

## ETUDE DES PAROIS D'UNE SOUCHE DE *MICROMONOSPORA*. I. ISOLEMENT D'UN PHOSPHATE DE GLUCOSAMINE \*

E.VILKAS, J.C.MASSOT et E.ZISSMANN

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

Received 30 January 1970

### 1. Introduction

Les *Micromonospora* font partie, comme les Mycobactériacées, de l'ordre des Actinomycetales. Peu de travaux ont été publiés à ce jour sur la composition chimique de ces microorganismes dont certaines souches produisent des antibiotiques comme la gentamycine ou la megalomycine [1, 2]. Dans le cadre d'une étude taxonomique, Cummins et Harris étudient en 1958 les constituants des parois de 5 souches de *Micromonospora* et signalent la présence d'alanine, de glycine, d'acide glutamique, d'acide LL et DL diamino-pimélique, de glucosamine et d'acide muramique [3]. Yamaguchi publie en 1965 une étude comparative de la composition des parois des Actinomycetales où il inclue les *Micromonospora*. Il confirme les résultats de Cummins et Harris [3] en ce qui concerne les acides aminés et signale la présence de quantités variables de pentoses et d'hexoses [4].

Parallèlement à l'étude des parois de *Mycobacterium tuberculosis* [5, 6], nous avons entrepris celle de la structure des parois d'une souche de *Micromonospora*.

### 2. Matériel et méthodes

La souche de *Micromonospora* SpF<sub>3</sub> a été aimablement mise à notre disposition par le Dr. H.A. Lechevalier (Rutgers University, New Brunswick).

Les microorganismes, après complète sporulation sur une gelose contenant 1% de glucose et 1% d'ex-

trait de levure Difco, sont cultivés dans un milieu liquide de même composition, pendant 6 jours à 24°C sous agitation à 220 rpm. Le mycélium et les spores, récoltés par centrifugation et abondamment lavés à l'eau distillée, sont homogénéisés dans l'eau saline et cassés avec la presse de French (3 passages à 4°C). La centrifugation à 1000 rpm à 4°C sépare les cellules non cassées. La suspension surnageante est ensuite centrifugée à 13000 rpm pendant 30 min; ce traitement permet d'obtenir les parois brutes. Elles sont ensuite incubées avec la pronase\*\* (solution à 10%) dans le tampon phosphate 0.067 M à pH 7,8 pendant, 18 h, puis séparées du surnageant par centrifugation et lavées plusieurs fois avec de l'eau distillée. Après digestion pronasique, les parois sont délipidées à la température ambiante successivement par l'acétone, l'alcool/éther (1/1) et le chloroforme/méthanol (2/1).

Les anlayses qualitatives et quantitatives d'acides aminés et de sucres aminés sont effectuées sur les hydrolysats des parois à l'aide de l'autoanalyseur de Beckman. Les sucres aminés sont également dosés selon la méthode d'Elson-Morgan, modifiée par Rimington [7]. Le dosage de phosphore est fait selon King [8].

Les sucres neutres sont dosés par la méthode au phénol [9] et identifiés par chromatographie sur papier.

Les chromatographies sur papier Whatman No. 1 ou 4 et sur couche mince (Silicagel G Merck) sont effectuées dans les mélanges de solvants suivants:

\*\* Le traitement par la pronase a été ensuite abandonné, les parois ayant avant et après l'incubation la même composition en acides aminés.

\* 1ère communication sur les constituants des *Micromonospora*.

- A. butan-1-ol/acide acétique/eau 4/1/5
- B. butan-1-ol/éthanol/eau 10/1/2
- C. méthanol/acide formique/eau 85/15/5 ascendante
- D. propan-1-ol/ $\text{NH}_3\text{OH}$  (sp.0,88)/eau 6/3/1
- E. propan-1-ol/eau 7/1

Les révélations utilisées sont: la ninhydrine pour les acides et sucres aminés, le réactif molybdique pour les esters phosphoriques [10], le nitrate d'argent alcalin pour les glycols [11], le phtalate d'aniline pour les sucres réducteurs et le réactif d'Elson-Morgan pour les sucres aminés [12].

### 2.1. Extraction des parois par l'acide trichloroacétique [13]

500 mg de parois délipidées sont homogénéisées dans 50 ml de TCA à 10% et laissées en contact pendant 24 h à 4°C sous agitation mécanique. On sépare le surnageant pas centrifugation et on recommence l'extraction dans les mêmes conditions pendant 72 h. Après centrifugation, les deux surnageants sont réunis et concentrés par lyophilisation. A un volume de la solution acide on ajoute 5 volumes d'éthanol glacé. Il se forme un précipité incolore (130 mg) qui est séparé par centrifugation.

### 3. Résultats

*Micromonospora* SpF<sub>3</sub> contient environ 1% de lipides totaux (par rapport au poids sec) dont 60% sont des phospholipides, le reste étant composé de glycérides, d'acides gras libres, de peptido- et de glycolipides [14].

La composition des parois délipidées est indiquée dans le tableau 1.

Des quantités importantes d'ammoniaque ont été mises en évidence au cours de l'analyse selon Moore et Stein effectuée sur l'hydrolysat acide des parois. Les

carboxyles d'acides aminés non engagés dans les liaisons peptidiques semblent donc amidifiés [15].

L'hydrolysat contient également de faibles quantités de glycérol décelées par chromatographie sur papier.

La glycine, lalanine, l'acide glutamique et l'acide diaminopimélique ont été identifiés dans les parois en proportions molaires approximatives 1,5/1/1/2; les aminosucres, glucosamine et acide muramique se trouvent en proportion molaire de 3/1. Les parois ne contiennent pratiquement pas d'autres acides aminés.

Le dosage selon Calkins [16] effectué sur les parois montre la présence d'acide glycolique en quantité à peu près équimoléculaire avec l'acide muramique (0,7/1). L'acide muramique de *Micromonospora* pourrait donc se trouver sous forme *N*-glycolylé comme c'est le cas chez les Mycobactéries et *Nocardia* [17, 18].

Le précipité obtenu à partir de l'extrait trichloroacétique au moyen d'éthanol contient environ 25% de glucosamine et 2,2% de phosphore.

Son hydrolyse ménagée (HCl, 0,1 N; 10 min à 100°C), suivie de chromatographie sur papier (solvant D) et sur couche mince (solvant E) permet d'identifier à côté d'autres constituants la *N*-acetylglucosamine,  $R_f$  = 0,66 et 0,56.

A partir de ce même précipité nous avons également pu obtenir, au cours d'une hydrolyse menagée (HCl, 6 N; 20 min à 100°C), deux substances phosphorylées à  $R_f$  respectifs, 0,78 et 0,51 (solvant C).

Le produit ayant un  $R_f$  = 0,78 a été isolé par chromatographie préparative sur papier (même solvant). Son hydrolyse acide (HCl 6 N; 8 h à 100°C) fournit de la glucosamine et du phosphate minéral en proportion 1/0,8. Son traitement par la phosphatase alcaline (incubation à 37°C pendant 18 h dans un tampon  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,01 M à pH 9,3) libère de la glucosamine et du phosphate. Il s'agit donc bien d'un phosphate de glucosamine. Afin de déterminer le point d'attache

Tableau 1  
Composition des parois de *Micromonospora* SpF<sub>3</sub>.

Acides aminés	Sucres aminés*	Sucres neutres**	P	Résidu minéral après combustion
26%	20%	15%	1,2%	8%

\* Calculé en glucosamine.

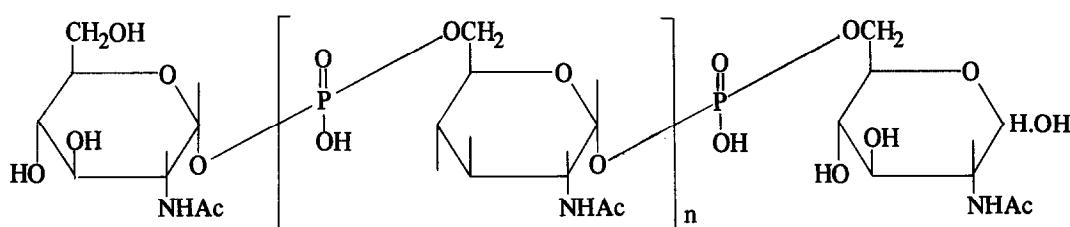
\*\* arabinose, galactose, mannose, rhamnose.

de l'acide phosphorique sur la glucosamine, nous avons soumis cette substance à l'oxydation périodique selon Roseman [19]. Le produit de réaction a pu être identifié par sa vitesse de migration dans les solvants C et D au 1-phosphate de glycolaldehyde authentique ( $R_f = 0,25$ ; révélation par  $\text{NO}_3\text{Ag}$  et réactif molybdique).

Ce résultat, ainsi que la relative stabilité du phosphate de glucosamine en milieu acide, semblent indiquer que l'acide phosphorique estérifie le carbone 6

du sucre aminé. Toutefois la migration du phosphate du C 4 au cours de l'hydrolyse acide ne peut pas être exclue.

Récemment, Baddiley et coll. [20] signalent la présence dans les parois de *Staphylococcus lactis* NCTC 2101 d'un polymère contenant de la *N*-acetyl-glucosamine et de l'acide phosphorique pour lequel ils proposent la structure suivante:



Les expériences en cours permettront de vérifier si la souche de *Micromonospora* étudiée, contient un polymère analogue.

### Remerciements

Nous remercions Monsieur le Professeur E. Lederer pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Ce travail a bénéficié d'une subvention de l'Organisation Mondiale de la Santé.

### Références

- [1] M.J. Weinstein, G.M. Luedemann, E.M. Oden, G.H. Wagman, J.P. Rosselet, J.A. Marquez, C.T. Coniglio, W. Charney, H.L. Herzog et J. Black, *J. Med. Pharm. Chem.* 6 (1963) 463.
- [2] A.K. Mallams, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 7505.
- [3] C.S. Cummins et H. Harris, *J. Microbiol.* 18 (1958) 173.
- [4] T. Yamaguchi, *J. Bacteriol.* 89 (1965) 444.
- [5] C. Amar-Nacasch et E. Vilkas, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 51 (1969) 613.
- [6] C. Amar-Nacasch et E. Vilkas, *Bull. Soc. Chim. Biol.* sous presse.
- [7] C. Rimington, *Methods Biochem. Anal.* 2 (1955) 292.
- [8] E.J. King, *Biochem. J.* 26 (1932) 292.
- [9] M. Dubos, M. Gilles, K.A. Hamilton, P.A. Rebers et F. Smith, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350.
- [10] R.S. Bandurski et B. Axelrod, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 405.
- [11] W.E. Trevelyan, D.P. Procter et J.S. Harrison, *Nature* 166 (1950) 444.
- [12] A.E. Gal, *Anal. Biochem.* 24 (1968) 452.
- [13] A.J. Wicken, *Biochem. J.* 99 (1966) 108.
- [14] H. Tabaud et E. Vilkas, résultats inédits.
- [15] a) E. Munoz, J.M. Ghuyzen et H. Heymann, *Biochemistry* 6 (1967) 3659.  
b) J.F. Petit, A. Adam, J. Wietzerbin-Falszpan, E. Lederer et J.M. Ghuyzen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35 (1969) 429.
- [16] V.P. Calkins, *Anal. Chem.* 15 (1943) 762.
- [17] A. Adam, J.F. Petit, J. Wietzerbin-Falszpan, P. Sinay, D.W. Thomas et E. Lederer, *FEBS Letters* 4 (1969) 87.
- [18] M. Guinand, M.J. Vacheron et G. Michel, *FEBS Letters* 6 (1970) 37.
- [19] J.J. Distler, J.M. Merrick et S. Roseman, *J. Biol. Chem.* 230 (1958) 497.
- [20] A.R. Archibald, J. Baddiley, D. Button, S. Heptinstall, G.H. Stafford, *Nature* 219 (1968) 855.