

L'ACIDE *N*-GLYCOLYL-MURAMIQUE, CONSTITUANT DES PAROIS DE *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*: IDENTIFICATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE*

A.ADAM, J.F.PETIT et J.WIETZERBIN-FALSZPAN

*Institut de Biochimie, Faculté des Sciences,
91 Orsay, France*

P.SINAY

*Laboratoire de Chimie des Composés Biologiques,
Faculté des Sciences, 91 Orsay, France*

et

D.W.THOMAS et E.LEDERER

*Institut de Chimie des Substances Naturelles,
C.N.R.S., 91 Gif-sur-Yvette, France*

Received 20 June 1969

The repeating disaccharide unit of the mucopeptide of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis* contains *N*-acetyl-glucosamine linked to *N*-glycolyl-muramic acid. This first identification of *N*-glycolyl-muramic acid as a natural product has been performed by mass spectrometry of the permethylated disaccharide. *N*-glycolyl muramic acid has been synthesized: the natural and synthetic products are identical.

1. Introduction

Dans une note récente [1], nous avons décrit l'obtention du peptidoglycane de la paroi de *M. smegmatis* par traitement chimique; son hydrolyse par l'enzyme lytique de *Myxobacter AL₁* puis par le lysozyme nous a permis d'isoler ses unités disaccharidiques.

La chromatographie dans divers solvants de ces disaccharides montre qu'environ 10% d'entre eux ont un comportement identique à celui de l'acide *N*-acétyl-

glucosaminy- β -1 \rightarrow 4-*N*-acétyl-muramique isolé de *Micrococcus lysodeikticus*, constituant classique de la paroi de nombreuses bactéries; mais la majeure partie (90% environ) a un comportement différent à la fois de ce disaccharide et de son dérivé *O*-acétylé sur le C-6 de l'acide muramique qui sont les seuls à avoir été rencontrés jusqu'ici [2] dans les parois bactériennes.

La structure de ce disaccharide a pu être établie grâce à la spectrométrie de masse; il s'agit de l'acide *N*-acétyl-glucosaminy- β \rightarrow *N*-glycolyl-muramique; la liaison glycosidique est très vraisemblablement 1 \rightarrow 4. L'acide *N*-glycolyl-muramique obtenu par hydrolyse enzymatique de ce disaccharide est identique à l'acide *N*-glycolyl-muramique obtenu par l'un de nous (P.S.) par synthèse chimique [3].

* 113ème Communication sur les Constituants des Mycobactéries. 112ème Communication: Cl. Amar-Nacasch et E. Vilkas "Etudes des parois d'une souche humaine virulente de *Mycobacterium tuberculosis*. Préparation et analyse chimique", Bull. Soc. Chim. Biol., sous presse.

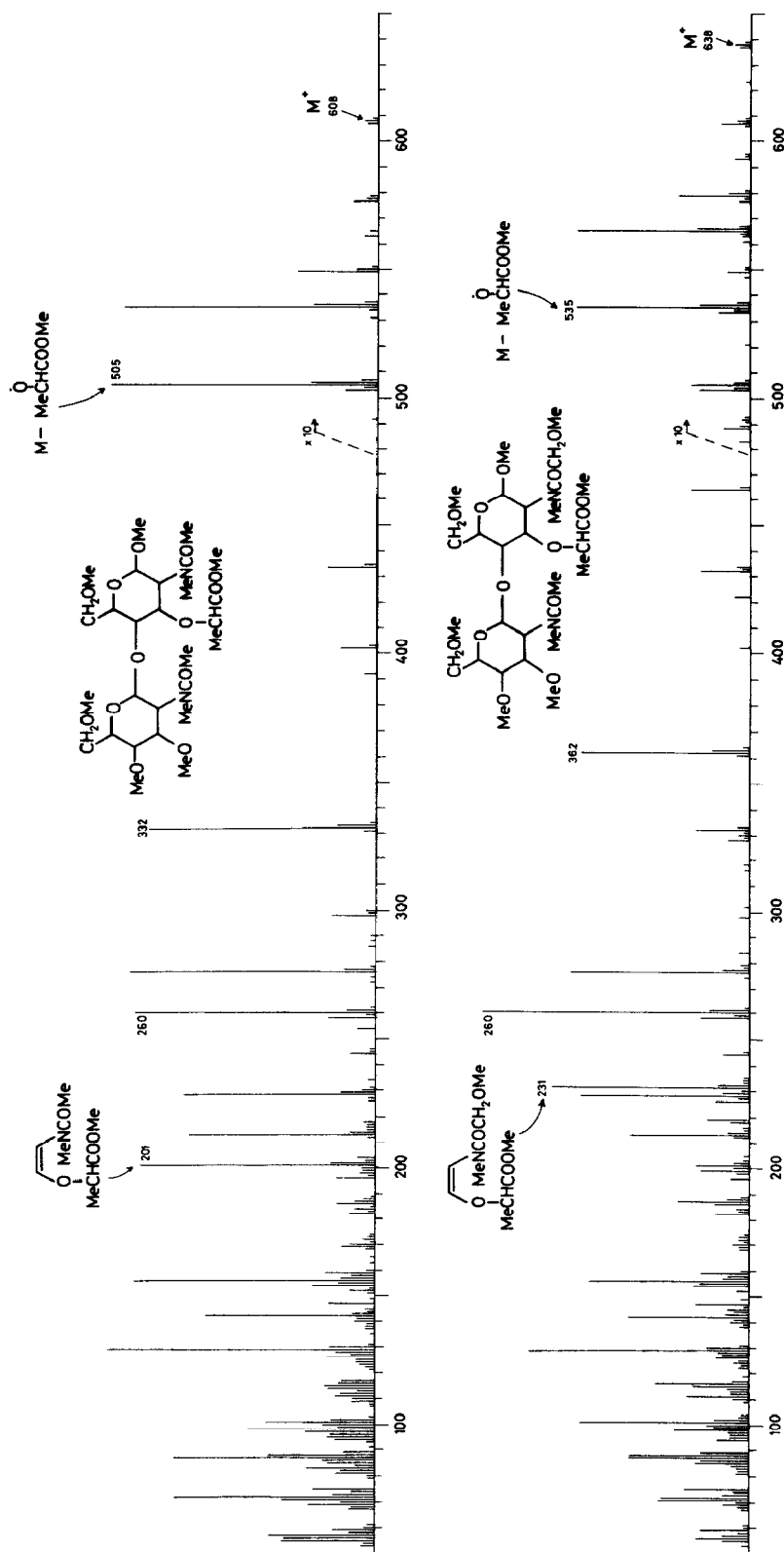


Fig. 1. Spectres de masse des disaccharides perméthylés: en haut, de *M. lysodeikticus*; en bas, de *M. smegmatis*.

2. Méthodes

Les spectres de masse ont été obtenus avec un spectromètre AEI modèle MS 9 après perméthylation selon Coggins et Benoiton [4].

Les chromatographies ont été faites sur papier Whatman no. 1 ou sur couche mince de silicagel G dans les solvants suivants: (1) butanol-acide acétique-eau (5:1:2); (2) butanol-pyridine-eau (5:3:2); (3) acide isobutyrique-ammoniaque *N* (10:6); (4) éthanol-ammoniaque-eau (8:1:1).

Les sucres aminés ont été révélés selon la technique de Sharon [5] et l'acide glycolique par pulvérisation d'une solution à 0.1% de bleu de bromophénol. L'acide glycolique a été dosé par la réactif d'Eegriwe [6] au 2,7-dihydroxy-naphtalène selon la méthode de Calkins [7]. Les disaccharides et sucres aminés acylés ont été dosés par la méthode de Morgan-Elson selon la technique décrite par Ghuysen et al. [8].

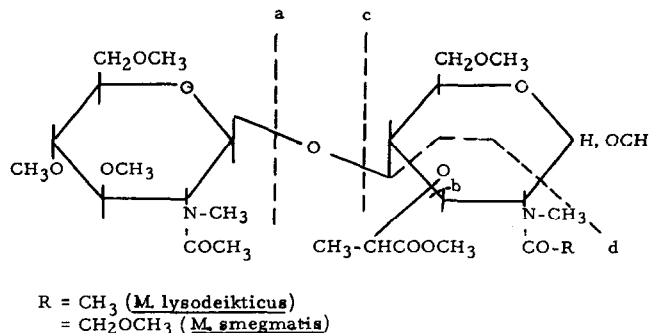
L'acide *N*-acétyl-glucosaminyl- β -1 \rightarrow 4-*N*-acétyl-muramique a été isolé par chromatographie préparative sur papier d'un hydrolysate de parois de *Micrococcus lysodeikticus* par le lysozyme.

3. Résultats

(1) L'hydrolyse acide (HCl 4 N, 4 h, 100°) des disaccharides de *M. lysodeikticus* et de *M. smegmatis* donne des quantités équimoléculaires de glucosamine et d'acide muramique, qui ont été identifiés par chromatographie sur papier dans les solvants 1, 2 et 3 et par chromatographie sur colonne selon Moore et Stein à l'autoanalyseur Technicon*. L'hydrolyse après réduction par le borohydrure de potassium conduit à un mélange de glucosamine et de muramitol, identifiés par chromatographie sur papier dans le solvant 1.

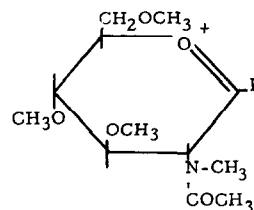
(2) Les spectres de masse des deux disaccharides perméthylés (formule 1) sont très similaires (fig. 1); ils présentent une série de pics identiques et une série de pics homologues, à 30 unités de masse plus haut dans le cas du disaccharide de *M. smegmatis*.

La fragmentation de la liaison osidique selon (a) (voir formule 1) donne lieu dans les deux cas à la



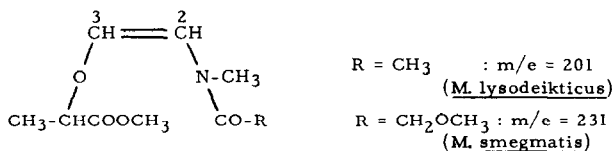
Formule 1.

formation de l'ion oxonium (formule 2), à $m/e = 260$, ce qui confirme la présence et la position terminale de la *N*-acétyl-glucosamine dans les deux disaccharides.



Formule 2.

La fragmentation selon (b) donne un pic très intense à $M-103$, ce qui implique la présence dans les deux disaccharides d'un groupement lactyl. La fragmentation selon (c) conduit à des pics homologues ($m/e = 332$ et 362). Enfin la fragmentation selon (d) conduit à des pics à $m/e = 201$ et 231 provenant du fragment C-2, C-3 (formule 3) de l'acide muramique [9].



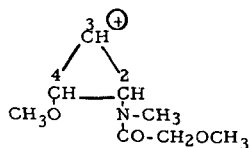
Formule 3.

* Nous remercions le Dr. C.Gros et Madame B.Charetteur, Institut de Biochimie, Faculté des Sciences, Orsay, qui ont effectué les analyses à l'autoanalyseur Technicon.

Comme il y a un groupement lactyl en C-3 dans les deux disaccharides, (puisque chacun donne de l'acide muramique par hydrolyse acide), la seule possibilité qui reste pour expliquer la différence de 30 unités de masse est celle d'une acylation de l'azote en C-2 du disaccharide de *M. smegmatis* par une fonction de 30 unités de masse plus lourde que l'acétyl, soit $-\text{COCH}_2\text{OCH}_3$. Une perdeutériométhylation [10] du disaccharide de *M. smegmatis* ayant montré qu'aucun hydroxyl n'était méthylé dans le produit naturel, nous en concluons que le substituant sur l'azote en C-2 du disaccharide de *M. smegmatis* est un groupement glycolyl.

La similitude des spectres de masse des deux disaccharides perméthylés suggère que la *N*-acétylglucosamine se trouve en position C-4 de l'acide muramique dans le disaccharide de *M. smegmatis*.

En outre, l'absence d'un pic à $m/e = 172$ (voir formule 4) [9] dans le spectre du disaccharide perméthylé de *M. smegmatis*, exclue la présence d'un groupe-



$m/e = 172$

Formule 4.

ment O-Me sur le C-4 et confirme cette hypothèse.

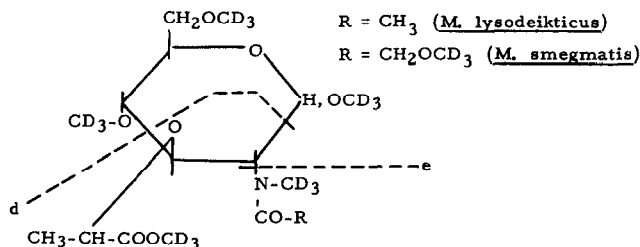
(3) En vue d'avoir une substance de comparaison authentique l'un de nous (P.S.) a synthétisé l'acide *N*-glycolyl-muramique [3]: l'acide muramique est glycolylé par l'anhydride de l'acide *O*-carboxyglycolique [11] dans le dioxane aqueux à pH 6 [12]; l'acide *N*-glycolyl-muramique est ensuite purifié par une chromatographie sur Dowex 2 X 8 (200-400 mesh), forme formiate, avec un gradient d'acide formique.

(4) Les disaccharides de *M. lysodeikticus* et *M. smegmatis* ont été hydrolysés par une *N*-acétyl-glucos-

aminidase isolée de l'intestin de mouton* ou par le suc digestif d'*Helix pomatia***. Tous deux donnent de la *N*-acétyl-glucosamine, et un autre composé qui est l'acide *N*-acétyl-muramique dans le cas de *M. lysodeikticus*, et essentiellement de l'acide *N*-glycolyl-muramique dans le cas de *M. smegmatis*; ces deux dérivés de l'acide muramique ont un comportement chromatographique différent, mais le composé isolé de *M. smegmatis* migre de façon identique à l'acide *N*-glycolyl-muramique de synthèse (tableau 1).

(5) L'acide muramique *N*-glycolyl a été isolé d'un hydrolysate du disaccharide de *M. smegmatis* par le suc digestif de *Helix pomatia*, par chromatographie préparative sur papier dans le solvant (2). L'acide glycolique libéré par une hydrolyse de 2 h à 100° par HCl 2 N a été extrait par l'éther puis dosé par la méthode de Calkins [7]. L'acide glycolique a également été identifié par chromatographie sur papier (solvant 1, $R_f=0,56$) ou sur couche mince (solvant 4, $R_f = 0,42$).

(6) Les spectres de masse des acides *N*-glycolyl-muramiques naturel et synthétique perdeutériométhylés sont identiques: ils ont été comparés au spectre de masse de l'acide muramique *N*-acétylé perdeutériométhylé (voir formule 5).



Formule 5.

Comme dans le cas des disaccharides les spectres sont très similaires (pics moléculaires à $m/e = 411$ et

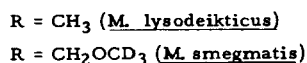
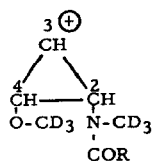
* Nous remercions le Dr. G. Herman (Institut de Biochimie, Orsay) qui a bien voulu nous donner cette préparation enzymatique.

** Fourni par l'Industrie Biologique Française, Quai du Moulin de Cage, 92 Gennevilliers. Nous remercions le Dr. Jarrige (Faculté de Médecine, Paris) qui nous a conseillés dans son utilisation.

Tableau 1

	Solvant 1	RN-acétyl-glucosamine Solvant 2	Solvant 3
Acide <i>N</i> -acétyl-muramique	1,92	0,46	0,97
Acide <i>N</i> -glycolyl-muramique de <i>M. smegmatis</i>	1,36	0,30	0,85
Acide <i>N</i> -glycolyl-muramique synthétique	1,36	0,30	0,85

$m/e = 378$) et présentent dans le cas du dérivé glycolylé des pics à 33 unités plus haut pour les fragments renfermant le substituant aminé; on trouve en particulier dans les deux spectres le pic à $m/e = 302$ qui correspond à la perte du groupement aminé (fragmentation selon (e); (voir formule 5) ainsi que les pics à $m/e = 207$ ou 240 (fragmentation selon (d)) et surtout des pics à $m/e = 148$ ou 181 correspondant aux carbones C-2, C-3, C-4 de l'acide muramique après perte du groupement lactyl (voir formule 6) [9] et dont l'absence dans le spectre du disaccharide de *M. smegmatis* nous a permis de supposer que la liaison osidique se fait sur le carbone 4 de l'acide muramique.



Formule 6

4. Discussion

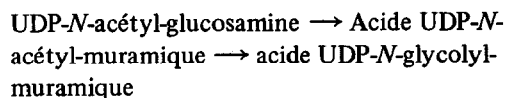
Les expériences que nous venons de décrire démontrent l'existence d'acide *N*-glycolyl-muramique dans la paroi de *Mycobacterium smegmatis*. Plus de 90% de l'acide muramique s'y trouvent sous cette forme. La liaison entre la *N*-acétyl-glucosamine et l'acide *N*-glycolyl-muramique est de toute probabilité β -1 \rightarrow 4; en effet, les spectres de masse des dérivés perméthylés du disaccharide β -1 \rightarrow 4 "classique" de *M. lysodeikticus* et du dérivé *N*-glycolylé de *M. smegmatis* sont très semblables (sauf pour le déplacement de 30 unités de masse de certains pics, déjà mentionné); il manque notamment le pic correspondant au fragment représenté dans la formule 4 qui se serait

formé à partir d'un dérivé 1 \rightarrow 6. L'hydrolyse enzymatique facile, l'analogie très probable des voies de biosynthèse sont également des arguments en faveur d'une liaison β -1 \rightarrow 4.

La présence d'une faible proportion d'acide *N*-acétyl-muramique incite à penser que ce dernier est un précurseur du dérivé *N*-glycolylé, ce qui serait conforme à ce que l'on connaît de la biosynthèse de l'acide muramique: on a pu montrer en effet chez diverses bactéries que l'acide UDP-*N*-acétyl-muramique dérive de l'UDP-*N*-acétyl-glucosamine [13,14].

Schoop et al. [15] ont d'autre part montré que, dans les glandes sous-maxillaires du porc, l'acide *N*-glycolyl-neuraminique est formé par oxydation du dérivé *N*-acétylé.

On peut donc imaginer chez *M. smegmatis* le schéma de biosynthèse suivant:



Ceci nous conduit à postuler l'existence d'une *N*-acétyl-muramate-hydroxylase analogue à la *N*-acétyl-neuraminase hydroxylase de glande sous-maxillaire de porc décrite par Schoop et al. [15].

Remerciements

Ce travail a bénéficié de l'aide de l'Organisation Mondiale de la Santé et de la Fondation pour la Recherche Médicale Française.

Références

- [1] J.F. Petit, A. Adam, J. Wietzerbin-Falszpan, E. Lederer and J.M. Ghuyssen, Biochem. Biophys. Res. Commun. 35 (1969) 429.

- [2] J.M.Ghuysen, *Bacteriol. Rev.* 32 (1968) 426.
- [3] P.Sináý, Abstracts of Papers, 158th Am. Chem. Soc. National Meeting, New York, September 1969.
- [4] J.Coggins et L.Benoiton, Abstracts of Papers, Biol. 18, 156th Am. Chem. Soc. National Meeting, Atlantic City, Septembre 1968.
- [5] N.Sharon, Proceedings of the 3rd Symposium on Fleming's lysozyme, Milan, Avril 1964.
- [6] E.Eegriwe, *Z. Anal. Chem.* 89 (1932) 123.
- [7] V.P.Calkins, *Anal. Chem.* 15 (1943) 762.
- [8] J.M.Ghuysen, D.J.Tipper and J.L.Strominger, in: *Methods in Enzymology*, vol. VIII (Academic Press, New York, 1966) p. 685.
- [9] N.K.Kochetkov and O.S.Chizhov, *Advances in Carbohydrate Chem.* 21 (1966) 39.
- [10] B.C.Das, S.D.Géro and E.Lederer, *Nature* 217 (1968) 547.
- [11] W.H.Davies, *J. Chem. Soc.* (1951) p. 1357.
- [12] F.Wirtz-Peitz, R.Schauer und H.Faillard, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 350 (1969) 111.
- [13] K.G.Gunetileke and R.A.Anwar, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 5740.
- [14] K.G.Gunetileke and R.A.Anwar, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 5770.
- [15] H.J.Schoop, R.Schauer und H.Faillard, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 350 (1969) 155.