

All the H_2O_2 -destroying activity was abolished by boiling the cells for 3 min. Catalase and "peroxidase" activities could be separated cleanly by treatment with toluene and sodium azide, respectively. Exposure to toluene abolished the "peroxidase" activity without affecting the catalase, whereas $10^{-4} M$ azide at pH 7 inactivated the catalase without influencing the "peroxidase" activity. The latter was inhibited 32 % by $10^{-3} M$ azide and 83 % by $10^{-2} M$ azide; these values are appropriate for peroxidases containing heme⁶. A trichloroacetic acid extract of *Rps. spheroides*, prepared as described by VERNON⁷, showed negligible peroxidase activity with guaiacol and cytochrome *c* as hydrogen donors. Aeration or addition of H_2O_2 , sufficient to induce a 10-fold increase in catalase content during 1 h, did not alter the "peroxidase" activity of the initial cells. Thus it is possible to induce wide variations in the relative magnitudes of catalase and "peroxidase" activities in *Rps. spheroides*.

In studies of the effects of H_2O_2 (e.g., in radiobiology), catalase is generally assayed by methods in which the H_2O_2 concentration is millimolar or higher. The destruction of H_2O_2 at much lower concentrations is then predicted from this assay. Such an extrapolation, from the kinetics of peroxide destruction at high concentrations of H_2O_2 to the kinetics at low concentrations, is not justifiable. With *Rps. spheroides*, and perhaps with many other systems, the extrapolation would be grossly in error.

Biology Division, Oak Ridge National Laboratory*,
Oak Ridge, Tenn. (U.S.A.)

R. K. CLAYTON

¹ R. K. CLAYTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 37 (1960) 503.

² R. K. CLAYTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 36 (1959) 35.

³ R. K. CLAYTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 36 (1959) 40.

⁴ D. HERBERT, in S. P. COLOWICK AND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. II, Academic Press Inc., New York, 1955, p. 784.

⁵ M. I. DOLIN, *J. Bacteriol.*, 77 (1959) 383.

⁶ H. M. LENHOFF AND N. O. KAPLAN, *J. Biol. Chem.*, 220 (1956) 967.

⁷ L. P. VERNON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 43 (1953) 492.

Received November 28th, 1959

* Operated by Union Carbide Corporation for the U.S. Atomic Energy Commission.

Biochim. Biophys. Acta, 40 (1960) 165-167

Obtention du substrat du lysozyme contenu dans la paroi ectoplasmique d'*Eberthella typhi*

Nous avons précédemment montré¹ que la paroi ectoplasmique de *Salmonella* pathogènes pour l'homme, contient un substrat du lysozyme, qui paraît—au moins partiellement—responsable de sa rigidité puisque l'activité de l'enzyme se manifeste par sa totale dissolution. Ce substrat, dont on a pu penser qu'il pouvait s'identifier avec l'antigène somatique², n'est accessible au lysozyme que si les bactéries ont subi au préalable un traitement approprié dont l'action paraît être d'arracher des constituants

Biochim. Biophys. Acta, 40 (1960) 167-169

pariétaux superficiels riches en lipides. Nous avons cherché à isoler ce substrat, à le purifier et à l'identifier.

La bactérie étudiée est la souche O-901 d'*Eberthella typhi*, que l'on sait exempte d'antigène Vi, peu riche en antigène H et dont la constitution antigénique O est IX, XII. Elle est cultivée à 37° en milieu agité et oxygéné contenant 2 % d'hydrolysate de caséine et 1 % de glucose. La récolte est faite au bout de 24 h par centrifugation, le culot est remis en suspension en tampon phosphate 0.066 M de pH 7.2. Cette suspension est ajustée de telle manière que diluée 25 fois, elle ait une extinction de 0.97 à 720 m μ , puis elle est répartie à raison de 20 ml en ampoules de 25 ml que l'on scelle.

La méthode choisie pour obtenir les parois ectoplasmiques fait appel à une digestion par la trypsine. Par ce procédé en effet, on peut espérer se débarrasser au mieux des fractions protéiques sans modifier les constituants de nature polysaccharidique, parmi lesquels doit se trouver le substrat du lysozyme. Cependant, pour obtenir une bonne dissolution du protoplasme des bactéries et modifier suffisamment la paroi pour que celle-ci puisse être par la suite solubilisée sans que l'on fasse appel à un traitement violent, il est nécessaire de chauffer les bactéries avant de leur faire subir l'action de la trypsine. Cette opération est réalisée en plongeant pendant 10 min les ampoules scellées, dans de l'eau bouillante. On centrifuge, les bactéries sont remises en suspension dans le même tampon, l'extinction est ajustée à 0.97 à 720 m μ puis on ajoute une solution à 5 mg/ml de trypsine très pure de façon à obtenir une concentration finale de 0.5 mg/ml. On incube à 37° pendant 12 h. Les parois récoltées par centrifugation, remises en suspension dans le même tampon, sont soumises quatre fois encore à une digestion tryptique identique. Après ces opérations, le microscope électronique permet de contrôler que le protoplasme a entièrement disparu et qu'il ne persiste plus que les parois isolées. Celles-ci sont entièrement détruites si on les soumet à l'action du lysozyme en tampon trihydroxyaminométhane en présence d'acide éthylène-diamine-tétracétique¹. En faisant agir dans un volume de 1 ml pendant 2 h, 1 mg de lysozyme sur 21.5 mg de parois sèches, on constate une augmentation du pouvoir réducteur correspondant à 0.194 mg de glucose, ce qui correspond à 7.9 % du pouvoir réducteur total libéré par l'hydrolyse acide.

L'étape suivante consiste à obtenir la dissolution des parois en faisant appel à un traitement aussi peu traumatisant que possible. Dans ce but, on ajoute à la suspension de parois dialysée contre de l'eau distillée et ajustée à l'extinction de 0.97 à 720 m μ , un dixième de son volume de Teepol commercial (solution aqueuse à 21 % du sel de sodium d'alcoylsulfates secondaires). Cette substance tensioactive de pH neutre suffit à détruire entièrement la structure des parois trypsinées dont les constituants passent en solution à l'exception d'une fraction très riche en lipides que l'on écarte par centrifugation.

Il convient alors d'éliminer le Teepol. On y parvient, en le précipitant par le BaCl₂, mais les constituants hydrolysables par le lysozyme se trouvent également précipités. Après centrifugation, le culot est agité en présence d'Amberlite XE-66B qui, fixant le baryum, fait passer le Teepol en solution sous la forme acide. Une extraction par l'éthanol permet de se débarrasser de celui-ci. L'insoluble qui contient le substrat du lysozyme est soigneusement lavé à l'éthanol puis traité par l'acide éthylène-diamine-tétracétique. Une fraction sur laquelle le lysozyme est sans action se dissout, et le substrat du lysozyme demeure insoluble sous forme de complexe barytique. Il représente 3.7 % du poids sec des parois, soit 0.64 % du poids sec des bactéries. Son

insolubilité n'empêche pas le lysozyme d'agir; celui-ci fait passer en solution 24 % des glucides totaux titrés après hydrolyse acide.

Ce substrat contient 6.1 % d'azote, 0.49 % de phosphore et 11.3 % de baryum. Il est de nature glucidolipidopolypeptidique comme l'antigène somatique. La fraction lipidique représente 15.4 % du poids total dont 10.7 % de lipides très fermement liés, extractibles par le chloroforme, ne sont libérés qu'après hydrolyse acide prolongée. La fraction polypeptidique représente entre 36.3 (dosage des acides aminés libérés par la méthode de KEMBLE ET MAC PHERSON³ après hydrolyse acide) et 54 % (dosage des acides aminés par la méthode colorimétrique à la ninhydrine après hydrolyse acide). La fraction glucidique exprimée en glucose est de 9.13 % quand elle est estimée par le pouvoir réducteur après hydrolyse acide (dosage par la méthode de SOMOGYI⁴) et de 13.9 % quand elle l'est par la méthode à l'orcinol (méthode de TILLMANS ET PHILIPPI modifiée par RIMINGTON⁵). En réalité, comme cette fraction contient beaucoup d'oses aminés (10 % du poids total exprimé en glucosamine), et que ceux-ci ne sont totalement libérés qu'après une hydrolyse par HCl 6 N pendant 8 h à 100° (méthode de BELCMER *et al.*, modifiée par MONTREUIL ET SCHEPPLER⁶), ce traitement brutal détruit beaucoup d'autres glucides et il est vraisemblable que les chiffres précédents sont inférieurs à la réalité.

Dans la fraction polysaccharidique, on a identifié par chromatographie sur papier, la glucosamine et l'acide muramique. Les autres constituants s'ils existent, ne doivent se trouver qu'en très faible quantité.

Dans la fraction polypeptidique, on a identifié l'acide diaminopimélique, l'acide glutamique, l'acide aspartique, la lysine, le glycocolle et l'alanine.

Il résulte de cette composition que le substrat du lysozyme ne paraît pas identique à l'antigène somatique puisque la composition de la fraction polysaccharidique est très différente. En revanche, le fait que celle-ci soit riche en hexoses aminés et en acide muramique cadre bien avec ce que l'on sait de la spécificité du lysozyme⁷. De plus, cette composition, ainsi que celle de la fraction polypeptidique, correspond tout-à-fait à celle prêtée par E. WORK⁸ au "constituant fondamental de la structure pariétale", de qui dépendraient les propriétés mécaniques des parois et notamment la rigidité. Mais l'existence d'une fraction lipidique solidement liée à ces constituants est assez inattendue.

*Laboratoire de Bactériologie de la Section Technique de Recherches
et d'Etudes des Services de Santé des Armées, Lyon (France)*

LOUIS COLOBERT
OLIVIER CREACH

¹ L. COLOBERT, *Ann. inst. Pasteur*, 95 (1958) 156.

² L. COLOBERT ET P. SERVANT, *Ann. inst. Pasteur*, 97 (1959) 549.

³ A. R. KEMBLE ET H. T. MACPHERSON, *Biochem. J.*, 56 (1954) 548.

⁴ M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 19.

⁵ C. RIMINGTON, *Biochem. J.*, 34 (1940) 931.

⁶ J. MONTREUIL ET N. SCHEPPLER, *Bull. soc. chim. biol.*, 41 (1959) 13.

⁷ M. R. J. SALTON ET J. M. GHUYSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 36 (1959) 552.

⁸ E. WORK, *Nature*, 179 (1957) 841.

Reçu le 27 décembre 1959