

## STRUCTURE DES PAROIS CELLULAIRES DES NOCARDIA. I-SOLEMENT ET COMPOSITION DES PAROIS DE *NOCARDIA KIROVANI*\*

M.GUINAND, M.J.VACHERON et G.MICHEL

*Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences de Lyon,  
43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69 Villeurbanne*

Received 8 December 1969

*Nocardia kirovani* cell walls possess a lipidic fraction, a lipopolysaccharidic fraction and a peptidoglycan. The lipidic part is composed of glycerides, C<sub>16</sub> and C<sub>18</sub> free fatty acids, nocardic acids and of a carotenoid pigment. The lipopolysaccharidic part is composed of an arabinogalactan esterified by nocardic acids. The glycan strand consists of alternating 1→4 linked N-acetylglucosamine and N-glycolylmuramic acid residues substituted by a peptide subunit in which the aminoacids Ala, Glu, *meso*-Dap are present in the molar proportions 1,7:1,2:1.

### 1. Introduction

Les parois des mycobactéries sont constituées d'une fraction polysaccharidique estérifiée par un acide mycolique et d'un peptidoglycane renfermant les acides aminés Ala, Glu, *meso*-Dap [1-5]. Les mêmes acides aminés ont été retrouvés chez les Nocardia [6, 7] mais aucune étude complète de leurs parois n'a été réalisée et les recherches effectuées jusqu'à présent consistent essentiellement en une analyse comparée de différents Actinomycètes [8, 9, 10].

Nous avons préparé les parois de *Nocardia kirovani* et étudié leur partie lipidique ainsi que le peptidoglycane.

### 2. Méthodes et résultats

#### 1. Préparation des parois

Les bactéries cultivées à 37° sur milieu de Sauton pendant une semaine sont récoltées par filtration et lavées à l'eau distillée. Les parois sont préparées par désintégration ultrasonique, à 0° pendant 15 minutes avec un désintégrateur M.S.E. 500 W. Chaque essai

porte sur 25 g de bacilles en suspension dans 50 ml de tampon Tris 0,1 M pH 7,5 contenant du mercapto-éthanol et du sulfate de magnésium. On centrifuge 10 minutes à 1700 g, le culot est repris par 50 ml de tampon, soumis à nouveau à 15 minutes de sonication puis à 10 minutes de centrifugation; on recommence une troisième fois le cycle d'opérations. Les surnageants réunis sont à nouveau centrifugés 10 minutes à 1700 g et le culot est éliminé. On centrifuge ensuite 20 minutes à 40.000 g, le culot est lavé trois fois par le tampon Tris puis soumis à un traitement à l'urée à 60% pendant 4 heures à 37°. On centrifuge à nouveau à 40.000 g et on lave trois fois à l'eau distillée. Le culot est traité par la trypsine à 2 mg/ml dans le phosphate disodique M/30, pendant 5 heures à 37°. On centrifuge à 40.000 g et on lave trois fois. Le résidu lyophilisé constitue les parois brutes (P<sub>A</sub>). 100 g de bacilles humides donnent 2,54 g de parois brutes. Ces parois sont délipidées par extractions répétées avec alcool-éther (1:1), chloroforme et chloroforme-méthanol (1:1) à température ambiante. Chacun des solvants extrait respectivement 15,6% 1,3% et 0,6% de lipides. Le produit restant lyophilisé constitue les parois délipidées (P<sub>B</sub>) représentant 82% du produit initial. Les parois délipidées sont traitées par la potasse méthanolique à 0,5% pendant 48 heures à 37°. La solution alcoolique extrait 23% des parois P<sub>B</sub>, le résidu lyophilisé constitue les parois pures (P<sub>C</sub>). La pureté des pré-

\* 18ème communication sur les constituants des Nocardia.  
17ème communication, voir réf. [14].

parations est vérifiée par examen au microscope électronique après ombrage au platine irradié\*. Les parois présentent l'aspect caractéristique de sacs vides plus ou moins déchiquetés avec une surface granuleuse pour les parois brutes et plus lisse pour les parois délipidées.

### 2. Etude de la fraction lipidique.

La fraction extraite par alcool-éther (1:1) est colorée en orangé. Une chromatographie circulaire sur papier imprégné de kieselguhr [11] permet d'isoler un pigment rouge orangé qui présente un spectre visible caractéristique des caroténoides: pic principal à 478 nm et deux pics secondaires à 455 nm et 508 nm. La chromatographie de l'extrait éthéro-alcoolique sur couches minces de gel de silice dans le solvant hexane-éther (4:1) donne deux taches de  $R_F$  0,71 et 0,78 au niveau des triglycérides et une tache très étalée allant de  $R_F$  0 à  $R_F$  0,27 correspondant aux acides gras libres. La présence de triglycérides est démontrée par spectrométrie de masse et par identification du glycérol après saponification. Les acides gras libres sont recueillis et estérifiés par le diazométhane; les esters méthyliques sont soumis à une nouvelle chromatographie en couches minces dans le solvant hexane-éther (9:1), deux groupes d'esters sont séparés:  $R_F$  0,74 et  $R_F$  0,28. Les premiers sont identifiés par chromatographie gaz-liquide avec les esters d'acides linéaires en  $C_{16}$ ,  $C_{18}$  et  $C_{18:1}$ . Les seconds sont des esters hydroxylés dont le  $R_F$  correspond à celui d'esters nocardiques, la spectrométrie de masse indique qu'il s'agit effectivement d'esters nocardiques [12]. Les acides gras libres comprennent donc des acides de poids moléculaire moyen en  $C_{16}$  et  $C_{18}$  et des acides nocardiques. Ces derniers se retrouvent également dans la solution provenant du traitement par la potasse méthanolique des parois délipidées. Cette solution est acidifiée, le solvant est évaporé et le résidu repris par l'eau puis par l'éther. L'éther renferme les acides nocardiques, dans la solution aqueuse on identifie après hydrolyse chlorhydrique de faibles quantités de galactose et d'arabinose. La saponification des parois délipidées libère donc les constituants d'un arabino-galactane vraisemblablement estérifié par les acides nocardiques.

\* Cet examen au microscope électronique a été effectué au laboratoire de Bactériologie, 32 Boulevard de la Constitution, Liège, Belgique.

### 3. Etude du peptidoglycane

Les différents lots de parois sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique et les hydrolysats sont analysés; les aminoacides sont dosés par la méthode de Morre et Stein à l'autoanalyseur Technicon et les osamines par la méthode de Morgan-Elson selon la technique décrite par Ghuyzen et coll. [13]. Elles sont identifiées à la glucosamine et à l'acide muramique par chromatographie sur papier. La configuration meso de l'acide diaminopimélique est également déterminée par chromatographie sur papier selon Becker et coll. [8]. Le tableau 1 indique les résultats obtenus.

Tableau 1  
Rapports molaires des acides aminés et des hexosamines dans les parois.

Parois	<i>meso</i> -Dap	Glu	Ala	Hexosamines
P <sub>A</sub>	1	1,17	1,64	1,82
P <sub>B</sub>	1	1,2	1,65	1,72
P <sub>C</sub>	1	1,17	1,68	1,76

Le peptidoglycane renferme aussi de l'arabinose et du galactose, constituants de l'arabinogalactane qui a résisté au traitement alcalin. D'autre part les parois pures P<sub>C</sub> sont traitées par le lysozyme et les produits de dégradation sont fractionnés sur colonnes de Sephadex G-50 et G-25 montées en série, ce qui permet d'isoler le disaccharide peptide monomère. Ce dernier est ensuite scindé en disaccharide et en peptide monomère par action de la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase de *Streptomyces*. Le disaccharide est identifié à l'acide N-acétyl glucosaminyl-1 $\rightarrow$ 4-N-glycolyl muramique par spectrométrie de masse du dérivé perméthylé\*\*. Quant au peptide monomère (Ala<sub>2</sub>, Glu<sub>1</sub>, *meso*-Dap<sub>1</sub>) il semble être diaminé d'après sa mobilité à l'électrophorèse à pH 4.

\*\* Cette étude par spectrométrie de masse a été effectuée à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, 91 Gif-sur-Yvette. Nous remercions Monsieur le Professeur E.Lederer et le Docteur D.W.Thomas pour les spectres de masse.

### 3. Discussion

Les parois de *Nocardia kirovani* comprennent trois fractions principales: une partie lipidique, une partie lipopolysaccharidique, un peptidoglycane. Les fractions lipidiques renferment des glycérides et des acides gras libres parmi lesquels se trouve une proportion importante d'acides nocardiques. La présence de ces acides dans les parois est intéressante en raison de l'évolution de leur taux au cours de la croissance bactérienne. On observe effectivement une accumulation d'acides nocardiques au cours de la phase stationnaire du développement bactérien [14].

La fraction lipopolysaccharidique comprend un arabinogalactane estérifié par les acides nocardiques. La présence de mycolates d'arabinose dans les lipides des mycobactéries [15-18] et l'identification d'une liaison entre un acide mycolique et l'arabinogalactane de *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* [3] est en faveur d'un type identique de structure lipopolysaccharidique dans les mycobactéries et les nocardia.

Le peptidoglycane est constitué d'unités disaccharidiques d'acide N-acétyl-glucosaminyl-1→4-N-glycolyl muramique liées à une portion peptidique comprenant les acides aminés Ala, Glu, meso-Dap dans les proportions 1,7:1,2:1. Cette structure est analogue à celle du peptidoglycane des mycobactéries. En effet si la présence d'unités d'acide N-acétyl-glucosaminyl- $\beta$ -1 → 4-N-acétyl muramique a été trouvée dans toutes les bactéries étudiées [19], Adam et coll. ont démontré récemment que l'acide muramique était N-glycolylé dans les parois de *Mycobacterium smegmatis* [20]. Cette structure semble spécifique des mycobactéries les genres voisins *Streptomyces* et *Corynebacterium* possédant comme les autres bactéries le dérivé N-acétylé de l'acide muramique [21]. Les Nocardia présentent donc une analogie nouvelle avec les mycobactéries.

### Remerciements

Ce travail a été effectué avec la collaboration technique de M.C.Forrat et M.Karahjoli. Nous remercions

Monsieur le Professeur J.M.Ghuyse, laboratoire de Bactériologie, Liege, Belgique pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et Monsieur J.F.Petit, Institut de Biochimie, Faculté des Sciences d'Orsay, pour ses précieux conseils.

### References

- [1] I.Azuma, Y.Yamamura and K.Fukushi, J. Bacteriol. 96 (1968) 1885.
- [2] F.Kanetsuna, Biochim. Biophys. Acta 158 (1968) 130.
- [3] F.Kanetsuna, T.Imaeda and G.Cunto, Biochim. Biophys. Acta 173 (1969) 341.
- [4] J.F.Petit, A.Adam, J.Wietzerbin-Falszpan, E.Lederer and J.M.Ghuyse, Biochem. Biophys. Res. Comm. 35 (1969) 429.
- [5] C.Amar-Nacasch et E.Vilkas, Bull. Soc. Chim. Biol. 51 (1969) 613.
- [6] C.S.Cummins and H.Harris, J.Gen. Microbiol. 18 (1958) 173.
- [7] C.S.Cummins, Ann. Inst. Pasteur 103 (1962) 385.
- [8] B.Becker, M.P.Lechevalier, R.E.Gordon and H.A.Lechevalier, Appl. Microbiol. 12 (1964) 421.
- [9] B.Becker, M.P.Lechevalier and H.A.Lechevalier, Appl. Microbiol. 13 (1965) 236.
- [10] H.A.Lechevalier, M.P.Lechevalier and B.Becker, Int. J. System. Bacteriol. 16 (1966) 151.
- [11] A.Jensen and S.Liaaen-Jensen, Acta Chem. Scan. 13 (1959) 1863.
- [12] C.Bordet et G.Michel, Bull. Soc. Chim. Biol. 51 (1969) 527.
- [13] J.M.Ghuyse, D.J.Tipper and J.L.Strominger in Methods in Enzymology VIII p. 685, Academic Press New York (1966).
- [14] C.Bordet, M.J.Vacheron et G.Michel, FEBS Letters sous presse.
- [15] I.Azuma and Y.Yamamura, J.Biochem. 52 (1962) 200.
- [16] N.P.V.Acharaya, M.Senn et E.Lederer, C.R. Acad. Sci. 264 (1967) 2173.
- [17] M.Bruneteau et G.Michel, Chem. Phys. Lipids 2 (1968) 229.
- [18] E.Vilkas et J.Markovits, FEBS Letters 2 (1968) 20.
- [19] J.M.Ghuyse, Bacteriol. Rev. 32 (1968) 426.
- [20] A.Adam, J.F.Petit, J.Wietzerbin-Falszpan, P.Sinay, D.W.Thomas et E.Lederer, FEBS Letters 4 (1969) 87.
- [21] I.Azuma, D.W.Thomas, A.Adam, J.M.Ghuyse, R.Bonaly, J.F.Petit and E.Lederer, Biochim. Biophys. Acta soumis pour publication.