

ÉTUDE D'UN POLYOSIDE DE *Bacillus megaterium*

NADINE SEGOND, MARIE-ANTOINETTE CHALVIGNAC, RAYMOND GAVARD, REGINA TINELLI*,

Institut Pasteur, F-75724 Paris (France)

JOSE L. DI FABIO, D. NEDRA KARUNARATNE ET GUY G. S. DUTTON

Department of Chemistry, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V6T 1Y6 (Canada)

(Reçu le 15 janvier 1982; accepté sous forme revisée le 2 décembre 1982)

ABSTRACT

An intracellular polysaccharide containing D-glucose, D-galactose, and pyruvic acid in the ratios 2:1:1 has been extracted from *Bacillus megaterium*. Periodate oxidation of the polysaccharide, before and after removal of the 1-carboxyethylidene group, and ^1H -n.m.r. examination of the oligosaccharides obtained by acidic partial hydrolysis suggested the following structure for the repeating unit: $\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcP-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcP-(1}\rightarrow 3)\text{-[4,6-O-(Me)(CO}_2\text{H)HC-}\alpha\text{-D-GalP]}(1\rightarrow$. The high content of pyruvic acid suggests that the polysaccharide is a storage form of this acid, which could be liberated by an enzymic process during the metabolism of the bacterium (β -hydroxybutyric acid fermentation in particular).

SOMMAIRE

Un polyoside intracellulaire contenant D-glucose, D-galactose et acide pyruvique dans le rapport 2:1:1 a été extrait de *Bacillus megaterium*. L'oxydation périodique du polyoside avant et après élimination du résidu 1-carboxyéthylidène, suivie de l'étude des oligosides obtenus par hydrolyse acide partielle du polyoside et l'étude des spectres r.m.n.- ^1H ont permis d'établir la structure suivante de l'unité répétitive: $\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcP-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcP-(1}\rightarrow 3)\text{-[4,6-O-(Me)(CO}_2\text{H)C-}\alpha\text{-D-GalP]}(1\rightarrow$. La proportion élevée d'acide pyruvique laisse supposer que le polyoside serait une forme de stockage de cet acide, lequel serait libéré, par voie enzymatique, au cours du métabolisme bactérien (fermentation β -hydroxybutyrique en particulier).

INTRODUCTION

Au cours de la préparation de la dépolymérase du lipide β -hydroxybutyrique

*À qui toute correspondance doit être adressée.

chez *Bacillus megaterium*¹⁾, nous avons mis en évidence la présence d'une substance intracellulaire ayant les caractéristiques d'un polyoside et co-précipitant avec l'enzyme par le sulfate d'ammonium. Le comportement particulier de cette substance, vraisemblablement de nature polyosidique et acide, indiquait que ce polymère était différent des polyosides isolés par Aubert et coll.^{2,3} à partir de *B. megaterium*. Aussi avons-nous entrepris d'isoler directement cette substance afin d'étudier sa nature chimique et, par la suite, son rôle éventuel dans la physiologie de la bactérie.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Méthodes générales. — Le pouvoir rotatoire du polyoside a été déterminé avec un polarimètre Perkin-Elmer (241 Mc). Les spectres de r.m.n. ¹H et ¹³C sont enregistrés respectivement à 400 et 20 MHz sur appareils Bruker WH-400 et Varian CFT-20 avec l'acétone comme standard interne (δ 2,23 et 31,0⁷, respectivement, à partir du signal du 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonate de sodium pris comme référence interne). Les échantillons sont préparés par solution dans D₂O et lyophilisés à plusieurs reprises. Les spectres de r.m.n. ¹H sont enregistrés à 90 ± 5° et ceux de r.m.n. ¹³C à la température ambiante.

Souche bactérienne et culture des bactéries. — La souche de *B. megaterium* M.L. provient de l'ancien Service des Fermentations de l'Institut Pasteur. Les bactéries sont cultivées sur le milieu: D-glucose (35 g), bouillon de haricots (200 mL), K₂HPO₄ (3 g), KNO₃ (3 g), NaNO₃ (3 g), MgSO₄ · 7 H₂O (90 g), MnSO₄ · 4 H₂O (30 mg), FeSO₄ · 7 H₂O (30 mg), eau distillée *q.s.p.* 1 L. Onensemence le milieu (15 L) dans une cuve (25 L) maintenue sous forte aération et forte agitation. Après 16 h de culture, les bactéries sont centrifugées à 4°, lavées deux fois avec une solution saline tamponnée (SP) à pH 7 et les culots bactériens sont conservés à -25°.

Preparations du polyoside. — Nous n'en rappellerons que les principales phases, les détails ayant déjà été publiés⁵. Les culots bactériens sont broyés à la French press (100 MPa) et repris par le tampon SP (3 vol.) et centrifugés. Le surnageant est alors traité par le sulfate de protamine à pH 6 (2% final) pour éliminer les acides nucléiques. Après centrifugation, le surnageant (neutralisé et dialysé) qui contient la depolymérase et le polyoside est précipité au sulfate d'ammonium (60% final). Après centrifugation, le culot de protéines et de polyoside est extrait par dissolution dans une solution saturée de sulfate de soude à pH 3,8 sous agitation forte. Le culot de protéines obtenu par centrifugation contient la depolymérase^{1,2}, et le surnageant, le polyoside. Après une 2^{ème} précipitation au sulfate d'ammonium, on obtient le polyoside "brut" (1 g à partir de 200 mL de bactéries fraîches). Le polyoside est ensuite purifié par un traitement au bromure de cetyltriméthylammonium (10%) qui précipite spécifiquement le polyoside acide. Celui-ci, recueilli par centrifugation, est dissous dans une solution de NaCl 4M puis précipité par l'éthanol (5 vol.). Le polyoside acide est ensuite purifié par passage sur une colonne de DEAE-cellulose, afin d'éliminer les traces de protéines en-

trainées. Le tampon utilisé pour l'équilibration de la colonne est le Tris · formiate 50mM à pH 7, et l'élution se fait sous gradient de concentration continu de tampon Tris · formiate 0,05 à 1M (pH 7). Les fractions contenant le polyoside sont concentrées, dialysées et le polyoside est ensuite lyophilisé.

Constituants. — Les sucres constitutifs ont été dosés par la technique de Somogyi-Nelson⁶, après hydrolyse totale par l'acide sulfurique 0,5M pendant 5 h à 100°; ils sont identifiés par: (a) Chromatographie sur papier Whatman (1, 2 ou 3 MM) (après neutralisation de l'hydrolysat par l'hydroxyde de sodium et passage sur résine MB3) dans les solvants suivants: (A) 1-butanol-pyridine-acide chlorhydrique 0,1M (5:3:2), (B) 1-propanol-acétate d'éthyle-eau (7:1:2), (C) pyridine-acétate d'éthyle-acide acétique-eau (5:5:1:3). Les révélateurs sont le nitrate d'argent⁷, le phtalate d'aniline⁸, ou la *p*-anisidine⁹. (b) Par chromatographie en phase gazeuse, à l'état d'acétates d'alditol sur SP 2 340 (Supelcoport 3%, 100–120 mets.; 4 min. à 195°, puis 2°/min jusqu'à 260°); ou à l'état d'aldonitriles peracétylés selon Chen et McGinnis¹⁰. Le D-glucose et le D-galactose sont dosés spécifiquement par la D-glucose-oxydase (EC 1.1.3.4.) et la D-galactose-oxydase (EC 1.1.3.9.). Les acides uroniques sont identifiés par chromatographie, selon Young et Corden¹¹. Les amino sucres sont révélés par la ninhydrine après chromatographie. Les protéines et le groupe phosphate sont dosés par les techniques respectives de Lowry *et al.*^{12,13}. L'acide pyruvique, isolé par extraction à l'éther, de l'hydrolysat du polyoside, est identifié par formation de la 2,4-dinitrophénylhydrazone (chromatographie et p.f. 212–214°); il est dosé par la technique de Koepsell et Sharp¹⁴, ou celle de Sloneker et Orentas¹⁵.

Élimination du résidu 1-carboxyéthylidène. — L'obtention d'un polyoside non dégradé et dépourvu d'acide pyruvique a été obtenue par "autohydrolyse" du polyoside acide, suivie d'une hydrolyse acide faible: la solution aqueuse de polyoside, passée sur résine échangeuse d'ions IR-120 (H^+) et ayant un pH ~3, est maintenue à 100° pendant 4 h. L'hydrolysat concentré est passé sur une colonne de Bio-Gel P-4 qui permet de récupérer le polyoside non dépolymérisé, mais contenant encore 3–4% d'acide pyruvique. Celui-ci est totalement éliminé (à 0,2% près) par action de l'acide sulfurique 5mM pendant 2 h à 100° qui ne provoque pas la dépolymérisation du polyoside.

Oxydation périodique du polyoside. — Cette oxydation est effectuée sur le polyoside natif et sur le polyoside dépourvu d'acide pyruvique selon la technique, en deux temps, de Sømme¹⁶, et selon la technique de Tinelli et Staube¹⁷ ou par la technique spectrométrique pour les petites quantités¹⁸. Polyoside natif (100 mg, 5 μ M/mL, 29 mg/10 mL), periodate de sodium 16mM, 25°, à l'obscurité pendant 48 h, puis encore pendant 72 h, et la réaction est arrêtée: consommation de 9,4 μ mol. L'hydrolysat de polyoside oxydé (4 mg) par l'acide sulfurique 0,5M, pendant 5 h à 100° est neutralisé par le carbonate de baryum. On centrifuge le sulfate de baryum formé; le sel est éliminé par la résine échangeuse d'ions MB 3 afin que la séparation de l'érythritol et du glycérol par chromatographie soit nette. La solution est alors concentrée à 1 mL et déposée sur papier Whatman no 1 pour une chromatographie

ascendante préparative dans le solvant *B* avec une durée de 7 h. La *p*-anisidine révèle les alcools et les sucres (voir Tableau I). Cette chromatographie (Fig. 1) permet l'élution de l'érythritol et d'une bande correspondant au glycérol (ainsi que d'un "blanc"). Les éluats sont concentrés à 1 mL. Les alcools sont dosés par l'acide chromotropique après oxydation par l'acide périodique en aldéhyde formique selon Hay *et al.*¹⁹.

Obtention d'oligosides par hydrolyse acide ménagée et par hydrolyse enzymatique. — Le polyoside acide est hydrolysé partiellement soit par H₂SO₄ 0,1M à 100° pendant 50 min, soit par l'acide trifluoroacétique 2M à 100° pendant 30 min.

Nous avons isolé à partir du sol, une souche bactérienne, identifiée à *Flavobacterium aquatile*, capable d'utiliser le polyoside comme seule source énergétique de carbone.

L'enzyme est extraite par désintégration des bactéries pendant 2 fois 5 min dans un appareil Sonifier Branson B 30 à 20 keycycles/s. Après traitement au sulfate de protamine à 2%, puis précipitation au sulfate d'ammonium entre 40 et 80% de saturation, le précipité (100 mg en protéines), dialysé contre un tampon phosphate de sodium 0,1M, pH 7, est passé sur une colonne de Sephadex G-100 (hauteur 90 cm, diamètre 3 cm), équilibrée dans le même tampon. Des fractions de 5 mL sont recueillies. L'activité enzymatique définie ci-dessous est retrouvée dans le pic d'exclusion du gel, elle est de 708 nmol de D-glucose/mg de protéine. Après concentration des fractions actives et dialyse contre un tampon Tris · formiate 0,05M, pH 8,2, l'extrait (20 mg de protéines) est posé sur une colonne de DEAE-cellulose (hauteur 12,5 cm, diamètre 3 cm) préalablement équilibrée en tampon Tris · formiate 0,05M, pH 8,2. L'enzyme, élue par un gradient de molarité en Tris de 0,05M (200 mL) à M (200 mL), sort à 0,15M.

L'extrait est ensuite concentré par précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation puis dialysé contre un tampon de phosphate 0,1M, pH 7, et conservé à -20°. L'extrait ainsi obtenu (5,76 mg de protéines) a une activité de 2,06 μmol/mg de protéine. La purification est de 50 fois. À chaque étape de purification, l'enzyme est repérée par l'apparition du pouvoir réducteur mesuré par la méthode de Somogyi-Nelson⁶. Nous avons arbitrairement défini l'activité enzymatique comme la quantité de nmol de D-glucose libérées en 1 h à 37°, à partir d'une solution de polysaccharide à 1% dans un tampon phosphate de sodium 0,1M, pH 7, par 1 mL d'extrait enzymatique. Les protéines sont déterminées par la méthode de Lowry *et al.*¹².

A pH 7 et à 37° cette enzyme dépolymérise le polyoside, tout en laissant le groupe 1-carboxyéthylidène lié aux oligosides. Les produits formés par hydrolyse enzymatique, isolés à l'état de sels de baryum sont séparés par chromatographie sur papier Whatman 3 MM dans le solvant *C* pendant 18 h. La réduction des oligosides par le borohydrure de sodium afin d'identifier le sucre terminal réducteur est faite selon la technique habituelle²⁰.

Sérums. — Le polyoside a été couplé avec l'albumine humaine selon la technique de Goebel et Smith²¹, afin de lui conférer une immunogénicité. Ce com-

plex est dissous dans l'eau physiologique additionnée de 2% $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$; le pH étant ramené à 7, la concentration finale de l'antigène est de 1%. Six injections de 0,5 mL sont faites à un lapin par voie intraveineuse pendant deux semaines. Un rappel est fait après 15 jours. Les techniques classiques de précipitation antigène-anticorps et d'inhibition de la précipitation afin d'identifier le sucre immunodominant ont été décrites^{20,22}.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Composition du polyoside. — Le polyoside obtenu après lyophilisation possède un M_r 88 000–110 000 (déterminé par osmométrie). Il ne contient ni phosphore, ni azote (0,08%) et présente $[\alpha]_D^{23} +69^\circ$ (*c* 0,5, eau).

L'hydrolyse totale du polysaccharide (40 mg) donne 33,5–34 mg de sucres réducteurs (exprimés en D-glucose), soit ~84,5–85%. Ce polyoside ne contient ni groupes phosphates, ni résidus d'acides uroniques ou de sucres aminés. Son caractère acide est dû à la présence d'acide pyruvique qui représente en moyenne 15 à 16%, concentration nettement supérieure à celle existant dans d'autres polyosides bactériens à acide pyruvique^{23–32}. La chromatographie sur papier de l'hydrolysat précédent a montré la présence de deux taches correspondant au D-galactose et au D-glucose. Les dosages enzymatiques ont montré que le rapport Glc:Gal variait de 1,8–2,01. On peut en conclure que le polyoside contient deux molécules de D-glucose et une de D-galactose, l'ensemble représentant 84 à 85% du poids du polysaccharide. La chromatographie en phase gazeuse des acétates d'alditol méthylés a confirmé ce résultat: 2,3,6-tri-*O*-méthyl-Glc/2-*O*-méthyl-Gal 2:1. La quantité d'acide pyruvique étant de 15–16% le rapport D-Glc/D-Gal/acide pyrivate est de 2:1:1

En spectrographie r.m.n. on a observé les résultats suivants: r.m.n.-¹H: δ 5,46 (H-1α), 4,74 (H-1β), 4,53 (H-1α), 1,47 (3 H, pyruvate); r.m.n.-¹³C: δ 104,66, 103,36, 101,62 et 101,14 (C-1α et pyruvate).

Oxydation périodique du polysaccharide. — Cette oxydation a été effectuée sur le produit natif et sur le produit dépourvu d'acide pyruvique. On a observé une consommation de deux moles de periodate par unité répétitive. La chromato-

TABLEAU I

TENEUR EN SUCRES APRÈS OXYDATION PÉRIODIQUE DU POLYOSIDE

Composé	<i>Polyoside (mg/mL)</i>	
	<i>Non oxydé^a</i>	<i>Oxydé</i>
Polyoside ^a	1	0,4
D-Galactose ^b	260	245
D-Glucose ^b	540	2

^aSucres réducteurs avant hydrolyse. ^bAprès hydrolyse

graphie d'un hydrolysat du polysaccharide oxydé a indiqué la disparition quasi totale du D-glucose. Le dosage des sucres restant (Tableau I) a montré qu'effectivement la teneur en D-glucose avait diminué de 99,5%, alors que celle en D-galactose était pratiquement inchangée. Le dosage de l'acide pyruvique dans cet hydrolysat a montré que sa teneur n'avait pas varié (1,1 mol/mol de Gal.). Le glucose étant totalement détruit est donc lié soit à O-4 ou O-6 mais comme il y a 2 molécules de D-glucose par unité répétitive le périodate consommé indique une liaison (1→4). L'acide pyruvique lié a un sucre par une liaison acetal nécessitant 2 groupes hydroxyles libres ne peut être lié au D-glucose qui est oxydable par le périodate. Le D-galactose non oxydé par le périodate, ne peut être lié au D-glucose qu'en O-3, O-4 et O-6 étant liés à l'acide pyruvique.

La chromatographie de l'hydrolysat du polysaccharide oxyde puis réduit montre la présence d'une tache blanche sur fond jaune correspondant à l'erythritol, rien n'apparaissant au niveau du glycerol (Fig. 1). On trouve ~ 8,20 mg

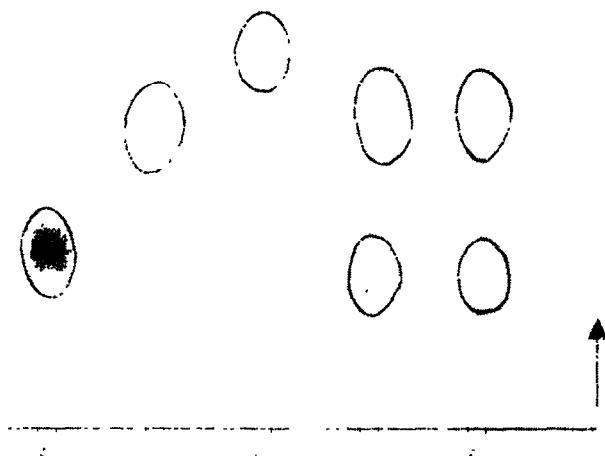


Fig. 1. Chromatographie analytique des produits formés par oxydation périodique du polyoside natif et dépyruvyle sur papier Whatman no. 1 dans 1-propanol-acétate d'éthyle-eau 7/1/2 (v/v) pendant 7 h et révélation avec la *p*-amididine. (A) standard de D-glucose et D-galactose; (B) de erythritol; (C) de glycerol; (D) hydrolysat de polyoside natif oxyde; (E) hydrolysat de polyoside dépourvu d'acide pyruvique et oxyde.

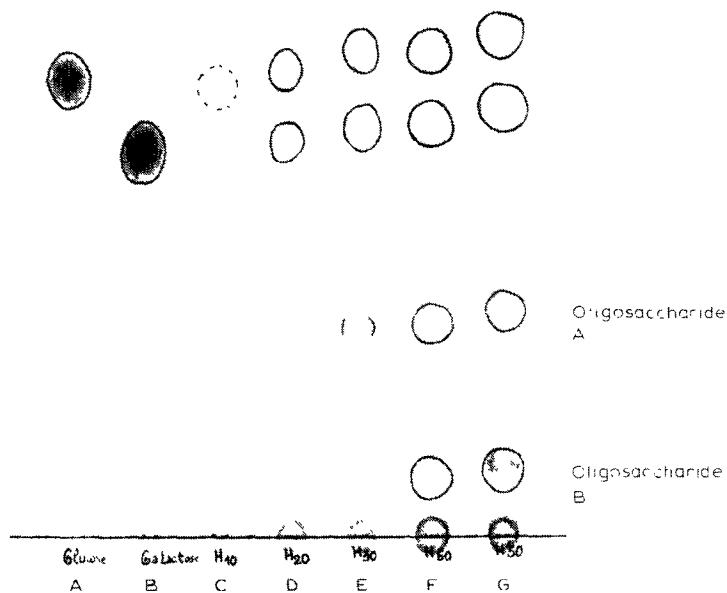


Fig. 2. Chromatographie analytique descendante après hydrolyse ménagée du polyoside avec H_2SO_4 50 mM (C-F) et H_2SO_4 0,1M (G) sur papier Whatman no 2 dans 1-butanol-pyridine-acide chlorhydrique 0,1M 5:3:2 (v/v) pendant 48 h avec révélation par phthalate d'aniline. (A) standard de D-glucose; (B) standard de D-galactose; hydrolyse pendant 10 (C), 20 (D), 30 (E), 40 (F) et 50 min (G).

d'érythritol/mL d'éluat (soit 66 μ mol), soit \sim 1 mol d'érythritol/mol de periodate consommé, ce qui permet de conclure que le D-glucose est lié en O-4.

Oxydation periodique du polyoside dépourvu d'acide pyruvique. — Le polyoside est oxydé dans les mêmes conditions que le polysaccharide natif. Au bout de 5 jours, la consommation de periodate de sodium est de 10,8 μ mol/6 μ mol d'ose, soit \sim 2 mol de periodate/mol d'ose, résultat semblable à celui de l'oxydation périodique du polysaccharide natif. Les dosages de D-glucose et de D-galactose après hydrolyse ont montré que le D-glucose avait disparu, alors que \sim 95% de D-galactose étaient retrouvés. Donc le D-galactose ne peut être lié qu'en O-3 et, par suite, les OH-4 et -6 sont liés à l'acide pyruvique, le qui indique une structure D-Glc-(1 \rightarrow 3)-D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc, mais l'ordre d'enchaînement n'est pas encore établi.

Hydrolyse acide ménagée. — (a) Par H_2SO_4 0,1M pendant 50 min à 100°. Après neutralisation, traitement par résine MB 3 et concentration, cet hydrolysat

est chromatographié (Fig. 2) sur papier (solvant A), pour récupérer les oligosides A et B par élution par l'eau. On a ainsi obtenu à partir de 40 mg, 6,4 mg de l'oligoside A et 4,35 mg de l'oligoside B.

(b) *Par l'acide trifluoroacétique pendant 30 min à 100°.* Après chromatographie sur papier Whatman no 1 (solvant: 1-butanol-acide acétique-H₂O, 2:1:1, v/v), 2 oligosides sont apparus et ont été récupérés: (C) 45 mg, R_{Glc} 0,5; (D) 15 mg, R_{Glc} 0,20.

Structure des oligosides. — La composition des oligosides A et B a été déterminée, après hydrolyse totale de chacun d'eux, par chromatographie de l'hydrolysat et dosage des différents sucres isolés (D-glucose et D-galactose). L'oligoside A est constitué de D-glucose et de D-galactose dans le rapport 1:1, l'oligoside B dans le rapport 2:1 (Tableau II). Ces oligosides ne contiennent pas d'acide pyruvique puisque l'hydrolyse du résidu 1-carboxyethylidène a lieu dans des conditions d'hydrolyse beaucoup plus douces.

Après réduction par le borohydrure et hydrolyse totale des oligosides, le dosage du D-glucose et du D-galactose (voir Tableau II) indique la disparition totale ou partielle du D-galactose dans les oligosides réduits, ce qui suggère que cet ose est à l'extrémité réductrice. Le D-glucose, qui apparaît le premier lors de l'hydrolyse ménagée de l'oligoside, est à l'extrémité non-réductrice.

La chromatographie des hydrolysats (solvant A, papier Whatman no 2) a montré l'absence totale de D-galactose dans l'oligoside A réduit. L'oligoside A est donc un D-glucosyl → D-galactose.

L'oligoside B, qui possède 2 résidus de D-glucose pour 1 de D-galactose et dans lequel la moitié du D-galactose est réduite, ne peut être qu'un hexaoside de formule: D-Glc → D-Glc → D-Gal → D-Glc → D-Glc → D-Gal. L'enchaînement des sucres dans le polyoside est donc: →D-Glc-(1→4)-D-Glc-(1→3)-D-Gal-(1→4)-D-Glc-(1→4)-D-Glc-(1→3)-D-Gal-(1→4)-D-Glc-(1→4)-D-Glc(1→). L'acide pyruvique, dont la fonction acide est libre, est lié sous forme acetal avec O-4 et -6 des résidus de D-galactose.

L'hydrolyse de l'oligoside C libère uniquement du D-glucose et son spectre de r.m.n.-¹³C est identique à celui du cellobiose.

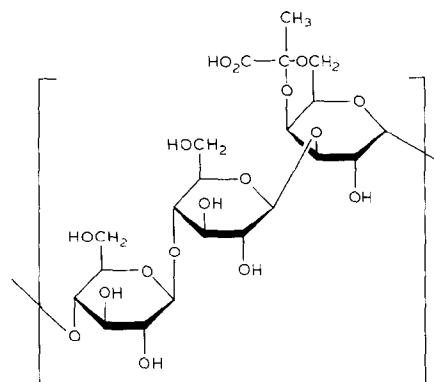
L'oligoside D a montré les propriétés suivantes: $[\alpha]_D^{23} +50^\circ$ (c 0,32, eau); R_{Glc} (1-butanol-acide acétique-H₂O 2:1:1, v/v) 0,20; r.m.n.-¹H (400 MHz,

TABLEAU II

TENEUR EN SUCRES APRÈS RÉDUCTION PAR LE BOROHYDRURE ET HYDROLYSE TOTALE DES OLIGOSIDES A ET B

Sucre	Oligoside (μg)				
		A réduit	B	B réduit	
D-Glucose	75	75	108		103
D-Galactose	80	8	52,5		27

oligoside réduit par le borohydrure): δ 4,50 (1 H), 4,54 (1 H). L'hydrolyse de l'oligoside réduit par l'acide trifluoroacétique, puis la conversion en aldononitriles peracétylés et la chromatographie en phase gazeuse sur OV-225 (3% sur Gas Chrom Q, 100–120 mesh) à 210° ont donné: R_T (par rapport au dérivé du D-mannose) 1,22 (D-glucose, 66 mol/100 mol), 1,45 (galactitol, 33 mol/100 mol). L'oside D a donc la structure D-Glc→D-Glc→D-Gal. La méthylation selon Hakomori³³ et identification par s.m. selon Björndal *et al.*³⁴ de ce trioside réduit a donné les résultats suivants (acétates d'alditols séparés sur OV-225 à 170°): R_T 1,00 (2,3,4,6-Me₄Glc, 45 mol/100 mol); 2,31 (2,3,6-Me₃Glc, 55 mol/100 mol). Ce résultat confirme la structure présentée ci-dessus. Sur la base des résultats précédents, la structure de l'unité de base est représentée par 1.



1

Hydrolyse enzymatique. — La chromatographie de l'hydrolysat (solvant C) a montré la présence de trois taches de faible migration. Seul, l'oligoside correspondant à la tache la plus intense a été récupéré par élution aqueuse (2,5 mg). L'hydrolysat acide de cet oligoside avant et après réduction par le borohydrure de Na a donné un pouvoir réducteur respectivement de 0,128 et 0,107 mg/mL, ce qui indi-

TABLEAU III

PRÉCIPITATION DU POLYOSIDE NATIF ET DÉPOURVU D'ACIDE PYRUVIQUE AVEC SÉRUM DE LAPIN

<i>Polyoside natif ou dépourvu d'acide pyruvique ($\mu\text{g}/\text{mL}$)</i>	<i>Teneur en protéines (μg) dans le précipité avec</i>	
	<i>Polyoside natif</i>	<i>Polyoside dépourvu d'acide pyruvique</i>
2	52	31
5	88	38,5
10	122	37
15	134	34
20	125	27
30	102	

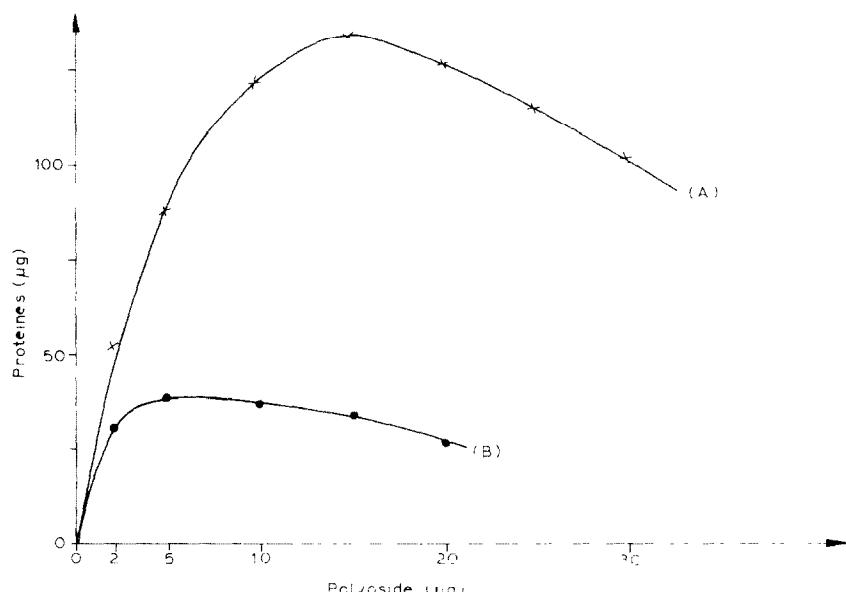


Fig. 3. Courbes de précipitation de l'immunsérum avec le polyoside natif (A) et le polyoside dépourvu d'acide pyruvique (B).

que un degré de polymérisation de 6. La teneur en D-glucose est double de celle du D-galactose et le D-glucose est le sucre terminal réducteur. Le dosage de l'acide pyruvique a montré que celui-ci était en même quantité molaire que le D-galactose. On est donc en présence d'un hexaoside ayant un résidu de D-glucose terminal réducteur, ayant gardé l'acide pyruvique, non hydrolysé par l'action enzymatique.

Propriétés immunologiques du polyoside. — Les réactions de précipitation ont été réalisées avec le polyoside natif et dépourvu d'acide pyruvique contre le sérum de lapin anti-polysaccharide natif-albumine. Les résultats sont représentés sur le Tableau III et la Fig. 3. L'inhibition de la précipitation (le maximum de précipitation est obtenu par 15 μg de polysaccharide natif) est essayée avec le D-glucose, D-galactose et l'acide pyruvique à la concentration de 40 mg/mL (voir Tableau

TABLEAU IV

INHIBITION DE LA PRÉCIPITATION DU POLYOSIDE NATIF^a PAR SÉRUM DE LAPIN

Addition ^b	Protéines précipitées (μg)	Inhibition (%)
Aucune	152	0
D-Glucose	146,5	3,6
D-Galactose	111	27
Acide pyruvique	84	44,7

^a15 μg. ^b40 μg

IV). L'acide pyruvique provoque la plus forte inhibition: il serait donc un véritable constituant immunodominant du polyoside. Cette propriété de l'acide pyruvique a été également signalée par Lew et Heidelberger³⁵ au cours de leur étude sur les polyosides de certains pneumocoques. Le rôle des polyosides à acide pyruvique dans la physiologie des bactéries correspondantes n'est pas encore élucidé. Mais, du moins chez *B. megaterium* où se déroule la fermentation β -hydroxybutyrique, on peut supposer que le polyoside substitué par l'acide pyruvique représenterait une forme de stockage de cet acide. En effet, il apparaît comme facilement hydrolysable et ne semble pas lié au sucre par une liaison spécifique, puisque dans le polyoside³⁵ de *Pneumococcus type IV* il est lié en O-2-O-3 et chez les *Klebsiella K13, K32, K70*, il est lié³⁶ en O-3-O-4. L'acide ainsi stocké par liaison avec des polyosides serait libéré par voie enzymatique selon les besoins de la bactérie.

RÉFÉRENCES

- 1 R. GAVARD, A. DAHINGER, B. HAUTTECOEUR ET C. RAYNAUD, *C.R. Acad. Sci., Ser D*, 263 (1966) 1640-1643.
- 2 R. GAVARD, C. RAYNAUD, B. HAUTTECOEUR ET A. DAHINGER, *C.R. Acad. Sci., Ser D*, 265 (1967) 1557-1559.
- 3 J. P. AUBERT, *Ann. Inst. Pasteur*, 80 (1951) 644-658.
- 4 C. BARRY, R. GAVARD, G. MILHAUD ET J. P. AUBERT, *Ann. Inst. Pasteur*, 84 (1953) 605-613.
- 5 N. SEGOND, *Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études*, Paris, 1980
- 6 M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 19-23.
- 7 W. E. TREVELyan, D. P. PROCTER ET J. S. HARRISON, *Nature (London)*, 166 (1950) 444-445.
- 8 S. M. PARTRIDGE, *Nature (London)*, 164 (1949) 4443.
- 9 J. CERBULIS, *J. Anal. Chem.*, 27 (1955) 1400-1401.
- 10 C. C. CHEN ET G. D. McGINNIS, *Carbohydr. Res.*, 90 (1961) 127-130.
- 11 R. J. YOUNG ET M. E. CORDEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 83 (1964) 124-126.
- 12 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275.
- 13 O. H. LOWRY, N. R. ROBERTS, K. Y. LEINER, M. I. WU ET A. L. FARR, *J. Biol. Chem.*, 207 (1954) 2-17.
- 14 H. J. KOEPSELL ET E. S. SHARP, *Arch. Biochem. Biophys.*, 38 (1952) 443-449.
- 15 J. H. SLONEKER ET D. J. ORENTAS, *Nature (London)*, 194 (1962) 478-479.
- 16 R. SØMME, *Carbohydr. Res.*, 33 (1974) 89-96
- 17 R. TINELLI ET A. M. STAUB, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41 (1959) 1221-1231
- 18 E. A. KABAT ET M. M. MAYER, *Experimental Immunoochemistry*, 2nd edn., Thomas, Springfield, 1961, p. 905.
- 19 G. W. HAY, B. A. LEWIS ET F. SMITH, *Methods Carbohydr. Chem.*, 5 (1965) 377-380.
- 20 R. TINELLI ET A. M. STAUB, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42 (1960) 583-599; 601-610.
- 21 W. F. GOEBEL ET O. T. SMITH, *J. Exp. Med.* (1931) 431
- 22 COURS DE L'INSTITUT PASTEUR, *Immunologie Générale et Médicale*, Paris, 1979.
- 23 A. S. CHAUDHARI, C. T. BISHOP ET W. F. DUDMAN, *Carbohydr. Res.*, 28 (1973) 221-231.
- 24 M. S. COHN, C. W. TABOR ET H. TABOR, *J. Biol. Chem.*, 252 (1977) 8212-8216.
- 25 R. J. FIELDER, S. F. GRAPPEL, C. T. BISHOP ET F. BLANCK, *Can. J. Microbiol.*, 18 (1972) 701.
- 26 P. J. GAREGG, B. LINDBERG, T. ONN ET T. HOLME, *Acta Chem. Scand.*, Ser. B., 25 (1971) 1185-1194.
- 27 P. A. J. GORIN ET J. F. T. SPENCER, *Can. J. Chem.*, 42 (1964) 1230-1232.
- 28 P. A. J. GORIN, T. ISHIKAWA, J. F. T. SPENCER ET J. M. SLONEKER, *Can. J. Chem.*, 45 (1967) 2005-2008.
- 29 M. HEIDELBERGER, W. F. DUDMAN ET W. NIMMICH, *J. Immunol.*, 104 (1970) 1321.
- 30 S. HIRASE, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 30 (1975) 75.

- 31 C J LAWSON, C W McCLEARY, H I NAKADA, D A REES, I W SUTHERLAND ET J F WILKINSON, *Biochem J.*, 115 (1969) 947-958
- 32 D G ORENTAS, J H SLOANE & A JEANES, *Can. J. Microbiol.*, 9 (1963) 427
- 33 S HAKOMORI, *J. Biochem. (Tokyo)*, 55 (1964) 205-208
- 34 H BJORNDAHL, B LINDBERG ET S SVENSSON, *Carbohydr Res.*, 5 (1967) 440-443; H BJORNDAHL, C G HELIERQVIST, B LINDBERG ET S SVENSSON, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 9 (1970) 610-619
- 35 J Y LEW ET M. HILDEBERGER, *Carbohydr Res.*, 52 (1976) 255-258
- 36 G G S DUTION ET K L MACKIE, *Carbohydr Res.*, 62 (1978) 321-335