'action du fluorodinitrobenzène. La presque totalité du matériel chromatographié se retrouve sous la forme de deux composants principaux chargés négativement et ne réagissant plus avec la ninhydrine (composants DNP).

Après digestion par F1 seul des parois de *S.H.* et électrophorèse à pH 7, μ 0.1 (3 heures, 400 V) (Fig. 11, rangée V), on observe à nouveau la séparation de trois composants principaux, dont deux chargés négativement. L'image électrophorétique est comparable à celles obtenues à partir des fractions non dialysables de *S.S.* Toutefois, un composant supplémentaire, à caractère nettement basique, apparaît lorsque la digestion de *S.H.* est réalisée par l'association F1 + F2 (Fig. 11, rangée VI). Cette observation permet de confirmer, d'une part, l'individualité des deux souches de staphylocoques utilisées et, d'autre part, la bonne séparation des deux enzymes F1 et F2.

(2) *Ultracentrifugation.* Les indialysats obtenus après digestion des parois de *S.S.* et *S.H.* représentent plus de 70% des parois cellulaires originales. Nous en avons également examiné le comportement à l'ultracentrifuge (solution 0.5%; tampon pH 7, μ 0.1 de MILLER ET GOLDBER). Les divers composants, mis en évidence par électrophorèse, se déplacent sous la forme d'un pic unique (Fig. 12) dont la faible vitesse de sédimentation ($S_{20} = 1$ environ, voir Tableau IV) indique des poids moléculaires de 10,000 à 15,000.

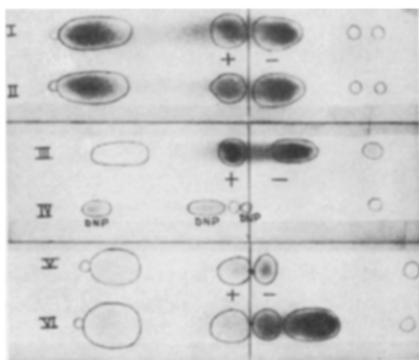


Fig. 11. Électrophorèse sur papier des fractions non dialysables obtenues après digestion enzymatique des parois cellulaires de *S. aureus* S (I, II, III), des DNP parois de *S. aureus* S (IV) et des parois cellulaires de *S. aureus* H (V, VI); conditions électrophorétiques: voir texte.

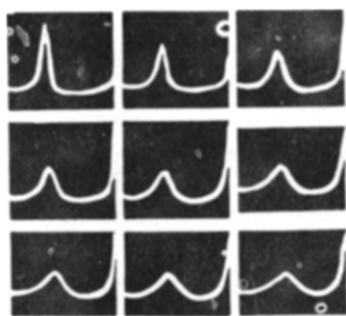


Fig. 12. Ultracentrifugation de la fraction non dialysable obtenue après digestion des parois cellulaires de *S. aureus* S par l'association F1 + F2. Vitesse de rotation: 56,700 r.p.m.; temps entre chaque photo: 8 minutes; température: de 20.9° à 22°.

CONCLUSIONS

L'actinomycétine brute renferme deux enzymes distincts, F1 et F2, dont l'activité lytique sur les structures rigides des parois cellulaires de certaines bactéries gram positives a été démontrée par la clarification des suspensions de ces parois. F1 et F2

TABLEAU IV

ULTRACENTRIFUGATION DU MATÉRIEL NON DIALYSABLE OBTENUS APRÈS
DIGESTION ENZYMATIQUE DES PAROIS STAPHYLOCOCCIQUES

Parois cellulaires	Enzyme utilisé	S ₂₀
<i>S. aureus</i> H	F ₁	0.96
<i>S. aureus</i> H	F ₁ + F ₂	1.05
<i>S. aureus</i> S	F ₁	0.96
<i>S. aureus</i> S	F ₁ + F ₂	0.92
DNP <i>S. aureus</i> S	F ₁	1.26

sont parfaitement séparés l'un de l'autre et peuvent être obtenus à un haut degré de purification du point de vue enzymatique en tout cas:

F₁ et F₂ sont des peptidases dont l'action lytique s'accompagne de la libération d'alanine et/ou de glycine, ainsi que de petits peptides dialysables. L'optimum de force ionique correspondant à la sensibilité maximum des parois cellulaires dépend de la charge électrique de celles-ci et varie respectivement pour F₁ et F₂. Selon que l'optimum de force ionique de l'association F₁ + F₂ est égal à celui de F₁, est compris entre celui de F₁ et F₂, ou est égal à celui de F₂, les parois cellulaires sont groupées en trois catégories. Du groupe I au groupe III, la sensibilité à F₂ va croissant et celle à F₁ va diminuant, l'association F₁ + F₂ étant cependant toujours synergique et permettant l'obtention d'une réaction d'ordre I. Parmi les parois examinées, seules celles appartenant au groupe I libèrent certainement de l'alanine sous l'action de F₁ ou de l'association F₁ + F₂, et, dans le cas des parois staphylococciques, l'alanine libérée est, au moins partiellement, sous la forme D.

L'appartenance à un groupe déterminé n'a aucun rapport avec ce que l'on connaît actuellement de la composition chimique globale des parois cellulaires. En effet, quoique les parois cellulaires de ces divers microorganismes possèdent en commun certains acides aminés (alanine, acide glutamique), les parois staphylococciques sont des complexes glycérophosphoprotéiques³¹ à très faible teneur en polysaccharides, tandis que celles de *S.L.*, *M.L.* et des *Bacillus* spp. par exemple, sont des muco-complexes composés d'environ 50% de polysaccharide et 50% de polypeptide¹⁵. Au contraire, cette classification doit — partiellement au moins — dépendre de la nature et de la position des groupements aminés libres situés à la surface de la paroi cellulaire. En effet, dans le cas de *M.L.*, par exemple, la transformation des NH₂ libres en dérivés DNP transforme ce substrat du type II en substrat du type I.

Après digestion des parois staphylococciques, il est possible de mettre en évidence trois ou quatre composants principaux, non dialysables, représentant au moins 70% des parois originales, d'un poids moléculaire de 10,000 à 15,000, de charges électriques différentes et riches en groupements NH₂ libres.

REMERCIEMENTS

L'un de nous (J.M.G.) remercie le Professeur H. B. MAITLAND pour l'accueil qu'il a bien voulu lui réserver et l'intérêt qu'il n'a cessé de lui témoigner durant le séjour qu'il a effectué dans son département.

Nous remercions également le Professeur V. DESREUX (Institut de Chimie-

Physique, Université de Liège, Belgique) pour l'aide qu'il nous a apportée lors des expériences d'ultracentrifugation.

RÉSUMÉ

Un certain nombre de parois cellulaires gram-positives peuvent être digérées par deux enzymes distincts, contenus dans l'actinomycétine et obtenus à l'état purifié. Contrairement au lysozyme et à l'enzyme streptolytique de McCARTY, ces deux enzymes sont des peptidases dont l'action lytique sur les parois cellulaires s'accompagnent de la libération d'alanine et/ou de glycine et de petits peptides dialysables. La force ionique du milieu joue dans la lyse un rôle essentiel qui a été précisé et qui dépend vraisemblablement de la charge électrique des parois cellulaires. Les produits de la digestion des parois staphylococciques ont été plus spécialement étudiés: une partie au moins de l'alanine libérée est de la forme D; les fractions non dialysables ont été examinées à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation.

SUMMARY

The cell walls of a number of gram-positive bacteria can be digested by two different enzymes, present in actinomycetin, which have been obtained in a purified form. In contrast to lysozyme and the streptolytic enzyme of McCARTY, these two enzymes are peptidases, their lytic action on the cell walls being accompanied by the liberation of alanine and/or glycine and small dialysable peptides. The ionic strength of the medium plays an essential role in the lysis. This role has been described and it probably depends on the electric charge of the cell walls. The products of the digestion of cell walls of staphylococci have been specially studied: at least some of the liberated alanine has the D-form; the non-dialysable fractions have been examined by electrophoresis and by ultra-centrifugation.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. R. J. SALTON, *Proc. 3rd. Intern. Congr. Biochem., Brussels*, 1955, Academic Press Inc., New York, 1956.
- ² M. R. J. SALTON, *6th Symposium Soc. Gen. Microbiol., Bacterial Anatomy*, University Press, Cambridge, 1956.
- ³ A. FLEMING, *Proc. Roy. Soc. (London)*, B 93 (1922) 306.
- ⁴ M. McCARTY, *J. Exptl. Med.*, 96 (1952) 555, 569.
- ⁵ R. LIESKE, *Morphologie und Biologie des Strahlenpilze*, Borntraeger, Leipzig, 1921.
- ⁶ A. GRATIA ET S. DATH, *Compt. rend. soc. biol.*, 91 (1924) 1442.
- ⁷ M. WELSCH, *Rev. belge pathol. et méd. exptl.*, 18, suppl. 2 (1947).
- ⁸ M. WELSCH, *Compt. rend. soc. biol.*, 126 (1937) 244.
- ⁹ M. WELSCH ET J. M. GHUYSEN, *Comp. rend. soc. biol.*, 157 (1953) 1659.
- ¹⁰ J. M. GHUYSEN, *Compt. rend. soc. biol.*, 158 (1954) 729.
- ¹¹ J. M. GHUYSEN, *Compt. rend. soc. biol.*, 156 (1952) 1812.
- ¹² J. M. GHUYSEN ET G. LÉGER, *Compt. rend. soc. biol.*, 158 (1954) 1691.
- ¹³ J. M. GHUYSEN, *Compt. rend. soc. biol.*, 158 (1954) 1694.
- ¹⁴ J. M. GHUYSEN, à publier.
- ¹⁵ M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 512.
- ¹⁶ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- ¹⁷ V. INGRAM ET M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta* (à publier).
- ¹⁸ A. A. GREEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 55 (1933) 2331.
- ¹⁹ G. L. MILLER ET R. H. GOLDBER, *Arch. Biochem.*, 29 (1950) 420.
- ²⁰ S. GARDELL, F. HEIJENSKJÖLD ET A. ROCHNORLUND, *Acta Chem. Scand.*, 4 (1950) 970.
- ²¹ P. S. STOFFYN ET R. W. JEANLOZ, *Arch. Biochem. Biophys.*, 52 (1954) 373.
- ²² M. A. JERNYN ET F. A. ISHERWOOD, *Biochem. J.*, 44 (1949) 402.
- ²³ A. R. PATTON ET E. M. FOREMAN, *Science*, 109 (1949) 339.
- ²⁴ S. M. PARTRIDGE, *Nature*, 164 (1949) 443.
- ²⁵ S. BLACKBURN ET A. G. LOWTHER, *Biochem. J.*, 48 (1951) 126.
- ²⁶ L. E. RHULAND, E. WORK, R. F. DEANMAN ET D. S. HOARE, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 4844.
- ²⁷ J. M. AUCLAIR ET R. L. PATTON, *Rev. can. biol.*, 9 (1950) 3.
- ²⁸ H. N. RYDON ET P. W. G. SMITH, *Nature*, 169 (1952) 922.
- ²⁹ E. C. COCKING ET E. W. YEMM, *Biochem. J.*, 58 (1954) xii.
- ³⁰ J. M. GHUYSEN, *Compt. rend. soc. biol.*, 146 (1952) 1268.
- ³¹ P. MITCHELL ET J. MOYLE, *J. Gen. Microbiol.*, 5 (1951) 981.

Reçu le 5 octobre 1956