

N° d'ordre : 661

50376
1977
137

50376
1977
137

MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

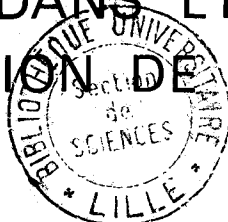
pour obtenir le titre

DOCTEUR DE 3^e CYCLE

spécialité BIOCHIMIE
par

DENIS DELEBASSEE

ETUDE DES PROPRIETES D'UNE
ENDOGLYCOSIDASE (dé polymérase)
ET DE SON SUBSTRAT POLYSACCHARIDIQUE
PRESENTS DANS LES MOULTS DE
FERMENTATION DE Bacillus subtilis.



Présenté le 17 octobre 1977 devant la commission d'examen

Membres du Jury :	M. J. MONTREUIL	Président
	Melle G. SPIK	Rapporteur
	M B. FOURNET	Examineur
	M P. J. SICARD	Invité



030 021162 8

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat de recherche souscrit avec la Société RAPIDASE de Seclin. Il a été effectué dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 ; Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués) sous la direction de Mademoiselle G. SPIK, Maître de Conférences, et du Professeur J. MONTREUIL, et dans les Laboratoires de la Société RAPIDASE, à laquelle nous adressons nos vifs remerciements pour l'aide précieuse qu'elle nous a apportée.

Nos recherches ont bénéficié d'une aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (contrat : 76 - 7 - 071).

TABLE des MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>GENERALITES</u>	3
Généralités sur l'apparition de la viscosité au cours des fermentations bactériennes et de ses conséquences sur la production de l' α -amylase par <u>Bacillus subtilis</u> souche Rapidase	4
I - <u>Caractères généraux de Bacillus subtilis et de la souche Rapidase</u>	4
A - <u>Caractères généraux de Bacillus subtilis</u>	4
B - <u>Caractères généraux de Bacillus subtilis souche Rapidase</u>	5
II - <u>Production d'α- amylase</u>	5
A - <u>Milieu de culture</u>	5
B - <u>Modification de la viscosité du milieu de fermen- tation</u>	6
III - <u>Production d'"Enzyme X"</u>	6
A - <u>Milieu de culture</u>	6
B - <u>Conditions de sécrétion de l'"Enzyme X" par Bacillus subtilis</u>	8
IV - <u>Conclusions</u>	11

Généralités sur les constituants
membranaires de *Bacillus subtilis*

12

I - <u>Le peptidoglycane</u>	12
II - <u>Les acides téichoïques</u>	14
A - <u>Définition</u>	15
B - <u>Isolement des acides téichoïques de <i>Bacillus subtilis</i></u>	15
C - <u>Structure des acides téichoïques de <i>Bacillus subtilis</i></u>	17
D - <u>Liaison acides téichoïques - peptidoglycane</u>	19
III - <u>Polysaccharides bactériens possédant des sucres aminés</u>	20
A - <u>Les acides téichuroniques</u>	20
B - <u>Polymère renfermant de la N-acétylgalactosamine</u>	20
C - <u>Polysaccharide renfermant du 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose</u>	21
D - <u>Polysaccharide renfermant de la D-fucosamine</u>	21
IV - <u>Variations de la composition des constituants polysaccharidiques de la paroi de <i>Bacillus subtilis</i></u>	21

Généralités sur les enzymes de
dépolymérisation des glycopeptides

27

I - <u>Les endo-N-acétylhexosaminidases</u>	27
A - <u>Le lysozyme</u>	27
B - <u>Les endo-N-acétylglucosaminidases</u>	30
II - <u>L'endo-α-N-acétylgalactosaminidase</u>	34

III - <u>L'endogalactosaminidase</u>	35
IV - <u>Les amidases</u>	36
A - <u>La 4'-L-aspartylglycosylamine amido hydrolase</u>	36
B - <u>L'endo-N-acétylmuramyl-L-alanine amidase</u>	37
 <u>MATERIEL et METHODES</u>	 39
I - <u>Dosage de l'activité de l'"Enzyme X" par viscosimétrie</u>	40
A - <u>Dosage</u>	40
B - <u>Détermination de l'activité de l'"Enzyme X" en fonction de la température et du pH</u>	44
II - <u>Purification de l'"Enzyme X"</u>	44
A - <u>Préparation industrielle d'une poudre atomisée d'"Enzyme X"</u>	44
B - <u>Inhibition des protéases neutres et alcalines</u>	46
C - <u>Précipitation par l'acétone</u>	46
D - <u>Précipitation par le sulfate d'ammonium</u>	46
E - <u>Fractionnement par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE cellulose</u>	48
III - <u>Préparation et étude de la fraction visqueuse du mucus</u>	48
A - <u>Préparation du mucus par Ultrafiltration</u>	48
B - <u>Fractionnement du mucus par chromatographie d'échange d'ions</u>	50
C - <u>Etude de la fraction visqueuse F_{IV}</u>	53

IV - <u>Détermination de l'activité de l'"Enzyme X"</u>	55
A - <u>Mise en évidence des produits de dégradation</u>	55
B - <u>Mise en évidence des nouveaux groupements ré-</u>	57
TRAVAUX PERSONNELS	60
I - <u>Dosage de l'activité de l'"Enzyme X" par méthode</u> <u>viscosimétrique</u>	61
A - <u>Détermination de l'activité de l'"Enzyme X" en</u> <u>fonction du pH</u>	61
B - <u>Détermination de l'activité de l'"Enzyme X" en</u> <u>fonction de la température</u>	61
C - <u>Conclusion</u>	61
II - <u>Purification de l'"Enzyme X"</u>	64
A - <u>Préparation industrielle de l'"Enzyme X"</u>	64
B - <u>Stabilisation de l'"Enzyme X" par inhibition des</u> <u>protéases</u>	65
C - <u>Précipitation par l'acétone</u>	65
D - <u>Précipitation par le sulfate d'ammonium</u>	67
E - <u>Fractionnement par chromatographie d'échange d'</u> <u>ions sur colonne de DEAE cellulose</u>	67
F - <u>Conclusion</u>	70
III - <u>Préparation et étude de la fraction visqueuse des</u> <u>moûts de fermentation</u>	70

A - <u>Composition centésimale du mucus M 895</u>	70
B - <u>Purification du mucus M 895 par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de DOWEX 1x2</u>	72
C - <u>Etude de la fraction F_{IV} rechromatographiée</u>	76
IV - <u>Etude de quelques propriétés enzymatiques de l'"Enzyme X"</u>	78
A - <u>Nature des composés coupés par l'"Enzyme X"</u>	78
B - <u>Etude des produits de dégradation de la fraction F_{IV} par l'"Enzyme X"</u>	80
C - <u>Mise en évidence des nouveaux groupements réducteurs apparus par le réactif d'ERLICH en milieu basique</u>	83
D - <u>Conclusion</u>	85

CONCLUSIONS GENERALES	89
-----------------------	----

BIBLIOGRAPHIE	93
---------------	----

I N T R O D U C T I O N

Depuis de nombreuses années, la Société RAPIDASE fabrique, à partir d'un mutant de Bacillus subtilis, de l' α - amylase bactérienne sur un milieu de maltodextrines de maïs, complémenté par des sels minéraux.

La production d' α - amylase est accompagnée depuis quelques années d'une augmentation de la viscosité des moûts de culture, ce qui gêne considérablement l'étape de filtration nécessaire à la préparation de l'enzyme.

La cause de cette augmentation de viscosité est encore inconnue. Elle peut être d'origine génétique, par mutation de la souche employée ou par infection phagique, ou être un phénomène d'adaptation de la bactérie à son milieu.

Les cultures d'une autre souche de Bacillus subtilis employée aux Etats-Unis présentent le même phénomène de viscosité.

Les laboratoires de la Société RAPIDASE ont remarqué qu'il existait, dans les cuves présentant une viscosité normale, une enzyme non identifiée (appelée "Enzyme X"), capable de faire disparaître la viscosité des moûts de culture.

La fermentation de Bacillus subtilis sur un milieu destiné à produire des protéases a donné les meilleurs résultats quant-à la production de cette enzyme. Des fermentations spéciales de production d'"Enzyme X" ont été ainsi pratiquées.

Au cours de notre D.E.A. (21), nous nous étions attachés à la mise au point du procédé de purification du polysaccharide responsable de la viscosité. Depuis, la poursuite de nos travaux a porté sur la purification de l'"Enzyme X", sur l'étude de sa spécificité et de quelques unes de ses propriétés.

Parallèlement, des travaux sur la composition du polysaccharide responsable de la viscosité ont été effectués en collaboration avec SAMOR (80).

Ces travaux ont abouti d'une part, à l'isolement du polysaccharide responsable de l'apparition de la viscosité des moûts de fermentation et d'autre part, par voie de conséquence, à l'identification de l'enzyme qui diminue la viscosité par hydrolyse du polysaccharide.

Le présent mémoire concerne d'une part, l'exposé des résultats relatifs à l'isolement et à la structure du polysaccharide que nous avons étudié en collaboration avec SAMOR, et d'autre part, la démonstration du fait que l'"Enzyme X", qui a pour substrat cet hétéropolysaccharide, est une endo-N-acétylhexosaminidase.

C'est pourquoi nous ferons précéder la description de nos travaux personnels par la présentation du problème de l'augmentation de la viscosité des moûts de fermentation de Bacillus subtilis, ainsi que d'une courte revue générale sur les polysaccharides libres et conjugués et sur les endoglycosidases synthétisées par les bactéries.

G E N E R A L I T E S

- 4 -

Généralités sur l'apparition de la viscosité au cours des fermentations bactériennes et de ses conséquences sur la production de l' α -amylase par Bacillus subtilis, souche Rapidase

L'apparition de la viscosité au cours des fermentations réalisées pour la production d' α -amylase d'origine bactérienne, est un phénomène complexe dont les conséquences sur le plan industriel et commercial sont importantes.

Un moût de fermentation visqueux est généralement impossible à traiter et seule, l'addition d'une solution d'"Enzyme X", provoquant la diminution de la viscosité, permet de résoudre ce problème.

C'est au niveau des étapes de filtration et d'ultrafiltration qui permettent d'isoler l' α -amylase secrétée dans le milieu, que se produisent les difficultés. La bactérie synthétise un composé visqueux qui colmate les filtres. Les conséquences en sont : une augmentation de la durée des opérations de filtration et le remplacement des filtres colmatés, ou encore un arrêt total de la production.

Nous décrivons dans ce chapitre les caractères généraux de Bacillus subtilis et de la souche Rapidase. Son utilisation pour la production d' α -amylase pose le problème de l'évolution de la viscosité des milieux de fermentation et de la méthodologie employée pour résoudre celui-ci. La production de l'"Enzyme X" par cette même souche bactérienne est un phénomène aléatoire et nous décrirons les conditions dans lesquelles cette enzyme est synthétisée.

I - Caractères généraux de Bacillus subtilis et de la souche Rapidase

Il existe de nombreuses variétés de Bacillus subtilis. Cette bactérie est communément utilisée dans les industries de fermentation pour la production d'enzymes.

A - Caractères généraux de Bacillus subtilis

Bacillus subtilis est une bactérie sporulée,

donnant une coloration Gram positive. Elle se présente généralement sous forme de bâtonnets de 0,7 à 0,8 microns de diamètre et d'une longueur qui peut atteindre 3 microns.

Cultivé sur un milieu riche en substances carbonées, le bacille peut donner des colonies filamenteuses. Ce type de bactérie possède des cils péritriches et est généralement non encapsulé. Elle est commune dans les sols et dans les matières organiques en décomposition.

B - Caractères généraux de Bacillus subtilis souche Rapidase

La souche de Bacillus subtilis utilisée par la Société Rapidase est apparentée au genre amyloliquefaciens par certains caractères microbiologiques. Sa morphologie est variable suivant le milieu de culture utilisé : cette souche, ensemencée sur le milieu destiné à la production de l'"Enzyme X", présente un épaissement des enveloppes cellulaires.

La souche fermente sans gaz : l'arabinose, le glucose, le xylose et le lactose. Elle est acétone positive et n'emploie pas le citrate comme source de carbone. C'est une bactérie aérobie stricte. Elle liquéfie l'amidon et la gélatine, la caséine est hydrolysée. Sur un milieu enrichi en maltodextrines de maïs, la synthèse de l' α -amylase est favorisée.

II - Production d' α - amylase

A - Milieu de culture

Le milieu sur lequel est ensemencé le bacille est composé de maltodextrines de maïs partiellement hydrolysées et est complété par des sels minéraux : Mg^{2+} , PO_4^{3-} et NaCl. Au cours de la fermentation, de l'amidon est ajouté pour compenser l'appauvrissement du milieu et pour introduire la synthèse de l' α -amylase. Les cultures sont réalisées dans des fermenteurs de 60 m³. Le métabolisme bactérien provoque l'acidification du milieu : des corrections de pH sont effectuées par l'addition d'ammoniaque. La température de fermentation est de 37°C et l'aération du milieu est constante. C'est

une fermentation de type discontinu, dont la durée moyenne est de 90 heures.

B - Modifications de la viscosité du milieu de fermentation

La densité du milieu de fermentation est variable car il est nécessaire d'ajouter de l'amidon de maïs pour palier à l'épuisement du milieu par la bactérie.

L'étude de la fermentation au cours du temps montre que la densité et la viscosité du milieu évoluent progressivement. Vers 45 heures de fermentation, la viscosité du milieu augmente alors sensiblement pour atteindre après 60 heures, 30 à 35 centipoises (figure 1). Le milieu devient alors impossible à traiter pour isoler l' α -amylase.

Pour pouvoir isoler cette enzyme, la viscosité moyenne du milieu doit se situer entre 5 et 10 centipoises.

Deux méthodes sont utilisées par la Société Rapidase pour diminuer la viscosité des moûts de fermentation. Elles consistent en l'addition au moût visqueux :

- d'une partie aliquote d'une fermentation "Enzyme X" préparée en même temps que la fermentation " α -amylase".
- d'"Enzyme X" sous forme de poudre atomisée.

III - Production d'"Enzyme X"

La production d'"Enzyme X" a été particulièrement étudiée car cette enzyme est nécessaire au traitement des productions d' α -amylase.

A - Milieu de culture

Il s'agit du milieu de culture destiné à la production de protéases à partir de la même souche de Bacillus subtilis.

Ce milieu se compose d'amidon de maïs et la source d'azote est le "corn-steep". Il est complémenté en sels minéraux.

Viscosité
en Cp

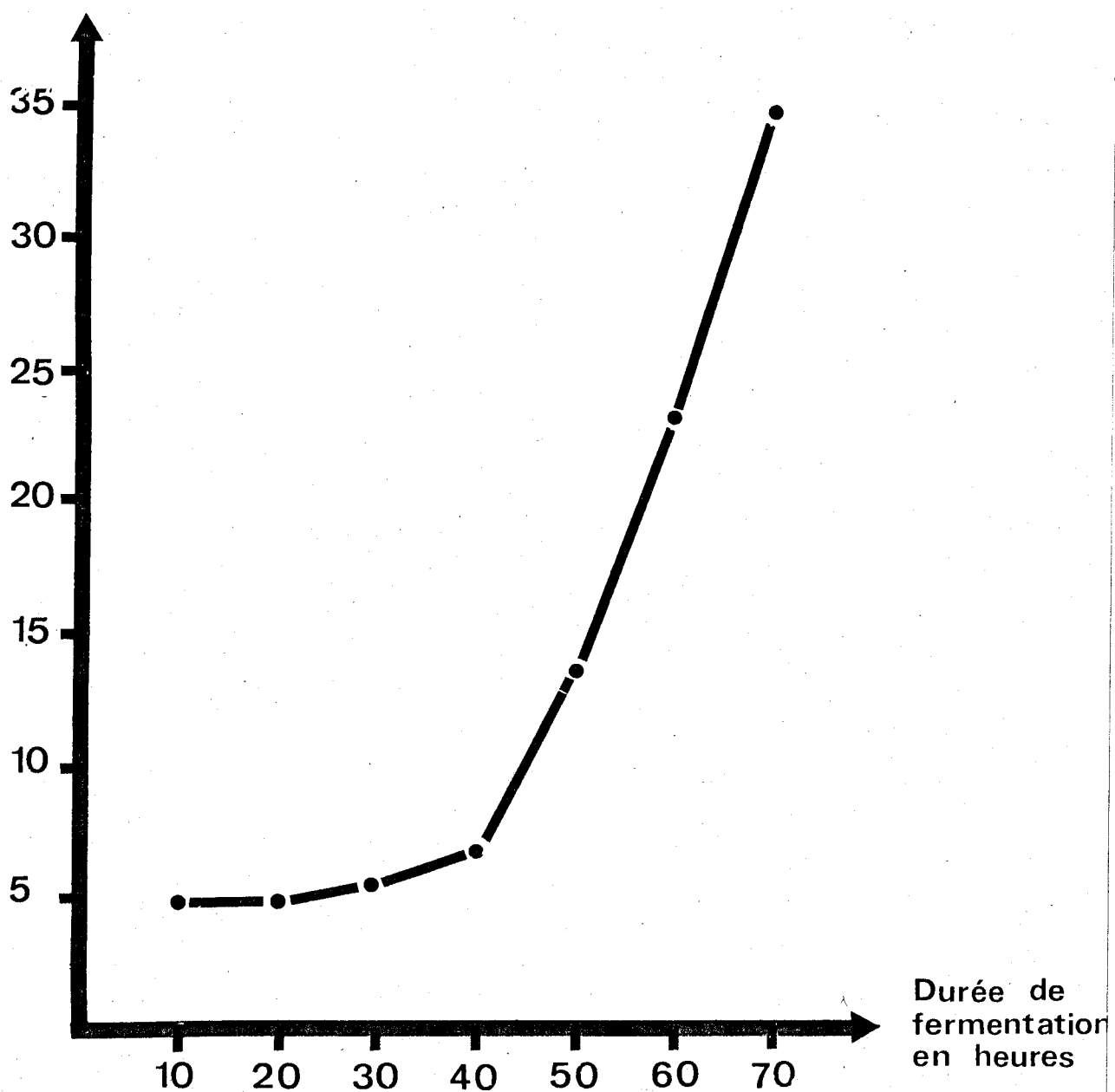


Figure :1 Evolution de la viscosité du milieu de fermentation
de Bacillus subtilis (souche Rapidase)



Le volume des fermenteurs est de $5,6 \text{ m}^3$ et le volume final du moût de fermentation atteint 3 m^3 .

B - Conditions de sécrétion de l'"Enzyme X" par Bacillus subtilis

L'apparition de l'"Enzyme X" se fait pendant la phase exponentielle de croissance après 10 à 15 heures de fermentation. Cette apparition est un phénomène fugace, en effet, après environ 15 heures de culture, la force d'enzyme commence à diminuer et disparaît vers 25 heures de fermentation (figure 2).

Selon l'évolution du pH du milieu de culture, on peut définir quatre types généraux de fermentation.

1 - Type I

La figure 3 montre l'apparition de l'activité "Enzyme X" en fonction des variations de pH au cours du temps.

Le pH se maintient vers 6,5 - 6,7 pendant 5 heures puis descend naturellement vers 6,20 - 6,30 lorsque la fermentation atteint 6 à 7 heures d'âge. Entre 8 et 10 heures, le pH remonte vers 6,5 - 6,7. Nous assistons ensuite à une chute du pH du milieu : les valeurs du pH sont entre 6,3 et 6,5 et restent constantes de 10 à 12 heures.

L'apparition de l'"Enzyme X" se fait lors de la deuxième diminution de pH et la sécrétion est maximale au cours de la phase de stabilisation.

2 - Type II

Les premières phases du profil d'évolution du pH sont identiques au type précédent. Seule, la phase de stabilisation du pH après 8 heures de culture ne se déroule pas et le pH ne cesse de décroître. Ce type d'évolution ne donne pas lieu à la production d'"Enzyme X".

3 - Type III

Ce type est identique au type II. La chute finale de pH est corrigée par l'addition d'ammoniaque jusqu'à ce qu'il

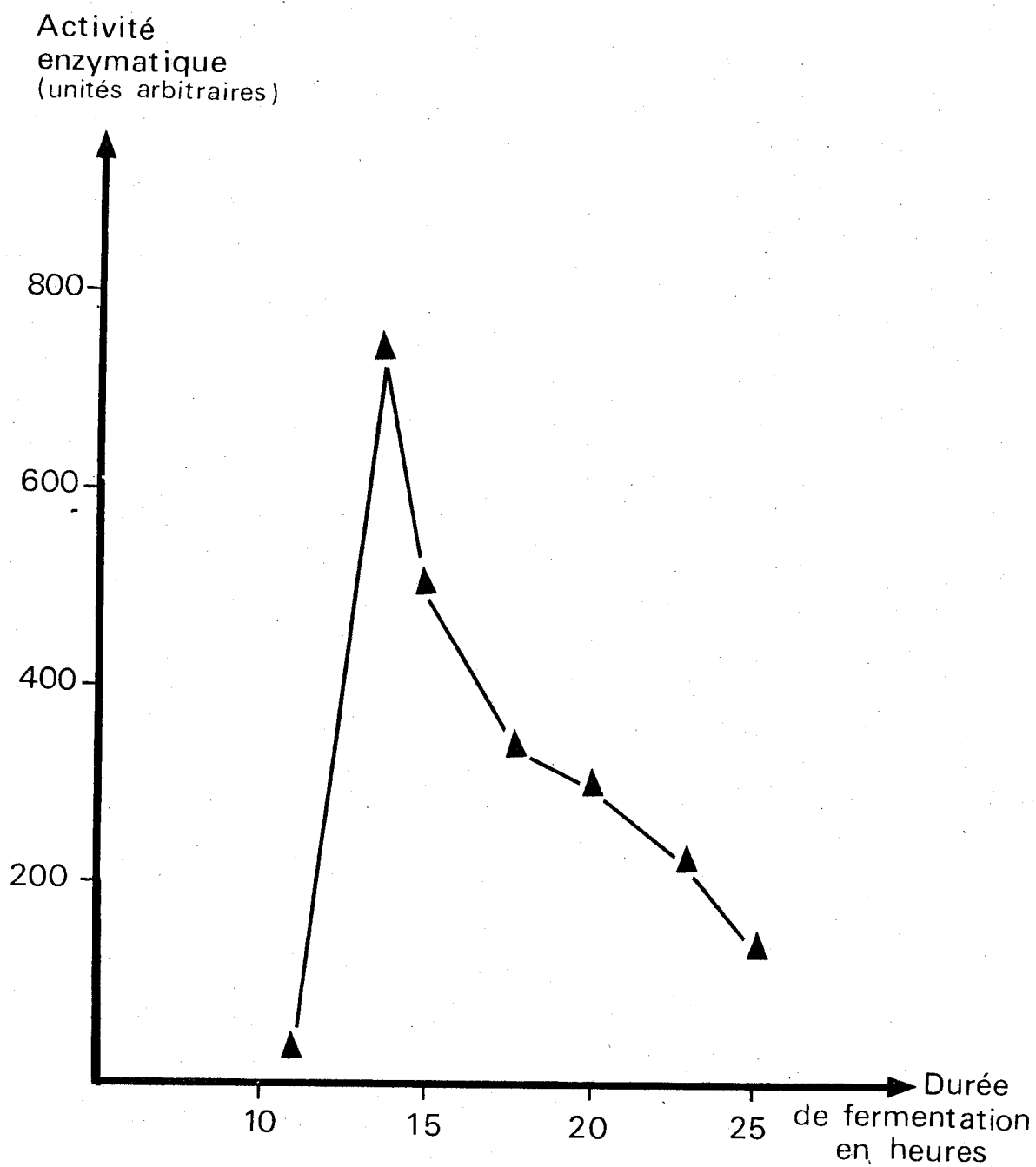


Figure 2 Production de l' "Enzyme X " en fonction du temps de fermentation



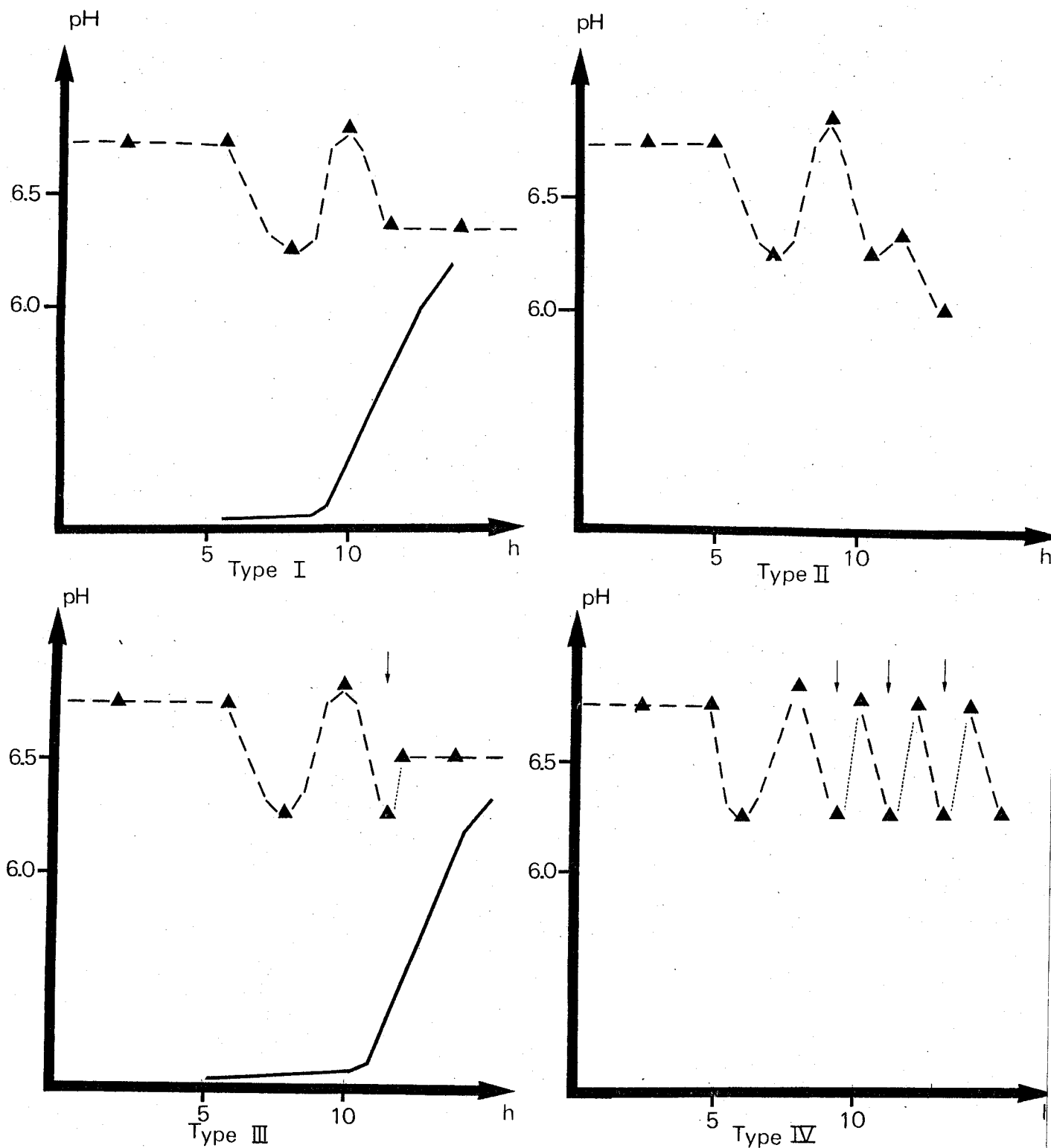


Figure:3 Production de l' "Enzyme X" en fonction des différents types d'évolution du pH du milieu de culture

— activité "Enzyme X"
 ▲ — — ▲ pH
 ↓ correction de pH



atteigne des valeurs comprises entre 6,3 et 6,4. Le pH se maintient alors naturellement et l'activité "Enzyme X" apparaît.

4 - Type IV

Les corrections de pH sont inactives. La bactérie est incapable de maintenir le pH du milieu à une certaine valeur et la production d'"Enzyme X" ne s'effectue pas.

IV - Conclusions

L'étude des fermentations " α - amylase bactérienne" et "Enzyme X" soulève deux problèmes majeurs qui sont l'apparition de la substance responsable de la viscosité et la production de l'enzyme qui diminue cette viscosité.

L'identification de la substance visqueuse permettra d'expliquer sa présence dans les milieux de fermentation α - amylase et de tenter de connaître les conditions exactes de sa production par la bactérie. L'étude de sa structure nous renseignera sur le mode d'action et sur la nature de l'"Enzyme X".

Ces deux problèmes sont étroitement liés, c'est pourquoi il était nécessaire de les traiter parallèlement.

Généralités sur les constituants
membranaires de Bacillus subtilis

Les différentes enveloppes bactériennes ont une importance considérable pour ceux qui utilisent les microorganismes à des fins de fermentations industrielles. En effet, toutes altérations de la structure de ces enveloppes provoquent des modifications des propriétés biologiques de la bactérie. Celles-ci peuvent être délibérément provoquées pour induire la synthèse préférentielle de certains composés élaborés par le microorganisme. Mais elles peuvent être parfois fortuites et les désavantages occasionnés sont alors préjudiciables.

L'étude des constituants des enveloppes bactériennes a pris, depuis longtemps, une extension considérable car les résultats obtenus permettent d'une part, d'expliquer certains phénomènes biologiques et d'autre part, sont d'une utilité appréciable pour la taxonomie bactérienne.

En ce qui concerne les constituants membranaires de Bacillus subtilis, nous allons résumer nos connaissances actuelles à propos de la structure et du rôle :

- du peptidoglycane
- des acides téichoïques et téichuroniques
- des divers polysaccharides bactériens.

I - Le peptidoglycane

A la suite des travaux de CUMMINS et HARRIS (18), il est établi que les parois des bactéries gram-positives se composent toutes d'un polymère constitué de N-acétyl-glucosamine (3 - O - D carboxyéthylglucosamine) et des acides aminés suivants : alanine, acide glutamique, lysine et acide diaminopimélique (D.A.P.).

Ce polymère a été improprement appelé muréine, mucopeptide, mais des auteurs comme SHARON et JEANLOZ (81), préfèrent lui donner le nom de : glycosaminopeptide.

Chez Bacillus subtilis, le peptidoglycane est formé de trois parties (figure 4) :

1 - Un polysaccharide constitué de la répétition du dimère : N-acétyl-D-glucosamine- β -(1-4)-acide N-acétyl-muramique. La liaison entre chaque unité de répétition est du type β (1-4).

2 - Chaque résidu d'acide muramique est substitué par un peptide dont la composition en acides aminés est : L-alanine, L-lysine, acide glutamique et l'acide diaminopimélique (HUGHES et al (41)). La liaison entre le résidu de L-alanine et le groupement carboxyle de l'acide muramique de la chaîne polysaccharidique est du type amide.

3 - Un pont interpeptidique composé, chez Bacillus subtilis, de quatre à cinq résidus de D-alanine, joint les peptides précédemment décrits pour conférer au peptidoglycane une structure réticulée. Généralement, la liaison intra ou intercaténaire se fait entre un résidu de D-alanine et l'acide diaminopimélique.

KELEMEN et ROGERS (50) ont déterminé la longueur moyenne du chaînon disaccharidique : N-acétylglucosamine-acide N-acétylmuramique. Elle est de 1,03 nm. En 1973, WARD (95) a calculé la grandeur moyenne d'une chaîne de peptidoglycane : 100 à 200 nm ; il y aurait donc 95 à 195 unités disaccharidiques par chaîne.

En conclusion, l'association de ces différents composants confère une structure réticulée tridimensionnelle. La condensation du peptide et de la partie glycanique du peptidoglycane donne à la paroi bactérienne ses caractères d'insolubilité, de rigidité et de résistance aux traitements mécaniques. La rupture d'une liaison glycosidique ou peptidique provoque la solubilisation de l'édifice macromoléculaire (GHUYSEN et al (35)). Il est à noter qu'aucun de ces auteurs n'a mis en évidence un caractère particulier de viscosité de ces constituants.

Mais la structure de la paroi bactérienne est complexe car de nombreux autres polymères, en particulier les acides téichoïques et téichuroniques, sont associés à cette structure.

II - Les acides téichoïques

A - Définition

Le nom d'acides téichoïques a été donné à un groupe de polymères contenant du phosphore, isolé des parois et des constituants cellulaires des bactéries Gram-positives.

Ces polymères sont formés de la répétition d'unités de glycérol ou de ribitol-phosphate, liées entre elles par des liaisons phosphodiesters. Généralement, les acides téichoïques sont substitués par des résidus d'oses ou estérifiés par de la D-alanine.

Chez les bactéries gram-positives, les acides téichoïques représentent jusqu'à 60p100 du poids sec des parois (ARMSTRONG et al (7)).

ARCHIBALD et al (5) distinguent deux types d'acides téichoïques :

- les acides téichoïques pariétaux constitués soit de ribitol, soit de glycérol.
- les acides téichoïques "intracellualires", localisés entre la paroi et la membrane de propoplaste. Ce sont généralement des polymères de glucosyl-glycérol-phosphate.

S'il convient, selon BADDILEY (8), de distinguer les acides téichoïques des polymères contenant des sucres 1-phosphate, on peut classer dans ce groupe les acides lipotéichoïques des bactéries gram-négatives résultant de l'association d'acides téichoïques avec des lipides et possédant les mêmes propriétés biologiques.

Les acides téichoïques isolés de Bacillus subtilis par ARMSTRONG et al (7) sont de type ribitol. Par contre, une autre souche, NCTC 3610, décrite par BURGER et GLASER (12), ne renferme que des acides glycérol-téichoïques.

B - Isolement des acides téichoïques de Bacillus subtilis

Dès 1960, ARMSTRONG et al (7) isolent des acides téichoïques constitués de ribitol, de glucose et de D-alanine en traitant les parois de Bacillus subtilis par l'acide trichloroacétique froid à une concentration de 10p100.

Les composés obtenus sont solubles dans l'eau et

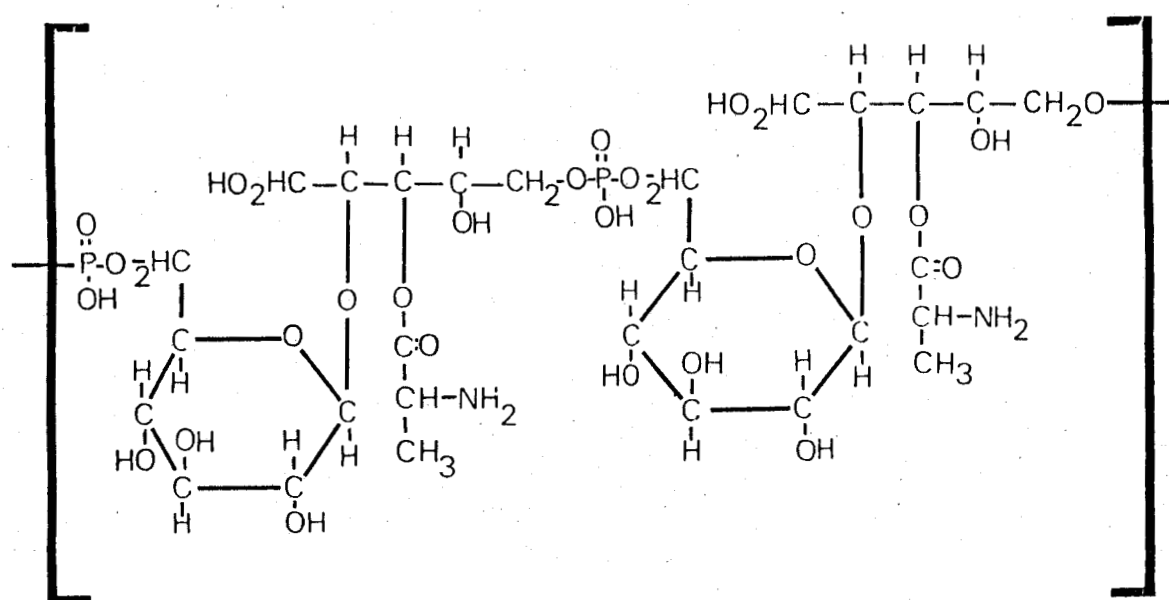


Figure: 5 Structure des acides ribitol-téichoïques trouvés dans la paroi de Bacillus subtilis

précipitables par l'éthanol ou l'acétone (WICKEN (96)). Ils se présentent alors sous forme de poudre blanche.

ARCHIBALD et BADDILEY (6) ont extrait des acides téichoïques en traitant les parois bactériennes par des solutions aqueuses de phénylhydrazine à pH 7. Ils obtiennent des polymères intacts puisque les liaisons phosphodiester et glycosidiques ne sont pas dégradées par cet agent chimique.

C - Structure des acides téichoïques de Bacillus subtilis

1- Acides ribitol-téichoïques

La figure 5 donne une représentation schématique des acides téichoïques à ribitol isolé de la paroi de Bacillus subtilis par ARMSTRONG et al (7).

Les résultats de l'oxydation périodique de ce polymère indiquent que le groupement hydroxyle en 4 du ribitol, est substitué par un résidu de glucose. Les études enzymatiques montrent que la liaison o-glycosidique est du type β .

Le résidu de D-alanine est associé à ce polymère par une liaison ester, labile en milieu alcalin.

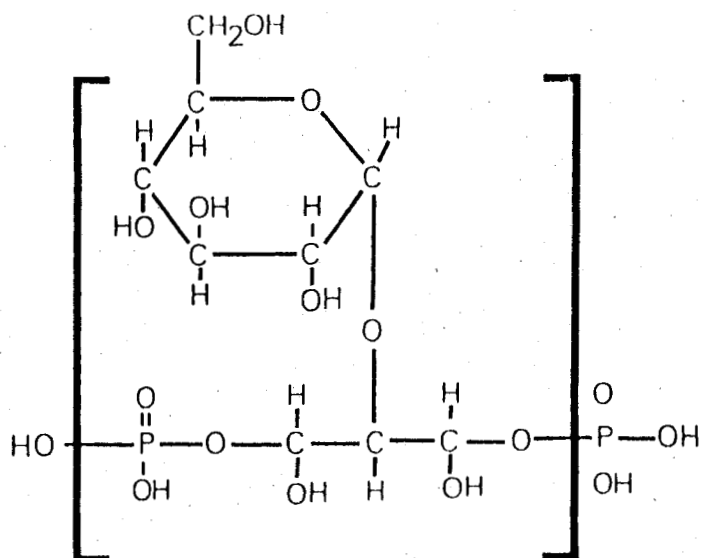
2 - Les acides glycérol-téichoïques

Généralement situé entre la paroi et la membrane cytoplasmique, ce type de polymère a été étudié chez différentes souches de Bacillus.

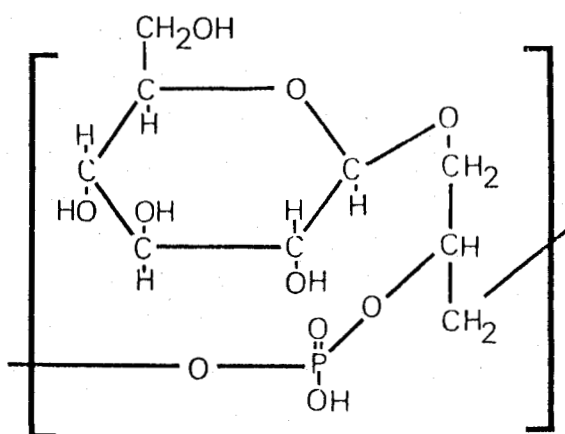
La figure 6 résume les diverses structures établies.

HAMADA et al (37), en 1971, ont isolé de Bacillus subtilis, var. amyloliquifaciens, un polymère composé de α -D-glucose et dont la fonction hydroxyle du carbone 3 du glycérol est engagée dans la liaison phosphodiester.

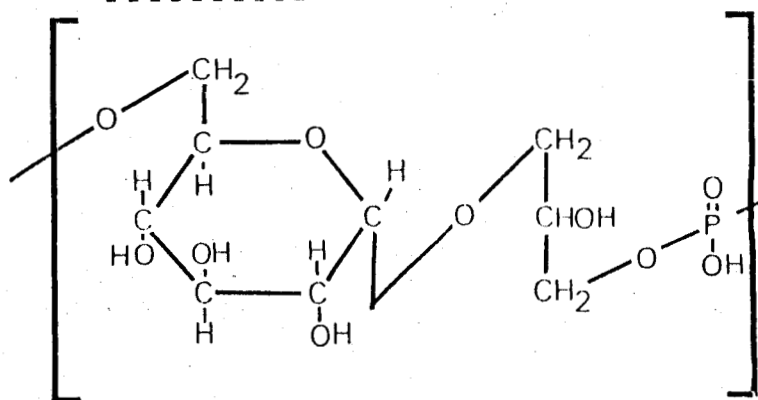
La souche de Bacillus subtilis var. niger, étudiée par de BOER et al (20), synthétise des acides téichoïques possédant des résidus de α -D-glucose mais dont la liaison phosphodiester se fait avec l'hydroxyle du carbone 2 du glycérol.



Bacillus subtilis var. amyloliquefaciens



Bacillus subtilis var. niger



Bacillus stearothermophilus

Figure : 6 Structure des acides glycérol-téichoïques trouvés dans différentes souches de Bacillus



Un acide téichoïque dont les résidus de glucose ont la configuration β , a été isolé de Bacillus stéarothermophilus par ANDERSON et ARCHIBALD (3).

D - Liaison acides téichoïques-peptidoglycane

La nature des méthodes employées pour extraire les acides téichoïques suggère que ceux-ci soient liés de manière covalente au peptidoglycane. YOUNG et al (101) montrent que l'extrémité phosphate terminale des acides téichoïques est impliquée dans cette liaison.

ARCHIBALD et BADDILEY (6) prouvent que cette liaison est stable lorsqu'on traite les parois par la phénylhydrazine à pH neutre. Ces auteurs pensent que le groupement phosphate terminal est engagé dans une liaison de type phosphodiester avec le résidu NH_2 de la glucosamine ou de l'acide muramique, en position terminale réductrice dans le peptidoglycane.

En 1972, MAUCK et GLASER (63) ont confirmé que les acides téichoïques de Bacillus subtilis var. niger sont liés de manière covalente au peptidoglycane en voie de synthèse. Ce type de liaison se retrouve chez Bacillus licheniformis (WYKE et WARD (99)).

La liaison acides téichoïques -peptidoglycane confère à la paroi ses propriétés physiologiques : rôle de protection et de contrôle de la perméabilité aux ions.

La présence d'acides téichoïques liés au peptidoglycane permet, selon LAMBERT et al (52), de maintenir au niveau de la surface cellulaire, un environnement ionique en cations divalents qui sont nécessaires au fonctionnement des enzymes de la paroi et de la membrane cytoplasmique.

Si les propriétés sérologiques des acides téichoïques intracellulaires de différentes souches de streptocoques furent très tôt étudiées (WICKEN et BADDILEY (97)), ce sont les travaux de DAVISON et al (19) qui ont montré que les propriétés immunologiques et chimiques des acides téichoïques de la paroi peuvent être utilisées à la caractérisation des diverses souches de staphylocoques.

Aucun des auteurs précédemment cités ne mettent en valeur un caractère particulier de viscosité de ces polymères pariétaux.

III - Polysaccharides bactériens possédant des sucres aminés

A - Les acides téichuroniques

Lorsque la bactérie croît sur un milieu carencé en ions phosphates, la composition chimique de la paroi subit de profondes modifications.

En 1961, JANCZURA et al (45) ont isolé de Bacillus subtilis ensemencé sur un tel milieu, un polysaccharide composé de galactosamine et d'acide glucuronique dans les rapports molaires : 1 : 1. Les auteurs ont appelé ce polymère acide téichuronique par analogie aux acides téichoïques qu'ils remplacent dans la paroi. Les acides téichuroniques sont obtenus en traitant les parois bactériennes par l'acide trichloroacétique chaud.

La structure de ce composé a été établie par HUGHES et THURMANS (42) : il est formé de la répétition du dimère : acide glucuronique α -(1-3)-N-acétyl-galactosamine. Chaque unité de répétition est liée à la précédente par une liaison de type α 1-4 (fig.7). Ce polymère diffère de l'acide hyaluronique et de la chondroïtrine par son pouvoir rotatoire et sa résistance à l'action de la hyaluronidase testiculaire (JANCZURA et al (45)). Il a été récemment isolé par WRIGHT et HECKELS (98) de la souche Bacillus subtilis W 23.

Selon TEMPEST et al (92), le rôle physiologique de ce polysaccharide est analogue à celui des acides téichoïques : il intervient dans la perméabilité de la paroi aux ions. La présence de groupements anioniques (acide glucuronique) permet la capture d'ions divalents, magnésium en particulier, nécessaires à l'activité de certaines enzymes.

B - Polymère renfermant de la N-acétyl-galactosamine

La structure de la paroi de Bacillus subtilis est complexe puisque d'autres polymères ont pu être isolés. En 1972, DUCKWORTH et al (24) ont mis en évidence dans la paroi de Bacillus subtilis 168, un hétéro-polysaccharide constitué de glucose, de phosphore et de N-acétyl-galactosamine dans les rapports molaires : 1 : 1. La structure définitive de l'unité de répétition de ce polymère a été établie par SHIBAEV et al (83), (figure 7). Cependant, le rôle de ce polysaccharide n'a pas été clairement établi.

C - Polysaccharide renfermant du 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose

L'étude des polysaccharides synthétisés par les différentes souches de *Bacillus* a permis la découverte de sucres aminés de structure particulière.

En 1960, SHARON et JEANLOZ (81) ont caractérisé dans les parois d'une souche de *Bacillus subtilis* ATCC 9945, identifiée plus tard comme étant une souche de *Bacillus licheniformis*, un polysaccharide ayant la propriété de donner des solutions aqueuses extrêmement visqueuses.

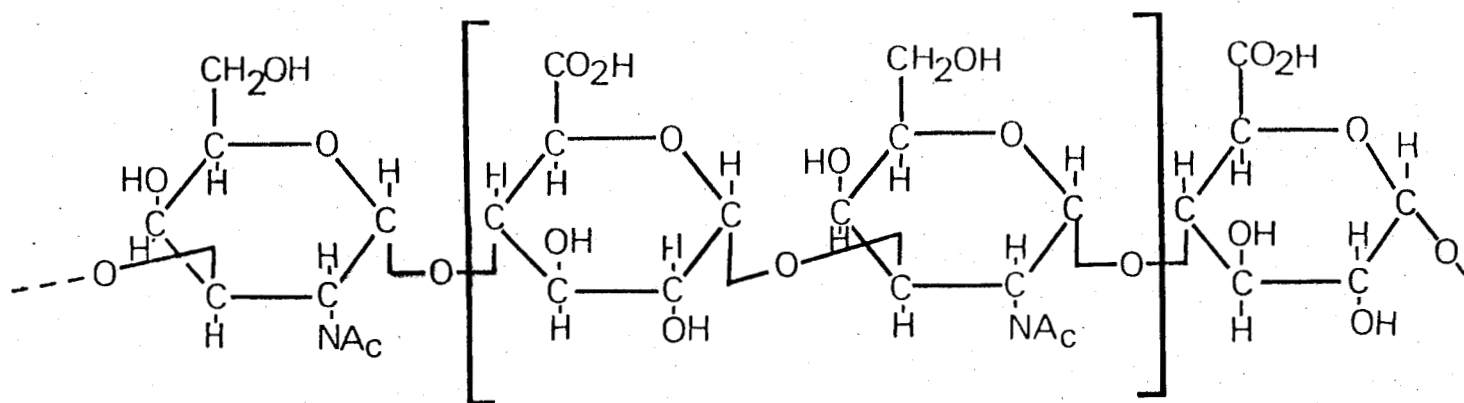
L'hydrolyse sulfurique douce de ce polymère permet la mise en évidence d'un tridéoxyhexose : le 4 acétamido-2-amino-2,4,6 tridéoxyglucose (figure 7) : la bacillosamine (HORTON (40)). Par la suite, la présence de cette hexosamine n'a été confirmée que dans les polysaccharides synthétisés par *Bacillus licheniformis*. Le rôle de l'acide glutamique et de l'ammoniaque dans les milieux de culture de *Bacillus licheniformis* ATCC 9945 est de favoriser, selon SHARON et al (82), la synthèse de cet ose.

D - Polysaccharide renfermant de la D-fucosamine

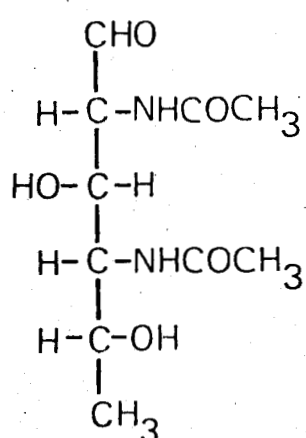
L'étude comparative réalisée par SHARON et al (82) de la composition en monosaccharide des polysaccharides isolés de *Bacillus subtilis* et de *Bacillus licheniformis* ATCC 9945, a permis l'identification de la D-fucosamine. Cette 6-déoxyosamine se retrouve dans les polymères élaborés par les deux types de bacille, mais seul *Bacillus licheniformis* a la propriété de synthétiser le 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose décrit précédemment. Cette particularité permettrait, selon les auteurs, de différencier les deux souches.

IV-Variation de la composition des constituants polysaccharidiques de la paroi de *Bacillus subtilis*

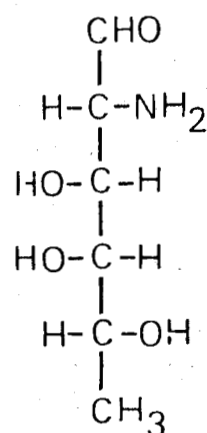
Les bactéries sont capables de s'adapter aux conditions extérieures et de se développer sur des milieux très différents. Cette



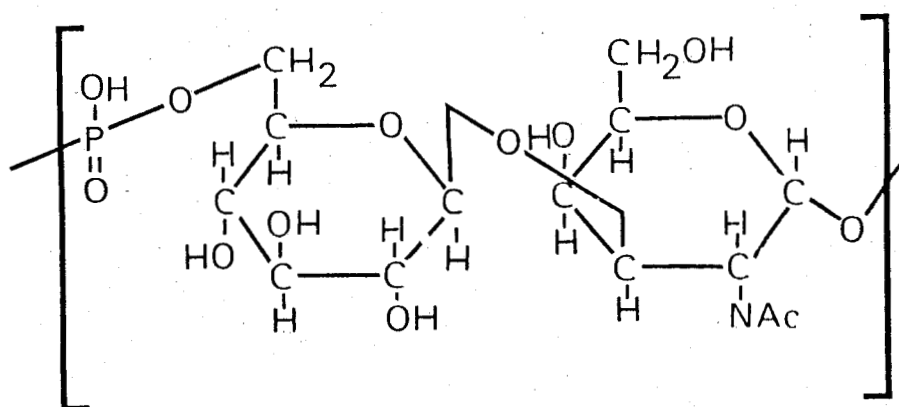
Acide téichuronique



2,4 diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose



D-fucosamine



Polymère à N-acétylgalactosamine

Figure: 7 Constituants particuliers trouvés dans la paroi de Bacillus subtilis

adaptation se traduit par des modifications de la composition chimique de la paroi. La composition chimique, le pH, la température et l'aération des milieux de culture sont des facteurs importants car ils induisent les transformations.

YOUNG et al (101) ont mis en évidence deux types de Bacillus subtilis. Le premier type est caractérisé par les variations qui affectent la composition de leurs parois lorsque les conditions du milieu extérieur varient. Le second groupe ne possède pas cette caractéristique et les parois de ces bactéries ont un faible taux de galactosamine. Par contre, on note la présence d'une quantité importante d'alanine, d'acide diaminopimélique, d'acide glutamique, d'acide muramique et de glucosamine.

En 1965, YOUNG (100) confirme que la galactosamine est le marqueur des bactéries sensibles et transformables, car le taux de cette osamine est important dans les parois de bactéries croissant sur un milieu carencé en phosphate.

ELLWOOD (25) a étudié la variation de la composition de la paroi de Bacillus subtilis var. niger en fonction du milieu de culture. Dans des conditions normales, la paroi contient des acides téichoïques. Lorsque ce milieu est carencé en phosphate, la bactérie synthétise alors d'autres polymères anioniques : les acides téichuroniques.

Les modifications affectant la composition chimique de la paroi bactérienne se traduisent par des variations de la nature des polymères qui la composent. Le tableau (I) résume les effets de différents facteurs limitants sur la composition de la paroi de Bacillus subtilis (ELLWOOD et TEMPEST (27)).

Les ions NH_4^+ , K^+ , SO_4^- et le glucose ont un rôle négligeable. Par contre, les ions phosphates du milieu interviennent de manière importante. Lorsque le taux de phosphore extracellulaire est faible, la synthèse des acides téichuroniques est favorisée à la place de celle des acides téichoïques.

Cependant, en milieu carencé en ions Mg^{++} , la synthèse d'acides téichoïques est accrue : le taux de ces polymères dans la paroi augmente afin de maintenir un environnement ionique constant au niveau de la surface cellulaire (MEERS et TEMPEST (64)).

Tableau: I Effets de la limitation de certains éléments sur les
constituants de la paroi de Bacillus subtilis var. niger
(d'après ELLWOOD et TEMPEST (26))

Composition de la paroi (en p.100 du poids sec)							
Carences	Paroi *	Protéines	Phosphore	Acides téichoïques	Hexoses	Acides hexuroniques	Galactosamine
Glucose	12 - 13	10	3.9	35 - 45	20	tr.	tr.
NE ₄ ⁺	21	11.5	4.8	35 - 52	23	tr.	tr.
SC ₄ ²⁻	21	12.5	4.9	45 - 53	23	tr.	tr.
K ⁺	15.3	10.5	4.3	39 - 46	20	tr.	tr.
Ca ₅ ²⁺	17.8	12.5	6.9	62 - 74	32	tr.	tr.
PC ₄ ³⁻	17	10.5	0.5	tr.	tr.	25	17

tr. traces

* résultats exprimés en p.100 du poids sec de la bactérie



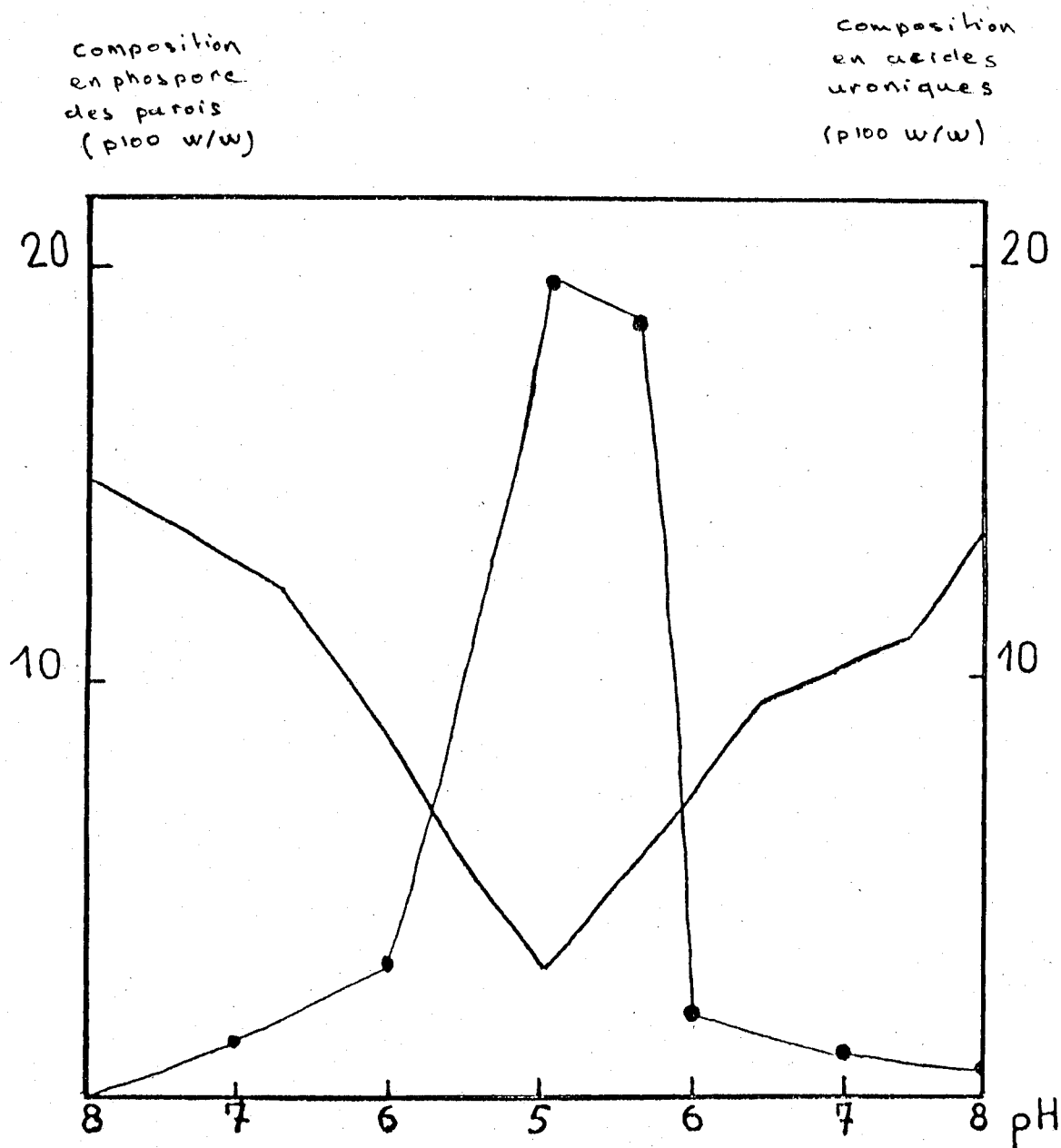


Figure 8 : Influence du pH du milieu de culture sur la composition en Phosphore et en Acides uroniques de spores de *Bacillus Subtilis* (variété Niger)

Les facteurs physiques du milieu interviennent également. ELLWOOD et TEMPEST (26) ont étudié l'influence du pH. En milieu acide -pH 5,0- la bactérie synthétise des acides téichoïques. Lorsque le pH évolue vers des zones plus basiques -pH 8,0- les parois de Bacillus subtilis contiennent uniquement des acides téichuroniques (figure 8). Ce phénomène est réversible et montre ainsi la faculté d'adaptation de la bactérie aux conditions extérieures.

Ces exemples démontrent que la bactérie réagit vis-à-vis du milieu. Cependant, les polysaccharides synthétisés font partie intégrante de la structure des enveloppes bactériennes et nous ne pouvons pas tirer de conclusions quant-à l'influence de la bactérie sur la structure du milieu.

Récemment (CHENG et al (15)), ont étudié la modification de viscosité du milieu par Streptococcus bovis. Lorsque le milieu nutritif varie, cette bactérie synthétise un polysaccharide extracellulaire qui rend le milieu extrêmement visqueux (112 centipoises).

Généralités sur les enzymes de
dépolymérisation des glycopeptides

Les polysaccharides de haut poids moléculaire peuvent être dégradés biologiquement par différents types d'enzymes. La coupure des liaisons à l'intérieur des chaînes par des endo-enzymes permet d'obtenir des molécules de masse moléculaire plus faible qui sont alors sensibles à l'action récurrente des exo-enzymes.

Nous présenterons, dans ce chapitre, les endo-enzymes qui ont la propriété d'hydrolyser les liaisons hexosaminyles des polysaccharides (les endo-N-acétylhexosaminidases et les endo-hexosaminidases) et certaines amidases particulières qui hydrolysent le peptidoglycane bactérien et les liaisons N-glycosidiques des glycopeptides.

I - Les endo-N-acétylhexosaminidases

A - Le lysozyme (E.C.3.2.1.7.)

1 - Historique

Le lysozyme ou mucopeptide N-acétylmuramylhydrolase dont l'action a été observée pour la première fois en 1922 par FLEMING (32), a été cristallisé par ABRAHAM et ROBINSON (1) en 1937. Le substrat de cette enzyme a été préparé à partir d'hydrolysats de paroi de bactéries Gram-positives (SALTON et GHUYSEN (79), JOLLES et al (47) et CANFIELD (13).

2 - Mode d'action du lysozyme

SALTON (79) a démontré que le lysozyme hydrolysait la chaîne polysaccharidique du peptidoglycane des bactéries Gram-positives. L'enzyme catalyse la coupure des liaisons N-acétylmuraminyl β 1-4' N-acétylglucosaminique et des chaînons disaccharidiques sont libérés (figure 4). En 1957, BERGER et WEISER (9) ont montré que le lysozyme possédait une activité secondaire β -N-acétylglucosaminidasique.

Tableau : II Propriétés physico-chimiques de lysozymes de différentes origines

	Lysozyme Bacillus subtilis (TAKAHARA (85))	Lysozyme Bacillus subtilis (CRADA (70))	Lysozyme Blanc d'oeuf de poule (JCLLES et al (47))
pH optimal	6,2	6,5	5 à 9
Température optimale	60	50	60
Masse moléculaire	13 000	93 000	14 000 - 14 700
Point iso-électrique	9,8	9,8	11 à 11,35
Hydrolyse de L'acétyle glycyl-chitine	0	0	+

De nombreux substrats ont été préparés pour le dosage de l'activité du lysozyme : peptidoglycane partiellement hydrolysé (JOLLES (46), SALTON (78), LEYH-BOUILLE et al (55)), des dérivés de la chitine : 6-O-glycol chitine (HAMAGUCHI et FUNATSU (38)) et 6-O-carboxyméthylchitine (MATSUSHIMA et al (61), HAYASHI et al (39)). Le dosage de l'activité du lysozyme est réalisé selon trois méthodes : la mesure de la lyse des parois de Micrococcus lyso-deikticus, la mesure de la variation de viscosité des dérivés solubles et la mesure de l'augmentation du pouvoir réducteur.

3 - Répartition

Le lysozyme est très largement réparti dans la nature. Chez l'homme, le lysozyme a pu être caractérisé dans les milieux de sécrétions : le lait (JOLLES et JOLLES (49)), la salive (PETIT et JOLLES (72)) et les larmes (JOLLES et JOLLES (48)). Le lysozyme est présent chez le fœtus et le nouveau-né (GLYNN et al (36)).

Le lysozyme peut être facilement préparé à partir d'œufs de différentes espèces d'oiseaux et JOLLES et al (47) et CANFIELD (14) ont déterminé, dès 1963, la structure primaire du lysozyme du blanc d'œuf de poule.

Dans le règne végétal, IWATA (44) a montré l'existence d'une enzyme hydrolysant les parois bactériennes, dans une préparation d' α -amylase d'orge.

Enfin, de nombreux lysozymes ont été isolés de microorganismes. TAKAHARA (85) ainsi que OKADA et KITAMATA (70) ont décrit et étudié le lysozyme de Bacillus subtilis.

4 - Propriétés physico-chimiques de quelques lysozymes

Les propriétés physicochimiques des lysozymes de Bacillus subtilis ont été comparées à celles du lysozyme du blanc d'œuf de poule et sont décrites dans le tableau II.

Il existe deux types de lysozyme bactérien : le premier, de masse moléculaire faible, est proche du lysozyme isolé du blanc d'œuf de poule, et le second, l'endo-N-acétylmuramyl hydrolase, possède une masse moléculaire importante. Ce type d'enzyme a été appelé "lysozyme-like".

B - Les endo-N-acétylglucosaminidases

1 - Définition

L'endo-N-acétylglucosaminidase est une enzyme qui hydrolyse les liaisons O-glycosidiques d'un polysaccharide en libérant des chaînons disaccharidiques au minimum et qui possèdent une N-acétylglucosamine en position terminale réductrice. Le glycone peut être libre ou associé à une protéine.

2 - Répartition

De nombreuses endo-N-acétylglucosaminidases ont été caractérisées chez des organismes appartenant à tous les règnes. Nous insisterons dans ce chapitre sur les enzymes d'origine bactérienne et plus particulièrement sur celles de Bacillus subtilis.

a) Règne végétal

IWATA (44) a mis en évidence dans les grains d'orge la présence d'une endo-N-acétylglucosaminidase qui, avec une endo-N-acétylmuramylhydrolase, est capable de lyser les parois bactériennes.

b) Règne animal

L'endo-N-acétylglucosaminidase isolée par NISHIGAKI et al (69) du foie, de la rate et du rein de rat, ainsi que de la rate de porc, a la propriété d'hydrolyser la liaison O-glycosidique du chaînon Glc NAc β^{1-4} Glc NAc du glycopeptide Asn (GlcNAc)₂ Man₆. La mise en évidence d'une activité d'endo β -N-acétylglucosaminidase dans le foie humain a été réalisée par BOERSMA et al (11).

Récemment, TARENTINO et MALEY (89) ont décrit l'existence d'une endo-N-acétylglucosaminidase dans les tissus de l'oviducte de poule.

Enfin, STIRLING (84) a isolé du foie humain une chitobiase de masse moléculaire faible (25-50 000 daltons) qui hydrolyse la liaison O-glycosidique du chaînon disaccharidique Glc NAc β^{1-4} Glc NAc et qui est inactive sur le 4-méthyl-ombelliféryl-N-acétyl- β -glucosaminide.

c) Règne bactérien

La découverte que les endo β -N-acétylglucosaminidases d'origine bactérienne sont actives sur les glycoprotéines a entraîné une étude poussée de ces enzymes en vue de les utiliser pour déterminer la structure des glycopeptides.

NAKAJIMA et al (68) ont montré qu'il existait chez Saccharomyces cerevisiae une enzyme libérant des chaînons polysaccharidiques constitués de dix-huit résidus de mannose et d'une N-acétylglucosamine en position terminale réductrice. L'endo β -N-acétylglucosaminidase D de Diplococcus pneumoniae, décrite par MURAMATSU (67) est active sur les glycopeptides des immunoglobulines de Myélome de souris. KOIDE et MURAMATSU (51) ainsi que ITO et al (43) ont montré la nécessité de la présence d'un résidu de mannose non substitué branché sur l'ose en α de la N-acétylglucosamine pour obtenir une hydrolyse de la chaîne.

Une enzyme catalysant le même type d'hydrolyse a été mise en évidence chez Streptomyces griseus par TARENTINO et al (91). La liaison β -1-4-N-acétylglucosaminide du résidu di-N-acétylchitobiose présent dans de nombreuses glycoprotéines est hydrolysée par cette enzyme. TARENTINO et MALEY (88) ont fractionné cette endo-N-acétylglucosaminidase en deux formes : l'endo-N-acétylglucosaminidase H et l'endo-N-acétylglucosaminidase L. La forme H dégrade les glycoprotéines possédant au moins 5 résidus de mannose. Par contre, la forme L est spécifique des chaînes légères du type $\text{Asn}(\text{GlcNAc})_2 \text{Man}_1$.

Dans les préparations commerciales de neuraminidase de Clostridium perfringens, CHIEN et al (17) ont mis en évidence une endo- β -N-acétylglucosaminidase. Cette enzyme hydrolyse le glycopeptide $\text{Asn}(\text{GlcNAc})_2 \text{Man}_5$ en libérant le chaînon AsnGlcNAc .

Enfin, FAN et BECKMAN (30) ont montré que Bacillus subtilis synthétise une endo- β -N-acétylglucosaminidase qui hydrolyse le peptidoglycane de Micrococcus lysodeikticus.

3 - Propriétés physicochimiques des endo-N-acétylglucosaminidases

Quelques propriétés physicochimiques des endo- β -N-acétylglucosaminidases d'origines diverses ont été comparées à celles de Bacillus subtilis et sont résumées dans le tableau IV.

Tableau III : Propriétés physico-chimiques des endo-N-acétylglucosaminidases

Enzymes	pH optimum	Masse moléculaire	Références
<i>Bacillus subtilis</i>	5	50 000	FAY et BROUHAU (30)
<i>Streptomyces griseus</i>	5 à 6	28 000	TARENTINO et VALEY (88)
<i>Clostridium perfringens</i>	5,5		CHEN et al (17)
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	6,5		KOIDE et MORIMATSU (51)
Foie de Porc	7		NISHIMURA et al (69)
Criquette de Poule	5,5	56 000	TARENTINO et VALEY (89)



Tableau : IV Action des différentes endo- β -N-acétylglucosaminidases sur des glycopeptides de type N-acétyllactosaminique et leur dérivé

Nature du glycopeptide	L TARENTINO et al (90)	H ARAKAWA et al (4)	D TARENTINO et MALEY (89)	S. griseus D. pneumoniae Bacillus subtilis
Asn(GlcNAc) ₂ Man	+	-	-	
Asn(GlcNAc) ₂ Man ₅	-	+	+	+
Asn(GlcNAc) ₂ (Man) ₃ Fuc	-	-	+	-
Asn(GlcNAc) ₂ (Man) ₃ GlcNAc	-	-	+	+
Peptidoglycane				+

4 - Spécificité d'action des endo-N-acétylglucosaminidases d'origine bactérienne

L'étude de la spécificité d'action des endo-N-acétylglucosaminidases d'origine bactérienne a été réalisée par de nombreux auteurs, car ces enzymes sont très utilisées pour la détermination de la structure des glycoprotéines. Le tableau IV résume les résultats concernant le mécanisme d'action de ces enzymes.

La structure des glycopeptides, et en particulier le nombre de résidus de mannose, a permis de différencier les formes H et L des endo-N-acétylglucosaminidases isolées de Streptomyces griseus. Récemment, TARENTINO et MALEY (39) ont comparé les spécificités d'action des endo- β -N-acétylglucosaminidases de Diplococcus pneumoniae et de Streptomyces plicatus. L'endoglycosidase de Streptomyces plicatus est active sur les glycopeptides $\text{Asn}(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3\text{GlcNAc}$ et $\text{Asn}(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_5$.

Le glycopeptide $\text{Asn}(\text{GlcNAc})_2\text{Fuc}(\text{Man})_3$ n'est pas hydrolysé. Si le résidu de fucose est absent, cette enzyme se révèle alors active. Le fucose, lié sur le di-N-acétylchitobiose, induit donc la spécificité de cette enzyme. Par contre, l'endo- β -N-acétylglucosaminidase D de Diplococcus pneumoniae hydrolyse ce glycopeptide. D'ailleurs, cette enzyme est active sur des glycopeptides de structure complexe (Tableau IV) et les auteurs pensent que sa spécificité d'action n'est pas clairement établie car les préparations enzymatiques étudiées contenaient des exoglycosidases.

La spécificité d'action de l'endo- β -N-acétylglucosaminidase de Bacillus subtilis sur les glycopeptides cités n'a pas été étudiée. Seule, l'hydrolyse du chaînon polysaccharidique du peptidoglycane de Micrococcus lysodeikticus montre qu'il s'agit d'une endo- β -N-acétylglucosaminidase (FAN et BECKMAN (34)). Cette enzyme est inactive sur le p-nitrophényl-N-acétylglucosaminide.

II- L'endo- α -N-acétylgalactosaminidase

A - Définition

L'endo- α -N-acétylgalactosaminidase de Diplococcus

pneumoniae, isolée par ENDO et KOBATA (28), a la propriété d'hydrolyser les glycopeptides en libérant des chaînons Gal- β -1-3-GalNAc avec la N-acétylgalactosamine en position terminale réductrice.

B - Spécificité d'action

Cette enzyme hydrolyse les glycanes des glycoprotéines désialysées des membranes erythrocytaires humaines. Son substrat spécifique est le glycopeptide Gal β (1-3)GalNAc α 1-Ser ou Thr.

C - Propriétés physicochimiques

Le pH optimum d'activité de l'endo- α -N-acétylgalactosaminidase est de 6. Elle est inhibée à 60p100 par le p-chloro-mercuribenzènesulfonate 1 mM et à 63p100 par le 1'éthylènediamine tétracétique. Elle perd 50p100 de son activité à pH 5,5 et à pH 7.

III- L'endo-galactosaminidase

A - Définition

L'endo-galactosaminidase hydrolyse les liaisons o-glycosidiques d'un polysaccharide et conduit à la formation de chaînons possédant une galactosamine en position terminale réductrice. Ce type d'enzyme a été isolé du milieu de culture de Streptomyces griseus par REISSIG et al (74).

B - Spécificité d'action

L'endo-galactosaminidase de Streptomyces griseus (74) hydrolyse les liaisons GalNH₂-GalNH₂ dans l'oligogalactosaminoglycane isolé du filtrat de culture d'un mutant de Neurospora. Les fragments polysaccharidiques, résultant de l'hydrolyse enzymatique, ont une masse moléculaire de 100 000 daltons. Ces résultats laissent présager une spécificité d'action étroite, et l'enzyme est inactive sur les liaisons GalNAc - GalNAc.

C - Propriétés physicochimiques

L'enzyme de Streptomyces griseus a un pH optimum d'action de 5,4 et conserve 50p100 de son activité pour des valeurs de pH comprises entre 4 et 7. La température optimale n'a pas été déterminée, cependant l'enzyme est relativement thermostable car sa demi-durée de vie est de 3 minutes à 100°C.

IV - Les amidases

Ce sont des enzymes qui ont la propriété d'hydrolyser les liaisons amides entre les protéines et les groupements polysaccharidiques des glycoprotéines.

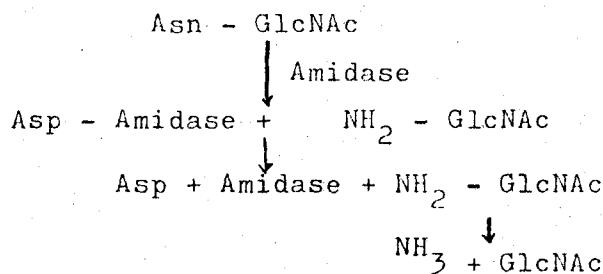
Nous étudierons les deux types mis en évidence :

- la 4'-L-Aspartylglycosylamine amido hydrolase, et
- l'endo-N-acétylmuramyl-L-alanine amidase.

A - La 4'-L-Aspartylglycosylamine amido hydrolase

1 - Définition

Dans de nombreuses glycoprotéines, la partie glycanique est liée à la protéine par une liaison de type N-glycosidique. Cette liaison est réalisée entre un résidu de N-acétylglucosamine et l'asparagine. La 4'-L-Aspartylglycosylamine amido hydrolase hydrolyse cette liaison selon le schéma proposé par TANAKA et al (86) :



2 - Répartition

Cette enzyme a été mise en évidence par MURAKAMI et EYLAR (66) dans l'épididyme de porc et de bouc. LEE et al (53)

l'ont caractérisée dans les émulsions d'amande douce et MAKINO et al (58) chez Proteus vulgaris. L'enzyme a été purifiée et isolée du sérum de porc par MAKINO et al (58) et de l'oviducte de poule par PLUMMER et al (73).

3 - Spécificité

L'enzyme hydrolyse les chaînons suivants :
4'-L-Asp-GlcNAc, 4'-L-Asp-GalNAc, 4'-Asp-Man, 4'-L-Asp-Gal. Elle est inactive lorsque les fonctions 2-NH_2 ou 1-COOH de l'acide aspartique sont bloquées. L'hydrolyse des glycoprotéines est possible si l'acide aspartique est lié N-glycosidiquement avec la fonction réductrice de l'ose du glycanne. Cependant, cette enzyme est inactive si la chaîne peptidique est importante : il s'agit donc d'une exoenzyme.

4 - Propriétés physicochimiques

L'amidase est stable dans une gamme de pH de 4 à 7 à 37°C pendant 22 h. Le pH optimum d'activité varie selon l'origine de l'enzyme. La masse moléculaire est également fonction de l'origine de cette enzyme. L'amidase du rein de rat (MAHADEVAN et TAPPET (57)) possède une masse moléculaire de 31 000 daltons alors que celle de poule isolée par TARENTINO et MALEY (87) est de 110 000.

B - L'endo-N-acétylmuramyl-L-alanine amidase

1 - Définition

L'endo-N-acétylmuramyl-L-alanine amidase hydrolyse la liaison amide entre la L-alanine et l'acide N-acétylmuramique du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Cette enzyme libère des groupements NH_2 sans qu'apparaisse une augmentation du pouvoir réducteur (figure 4).

2 - Répartition

De nombreuses bactéries synthétisent cette autolysine.

Elle a été mise en évidence chez *Streptomyces* par GHUYSEN et al (34). FAN et BECKMAN (29) ont montré que l'enzyme de *Bacillus subtilis* était fixée à la paroi et qu'elle en était détachée par le chlorure de lithium.

3 - Propriétés physicochimiques

L'autolysine isolée des parois de *Bacillus subtilis* possède une masse moléculaire de 35 000 daltons et présente un optimum d'activité à pH 8. Elle est relativement thermostable car elle résiste à un chauffage de 51°C pendant dix minutes (FAN et BECKMAN (30)).

4 - Propriétés enzymatiques

L'alanine amidase est active sur le peptidoglycane de *Bacillus subtilis* mais ne lyse pas les parois de *Micrococcus lysodeikticus*. Cette différence serait due, selon FAN et BECKMAN (30), à ce que la composition en acides aminés des chaînons peptidiques serait différente suivant les bactéries. Souvent associée à une endo-N-acétylglucosaminidase, cette enzyme favoriserait la croissance bactérienne en lysant la paroi dans des zones précises (30).

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

I - Dosage de l'activité de l'Enzyme X par viscosimétrie

La force enzymatique de l'Enzyme X est déterminée au moyen d'un viscosimètre rotatif type Epprecht équipé d'une cuve de 150 ml.

A - Dosage

1 - Principe

La force enzymatique d'une solution est déterminée par la mesure de la capacité d'abaissement de 15p100 de la viscosité (comprise entre 17 et 35 centipoises) d'un moût de fermentation de Bacillus subtilis à 40°C. La valeur de 100 unités correspond arbitrairement à la quantité d'enzyme nécessaire pour faire baisser la viscosité de 15p100 en une heure à 40°C.

2 - Matériel

Un viscosimètre Epprecht système MS-r-1 à cuve de 150 ml est employé pour les mesures.

La cuve du viscosimètre est placée dans un bain-marie réglable thermostaté à $\pm 1^\circ\text{C}$.

Les temps sont mesurés au chronomètre.

3 - Mode opératoire

a) Température

Les dosages se pratiquent à une température de 40°C. Cette température, proche du maximum d'activité de l'enzyme, a été choisie arbitrairement. Elle permet une stabilisation rapide du moût visqueux. Les températures plus élevées provoquent des phénomènes de coagulation et augmentent l'activité des protéases du milieu, ce qui peut interférer sur le dosage par viscosimétrie.

b) Détermination du temps 0

140 ml de substrat (moût de culture visqueux de Bacillus subtilis) sont introduits dans la cuve du viscosimètre,

puis, après stabilisation de la température à 40°C, 10 ml d'eau distillée sont ajoutés. Quand la viscosité a atteint une valeur stable, cette valeur correspond au point 0.

c) Mesure de la viscosité de l'eau à 40°C

La viscosité de 150 ml d'eau distillée à 40°C correspond à la division 24,4 sur le cadran de notre viscosimètre, soit 1,32 centipoises.

d) Détermination de l'abaissement de 15p100 de la viscosité

Soit : V la lecture de la viscosité au temps 0

v la lecture de la viscosité de l'eau

V₋₁₅ la valeur de la viscosité après abaissement de 15p100

Nous pouvons écrire :

$$V_{-15} = \frac{(V - v) \times 85}{100} + v$$

e) Dosage de la force enzymatique d'une solution

140 ml de substrat visqueux sont mis à stabiliser dans le viscosimètre à 40°C.

10 ml de la solution enzymatique à doser sont ajoutés.

Le chronomètre est déclenché lorsque la valeur de la viscosité correspond à celle du point 0.

La viscosité est relevée toutes les quinze secondes jusqu'à la valeur correspondant à la diminution de 15p100 de la viscosité.

La courbe de la diminution de la viscosité en fonction du temps est ensuite tracée. La vitesse initiale de décroissance de la viscosité, tangente aux premiers points de la courbe, est proportionnelle à la quantité d'enzyme mise en jeu. Cette droite permet de déterminer un temps théorique d'abaissement de

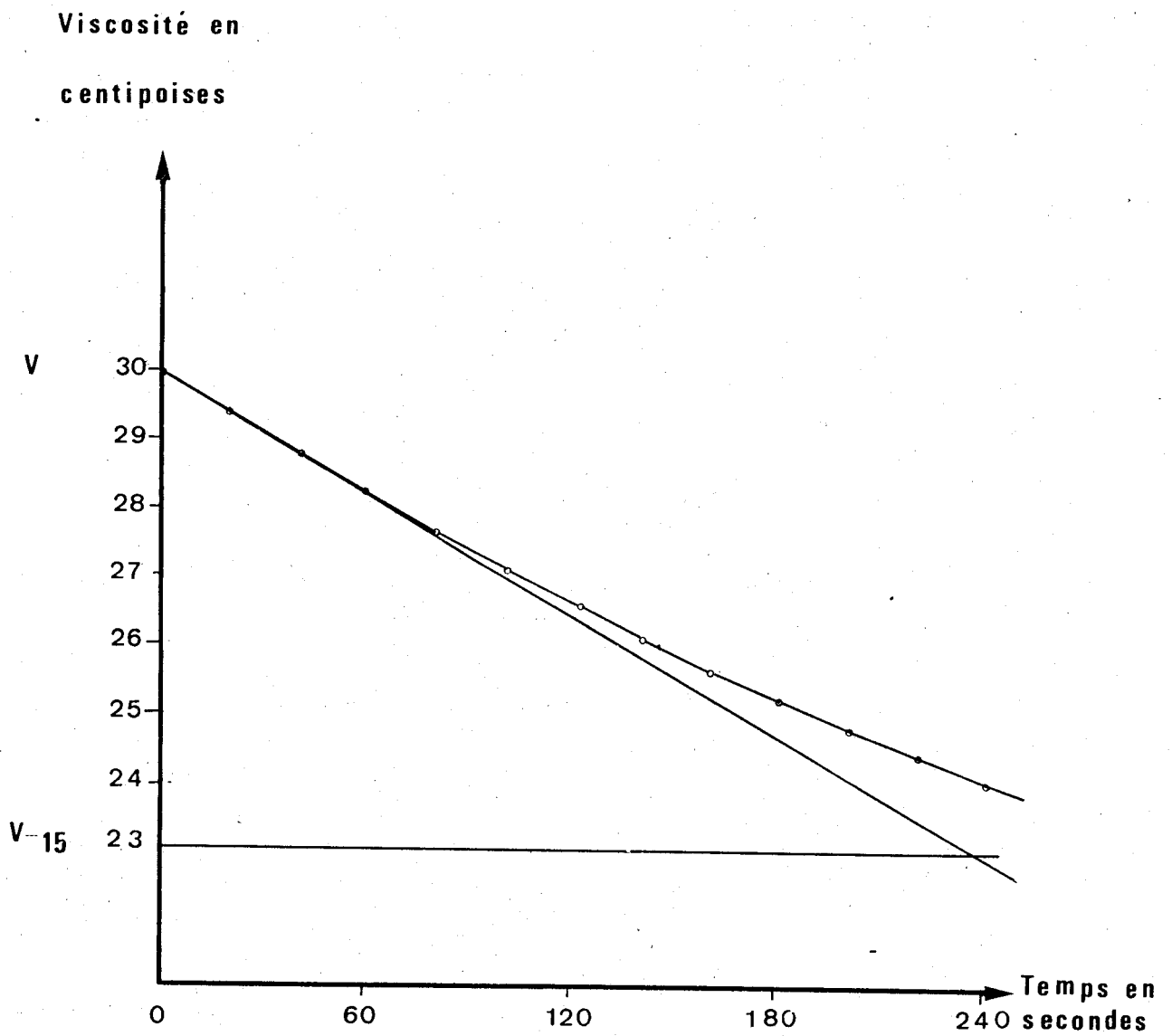


Figure 9 Diminution de la viscosité d'un moût de fermentation
de Bacillus subtilis par action de l'Enzyme X

de 15p100 de la viscosité : T_{-15} (fig.9).

La force F de la solution à 40°C en unités par millilitre est, d'après la définition :

$$F = \frac{3\ 600s \times 100u}{T_{-15} \times 10\ ml}$$

avec T_{-15} le temps en secondes de l'abaissement de viscosité de 15p100.

Soit :

$$F\ u/ml = \frac{36\ 000}{T_{-15}}$$

B - Détermination de l'activité de l'Enzyme X en fonction de la température et du pH

1 - Activité en fonction de la température

Les moûts visqueux sont mis à stabiliser à la température du dosage.

Le point 0 est déterminé pour chaque température et la valeur de 15p100 de baisse de viscosité est calculée.

La force de 10 ml d'une solution enzymatique préalablement portée à la température du dosage est alors mesurée pour chaque température.

Les valeurs sont déterminées de 5 en 5°C pour les températures comprises entre 20°C et 70°C.

2 - Activité en fonction du pH

100 ml d'un moût de fermentation très visqueux sont ajustés aux différents pH de l'expérience (4 - 4,5 - 5 - 5,5 - 6 - 6,5 - 7 - 7,5 - 8 - 8,5 - 9) par addition d'acide citrique 0,2M pour les pH acides et d'une solution tampon phosphate trisodique 0,2M pour les pH basiques. De l'eau distillée est ajoutée en quantité suffisante pour 140 ml afin d'obtenir la même concentration en substrat.

La force de 10 ml d'une solution enzymatique est alors mesurée par la baisse de viscosité à 40°C des substrats aux différents pH.

II - Purification de l'Enzyme X

A - Préparation industrielle d'une poudre atomisée d'Enzyme X

Un moût de culture de Bacillus subtilis (3 000 litres environ) destiné à la préparation d'Enzyme X est dosé toutes les demi-heures pour déterminer le maximum d'activité. Lorsque celui-ci est atteint, le moût est débarrassé de la plupart des bactéries du milieu par addition d'un agent de floculation industriel : le tétrofloc 63, et filtré sur filtres presse garnis de cartons

Milieu de fermentation total



Floculation (Tétrofloc 63)



Filtration stérile

(Cartons "C5 et E.K.S.")



Atomisation

Figure 10 : schéma de la préparation industrielle
de l'enzyme X

C5, E.K.S. pour éliminer le précipité dans lequel sont emprisonnées les bactéries. Le liquide brillant obtenu est atomisé et donne une poudre soluble dans l'eau, titrant entre 5 000 et 20 000 unités par gramme. Cette poudre est stable à température ambiante.

B - Inhibition des protéases neutres et alcalines

En solution, l'Enzyme X' est détruite par les protéases présentes dans le milieu. L'action de la protéase neutre peut être inhibée par l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) à la concentration de $10^{-3}M$ qui complexe le zinc nécessaire à son activité (60). La protéase alcaline est irréversiblement inhibée par le phényl méthyl sulfonyle fluorure (PMSF) à la concentration de $10^{-4}M$ (62)(22).

C - Précipitation par l'acétone

100g d'enzyme atomisée titrant environ 10 000 u/gr sont dissous dans 500 ml d'une solution EDTA $10^{-3}M$ PMSF $10^{-4}M$ et sont stabilisés à $+4^{\circ}C$.

Un volume d'acétone refroidi à $-10^{\circ}C$ est additionné lentement (une heure environ) sous agitation. L'ensemble est ensuite mis à reposer une heure à $-10^{\circ}C$.

Le précipité est recueilli par centrifugation à 4 500 t/mn, 30 mn à $-10^{\circ}C$.

L'opération est recommencée deux fois après redissolution du précipité dans 500 ml d'eau renfermant de l'EDTA $10^{-3}M$ et du PMSF $10^{-4}M$.

Le précipité final est redissous dans 100 ml de la solution précédente et centrifugé à 4 500 t/mn pendant 30 mn à $+4^{\circ}C$ afin d'éliminer l'insoluble.

D - Précipitation par le sulfate d'ammonium

Les 100 ml de surnageant obtenus après précipitation à l'acétone sont amenés à 60p100 de saturation en sulfate

Enzyme brute atomisée



Précipitation par un volume d'acétone (3 fois)



Surnageant

Précipitation par le sulfate d'ammonium (60p100 de S)



Surnageant

Fractionnement sur colonne de DEAE Cellulose



élution à l'eau

élution par tampon phosphate
ph 6,7 70 mM

Elution par tampon phosphate ph 6,7 120 mM

Figure 11. Schéma de la purification de l'enzyme

d'ammonium par addition lente sous agitation de 150 ml d'une solution saturée à + 4°C.

Après une nuit à + 4°C, le précipité est recueilli par centrifugation à 13 000 t/mn pendant une heure dans une centrifugeuse Beckman J 21.

Le précipité est redissous dans un volume minimum de la solution aqueuse renfermant de l'EDTA 10^{-3} M et du PMSF 10^{-4} M, il est dialysé une nuit contre la même solution à + 4°C.

90 ml de l'adialysable sont ajustés à 100 ml par l'addition d'une solution tampon phosphate 100 mM, pH 6,7.

E - Fractionnement par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE - cellulose

La solution obtenue après précipitation au sulfate d'ammonium est déposée sur une colonne de DEAE-cellulose (2,5 x 30 cm) équilibrée dans le tampon phosphate 10mM, pH 6,7.

La colonne est éluée par un gradient discontinu de tampon phosphate pH 6,7, 10mM, 70mM et 120mM.

Le débit est de 40 ml/h.

Les fractions recueillies (20 ml) sont dosées par la méthode viscosimétrique. Les protéines sont repérées à 280 nm et dosées par la méthode de LOWRY (56) avec une gamme étalon de 50 à 150 μ g de sérum albumine bovine.

III - Préparation et étude de la fraction visqueuse du mucus

A - Préparation du mucus par ultrafiltration

La mise au point du procédé de préparation du mucus à partir des moûts de fermentation de Bacillus subtilis a été réalisée en collaboration avec la société RAPIDASE.

La figure 12, P. 49 en résume la préparation. Nous avons traité 170 l du milieu de fermentation 895 afin d'obtenir un produit homogène.

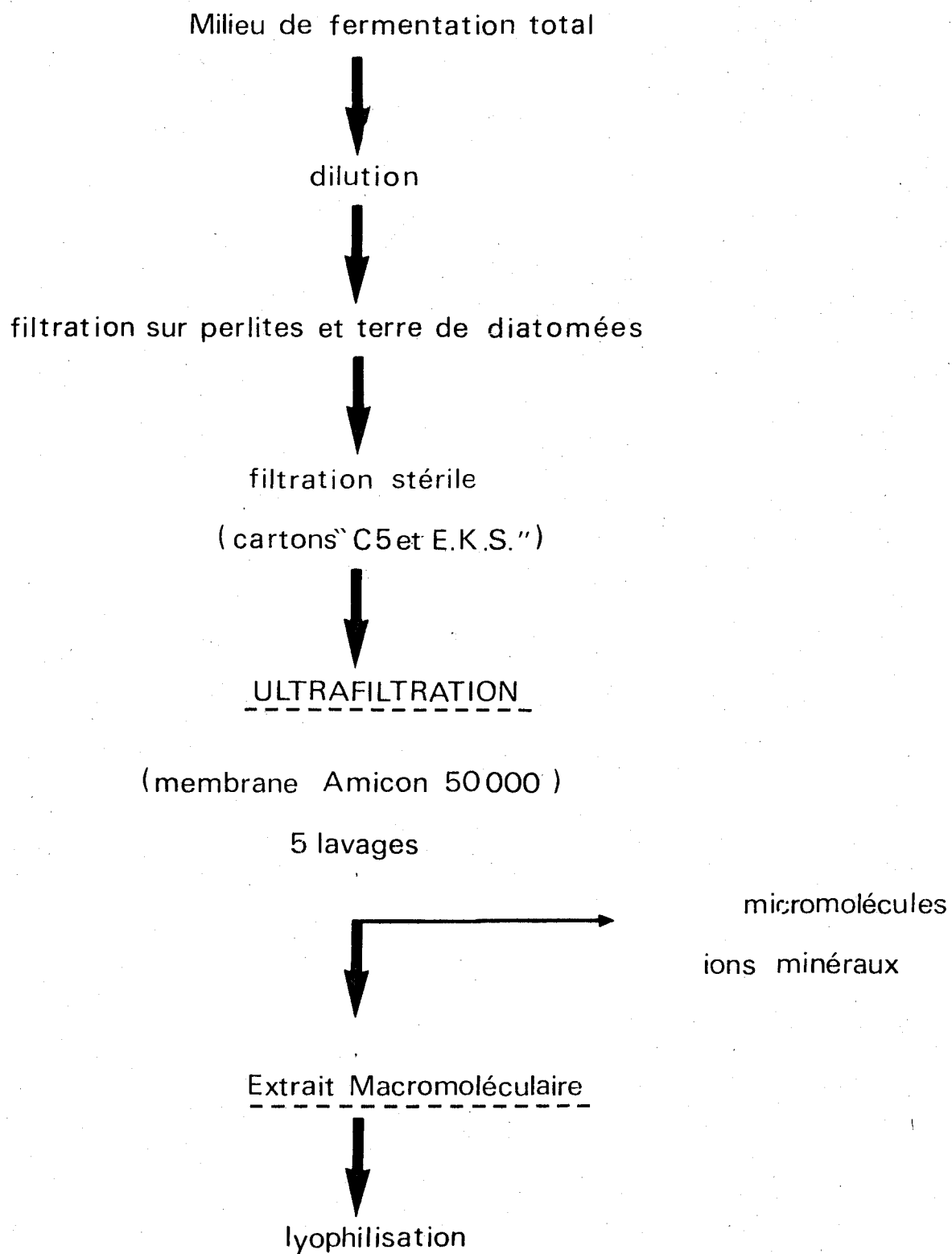


Figure 1 2 schéma de la préparation de l'extrait visqueux

1- Filtration

170 litres du moût de fermentation 895 d'une viscosité de 35 centipoises sont dilués à 680 litres pour diminuer la viscosité.

La filtration sur perlites et terre de diatomées permet d'éliminer la plupart des germes et des débris bactériens.

La phase clarifiée ainsi obtenue est débarrassée des germes restants par filtration sur carton C5 et E.K.S. Du toluène est additionné pour éviter les infections bactériennes au cours des opérations suivantes.

Le volume du filtrat est de 540 l.

2- Ultrafiltration

Le filtrat est concentré sur membrane Amicon XM50 laissant passer les molécules de masse inférieure à 50 000, jusqu'à un volume de 35 l, puis lavé cinq fois pour éliminer les micro-molécules.

Le volume final est de 24,5 l.

3- Lyophilisation

Le mucus est lyophilisé et conservé à + 4°C. Il se présente sous la forme d'une poudre argentée qui donne une solution claire, visqueuse et légèrement pigmentée.

Nous avons obtenu environ 100 grammes de produit appelé mucus M895.

B - Fractionnement du mucus par chromatographie d'échange d'ions

Le fractionnement du mucus sur colonne d'échangeur d'anions type Dowex 1x2 est réalisé selon la technique préconisée par HAMADA et al (37).

1- Mode opératoire

L'échangeur d'anions : Dowex 1x2 200-400 mesh est mis sous forme H^+ par passage d'acide chlorhydrique puis rincé par l'eau jusqu'à neutralité.

1g de mucus M895 repris par 10 ml d'eau distillée est injecté sur la colonne (3 x 70 cm).

La colonne est lavée par 500 ml d'eau distillée puis éluée par un gradient linéaire d'acide chlorhydrique de 0 à 1 N (flacons de 800 ml). Le débit d'élution est de 15 ml/h et les fractions recueillies ont un volume de 5 ml.

Les différentes fractions sont neutralisées par de la soude 0,5 N, dialysées contre 100 fois leur volume d'eau distillée et lyophilisées.

2- Procédés de repérage

Les protéines sont repérées par l'absorption à 280 nm. Les oses totaux sont mis en évidence par la microméthode au phénol sulfurique (51). Le repérage des osamines est réalisé selon la méthode d'Elson-Morgan modifiée (51). Le phosphate est dosé par la méthode de Allen (2) après minéralisation.

3- Etude des constituants du mucus

Le dosage, la nature des constituants et leurs rapports molaires ont été déterminés en collaboration avec SAMOR (80).

Nous décrirons brièvement les méthodes employées.

a) Méthodes de dosage colorimétriques

α - Oses neutres

Les oses neutres sont dosés par la méthode à l'orcinol de TILLMANS et PHILIPPI (93) modifiée par RIMINGTON (76). Ce dosage est effectué simultanément avec celui des acides uroniques par la méthode au carbazol de DISCHE (23) afin d'éliminer les interférences (MONTREUIL et SPIK (51)).

β - Osamines

Les osamines sont dosées par la méthode d'Elson-

Morgan modifiée (51) après hydrolyse en tube scellés par l'acide chlorhydrique 4 N, 4 heures à 100°C.

Y- Acides uroniques

Les acides uroniques sont dosés par la méthode de DISCHE au carbazol (23) couplée avec celle des oses neutres à l'orcinol afin d'éliminer les interférences (MONTREUIL et SPIK (51)).

6 - Dosage de l'azote

L'azote est dosé par la méthode de KJELDAHL après destruction par l'acide sulfurique concentré.

L'azote protéique est déterminé par différence entre l'azote total et l'azote osaminidique.

Les protéines sont aussi dosées par la méthode de LOWRY (56) avec une gamme étalon de sérum albumine.

6- Dosage du phosphore

Le phosphore est dosé par la méthode de ALLEN (2) avant et après destruction par le mélange $HCl\ O_4 / H_2SO_4$ (2:1)

b) Identification des monosaccharides

Les différentes fractions sont hydrolysées par l'acide chlorhydrique 2N, 2 heures à 100°C pour les oses neutres et acides et 4N, 4 heures à 100 °C pour les osamines.

Après purification par chromatographie sur colonnes couplées de DOWEX 50 x 8, 25-50 mesh forme acide et de DUOLITE A 102 D, 25-50 mesh forme formiate. Les hydrolysats sont chromatographiés sur papier Whatman 3 dans le système solvant de FISCHER et NEBEL (31) pendant 18 heures.

Les chromatogrammes sont révélés par les réactifs à l'oxalate d'aniline de PARTRIGE (71) et au nitrate d'argent de TREVELYAN (94). Les osamines sont mises en évidence par le réactif à la ninhydrine.

c) Procédé de détermination de la composition molaire glucidique

La composition molaire glucidique est déterminée

par chromatographie en phase gazeuse selon le procédé de ZANETTA et al (102) adapté au laboratoire par FOURNET (33) après méthanolyse et trifluoroacétylation.

C - Etude de la fraction visqueuse F IV

1- Etude des constituants de la fraction F IV

L'étude des constituants de la fraction F IV visqueuse est réalisée sur un extrait sec de cette fraction rechromatographiée sur colonne de DOWEX 1x2 pour éliminer les contaminants des autres fractions.

a) Réduction des acides uroniques

La fraction F IV résiste à l'hydrolyse acide, aussi pour déterminer quantitativement ses constituants, il faut réduire les acides uroniques.

Le procédé de réduction a été décrit par SAMOR (80) et est relaté dans la figure 13, p. 54.

Le polysaccharide est méthanolysé et les liaisons O-glycosidiques les plus labiles sont rompues. Les fonctions semi-aldéhydriques des oses et des osides sont méthyl estérifiées.

Les produits sont ensuite peracétylés et sont solubilisés dans le tétrahydrofurane. Les acides uroniques sont réduits par le borane méthyl sulfide. Les monosaccharides sont dosés par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse.

2- Détermination de la masse moléculaire de la fraction F IV

La masse moléculaire de la fraction F IV a été déterminée à l'équilibre de sédimentation selon la méthode décrite par CHERVENKA (16). L'expérimentation a été réalisée avec l'Ultra-centrifugeuse analytique BECKMAN modèle E, à 20°C pendant 24 heures à 10 000 t/mn.

Les échantillons ont une concentration de 0,5 mg/ml dans le tampon Tris H Cl 0,1 M pH 7,25.

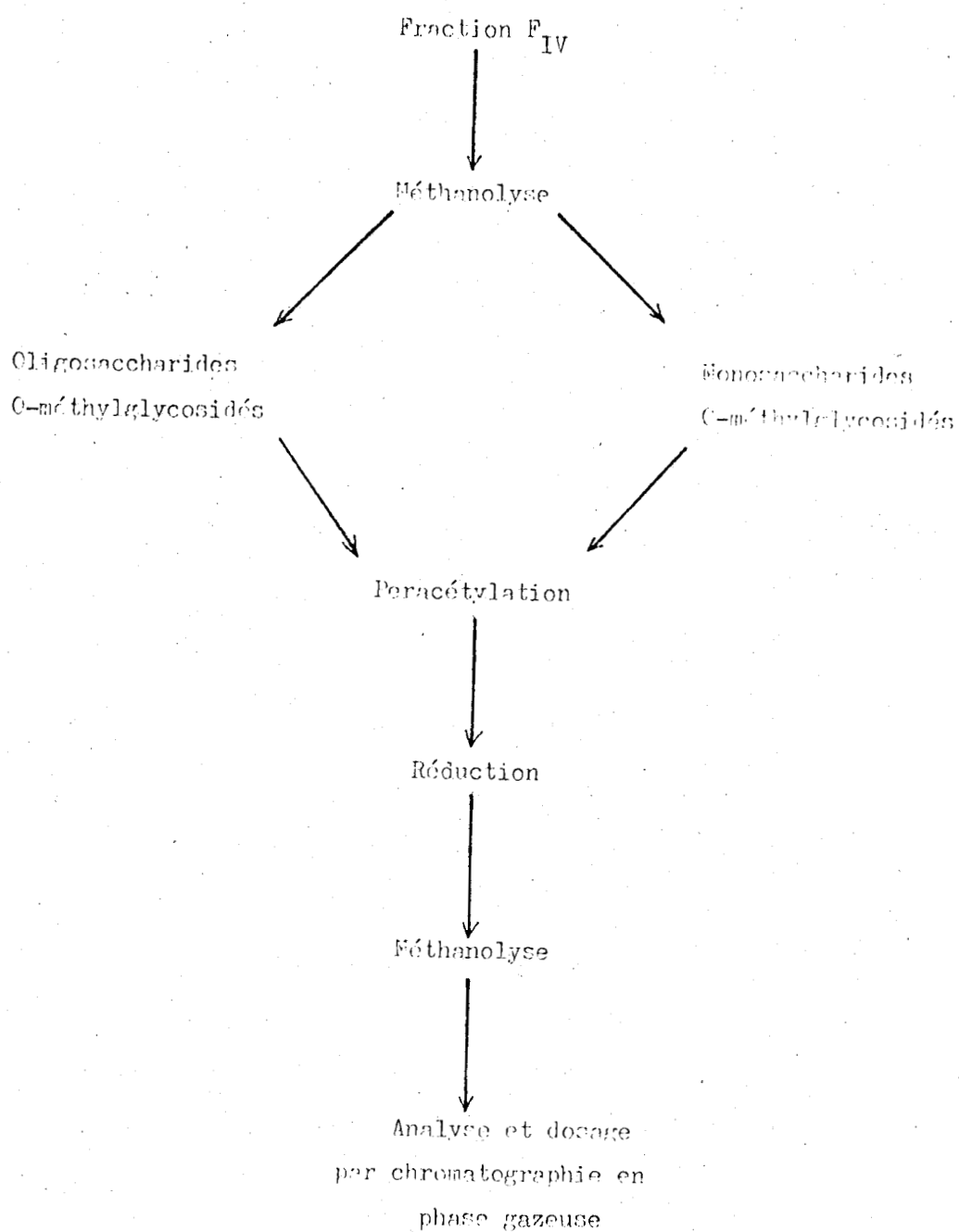


Figure : 13 Schéma général de la réduction des acides uroniques de la fraction F_{IV}



IV - Détermination de l'activité de l'Enzyme X"

A - Mise en évidence des produits de dégradation

1- Diminution de la viscosité intrinsèque

a) Appareil

L'appareil utilisé est un viscosimètre "VISCOMATIC". Le tube viscosimétrique est du type UBBELOHDE. Les différentes dilutions sont réalisées automatiquement avec la cellule "DOSIMAT". La précision des dilutions est de $\pm 0,01$ ml.

Le tube viscosimétrique et la cellule où sont effectuées les différentes dilutions sont maintenus à une température constante à l'aide d'un flux de liquide provenant d'un réservoir préalablement thermostaté à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ pendant 2 heures.

Les mesures des temps d'écoulement sont réalisées par l'intermédiaire d'un dispositif photoélectrique.

b) Mode opératoire

Les solutions sont dépoussiérées sur filtre Millipore dont le diamètre des pores est de 0,45 microns.

Le solvant employé est une solution de phosphate 10 mM de pH 6,5.

La solution de départ a une concentration C de 15mg/ml.

La fraction F IV a été hydrolysée pendant une nuit à 37°C par 300 u/ml d'Enzyme X"purifiée. Les dilutions réalisées automatiquement sont : C, 2 C/3, C/2, C/3, C/4.

La viscosité intrinsèque $[\eta]$ est déterminée graphiquement en extrapolant à concentration nulle la courbe :

$$\frac{t - t^{\circ}}{t^{\circ} C} = f(C)$$

avec :

t = temps d'écoulement de la solution

t° = temps d'écoulement du solvant

C = concentration en g/ml

2- Chromatographie sur papier des produits de dégradation enzymatique de la fraction F IV

Une solution à 1p100 de la fraction visqueuse rechromatographiée sur colonne de Dowex 1x2, une solution d'"Enzyme X" purifiée titrant 300 u/ml et une solution de la fraction visqueuse et de l'enzyme aux mêmes concentrations sont incubées une nuit à 37°C.

50 µl de chaque solution sont déposés sur papier Whatman 3 et chromatographiés pendant 16 heures dans le système solvant : pyridine / acétate d'éthyle / acide acétique / eau (5 : 5 : 1 : 3).

Les chromatogrammes sont révélés par les réactifs à la ninhydrine et à l'oxalate d'aniline

3- Chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de Biogel P 150 des produits de dégradation enzymatique de la fraction F IV

La fraction F IV hydrolysée est chromatographiée sur une colonne de Biogel P 150 stabilisée dans le tampon phosphate 10 mM, pH 6,5.

Les dimensions de la colonne sont de 1 x 60 cm.

Les fractions collectées ont un volume de 2 ml, le débit est de 6 ml/h.

La colonne a été étalonnée dans des conditions identiques par le Bleu dextran 2000 (MM : 2 000 000), la fraction F IV native et par une quantité d'enzyme identique à celle ayant été utilisée pour l'hydrolyse.

Le repérage des sucres totaux est fait par la micro-méthode au phénol sulfurique

4- Détermination de la masse moléculaire des produits de dégradation enzymatique de la fraction F IV

a) Chromatographie de tamisage moléculaire

La masse moléculaire de l'hydrolysate enzymatique de la fraction F IV a été déterminée par tamisage moléculaire.

Nous avons utilisé une colonne (1,2 x 82 cm) d'Ultrogel AcA 34 stabilisée dans une solution de phosphate 200 mM, pH 6,8.

La colonne a été étalonnée par le cytochrome C, la β lacto globuline, la sérum albumine bovine, la sérotransferrine humaine et le bleu dextran 2000.

b) Ultracentrifugation analytique

La fraction F IV hydrolysée par l'enzyme est dialysée contre de l'eau distillée et lyophilisée.

L' ultracentrifugation est réalisée sur ultracentrifugeuse analytique Beckman modèle E à 48 000 t/mn à 20°C.

Les produits sont dissous dans une solution tampon Tris H Cl 0,1 M pH 7,25 à une concentration de 2 mg/ml.

La fraction F IV native est employée comme marqueur interne.

B - Mise en évidence des nouveaux groupements réducteurs apparus

1- Méthode de dosage des nouveaux groupements réducteurs apparus

a) Réactifs

Les nouveaux groupements réducteurs apparus sont dosés par la méthode de REISSIG, STROMINGER et LELOIR (75) modifiée par LEVY et Mc ALLAN (54) au réactif d'ERLICH en milieu boraté.

Les solutions employées sont :

- Tétraborate de potassium 0,7 M pH 9,2
- Paradiméthylaminobenzaldéhyde (PDMAB) à 1p100 dans un mélange à 98,75p100 d'acide acétique et 1,25p100 d'acide chlorhydrique concentré.

b) Mode opératoire

A 0,4 ml de la solution à doser sont ajoutés 0,2 ml de la solution tampon boratée. L'ensemble est mis au bain-marie à 100°C pendant exactement 3 minutes puis est refroidi sous courant d'eau.

3 ml de réactif au PDMAB sont ajoutés et les tubes après agitation sont mis au bain-marie à 37°C ± 1 pendant 12 mn.

Après refroidissement, la densité optique est lue immédiatement à 585 nm.

2- Détermination de l'activité de l'Enzyme X en fonction du pH et de la température

a) Température

Une solution à 5 mg/ml de la fraction visqueuse dans un tampon phosphate-citrate 0,2 M pH 6,5 et une solution d'enzyme purifiée à 3 000 u/ml sont mis à incuber à la température de l'expérience.

A 0,4 ml de la solution visqueuse est additionné 0,1 ml de la solution enzymatique, l'ensemble après agitation est incubé à la température de l'expérience.

La réaction est arrêtée par l'addition de 0,2 ml de tampon borate et par le passage de 3 minutes au bain-marie bouillant.

Les températures d'expérience sont échelonnées entre 20 et 70°C, de 5 en 5°C.

b) pH

La fraction visqueuse est dissoute dans une gamme de solutions tampon phosphate 0,2 M, citrate 0,1 M de pH 3,5 à 8,5 échelonnées de 0,5 en 0,5 unités de pH pour avoir une concentration de 5mg/ml.

0,1 ml d'une solution d'enzyme purifiée titrant 3 000 unités par ml sont ajoutés et l'ensemble est incubé 20 minutes à 37°C.

La réaction est arrêtée par l'addition de 0,2 ml de tampon borate et par passage pendant 3 mn au bain-marie à 100°C.

3- Baisse de la viscosité et augmentation du pouvoir réducteur de la fraction F IV hydrolysée par l'enzyme

La mesure de la viscosité est réalisée par un viscosimètre du type Epprecht qui permet les prélèvements.

140 ml d'une solution à 0,04p100 de la fraction visqueuse F IV dans le tampon citrate phosphate 10 mM pH 6,5 sont hydrolysés par 2 ml de la solution enzymatique purifiée titrant 3 000 u/ml.

La température de stabilisation est de 25°C $\pm$ 1°C.

La mesure de la viscosité est relevée aux temps 0, 1, 2, 5, 10, 15 et 30 mn, 1, 2, 3, 4, 20 et 24 h.

L'augmentation du pouvoir réducteur est déterminée pour les mêmes temps sur des prélèvements plongés 3 mn dans l'eau bouillante pour arrêter la réaction enzymatique.

TRAVAUX PERSONNELS

I - Dosage de l'activité de l'Enzyme X par méthode viscosimétrique

Pour déterminer les taux de purification de l'Enzyme X', nous avons utilisé une méthode empirique de dosage de l'activité de cette enzyme, mise au point par les laboratoires de la Société RAPIDASE, et décrite p.40. Cette méthode de dosage basée sur la vitesse d'abaissement de la viscosité d'un moût de culture de Bacillus subtilis, quoique peu précise, possède l'avantage de permettre le dosage des solutions quelque soit leur stade de purification, ainsi que le repérage de l'enzyme lors de ses étapes de chromatographie.

Nous avons tout d'abord déterminé par cette méthode les zones de température et de pH dans lesquelles l'enzyme offre un maximum d'activité.

A - Détermination de l'activité de l'Enzyme X en fonction du pH

Par la méthode d'abaissement de la viscosité, nous obtenons un maximum d'activité de l'Enzyme X à la température de 40°C dans une zone de pH comprise entre 6 et 7 (fig. (14)).

L'activité de l'enzyme est nulle pour les valeurs de pH inférieures à 4,5 et supérieures à 9.

B - Détermination de l'activité de l'Enzyme X en fonction de la température

Nous avons déterminé l'action de l'Enzyme X en fonction de la température au moyen de culture visqueux dont les pH se situaient dans la zone du maximum d'activité, c'est à dire entre pH 6 et pH 7.

La zone de température dans laquelle l'activité de l'Enzyme X est mesurable se situe entre 35 et 45°C (fig. (15)).

L'activité de l'Enzyme X est nulle au-delà de 60°C.

C - Conclusion

Les repérages et les dosages de l'Enzyme X au

Activité en p100

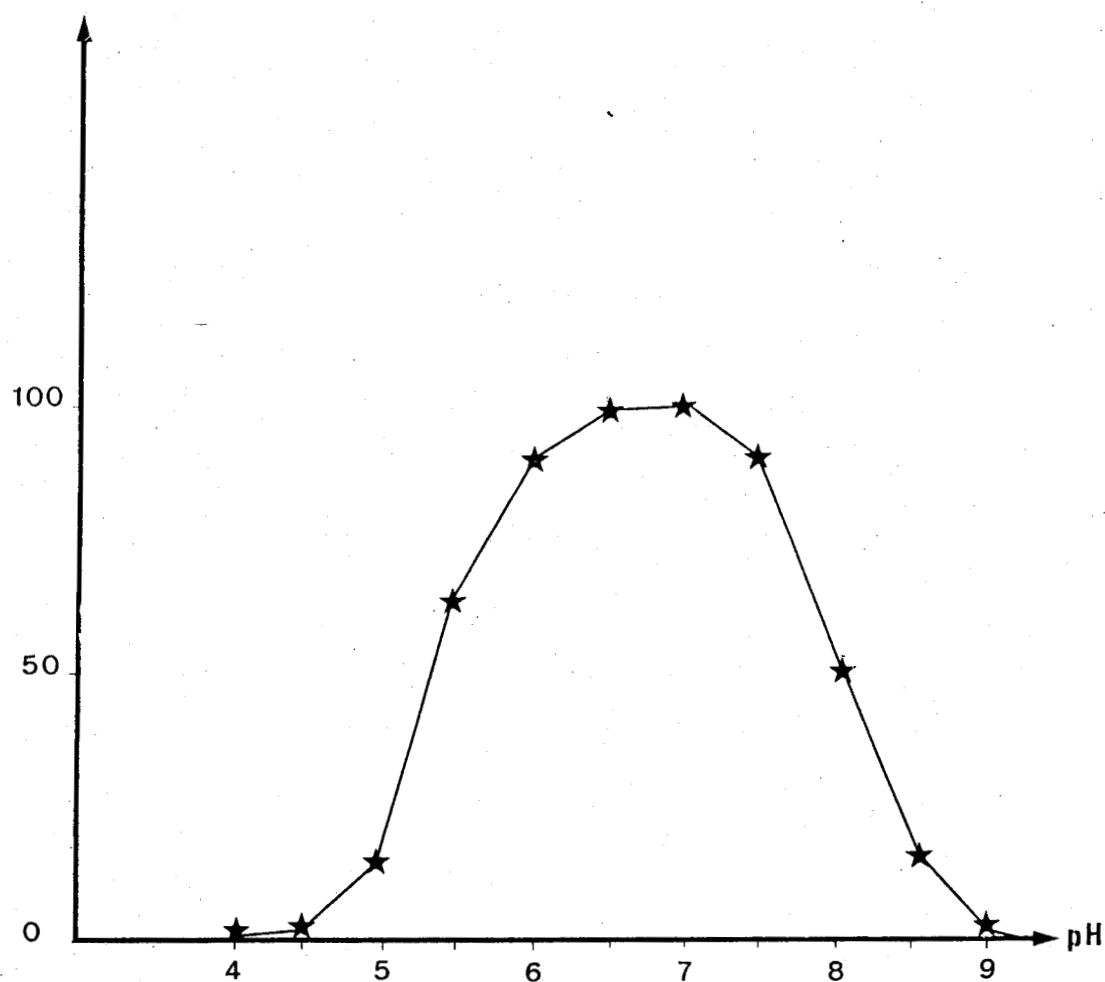


Figure 14 Activité de l'Enzyme X en fonction du pH
par méthode viscosimétrique

Activité en p100

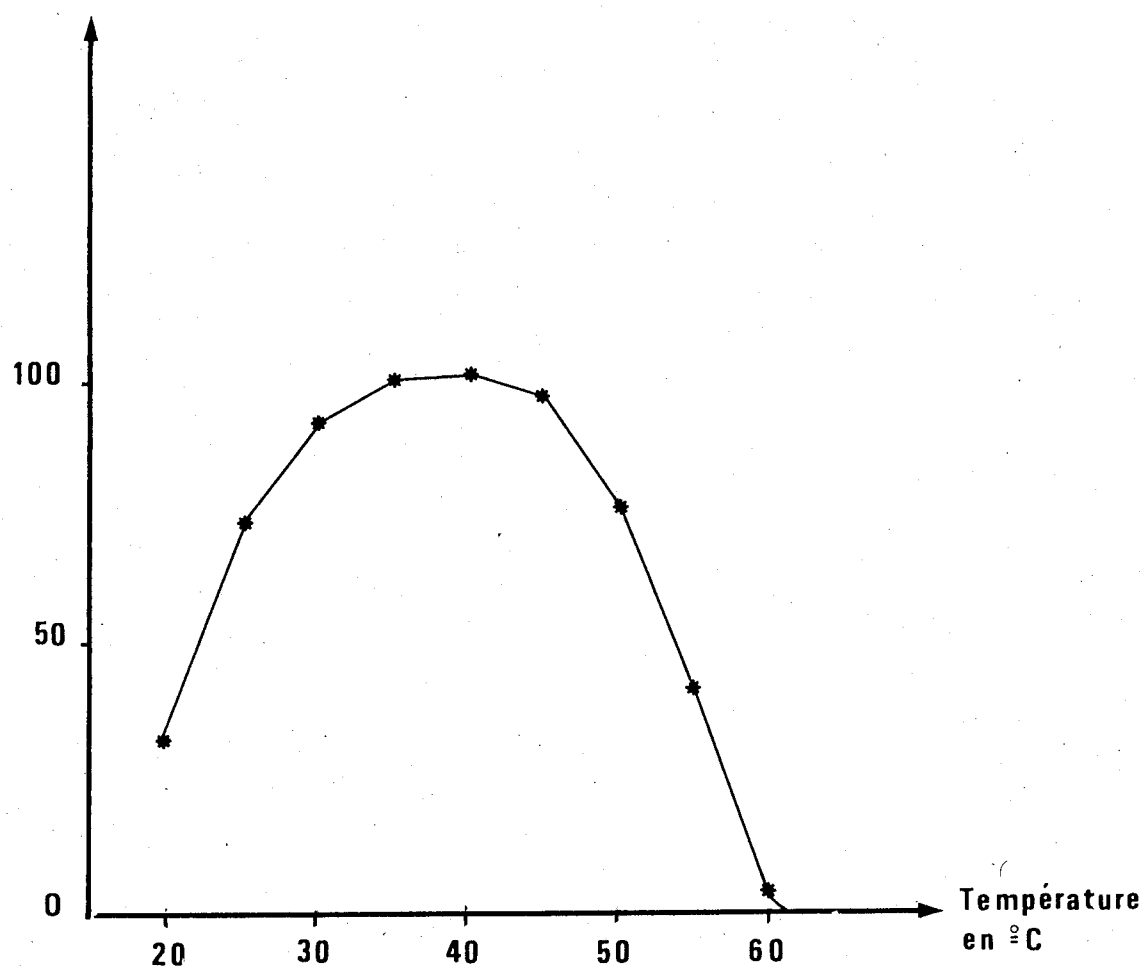


Figure 15 Activité de l' Enzyme X en fonction de la température par méthode viscosimétrique

cours de la purification seront donc pratiqués à la température de 40°C et au pH du moût de culture en fin de fermentation qui se situe dans la zone de pH d'activité optimale (6,5 à 7).

La limite inférieure de détermination de l'enzyme dans ces conditions est de 100 unités d'enzyme mises en jeu.

Etant donné la complexité du milieu de dosage, la baisse de viscosité due aux autres enzymes présentes dans le milieu, les phénomènes annexes de coagulation des protéines qui peuvent se produire à haute température, la variation de la viscosité du moût en fonction du pH et de la température du dosage, la sensibilité relativement faible du dosage, ces courbes ne peuvent qu'approcher les valeurs de pH et de température maximales, et ne sont utilisables que pour déterminer des zones de valeur dans lesquelles l'enzyme est proche du maximum d'activité. Néanmoins, ces valeurs permettent de standardiser la méthode de dosage.

Nous ferons plus loin une détermination plus précise de ces valeurs par méthode colorimétrique sur l'enzyme purifiée.

II - Purification de l'"Enzyme X"

A - Préparation industrielle de l'"Enzyme X"

La nécessité de disposer d'"Enzyme X" pour faire chûter la viscosité des préparations d' α Amylase a amené la Société RAPIDASE à préparer l'enzyme sous une forme stable.

C'est ce produit qui nous a servi de point de départ pour la purification de l'enzyme. Le schéma de la préparation est décrit p.45.

Les moûts de fermentation de Bacillus subtilis destinés à la production industrielle de l'"Enzyme X" sont prélevés toutes les trente minutes, afin de déterminer la force de l'enzyme.

En effet, le phénomène d'apparition de l'"Enzyme X"

étant fugace, il faut déterminer le moment où la force est maximale pour obtenir le meilleur rendement possible.

Le maximum de force enzymatique est atteint lorsque celle-ci n'augmente plus. Le moût de culture est alors traité par un agent flocculant industriel (Tetrofloc 63), afin de piéger les bactéries, puis filtré sur filtres presse garnis de filtres carton C5. Le liquide obtenu, d'aspect brillant, est alors atomisé pour sa conservation, car nous verrons ultérieurement que les préparations d'enzyme non purifiées ne sont pas stables en milieu liquide.

L'atomisation de la préparation d'enzyme donne une poudre brune titrant de 5 000 à 20 000 unités, pour un rendement de l'ordre de 80p100.

Le produit atomisé, gardé à + 4°C, est stable pendant plus d'un an s'il est gardé à l'abri de l'humidité.

B - Stabilisation de l'Enzyme X" par inhibition des protéases

La conservation en milieu liquide de l'Enzyme X" entraîne des pertes d'activité au cours du temps (fig. (16)).

Cette perte d'activité, assez rapide à température ambiante, est essentiellement due à la présence de protéases neutres et alcalines secrétées par Bacillus subtilis (DELECOURT (22)).

La protéase neutre est une métalloprotéine à zinc.

L'acide éthylène diamine tétracétique permet de complexer le zinc et inhibe ainsi réversiblement l'enzyme (Mc CONN et al (60)).

Les doses employées sont de 10^{-5} M par litre.

La protéase alcaline, peu active au pH 6,7 employé lors de la purification de l'enzyme, est inhibée irréversiblement par le Phénylméthylsulfonylfluorure (PMSF), à la dose de 10^{-4} M par litre (62).

C - Précipitation par l'acétone

La précipitation de 100 g de solution de la préparation d'enzyme atomisée par un volume d'acétone à froid donne

FORCE en U/ml

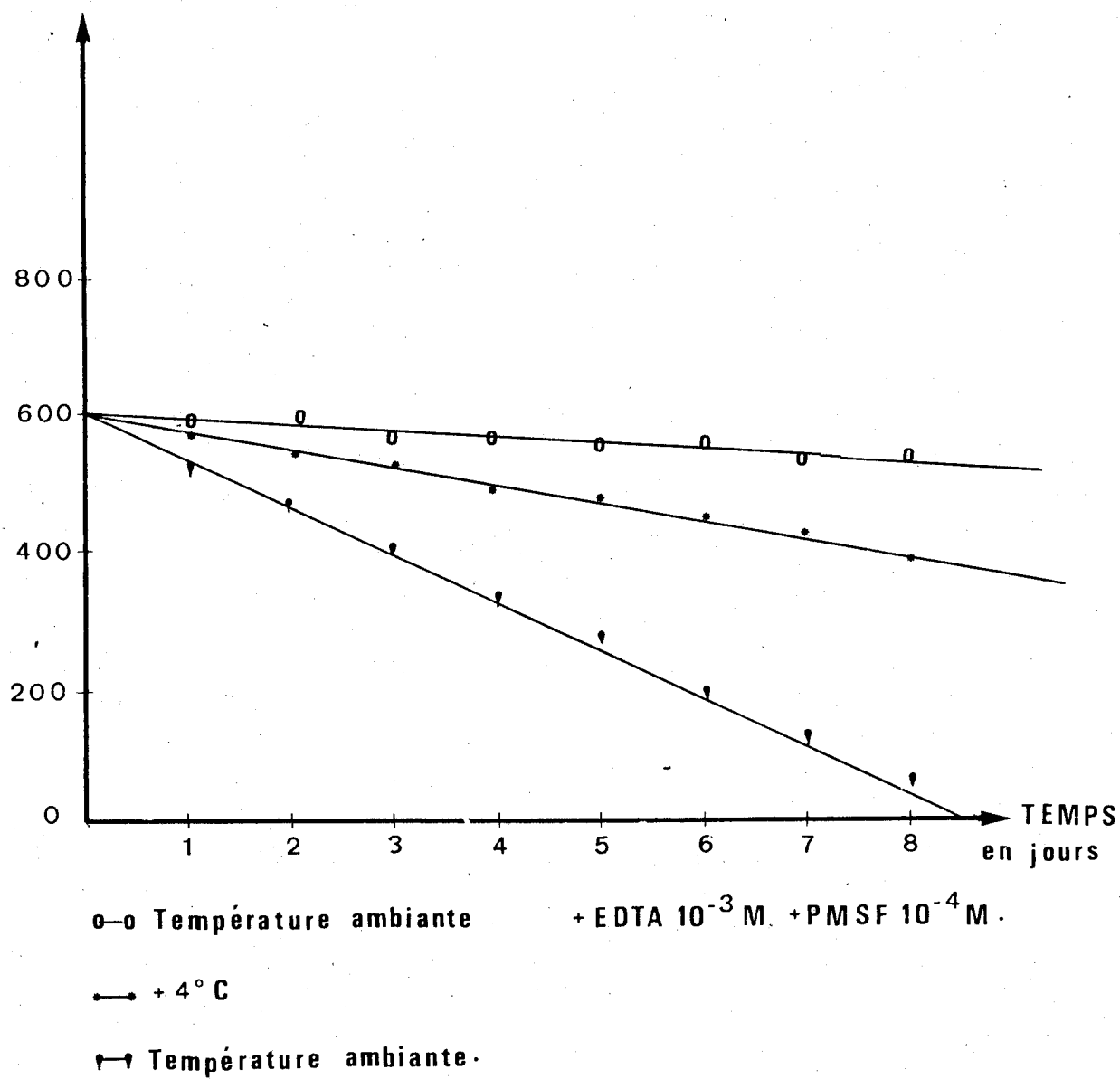


Figure 16 Diminution de l'activité d'une solution d'Enzyme X non purifiée en fonction du temps



après lyophilisation un poids sec de 20,2 g. Les protéines dosées par la méthode de LOWRY représentent 1,5 g.

Plus de 90p100 de l'activité de départ est retrouvée pour une activité spécifique multipliée par 6.

Cette étape apporte une purification appréciable compte tenu de son rendement.

D - Précipitation par le sulfate d'ammonium

Le précipité acétonique redissous dans une solution EDTA 10^{-3} M est amené à 60p100 de saturation en sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu est recueilli par centrifugation, redissous et dialysé contre la solution d'EDTA 10^{-3} M.

Après élimination de l'insoluble par centrifugation, le surnageant est complété à 100 ml et contient 5,2 mg de protéines pour une activité spécifique de 1 310 u/mg.

Au terme de cette deuxième étape, la purification est de 11,8 par rapport à la préparation d'enzyme atomisée, pour un rendement de 62p100.

La lyophilisation détruit une grande partie de l'activité, aussi la solution est aussitôt appliquée sur une colonne de DEAE cellulose.

E - Fractionnement par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de DEAE cellulose

La solution obtenue par précipitation au sulfate d'ammonium est appliquée sur une colonne de DEAE cellulose éluée par un gradient discontinu de tampon phosphate pH 6,7 10 mM, 70 mM, 120 mM.

L'enzyme éluée est repérée par viscosimétrie.

L'ensemble des fractions actives réunies a une activité spécifique de 45 300 u/mg de protéines, ce qui correspond à une purification de 409,5 par rapport à la préparation d'enzyme industrielle.

La solution enzymatique est répartie en aliquotes

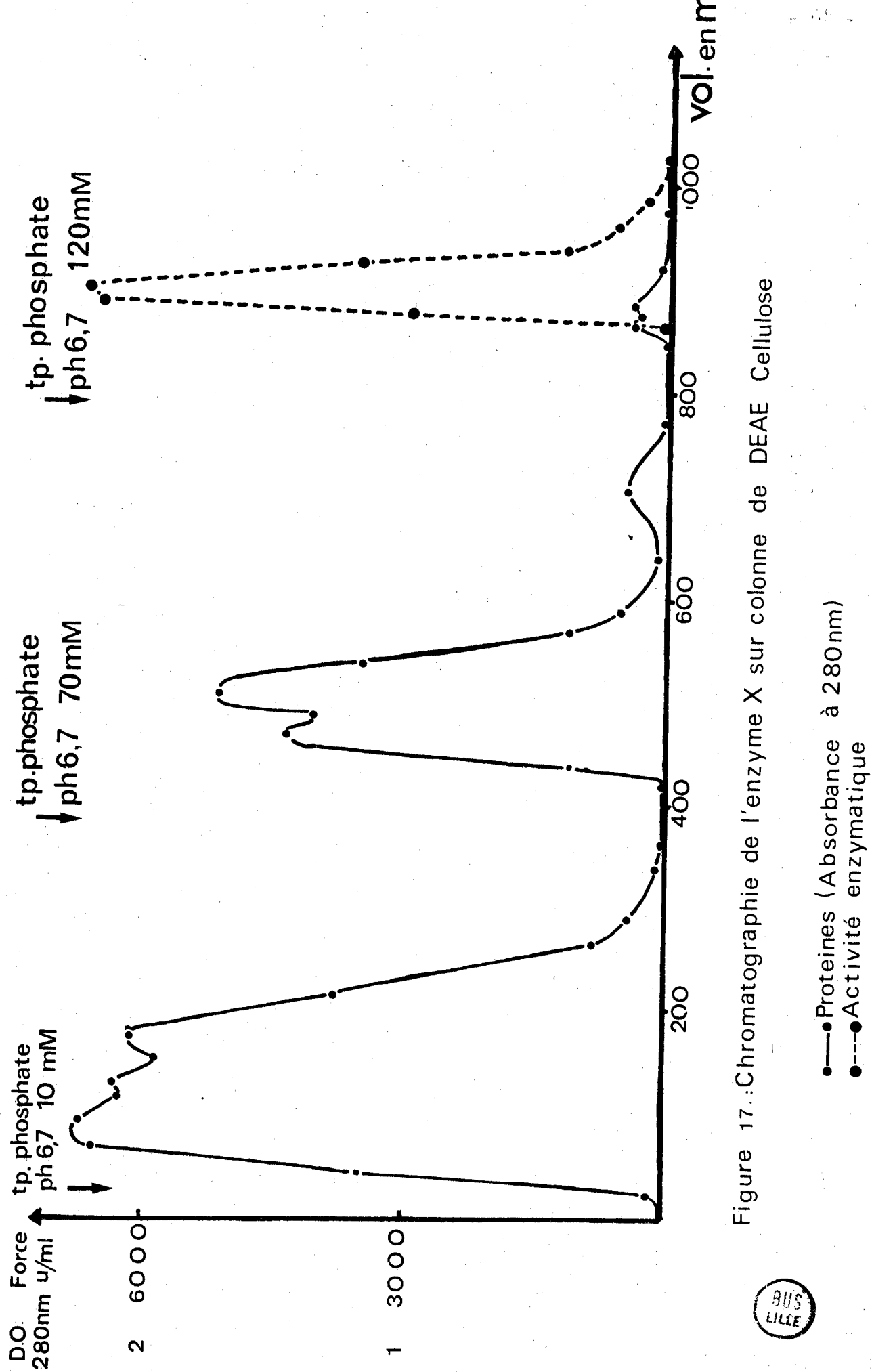


Figure 17 : Chromatographie de l'enzyme X sur colonne de DEAE Cellulose

Tableau V : Purification de l'enzyme X

	Volume en ml	Protéine en mg ml	Activité en U ml	Activité Spécifique en U _{mg}	Activité Totale	Rendement en p100	Purification en p100
Enzyme Atomisée	500	19,950	2208	110,6	1.104.000	100	1
Précipité Acétone	100	15,322	10.168	663,6	1.016.800	92,1	6
Précipité Sulfate d' Ammonium	100	5,225	6845	1310	684.500	62	11,8
DEAE Cellulose	140 -	0,078	3548	45300	4 96.800	45	409,5



de 2 ml et congelée.

Cette solution est stable pendant au moins 6 mois.

La lyophilisation détruit l'activité.

F - Conclusion

La purification de l'enzyme permet d'obtenir une solution limpide, stable sous forme congelée, d'activité spécifique élevée pour un rendement appréciable.

Cette préparation, quoique contenant encore des impuretés, va nous permettre d'étudier quelques propriétés enzymatiques et physicochimiques de l'Enzyme X!

Une purification plus poussée est possible par tamisage moléculaire, cependant les faibles taux d'activité obtenus et l'instabilité de l'enzyme à la concentration nous ont fait choisir ce stade de purification pour les études ultérieures.

III - Préparation et étude de la fraction visqueuse des moûts de fermentation

Afin de travailler sur un produit standardisé, nous avons, en collaboration avec la Société RAPIDASE, préparé une grande quantité d'une fraction enrichie en constituant visqueux afin de le purifier.

Ce produit, extrait à partir du moût de fermentation 895, a reçu le nom de mucus M 895.

SAMOR B. s'est plus particulièrement occupé de l'étude de sa composition, et nous rapporterons ici les principaux résultats qu'il a obtenus. (80).

A - Composition centésimale du mucus M 895

Le mucus M 895, dont la préparation est décrite p. 49, dans le chapitre "Matériel et méthodes", est très riche en sucres.

Tableau VI : Composition centésimale du mucus M895.

	Mucus 895
Monosaccharides Neutres	24,3
N-acétyl osamines	20,4
Acides Uroniques	4,5
Phosphore	8,9
Protéines	30,6

Résultats exprimés en p.100 du poids sec.



Comme le montre le tableau p. 71, ceux-ci constituent 50p100 de sa composition totale et sont des monosaccharides neutres et des N-acétylosamines pour l'essentiel, et des acides uroniques.

Le mucus est riche en glycérol phosphate provenant, comme nous le verrons ultérieurement, des acides téichoïques.

Enfin, le mucus contient environ un tiers de protéines dans sa composition.

B - Purification du mucus M 895 par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Dowex 1x2

Le mucus M 895 est dissous dans l'eau et chromatographié sur une colonne de Dowex 1x2 200-400 mesh. La colonne est éluée par l'eau, puis par un gradient continu d'acide chlorhydrique de 0 à 1 N.

Nous obtenons ainsi 5 fractions (figure (18)), dont les compositions centésimales sont reportées dans le tableau n°VIII p.75.

- La fraction F_I est riche en saccharides neutres et en protéines.
- La fraction F_{II} est constituée essentiellement par des protéines.
- La fraction F_{III} contient des sucres et des protéines.
- La fraction F_{IV} polysaccharidique est la fraction la plus visqueuse. Elle contient plus de 50p100 de N-acétylosamines.
- La fraction F_V riche en phosphore macromoléculaire. Il s'agit ici, comme l'ont montré BETHENCOURT et PLOUVIER (10), d'acides téichoïques à glycérol.

Nous étudierons plus particulièrement la fraction F_{IV} riche en osamines et qui est la plus visqueuse. Cette fraction est rechromatographiée sur colonne de Dowex 1x2 pour éliminer au maximum les contaminants des fractions F_{III} et F_V .

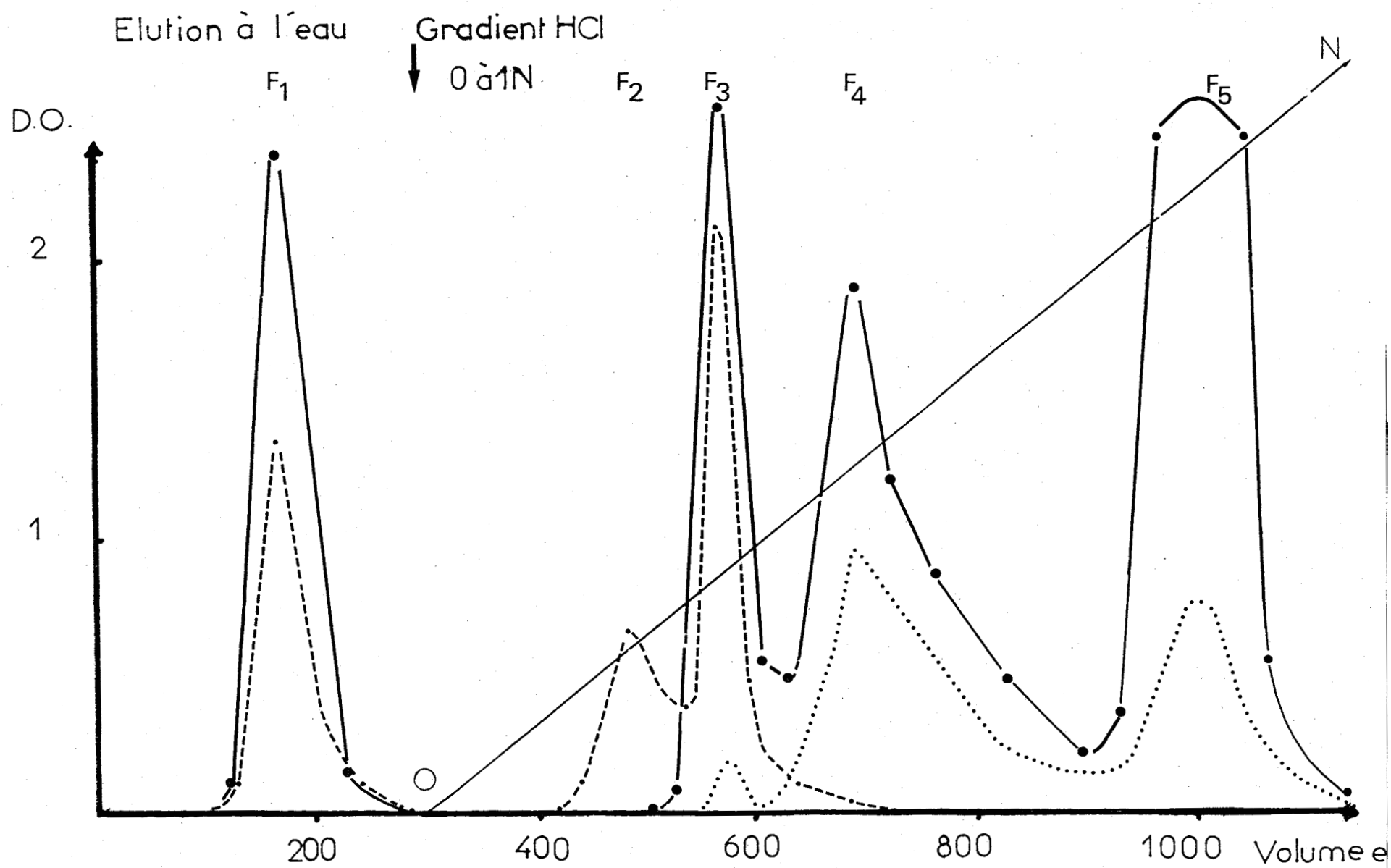


Figure 18 : Chromatographie du mucus M895 sur colonne de DOWEX 1x2

- Osés totaux (phénol sulfurique)
- Protéines (absorbance à 280nm)
- Osamines (Elson-Morgan)

Tableau VII : Composition centésimale des fractions du mucus 895

	F _I	F _{II}	F _{III}	F _{IV}	F _V
Monosaccharides Neutres	74	0,8	47,8	23,4	32,8
Acides Uroniques	0,2	0	4,4	3,5	11,4
N-acétyl hexosamines	2,9	0,18	6,4	51,5	11,8
Phosphore	0	0	0,2	1,5	16,75 29,4 *
Protéines	18,5	97,2	39	2,2	0

* Taux de glycérol-phosphate



Tableau VIII : Etude comparative de la composition centésimale des Fractions F_I à F_V

	F_I	F_{II}	F_{III}	F_{IV}	F_V
Glucides	77,1	0,8	58,6	78,4	5,6
Protéines	18,5	97,2	39	2,2	0
Glycérol- Phosphate	0	0	0,2	1,5	29,4
Total	95,6	98	97,8	82,1	85,4
Indosé	4,4	2	2,2	17,9	14,6

Tableau IX : Viscosité intrinsèque du mucus 895 et de ses fractions

	Mucus	F_I	F_{II}	F_{III}	F_{IV}	F_V
$[\eta]$ ml/g	258,5	18,8	19,6	28,1	323	12,8

C - Etude de la fraction F_{IV} rechromatographiée

La fraction F_{IV} rechromatographiée est dialysée contre de l'eau distillée et lyophilisée. Un extrait sec est réalisé sur le lyophilisant, afin d'en étudier la composition centésimale et la nature des constituants.

1- Composition de la fraction F_{IV}

a) Oses neutres

Les oses neutres sont dosés par la méthode à l'orcinol (65) et constituent 23,4p100 de la fraction F_{IV}.

La chromatographie sur papier après hydrolyse chlorhydrique selon la méthode décrite p. 52 permet de mettre en évidence du galactose et du mannose.

Le rapport molaire déterminé par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et péracétylation est de 5 molécules de galactose pour 1 de mannose.

b) Acides uroniques

La difficulté de couper quotidiennement les liaisons des acides uroniques par hydrolyse acide gênait leur dosage.

La réduction par le borane méthyl-sulfide permet de transformer l'acide uronique en son sucre neutre correspondant qui est ensuite dosé par chromatographie en phase gazeuse.

La fraction F_{IV} contient 3,5p100 d'acide glucuronique.

c) Osamines

Le dosage colorimétrique par la méthode d'Elson-Morgan des N-acétyl-osamines sur la fraction F_{IV} donne un taux de 51,5p100.

La chromatographie sur papier après hydrolyse chlorhydrique permet de mettre en évidence la glucosamine et la galactosamine.

La chromatographie en phase gazeuse nous donne un rapport molaire N-acetyl galactosamine N-acetyl glucosamine de 3 : 2.

Tableau X Composition centésimale de la fraction F_{IV} repurifiée

	F_{IV} repurifiée	F_{IV}
Monosaccharides neutres	24	23,4
N-acetyl hexosamines	51,5	51,5
Acides uroniques	3,5	3,5
Glycérol phosphate	0,92	1,5
Protéines	1,2	2,2
Total	81,1	82,1
indosé	18,9	17,9

Tableau XI Composition molaire glucidique de la fraction F_{IV} repurifiée

Composition molaire en	
Gal	5
Man	1
GalNA _c	3
GlcNA _c	2



Un sucre diaminé a été mis en évidence par spectrographie de masse par SAMOR : il s'agit du 2 amino 4 acétamido 2, 4, 6 tridéoxyglucose (Bacillosamine).

La présence d'osamine non N-acétylée a été montrée par rupture, par désamination nitreuse.

2- Masse moléculaire

La masse moléculaire de la fraction F_{IV} a été déterminée à l'équilibre de sédimentation, et est de 1 050 000 daltons $\pm$ 50 000.

3- Viscosité intrinsèque

La viscosité intrinsèque de la fraction F_{IV} déterminée par extrapolation à concentration nulle est de 323 ml/g.

IV - Etude de quelques propriétés enzymatiques de l'Enzyme X"

A - Nature des composés coupés par l'Enzyme X"

La propriété essentielle de l'Enzyme X" est de diminuer la viscosité des moûts de fermentation visqueux de Bacillus subtilis. Aussi, nous avons étudié l'action de l'enzyme après purification, pour éviter les réactions secondaires dues aux autres enzymes présentes, sur les différentes fractions obtenues par purification de l'extrait visqueux ultrafiltré par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Dowex 1x2.

Une diminution significative de la viscosité a été obtenue sur la fraction F_{IV} .

La viscosité intrinsèque de 323 ml/g passe, après hydrolyse d'une nuit à 37°C, à 95,12 ml/g. Aucune diminution significative de la viscosité n'a été observée sur les autres fractions.

L'analyse chimique de la fraction F_{IV} réalisée

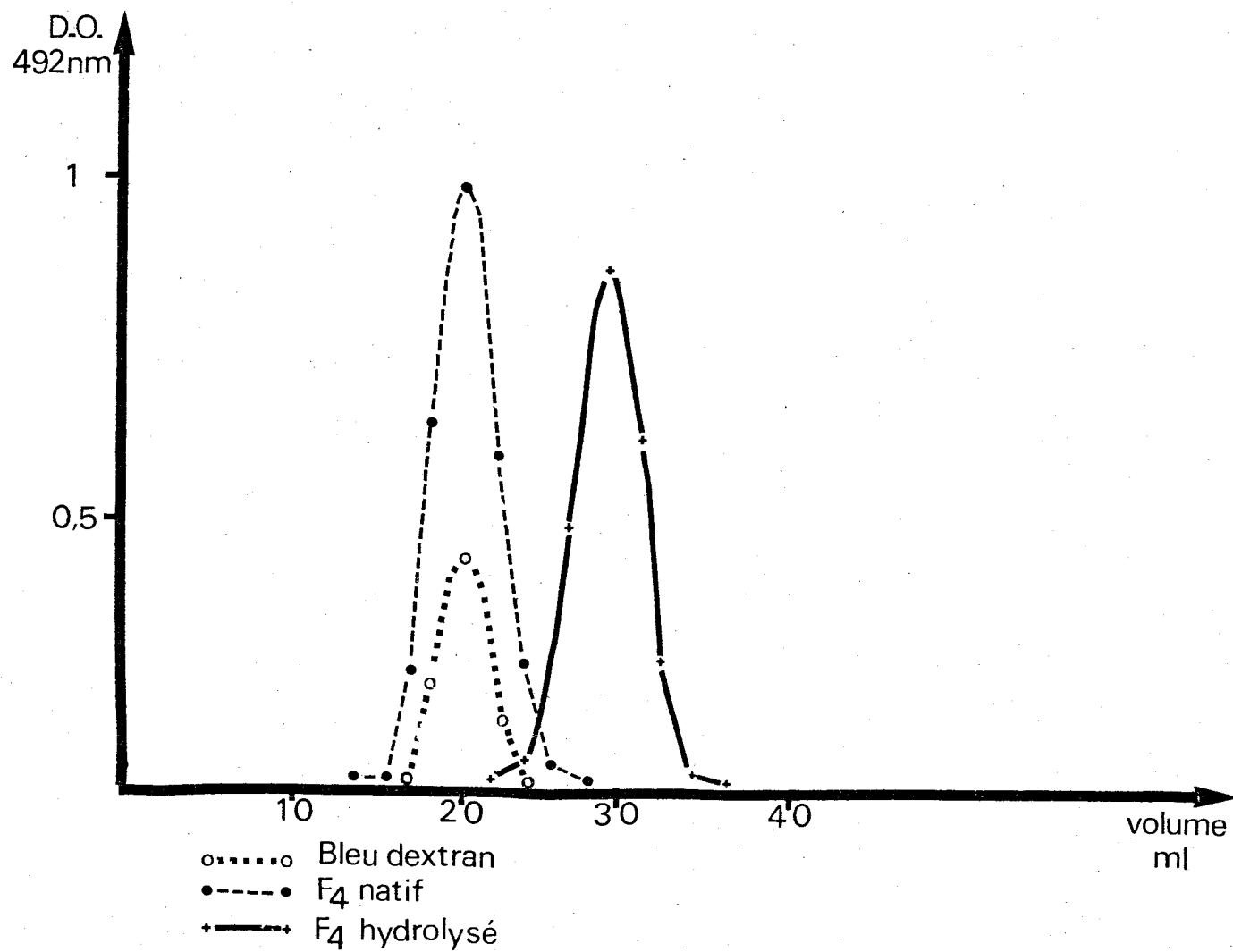


Figure 19: chromatographie sur Biogel P150 de l'hydrolysate enzymatique de la fraction 4

en collaboration avec SAMOR, nous a permis de montrer sa nature polysaccharidique (tableau X). L'Enzyme X' serait donc une osidase.

Nous nous sommes ensuite attachés à déterminer si l'Enzyme X" coupait à l'intérieur de la chaîne polysaccharidique ou à l'extérieur par récurrence.

B - Etude des produits de dégradation de la fraction F_{IV} par l'Enzyme X"

La rapidité de la diminution de la viscosité de la fraction F_{IV} par l'action de l'Enzyme X" était en faveur d'une endoenzyme.

Nous avons donc tenté de déterminer la taille des produits de dégradation de la fraction F_{IV} par l'Enzyme X"

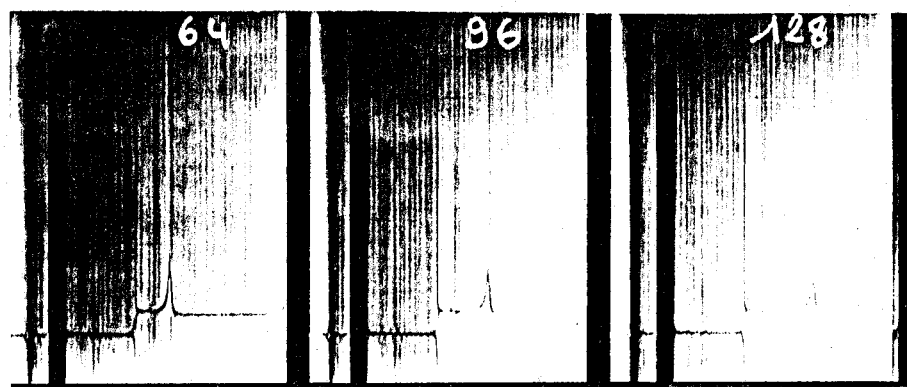
1- Chromatographie sur papier des produits de dégradation enzymatique de la fraction F_{IV}

La fraction F_{IV} est de nature polysaccharidique, si l'Enzyme X" est une exoenzyme ou si les produits de dégradation sont de faibles masses moléculaires, il est possible de les mettre en évidence par chromatographie sur papier. La fraction F_{IV} rechromatographiée est incubée une nuit à 37°C avec l'Enzyme X" purifiée. L'hydrolysate enzymatique est chromatographié sur papier Whatman 3 dans le système solvant pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5/5/1/3) selon la méthode décrite p.52.

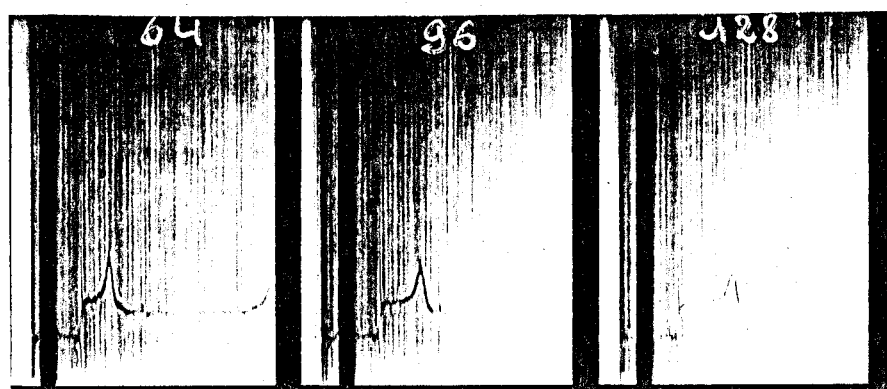
Les chromatogrammes sont révélés à l'oxalate d'aniline et à la ninhydrine pour les sucres aminés. La coloration montre que l'hydrolysate enzymatique n'a pas migré, ceci est en faveur de produits de dégradation de masse moléculaire élevée.

2- Chromatographie de gel filtration sur colonne de Biogel P 150

4 mg de la fraction F_{IV} hydrolysée par l'Enzyme X" sont chromatographiés sur colonne de gel filtration de Biogel P 150.



I - fraction F_{IV} native



II - fraction F_{IV} dépolymérisée

Figure 20 : Diagrammes des fractions F_{IV} native et F_{IV} dépolymérisée obtenus par ultracentrifugation analytique

Tableau XII Propriétés physiques des fractions F_{IV} native
et F_{IV} dépolymérisée

	F_{IV} Native	F_{IV} Dépolymérisée
Masse moléculaire	1050 000	19 500
$[\eta]$ en ml/g	323	93,12

4 mg de la fraction F_{IV} sont utilisés comme marqueur pour reproduire les mêmes conditions de viscosité. La colonne est étalonnée par des protéines standards, le void volume est déterminé par du bleu dextran 2 000 de masse moléculaire 2 000 000.

Les différentes fractions sont repérées par la micro-méthode au phénol sulfurique (65).

Les produits de dégradation, comme le montre la figure sont retardés par rapport à la fraction F_{IV} native et ont une masse moléculaire moyenne d'environ 20 000 daltons. La chromatographie de la même quantité d'enzyme servant à hydrolyser le polysaccharide ne donne pas de pic par révélation au phénol sulfurique.

3- Ultracentrifugation analytique

L'ultracentrifugation analytique des produits de dégradation enzymatique de la fraction F_{IV} selon la méthode décrite p.57 permet de déterminer une masse moléculaire de $19\,500 \pm 5p100$ daltons. Ce résultat est donc en accord avec la masse moléculaire déterminée par chromatographie de tamisage moléculaire.

4- Conclusion

La chromatographie des produits de dégradation de la fraction F_{IV} par l'"Enzyme X" permet d'isoler des fragments d'environ 20 000 daltons de masse moléculaire. Aucune micromolécule n'a pu être mise en évidence, l'"Enzyme X" serait donc une endoenzyme.

C - Mise en évidence des nouveaux groupements réducteurs apparus par le réactif d'ERLICH en milieu basique

1- Etude de la viscosité en fonction des nouveaux groupements réducteurs apparus

La méthode de REISSIG, STOMINGER et LELOIR (75), modifiée par LEVY et Mc ALLAN (54) permet, par l'emploi du réactif d'ERLICH au paradiméthylaminobenzaldehyde, de mettre en évidence les N-acétylosamines en position terminale réductrice. La méthode appliquée sur la fraction visqueuse purifiée avant et après l'action de l'"Enzyme X" montre une augmentation des groupements N-acétyl-

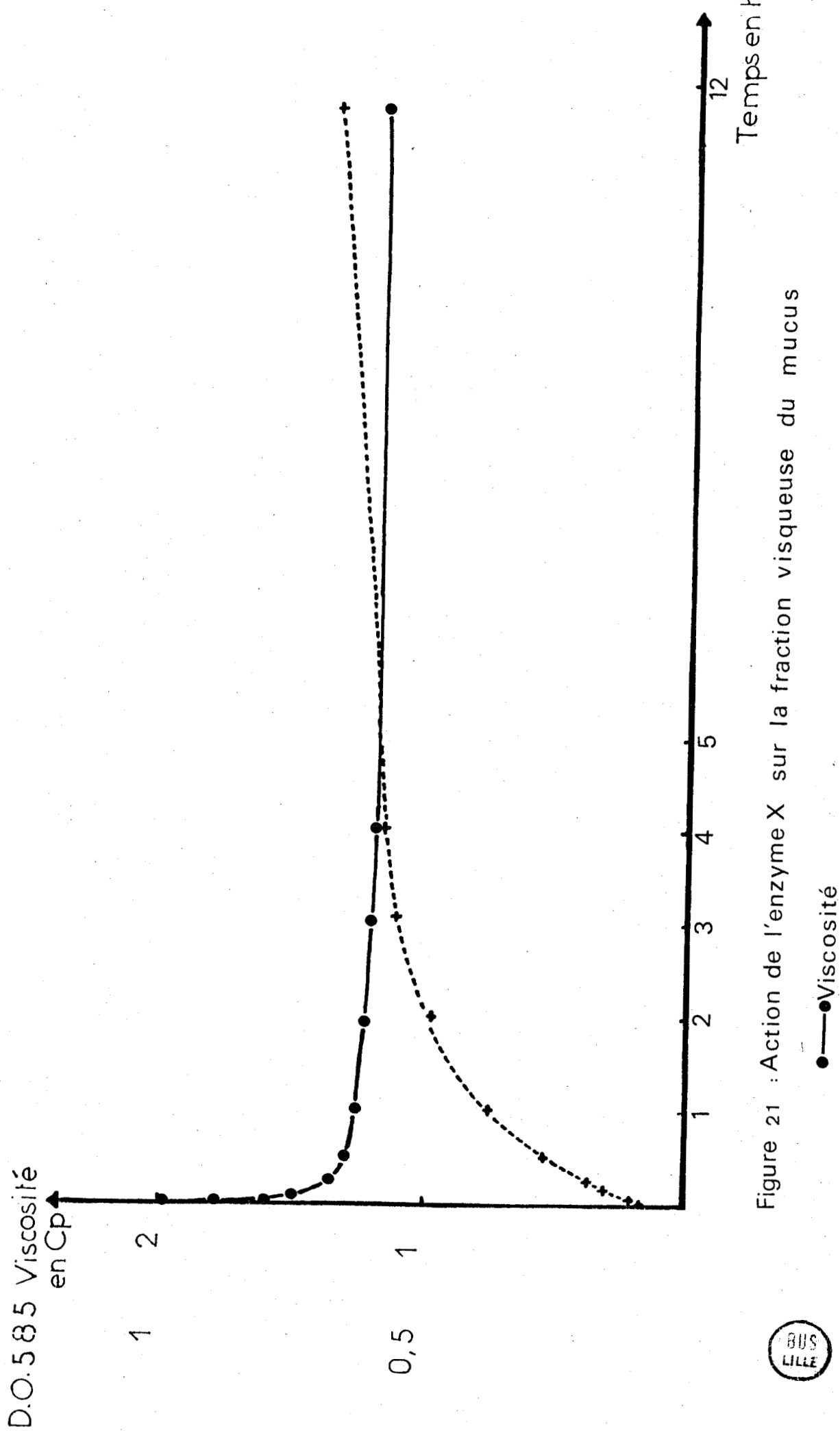


Figure 21 : Action de l'enzyme X sur la fraction visqueuse du mucus

-hexosamines en position terminale réductrice après l'action de l'enzyme. L'étude de la viscosité en fonction de l'augmentation des groupements apparus montre que la viscosité diminue très rapidement au début (figure 21), pour atteindre un palier où elle reste constante. Le pouvoir réducteur atteint un palier beaucoup plus tard, ce qui s'explique par le fait que la viscosité est une fonction exponentielle de la longueur des chaînes. L'"Enzyme X" est donc une endo-N-acétyl-hexosaminidase.

2- Etude de l'apparition des nouveaux groupements réducteurs apparus sous l'action de l'"Enzyme X" en fonction du pH et de la température

La méthode de dosage des nouveaux groupements réducteurs apparus nous a permis de déterminer plus précisément l'activité de l'"Enzyme X" sur la fraction visqueuse purifiée en fonction du pH et de la température.

a) Action de l'"Enzyme X" en fonction du pH

Les résultats relatés sur la figure 22 montrent que l'enzyme est active entre pH 4,5 et pH 8. Le maximum de l'activité étant obtenu pour des valeurs de pH comprises entre 6 et 6,5.

b) Action de l'"Enzyme X" en fonction de la température

Comme nous le voyons sur la figure 23, l'"Enzyme X" est inactivée par la chaleur et perd son activité au-delà de 60°C. Le maximum d'activité est obtenu pour des valeurs comprises entre 35°C et 40°C.

Conclusion

La détermination de l'action de l'"Enzyme X" par le dosage des nouveaux groupements réducteurs apparus après son action sur la fraction F_{IV} visqueuse, permet de préciser les conditions de pH et de température dans lesquelles l'enzyme présente un maximum d'activité.: pH 6 à 6,5, température de 35 à 40°C.

Cette méthode est plus précise que la méthode viscosimétrique et offre l'avantage d'être plus spécifique à l'"Enzyme X".

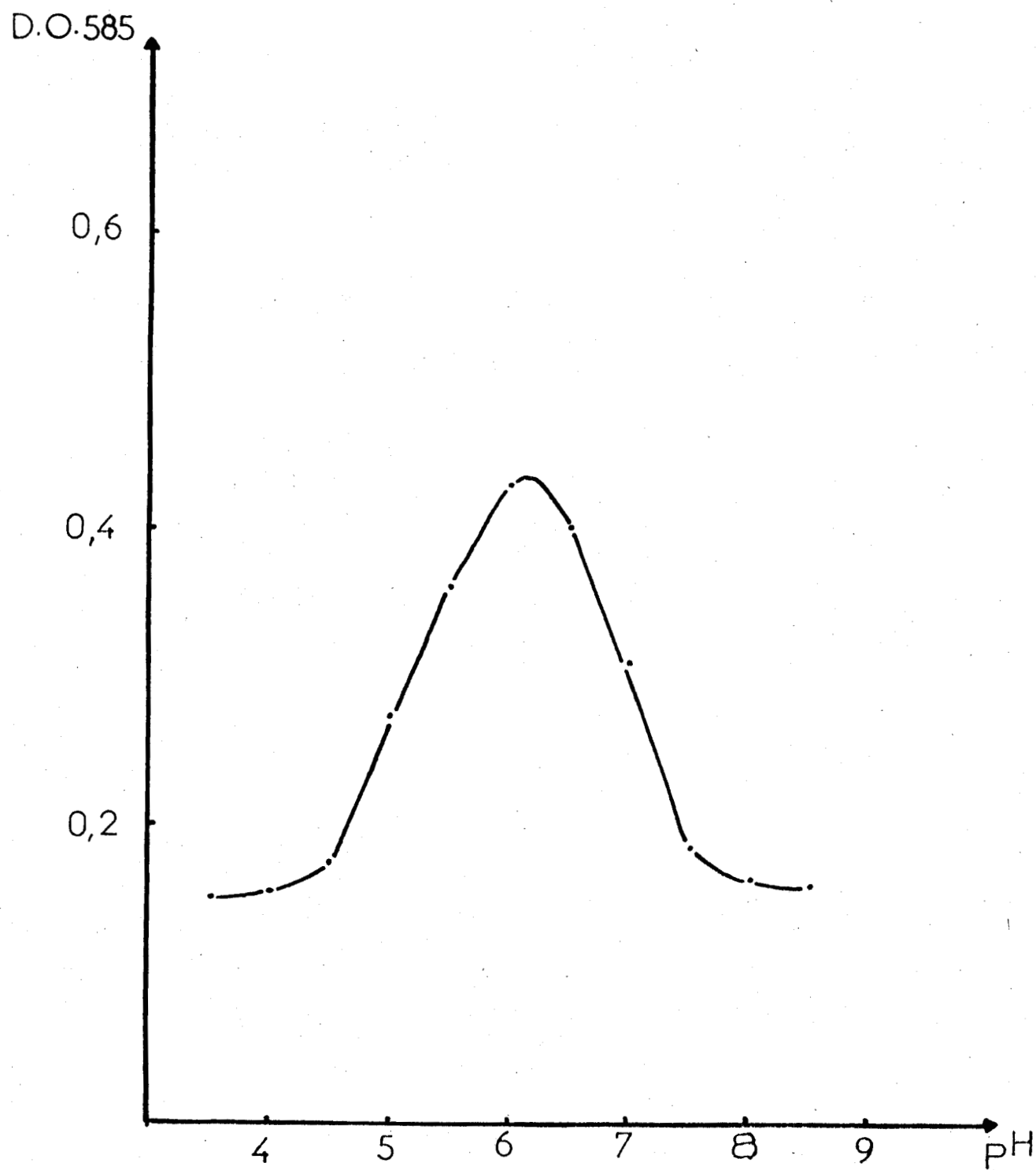


Figure 22 : Activité de l'enzyme X en fonction du pH



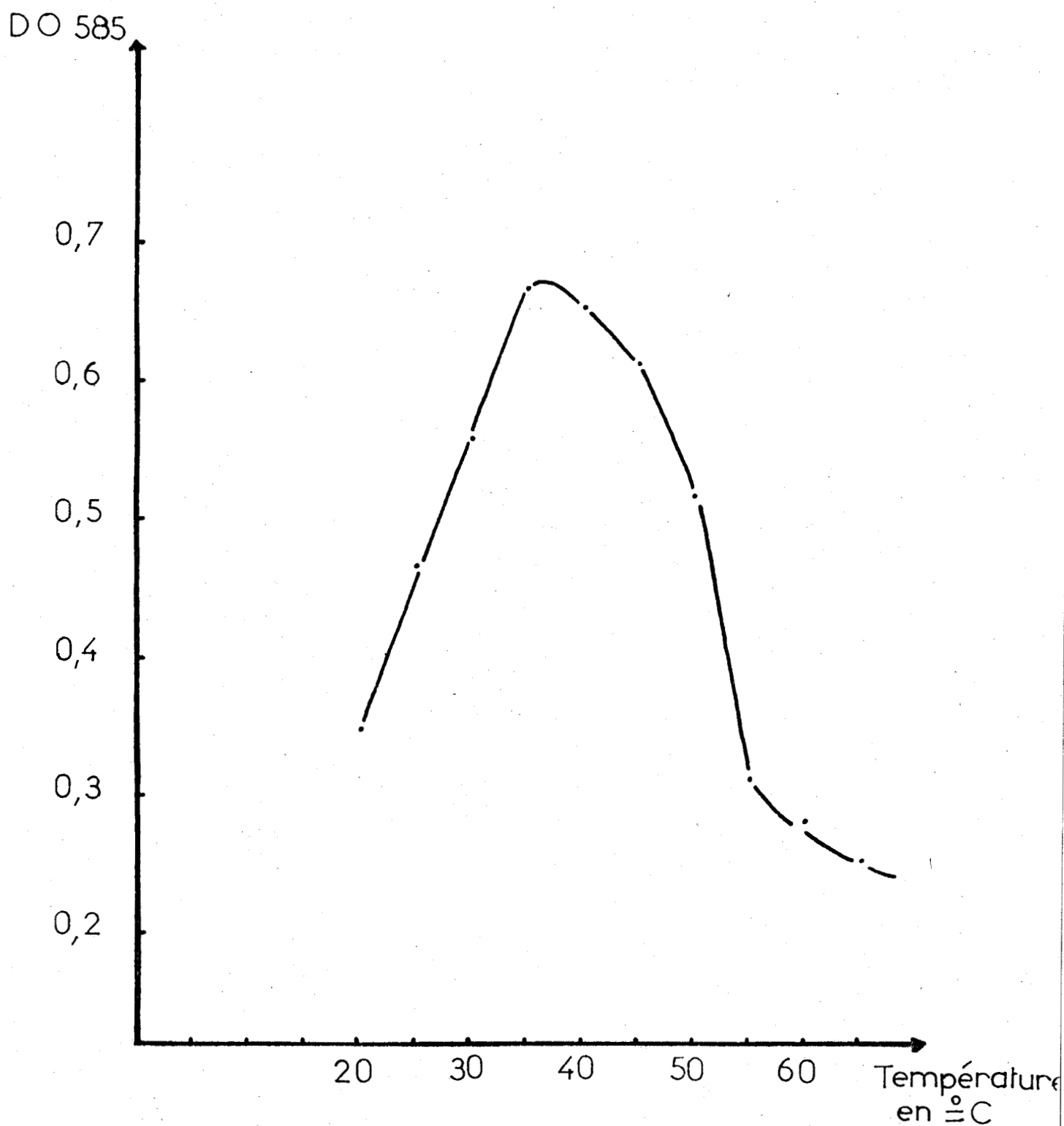


Figure 23 : Activité de l'enzyme X en fonction de la température

Néanmoins, elle ne peut être appliquée que sur des produits déjà purifiés. En effet, la présence de N-acétylosamines libres et d'exo-N-acétylosaminidases peut interférer dans le dosage.

En ce qui nous concerne, dans nos préparations d'enzyme purifiée, nous n'avons mis en évidence aucune activité exosaminidase par l'emploi de substrats synthétiques, tels que les dérivés orthonitrophénylés des osamines.

La détermination de la masse moléculaire des produits de dégradation de la fraction F_{IV} par l'"Enzyme X" purifiée nous permet d'affirmer qu'il s'agit d'une exoenzyme, active sur un hétéropolysaccharide : l'"Enzyme X" est donc une endoosidase.

L'étude des nouveaux groupements réducteurs apparus montre que l'"Enzyme X" coupe au niveau des sucres aminés N-acétylés.

Trois osamines N-acétylées ont été mises en évidence dans la fraction F_{IV} .

Il s'agit de :

- la galactosamine,
- la glucosamine, et
- du 2 amino 4 acétamido 2, 4, 6 tridéoxyglucose.

L'"Enzyme X" est donc une N-acétylhexosaminidase.

Le petit nombre de coupures (20 environ) de la chaîne polysaccharidique par action de l'"Enzyme X" laisse penser que celle-ci a une spécificité très étroite. Ceci peut s'expliquer par la nécessité pour l'enzyme de reconnaître une séquence particulière dans la chaîne, ou par la coupure au niveau d'un sucre particulier comme la bacillosamine, qui n'entre que pour 2 à 3 p100 dans la composition du polysaccharide responsable de la viscosité.

C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S

L'augmentation de la viscosité des moûts de fermentation de Bacillus subtilis pour la préparation d' α -amylase, que la Société RAPIDASE de Seclin fabrique industriellement, gêne l'étape de filtration nécessaire à la préparation de l'enzyme.

L'apparition de cette viscosité posait deux problèmes :

1°) La purification et l'isolement de la substance responsable de la viscosité, afin d'en étudier la composition chimique et tenter de déterminer la cause de son apparition et son origine.

2°) La purification de l'"Enzyme X", capable de diminuer la viscosité, afin de déterminer sa spécificité.

Ces deux problèmes étant liés, nous les avons traités simultanément, en collaboration avec SAMOR.

Les conclusions que nous pouvons tirer de nos travaux sont les suivantes :

1°) La mise au point d'un procédé de préparation d'un extrait enrichi en substance visqueuse, en collaboration avec la Société RAPIDASE, nous a permis, par Ultrafiltration sur membrane AMICON 50 000, de préparer un "mucus" d'une viscosité intrinsèque élevée, à partir du milieu de fermentation brute.

Cet extrait contient la substance responsable de la viscosité, et est sensible à l'action de l'"Enzyme X".

Cette préparation peut servir industriellement au dosage de l'activité de l'"Enzyme X" au cours de la fermentation.

La composition centésimale de ce "mucus" montre qu'il s'agit d'une substance de nature protéidique et glucidique, riche en N-acétylhexosamines, en acides uroniques et en phosphore. La nature hétérogène de ce produit nous a poussé à conduire plus loin sa purification.

2°) Le fractionnement de ce "mucus" par chromatographie sur échangeur d'anions type DOWEX 1 x 2, à l'aide d'un gradient d'acide chlorhydrique de 0 à 1 N, nous donne cinq fractions :

La fraction F_I, de nature glycoprotidique

La fraction F_{II}, de nature protéidique

La fraction F_{III}, de nature glycoprotidique

La fraction F_{IV}, polysaccharidique

La fraction F_V, polysaccharidique, riche en glycérophosphates, qui renferme les acides téichoïques.

3°) L'étude de la viscosité des différentes fractions montre que la fraction F_{IV} possède la viscosité intrinsèque la plus élevée ($[\eta] = 323 \text{ ml/g}$).

4°) L'analyse chimique de cette fraction repurifiée sur colonne de DOWEX 1 x 2 montre qu'il s'agit d'un polysaccharide, constitué de 24p100 d'oses neutres, de 51,5p100 de N-acétylhexosamines et de 3,5p100 d'acides uroniques.

Il persiste un indosé de 19p100.

Les monosaccharides neutres ont été identifiés au galactose et au mannose, l'acide uronique est de l'acide glucuronique. Les osamines sont :-la N-acétylgalactosamine

-la N-acétylglucosamine, et

-la 2, 4 diacétamido -2, 4, 6- tridéoxyglucose (bacillosamine).

5°) L'étude du polysaccharide nous a permis de déterminer sa masse moléculaire par Ultracentrifugation : 1 050 000 ± 50 000 daltons, pour une viscosité intrinsèque de 323 ml/g.

6°) La présence d'acides téichoïques dans l'extrait visqueux et de la bacillosamine dans le polysaccharide, ainsi que l'apparition de la viscosité lorsque la culture bactérienne approche de la phase de lyse, sont en faveur d'une origine pariétale de la substance responsable de la viscosité.

7°) La purification de l'"Enzyme X" à partir des moûts de fermentation de Bacillus subtilis nous a permis d'obtenir une préparation de forte activité spécifique.

Cette enzyme a été stabilisée grâce à l'inhibition des protéases neutres et alcalines par l'EDTA et la PMSF, et purifiée 400 fois par précipitation à l'acétone et au sulfate d'ammonium, et par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de DEAE cellulose.

8°) L'action de l'"Enzyme X" sur la fraction F_{IV} et l'étude de la masse moléculaire des produits de dégradation nous ont permis de déterminer la nature endoglycosidatique de l'enzyme. En effet, aucune micromolécule n'a pu être mise en évidence.

La masse moléculaire moyenne des produits de dégradation, déterminée par Ultracentrifugation, est de 19 500 [±]5p100 daltons, pour une viscosité intrinsèque de 93 ml/g.

9°) L'étude des nouveaux groupements réducteurs de la fraction F_{IV} après action de l'enzyme nous a permis de montrer que l'enzyme était une endohexosaminidase.

10°) La nature polysaccharidique du composé responsable de la viscosité et de l'"Enzyme X" ont donc été déterminées, néanmoins la spécificité de l'enzyme reste à démontrer. Celle-ci est très étroite étant donné le faible nombre de coupures de la chaîne polysaccharidique.

La coupure pourrait se faire au niveau de la bacillosamine, qui ne représente que 2 à 3p100 du polysaccharide.

Ceci pourrait être démontré par réduction des sucres situés en position terminale réductrice après action de l'enzyme, et par analyse en chromatographie de phase gazeuse après hydrolyse.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ABRAHAM E.P., ROBINSON R., Nature, 1937, 140, 24 (p.27)
- 2 - ALLEN R.J.L., Biochem. J., 1940, 74, 858 (p.51, 52)
- 3 - ANDERSON A.T. et ARCHIBALD A.R., Biochem. J., 1975, 151, 115 (p.19)
- 4 - ARAKAWA W. et MURAMATSU T., J. Biochem., 1974, 76, 307 (p.33)
- 5 - ARCHIBALD A.R., BADDILEY J. et BUCHANAN J.G., Biochem. J., 1961, 80, 254 (p.15)
- 6 - ARCHIBALD A.R. et BADDILEY J., Biochem. J., 1965, 95, 1964 (p.17,19)
- 7 - ARMSTRONG J.J., BADDILEY J. et BUCHANAN J.G., Biochem. J., 1960, 76, 610 (p.15, 17)
- 8 - BADDILEY J., Essays Biochem., 1972, 18, 35 (p.15)
- 9 - BERGER L.R. et WEISER R.S., Biochem. Biophys. Acta, 1957, 26, 517, (p.27)
- 10 - BETHENCOURT M. et PLOUVIER R., DEA Fac. Sci. Lille, 1973 (p.72)
- 11 - BOERSMA A., LAMBLIN G., ROUSSEL P., DEGAND P. et BISERTE G., CR. Acad. Sc. Paris, 1976, 281, 1269 (p.30)
- 12 - BURGER M.M. et GLASER L., J. Biol. Chem., 1964, 239, 3168 (p.15)
- 13 - CANFIELD R.E., J. Biol. Chem., 1963, 238, 2698 (p.27)
- 14 - CANFIELD R.E., J. Biol. Chem., 1963, 238, 2691 (p.29)
- 15 - CHENG K.J., HIRONAKA R., JONES G.A., NICAS T. et COSTERSON J.W., Can. J. Microbiol., 1976, 22, 450 (p.26)
- 16 - CHERVENKA C.H., Anal. Biochem., 1970, 34, 24 (p.53)
- 17 - CHIEN S.F., YEVICH J., LI S.C., LI Y.L., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 65, 683 (p.31, 32)
- 18 - CUMMINS C.S. et HARRIS H., J. Gen. Microbiol., 1959, 177, 327, (p.12)
- 19 - DAVISON A.L., BADDILEY, HOFSTAD T., LOSNEGARD N., CEDING P., Nature, 1964, 202, 872 (p.19)
- 20 - De BOER R., KRUYSEN F.J. et WOUTER T.M., Eur. J. Biochem., 1976, 62, 1 (p.17)
- 21 - DELEBASSEE D. et SAMOR B., DEA Fac. Sc. Lille, 1974 (p.1)
- 22 - DELECOURT R., Ann. Tech. Agr., 1974, 23 N°2, 193 (p.46, 65)
- 23 - DISCHE G., Biochem. Z., 1927, 189, 77 (p.51, 52)

- 24 - DUCKWORTH M., ARCHIBALD A.R., BADDILEY J., Biochem. J., 1972, 130, 691 (p.20)
- 25 - ELLWOOD D.C., Biochem. J., 1970, 118, 367 (p.23)
- 26 - ELLWOOD D.C. et TEMPEST D.W., Advances in Microbial Physiology, 1972, Vol.7, 83-117, ROSE A.M. et TEMPEST D.W. ed., London and New York, Acad. Press (p.24, 26)
- 27 - ELLWOOD D.C et TEMPEST D.W., J. Gen. Microbiol., 1972, 73, 395 (p.23)
- 28 - ENDO Y. et KOBATA A., J. Biochem., 1976, 80, 1 (p.35)
- 29 - FAN D.P. et BECKMAN M.M., J. Bacteriol., 1972, 109, 1258 (p.38)
- 30 - FAN D.P. et BECKMAN M.M., J. Bacteriol., 1973, 114, 804 (p.31, 32, 33, 34, 38)
- 31 - FISCHER F.G. et NEBEL H.J., Z. Physiol. Chem., 1955, 303, 10(p.52)
- 32 - FLEMING A., Proc. Roy. Soc. (LONDON), 1922, B.93, 306 (p.27)
- 33 - FOURNET B., Thèse Doc. es Sci. Lille 1973 (p.53)
- 34 - GHUYSEN J.M., DIERICK L., COYETTE J., LEY-BOUILLE M., GUINAND M. et CAMPBELL J.N., Biochemistry, 1969, 8, 213 (p.38)
- 35 - GHUYSEN J.M., STROMINGER J. et TIPPER D.J., Extracellular and Supporting Structures, 1968, Vol. A-26, Comprehensive Biochemistry, FLORKIN et STOTZ ed. (p.14)
- 36 - GLYNN A.A., MARTIN W. et ADINOFFI M., Nature, 1970, 225, 77(p.29)
- 37 - HAMADA N., FUKUMOTO J., YAMAMOTO T., Agr. Biol. Chem., 1971, 35, 1052 (p.17, 50)
- 38 - HAMAGUCHI K. et FUNATSU M., J. Biochem., 1959, 46, 1659 (p.29)
- 39 - HAYASHI K., FUJIMOTO N., KUGIMAYA M. et FUNATSU M., J. Biochem., 1969, 65, 401 (p.29)
- 40 - HORTON D., The Amino Sugars, 1969, Vol. IA, 186, JEANLOZ R.W. ed., Acad. Press Inc. (p.21)
- 41 - HUGHES R.C., PAVLIK J.G., ROGERS H., TANNER P.J., Nature (London) 1968, 219, 643 (p.14)
- 42 - HUGHES R.C. et THURMANS D.F., Biochem.J., 1970, 117, 441 (p.20)
- 43 - ITO S., MURAMATSU T., KOBATA A., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1975, 63, 938 (p.31)
- 44 - IWATA S., Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 1974, 48, 187 (p.29, 30)
- 45 - JANCZURA E., PERKINS H.R., ROGERS J., Biochem. J., 1961, 80, 82, (p.20)

- 46 - JOLLES P., *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.*, 1964, 3, 28 (p.29)
- 47 - JOLLES J. JAUREGUI-ADELL J., BERNIER I. et JOLLES P., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 78, 668 (p.27, 28, 29)
- 48 - JOLLES J. et JOLLES P., *Biochemistry*, 1967, 6, 411 (p.29)
- 49 - JOLLES J. et JOLLES P., *Nature*, 1961, 192, 1187 (p.29)
- 50 - KELEMEN M.V. et ROGERS H.J., *Proc. Acad. Sci. US*, 1971, 68, 982 (p.14)
- 51 - KOIDE N. et MURAMATSU T., *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 4897 (p.31, 32)
- 52 - LAMBERT P.A., HANCOCK I.C. et BADDILEY J., *Biochem. J.*, 1975, 149, 519 (p.19)
- 53 - LEE Y.C., WU Y.C. et MONTGOMERY R., *Biochem. J.*, 1964, 91, 9 (p.36)
- 54 - LEVY G.A. et Mc ALLAN A., *Biochem. J.*, 1959, 73, 127 (p.57, 83)
- 55 - LEY-BOUILLE M., GHUYSEN J.M., TIPPER D.J. et STROMINGER J.L., *Biochemistry*, 1966, 5, 3079 (p.29)
- 56 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR L., RANDALL R.J., *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265 (p.48, 52)
- 57 - MAHADEVAN S. et TAPPEL A.L., *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 4968 (p.37)
- 58 - MAKINO M., KOJIMA T., OHGUSHI T. et YAMASHINA I., *J. Biochem.*, 1968, 63, 186 (p.37)
- 59 - MAKINO M., KOJIMA T., YAMASHINA I., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1966, 24, 961 (p.37)
- 60 - McCONN J.D., TSURU D., YASUNOBU K.T., *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 3706 (p.46, 65)
- 61 - MATSUHIMA Y., HARA S., MIMAHARA T. et ENUNERA Y., *Seikagaky (Japanese)*, 1965, 37, 616 (p.29)
- 62 - MARKLAND F.S., SMITT E.L., *The Enzymes*, ed. by BOYER, Acad. Press Inc. (New York), 1971, Vol. III, 562 (p.46, 65)
- 63 - MAUCK J. et GLASER L., *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 1180 (p.19)
- 64 - MEERS J.L. et TEMPEST D.W., *J. Gen. Microbiol.*, 1970, 63, 325 (P.23)
- 65 - MONTREUIL J. et SPIK G., "Microdosages des Glucides", Fasc. I, Fac. Sci. Lille ed., 1963 (p.51, 52, 76, 81)
- 66 - MURAKAMI M. et EYLAR E.H., *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 556 (p.36)
- 67 - MURAMATSU T., *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 5535 (p.31)
- 68 - NAKASIMA T., BALBOU C.E., *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 7689 (p.31)
- 69 - NISHIGAKI M., MURAMATSU T., KOBATA A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 59, 638 (p.30, 32)
- 70 - OKADA S. et KITAHATA S., *J. Ferment. Technol.*, 1973, 51, 705, (p.28, 29)



- 71 - PARTRIDGE S.H., Biochemical Society Symposia, 1949, 3, 52 (P.52)
- 72 - PETIT J.F. et JOLLES P., Nature, 1963, 200, 169 (p.29)
- 73 - PLUMMER T.H., TARENTINO A. et MALEY F., J. Biol. Chem., 1968, 243, 51 (p.37)
- 74 - REISSIG J.L., LAI W.H. et GLASGOW J.E., Can. J. Biochem., 1975, 53, 1237 (p.35)
- 75 - REISSIG J.L., STROMINGER J.L. et LELOIR L.S., J. Biol. Chem., 1955, 217, 959 (p.57, 83)
- 76 - RIMINGTON C., Biochem. J., 1940, 34, 931 (p.51)
- 77 - SALTON M.R.J., Nature, 1952, 170, 746 (p.27)
- 78 - SALTON M.R.J., Ann. Rev. Biochem., 1965, 34, 143 (p.29)
- 79 - SALTON M.R.J. et GHUYSEN J.M., Biochim. Biophys. Acta, 1959, 36, 252 (p.27)
- 80 - SAMOR B., Thèse Doc. 3ème Cycle Lille, 1977 (p.2, 51, 53)
- 81 - SHARON N. et JEAHLOZ R.J.L., J. Biol. Chem., 1960, 235, 1(p.12,21)
- 82 - SHARON N., SHIF I. et ZEHAVI V., Biochem. J., 1964, 93, 210(p.21)
- 83 - SHIBAEV V.N., DUCKWORTH M., ARCHIBALD A.R., EADDILEY J., Biochem. J., 1973, 135, 383 (p.20)
- 84 - STIRLING J.L., FEBS Letters, 1974, 39, 171 (p.30)
- 85 - TAKAHARA Y., MACHIGAKI E. et MURAO S., Agr. Biol. Chem., 1974, 38, 2357 (p.28, 29)
- 86 - TANAKA M., KOHONO M. et YAMASHINA I., J. Biochem., 1973, 73, 1285 (p.36)
- 87 - TARENTINO A.L. et MALEY F., Arch. Biochem. Biophys., 1969, 130, 295 (p.37)
- 88 - TARENTINO A.L. et MALEY F., J. Biol. Chem., 1974, 249, 811 (p.31, 32)
- 89 - TARENTINO A.L. et MALEY F., J. Biol. Chem., 1976, 251, 6537 (p.30, 32, 33, 34)
- 90 - TARENTINO A.L., PLUMMER T.H., MALEY F., J. Biol. Chem., 1974, 249, 818 (p.33)
- 91 - TARENTINO A.L., PLUMMER T.H., MALEY F., J. Biol. Chem., 1972, 247, 2629 (p.31)
- 92 - TEMPEST L.W., DICES J.W., ELLWOOD D.C., Biochem. J., 1968, 106, 237 (p.20)
- 93 - TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1929, 219, 36 (p.51)

- 94 - TREVELLYAN W.E., PROCTER D.P., HARRISON J.S., Nature, (London), 1959, 166, 444 (p.52)
- 95 - WARD J., Biochem. J., 1973, 133, 395 (p.14)
- 96 - WICKEN A.J., Biochem. J., 1966, 99, 108 (p.17)
- 97 - WICKEN A.J. et BADDILEY J., Biochem. J., 1963, 87, 54 (p.19)
- 98 - WRIGHT J. et HECKELS J.E., Biochem. J., 1975, 147, 187 (p.20)
- 99 - WYKE A.W. et WARD J.B., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 65, 877 (p.19)
- 100 - YOUNG F.E., Nature (London), 1965, 207, 104 (p.23)
- 101 - YOUNG F.E., SPIZIZEN J., CRAWFORD I.P., J. Biol. Chem., 1963, 238, 31 (p.19, 23)
- 102 - ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C. et VINCENDON G., J. Chromatogr., 1972, 69, 291 (p.53)

