

50 326  
1977  
25

N° d'ordre : 631

50376  
1977  
25

# MEMOIRE

Présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

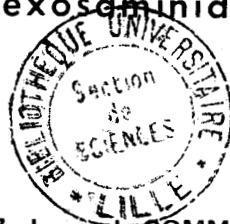
Spécialité : BIOCHIMIE APPLIQUEE

par

Bruno SAMOR

ETUDE D'UN NOUVEAU POLYSACCHARIDE PRESENT  
DANS LES MOUTS DE FERMENTATION DE *BACILLUS SUBTILIS*  
(SOUCHE RAPIDASE)

- 1 - Isolement et etude physico-chimique
- 2 - Etude de sa depolymerisation par une  
endo-N-acetylhexosaminidase



030 032030 6

Présenté le 6 Mai 1977, devant la COMMISSION d'EXAMEN

M.	J. MONTREUIL	Président
Mlle	G. SPIK	Rapporteur
M.	B. FOURNET	Examineur
M.	P.J. SICARD	Membre Invité

Ce travail a été réalisé dans le cadre de contrats de recherche souscrits avec la Société Rapidase de Seclin et avec la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (contrat 76-7-071). Nous exprimons à cette firme et à cet organisme notre profonde gratitude pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée. Il a été effectué dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille 1 (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 avec la participation du personnel des laboratoires de la Société Rapidase. A tous nous adressons nos vifs remerciements.

T A B L E des M A T I E R E S

---

---

<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' $\alpha$ -amylase par <u>Bacillus subtilis</u> souche Rapidase	4
<u>I - 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
<u>II - Production d'<math>\alpha</math>-amylase</u>	5
A - <u>Milieu de culture</u>	5
B - <u>Modification de la viscosité du milieu de fermentation</u>	5
<u>III - Production d' "Enzyme X"</u>	7
A - <u>Milieu de culture</u>	7
B - <u>Conditions de sécrétion de l' "Enzyme X" par Bacillus subtilis</u>	7
<u>IV - Conclusions</u>	9

Généralités sur les constituants membranaires de <u>Bacillus subtilis</u>	11
I - <u>Le peptidoglycane</u>	11
II - <u>Les acides téichoïques</u>	12
A - <u>Définition</u>	12
B - <u>Isolement des acides téichoïques de Bacillus subtilis</u>	14
C - <u>Structure des acides téichoïques de Bacillus subtilis</u>	14
D - <u>Liaison acides téichoïques - peptidoglycane</u>	16
III - <u>Polysaccharides bactériens possédant des sucres aminés</u>	18
A - <u>Les acides téichuroniques</u>	18
B - <u>Polymère renfermant de la N-acétylgalactosamine</u>	19
C - <u>Polysaccharide renfermant du 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose</u>	19
D - <u>Polysaccharide renfermant de la D-fucosamine</u>	19
IV - <u>Varitions de la composition des constituants polysaccharidiques de la paroi de Bacillus subtilis</u>	21
Généralités sur les enzymes de dépolymérisation des glycopeptides	25
I - <u>Les endo-N-acétylhexosaminidases</u>	25

A - <u>Le lysozyme</u>	25
B - <u>Les endo-N-acétylglucosaminidases</u>	27
II - <u>L'endo-<math>\alpha</math>-N-acétylgalactosaminidase</u>	32
III - <u>L'endogalactosaminidase</u>	33
IV - <u>Les amidases</u>	33
A - <u>La 4'-L-aspartylglycosylamine amido hydrolase</u>	33
B - <u>L'endo-N-acétylmuramyl-L-alanine amidase</u>	35
<u>MATERIEL et METHODES</u>	36
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">Préparation et analyse de l'extrait macromoléculaire ou mucus isolé à partir des milieux de fermentation</div>	37
I - <u>Préparation du mucus</u>	37
A - <u>Filtration sur perlites et terres de diatomées</u>	37
B - <u>Filtration stérile</u>	37
C - <u>Ultrafiltration</u>	37
D - <u>Lyophilisation</u>	39
II - <u>Fractionnement du mucus sur colonne d'échangeur d'ions</u>	39
A - <u>Mode opératoire</u>	39

B - <u>Isolement des fractions</u>	39
III - <u>Méthodes analytiques d'étude du mucus</u>	39
A - <u>Dosage et identification des glucides</u>	39
1 - <u>Méthodes colorimétriques de dosage des monosaccharides</u>	39
2 - <u>Procédés d'identification des monosaccharides</u>	40
3 - <u>Procédé de détermination de la composition molaire glucidique</u>	41
B - <u>Dosage des protéines et identification des acides aminés</u>	41
C - <u>Dosage du phosphore</u>	42
D - <u>Mise en évidence des glycérophosphates</u>	42
E - <u>Etude viscosimétrique</u>	43
IV - <u>Etude de la fraction F<sub>IV</sub></u>	43
A - <u>Purification</u>	43
B - <u>Détermination de la masse moléculaire</u>	44
C - <u>Composition en oses</u>	44
1 - <u>Réduction des acides uroniques</u>	44
2 - <u>Mise en évidence du 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose</u>	48
a) <u>Isolement et purification</u>	48
b) <u>Identification par chromatographie et électrophorèse sur papier</u>	50

c) <u>Identification et caractérisation du</u> <u>2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose par</u> <u>chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie</u> <u>de masse</u>	50
3 - <u>Mise en évidence de résidus d'hexosamines non</u> <u>acétylées dans la fraction F<sub>IV</sub></u>	52
V - <u>Hydrolyse enzymatique de la fraction F<sub>IV</sub></u>	54
A - <u>Isolément et purification de l'enzyme</u>	54
B - <u>Mise en évidence de l'activité endoglycosidase</u> <u>de la fraction enzymatique purifiée</u>	56
C - <u>Mise en évidence de l'activité endo-N-acétyl</u> <u>hexosaminidase de la solution enzymatique</u>	58
<p>TRAVAUX PERSONNELS</p> <hr style="width: 20%; margin: auto;"/>	
Etude de la préparation et analyse physico-chimique du mucus	61
I - <u>Etude de la préparation du mucus</u>	61
A - <u>Analyse qualitative du procédé d'isolement du mucus</u>	61
B - <u>Analyse quantitative</u>	61
C - <u>Conclusions</u>	62
II - <u>Etude physico-chimique du mucus</u>	62
A - <u>Composition centésimale glucidique</u>	62

B - <u>Composition en azote et en protéine</u>	62
C - <u>Composition en phosphore du mucus</u>	64
D - <u>Conclusions</u>	64
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin: 10px auto; width: fit-content;">           Fractionnement du mucus par chromatographie d'échange d'ions et étude physico-chimique des différents constituants         </div>	
I - <u>Fractionnement du mucus par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Dowex 1 x 2</u>	65
A - <u>Etude du profil d'élution</u>	65
B - <u>Etude quantitative du fractionnement du mucus par chromatographie d'échange d'ions</u>	67
C - <u>Conclusions</u>	67
II - <u>Analyse physico-chimique des fractions</u>	69
A - <u>Analyse comparative de la composition chimique des fractions</u>	69
1 - <u>Etude comparative de la composition chimique des fractions</u>	69
2 - <u>Etude de la composition en protéine et en acides aminés des fractions F<sub>I</sub>, F<sub>II</sub> et F<sub>III</sub></u>	74
3 - <u>Analyse de la composition en phosphore et en glycérophosphate de la fraction F<sub>V</sub></u>	76
B - <u>Analyse de la viscosité intrinsèque des fractions isolées par fractionnement du mucus</u>	76
III - <u>Conclusions</u>	78



Analyse physico-chimique de  
la fraction F<sub>IV</sub>

80

I - Purification de la fraction F<sub>IV</sub> par chromatographie  
d'échange d'ions sur colonne de Dowex 1 x 2

80

II - Propriétés physiques de la fraction F<sub>IV</sub>

80

A - Solubilité

80

B - Masse moléculaire

82

III - Propriétés chimiques de la fraction F<sub>IV</sub>

82

A - Composition centésimale

82

B - Composition molaire glucidique

84

C - Mise en évidence de la réduction des acides  
uroniques

84

D - Isolement, purification et analyse du 2,4-diacétamido  
2,4,6-tridéoxyglucose

86

E - Mise en évidence de la présence de résidus  
d'hexosamines non acétylées dans la fraction F<sub>IV</sub>

92

IV - Conclusions

92

Hydrolyse enzymatique de la  
fraction F<sub>IV</sub>

95

I - Isolement et purification de l'"Enzyme X"

95

A - <u>Préparation de la poudre "Enzyme X" atomisée</u>	95
B - <u>Purification de l'enzyme</u>	95
II - <u>Dépolymérisation enzymatique de la fraction F<sub>IV</sub></u>	98
A - <u>Mise en évidence de la diminution de la viscosité</u>	98
B - <u>Mise en évidence de l'activité endoglycosidasique</u>	98
C - <u>Mise en évidence de l'activité endo-N-acétylhexosaminidasique</u>	101
III - <u>Conclusions</u>	101

CONCLUSIONS GENERALES	105
-----------------------	-----

---

BIBLIOGRAPHIE	109
---------------	-----

---

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

---

La Société RAPIDASE de Seclin produit à l'échelon industriel de nombreuses enzymes, protéases, lécithinases et  $\alpha$ -amylases, par fermentation bactérienne ou fongique de différents milieux de culture.

L'  $\alpha$ -amylase est obtenue après ensemencement et après fermentation par un mutant de Bacillus subtilis, d'un milieu enrichi en maltodextrines de maïs partiellement hydrolysées. Au cours de ce type de fermentation, la bactérie a la propriété de synthétiser un constituant qui provoque une augmentation importante de la viscosité du milieu. Il devient alors impossible de traiter ces moûts de fermentation par ultrafiltration, opération nécessaire à l'isolement de l' $\alpha$ -amylase qui est excrétée dans le milieu par la bactérie.

Fortuitement, il a été observé que l'addition d'une partie aliquote d'un moût de fermentation normal à un moût visqueux, provoque une rapide diminution de cette viscosité. Le milieu normal renferme un facteur qui a la propriété de dépolymériser le constituant visqueux. Il a été appelé "Enzyme X".

Nous avons consacré l'essentiel de nos travaux à l'isolement et à la caractérisation du constituant visqueux et à l'enzyme qui le dégrade.

L'ultrafiltration d'un moût visqueux de fermentation nous a permis d'isoler un extrait macromoléculaire visqueux, sensible à l'action de l'"Enzyme X". L'étude de cet extrait ou mucus, a nécessité la mise au point d'un procédé de fractionnement par chromatographie sur échangeurs d'ions (colonne de DOWEX 1 x 2). Nous isolons et caractérisons cinq fractions dont une présente une viscosité intrinsèque élevée. Son étude physico-chimique montre qu'il s'agit d'un hétéropolysaccharide de masse moléculaire importante.

Parallèlement et en collaboration avec DELEBASSEE, nous avons purifié l'enzyme ou "Enzyme X", qui provoque la diminution de viscosité des milieux de fermentation.

Nous montrons que l'hétéropolysaccharide est le substrat de cette enzyme. Ce résultat nous a permis d'identifier l'"Enzyme X" comme étant une endo-hexosaminidase.

Nous ferons précéder l'exposé de nos résultats 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 endo-glycosidases synthétisées par les bactéries.

GENERALITES

\*\*\*\*\*

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

L'apparition de la viscosité au cours des fermentations réalisées pour la production d' $\alpha$ -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'ultra-filtration qui permettent d'isoler l' $\alpha$ -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' $\alpha$ -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 acétöfine 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' $\alpha$ -amylase est favorisée.

### II - Production d' $\alpha$ -amylase

#### A - Milieu de culture

Le milieu sur lequel est ensemencé le bacille est composé de maltodextrines de maïs partiellement hydrolysées et est complémenté 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 induire la synthèse de l' $\alpha$ -amylase. Les cultures sont réalisées dans des fermenteurs de 60 m<sup>3</sup>. 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.

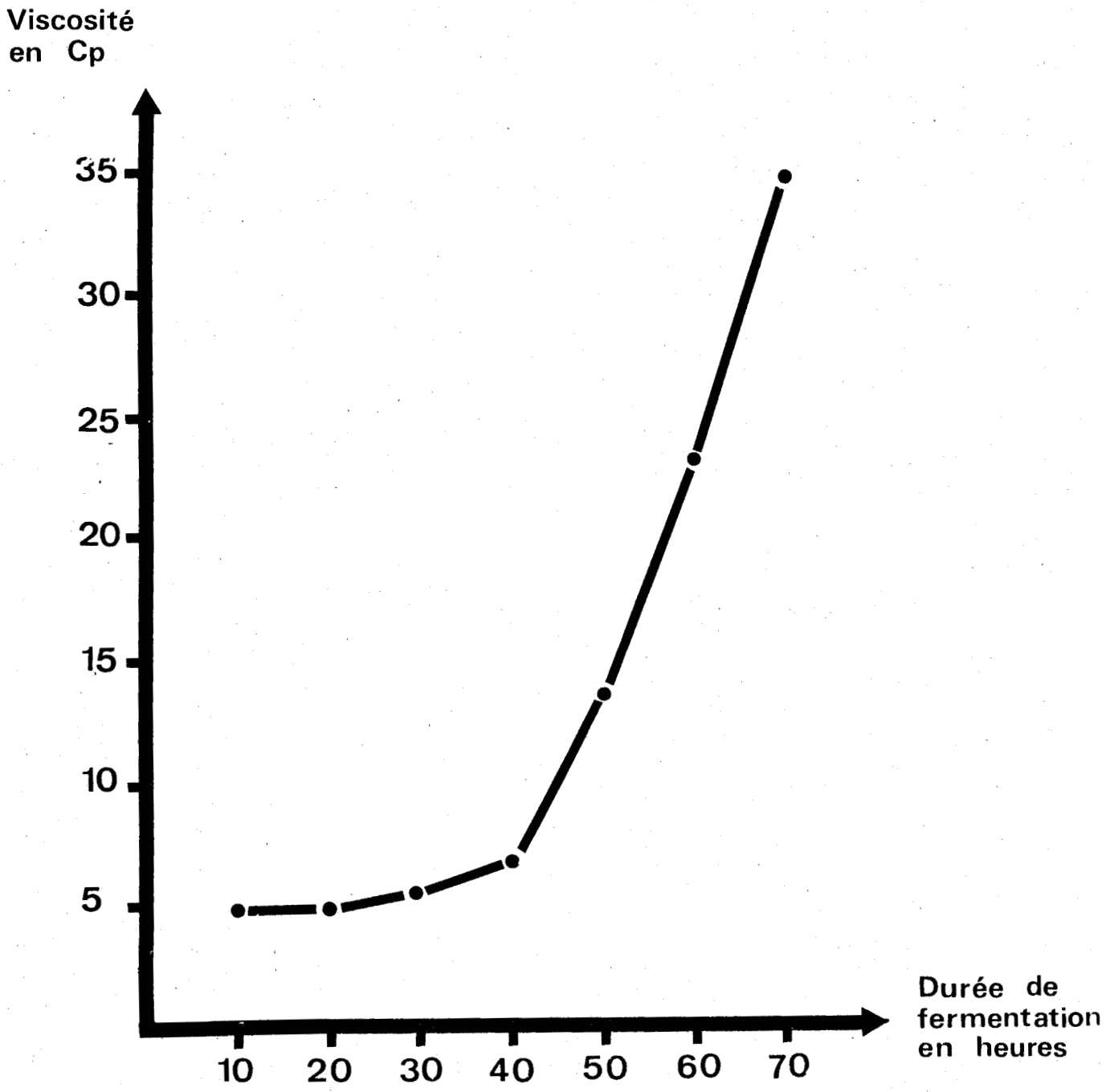


Figure 1 Evolution de la viscosité du milieu de fermentation de Bacillus subtilis (souche Rapidase)





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' $\alpha$ -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 mout visqueux :

- d'une partie aliquote d'une fermentation "Enzyme X" préparée en même temps que la fermentation " $\alpha$ -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' $\alpha$ -amylase.

#### A - Milieu de culture

Il s'agit du milieu de culture destinée 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.

Le volume des fermenteurs est de 5,6 m<sup>3</sup> et le volume final du mout de fermentation atteint 3 m<sup>3</sup>.

#### 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.

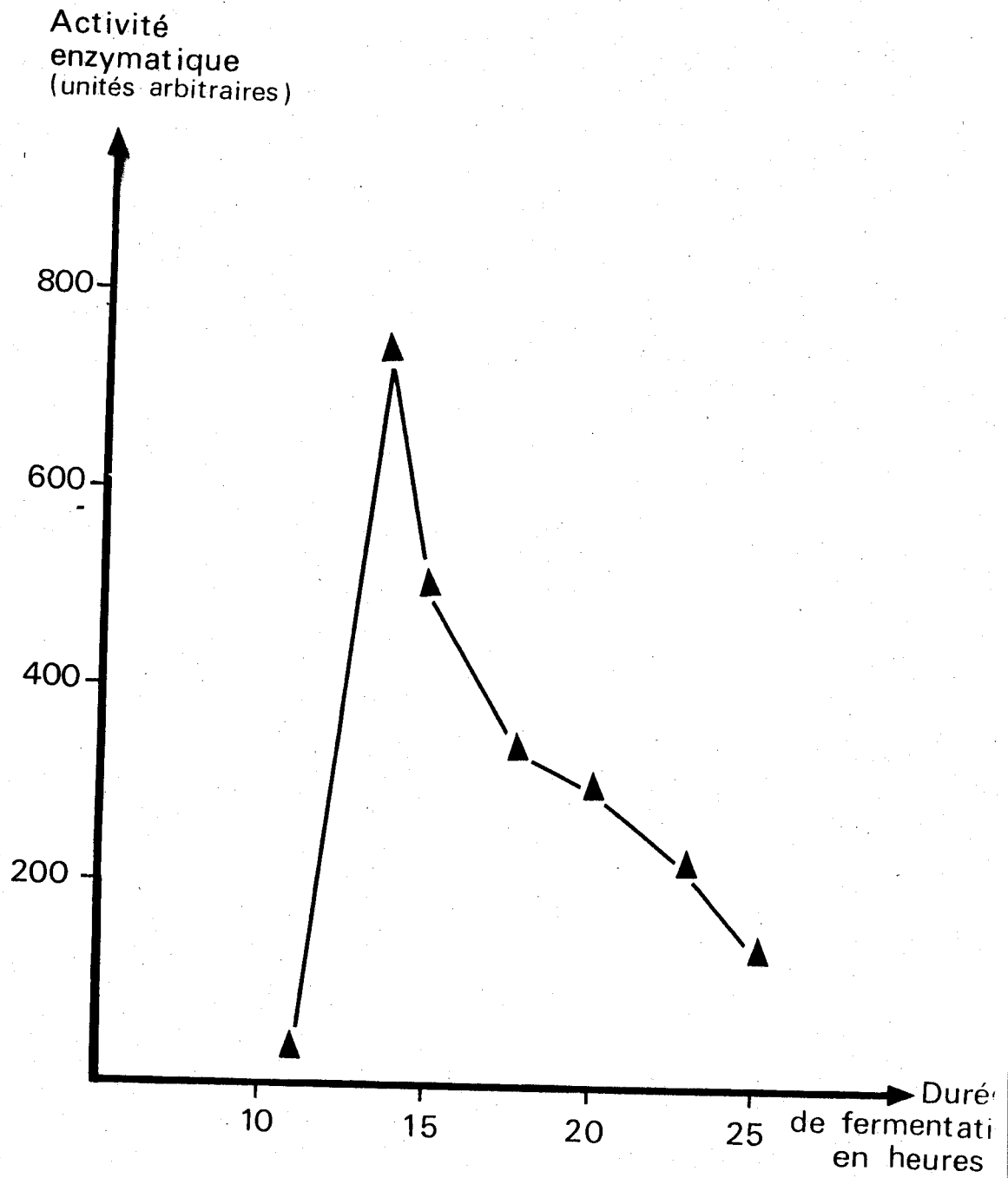


Figure 2 Production de l' "Enzyme X" en fonction du temps de fermentation



### 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 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 " $\alpha$  - 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  $\alpha$  - 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.

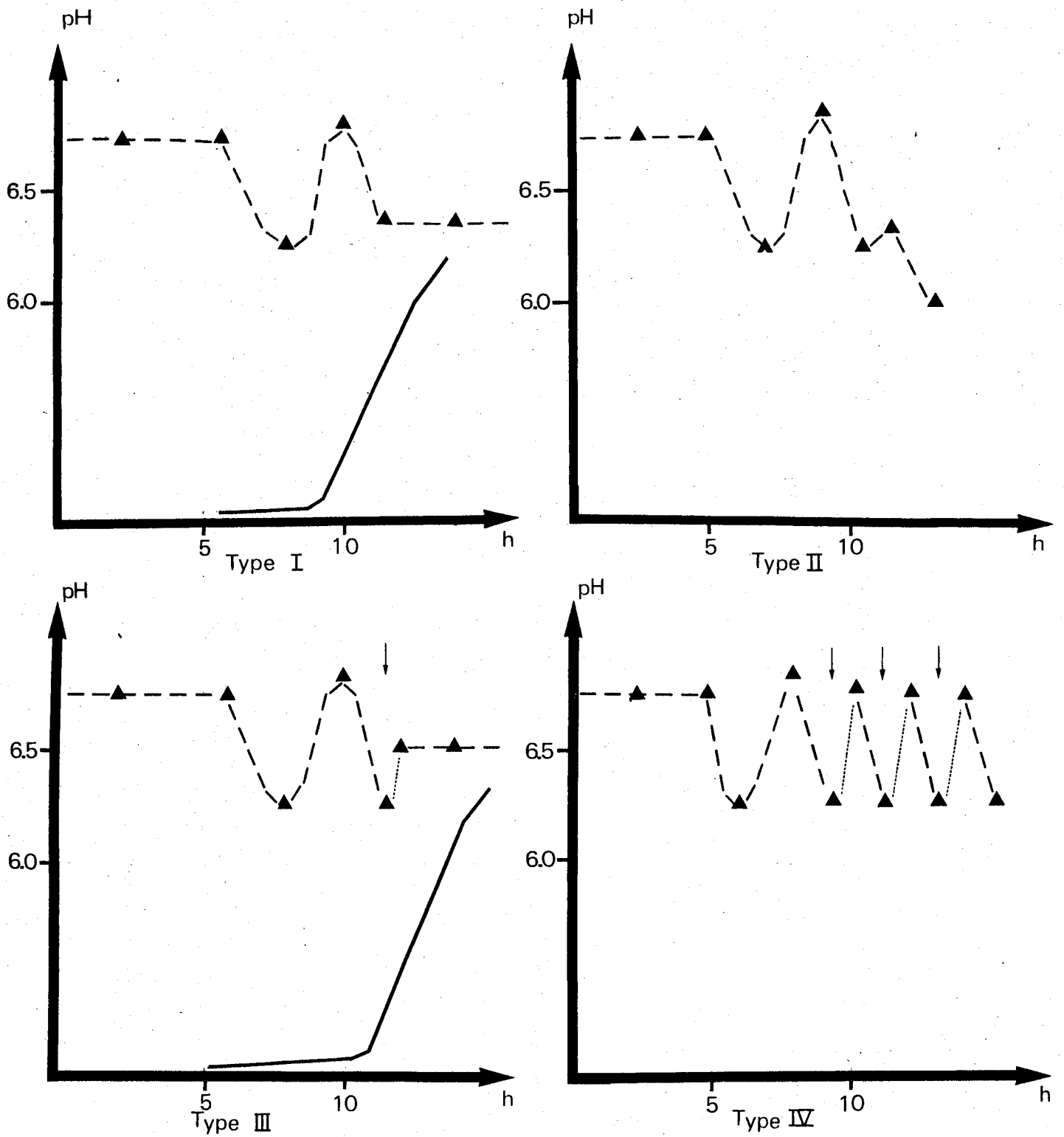


Figure:3 Production de l' "Enzyme X" en fonction des différents types d'évolution du pH du milieu de culture

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



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 (19), il est établi que les parois des bactéries gram-positives se composent toutes d'un polymère constitué de N-acétyl-glucosamine, d'acide muramique (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 (84), 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- $\beta$ -(1-4)-acide N-acétyl-muramique. La liaison entre chaque unité de répétition est du type  $\beta$  (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 (45)). 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 (54) ont déterminé la longueur moyenne du chaînon disaccharidique : N-acétylglucosamine-acide N-acétylmuramique. Elle est de 1,03 nm. En 1973, WARD (99) 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 (36)). 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.

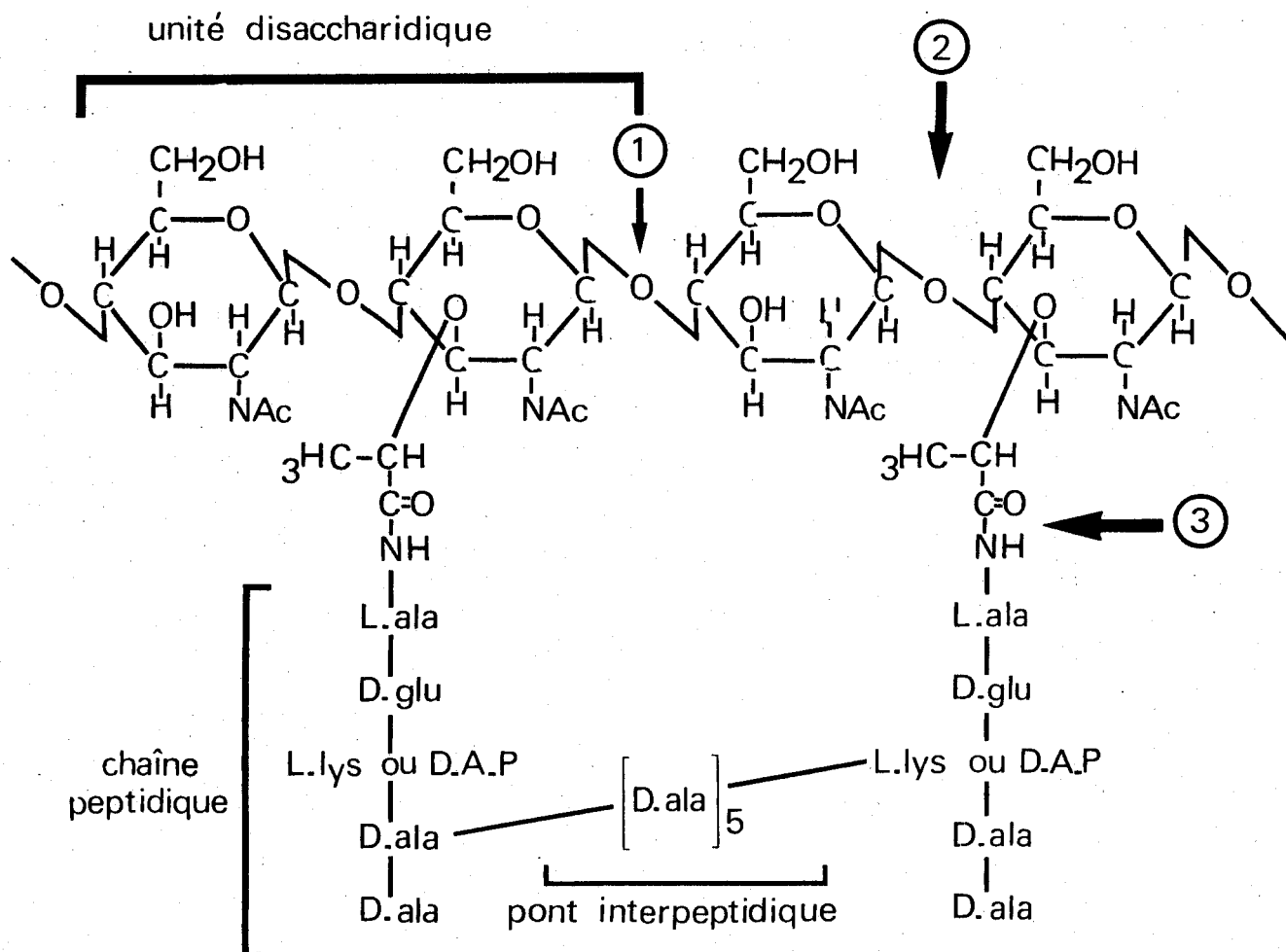


Figure: 4 Structure du peptidoglycane de

Bacillus subtilis et spécificité d'action de:

1. lysozyme
2. endo-N.acétylglucosaminidase
3. endo-N.acétylmuramyl.L.alanine amidase



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 60 p 100 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 "intracellulaires", localisés entre la paroi et la membrane du protoplaste. 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 (13), 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 10 p 100.

Les composés obtenus sont solubles dans l'eau et précipitables par l'éthanol ou l'acétone (WICKEN (102)). 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 phosphodiesters et glycosidiques ne sont pas dégradées par cet agent chimique.

#### C - Structure des acides téichoïques de Bacillus subtilis

##### a) Acides ribitol-téichoïques

La figure 5 donne une représentation schématique des



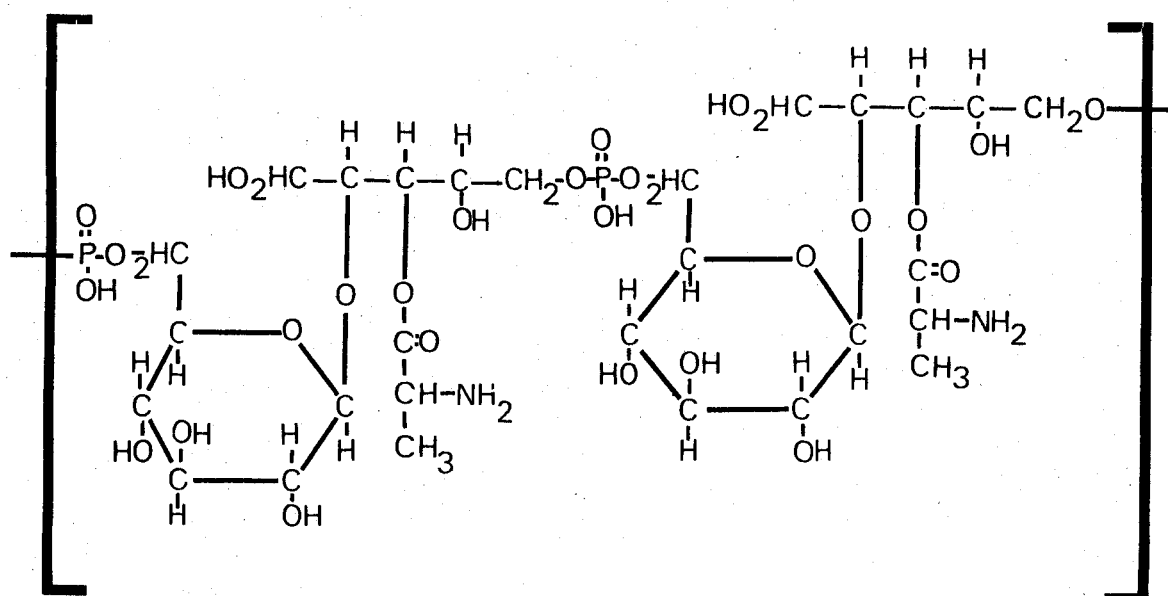


Figure: 5 Structure des acides ribitol-téichoïques trouvés dans la paroi de Bacillus subtilis

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  $\beta$ .

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

#### b) 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 (39), en 1971, ont isolé de Bacillus subtilis var. amyloliquéfaciens, un polymère composé de  $\alpha$  - D - glucose et dont la fonction hydroxyle du carbone 3 du glycérol est engagé dans la liaison phosphodiester.

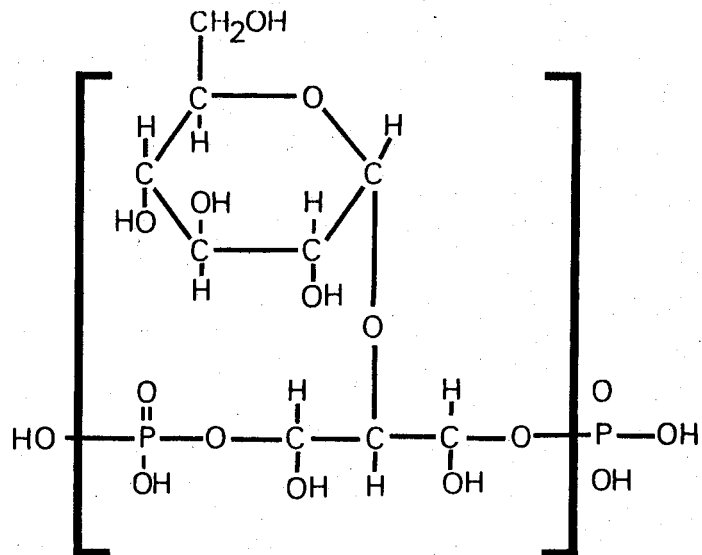
La souche de Bacillus subtilis var. niger, étudiée par de BOER et al (21), synthétise des acides téichoïques possédant des résidus de  $\alpha$  - D - glucose mais dont la liaison phosphodiester se fait avec l'hydroxyle du carbone 2 du glycérol.

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

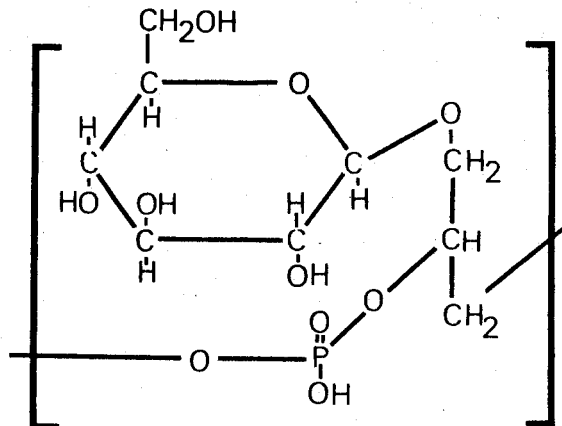
#### D - Liaison acides téichoïques - peptidoglycane

La nature des méthodes employées pour extraire les acides téichoïques, suggère que ceux-ci soient liés de manière covalente au peptidoglycane. YOUNG et al (105) montrent que l'extrémité phosphate terminale des acides téichoïques est impliquée dans cette liaison.

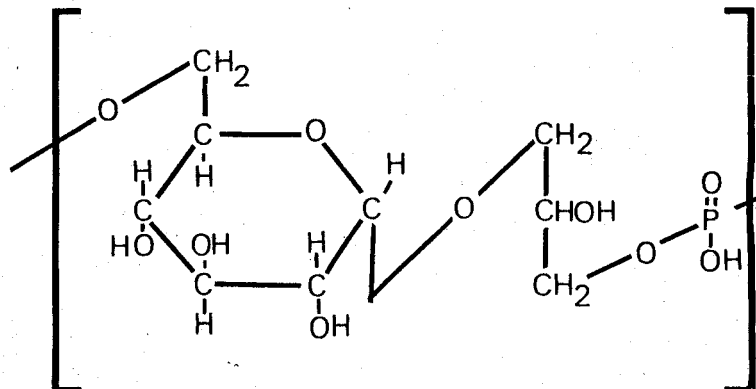
ARCHIBALD et BADDILEY (6) prouvent que cette liaison est stable lorsqu'on traite les parois par la phénylhydrazine à pH neutre. Ces auteurs pensent que le groupement phosphate terminal est engagé dans une liaison de type phosphodiester avec le résidu  $\text{NH}_2$  de la glucosamine ou de l'acide muramique, en position terminale réductrice dans le peptidoglycane.



Bacillus subtilis var. *amyloliquefaciens*



Bacillus subtilis var. *niger*



Bacillus stearothermophilus

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

En 1972, MAUCK et GLASER (64) 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 (104)).

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 (56), 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 (101)), ce sont les travaux de DAVISON et al (20) 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 (49) 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 (46) : il est formé de la répétition du dimère : acide glucuronique  $\alpha$ -(1-3)-N-acétyl-galactosamine. Chaque unité de répétition est liée à la précédente par une liaison de type :  $\alpha$  1-4 (figure 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 (49)). Il a été récemment isolé par WRIGHT et HECKELS (103) de la souche Bacillus subtilis W 23.

Selon TEMPEST et al (96), 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 (25) 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 SHIVAEV et al (86), (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

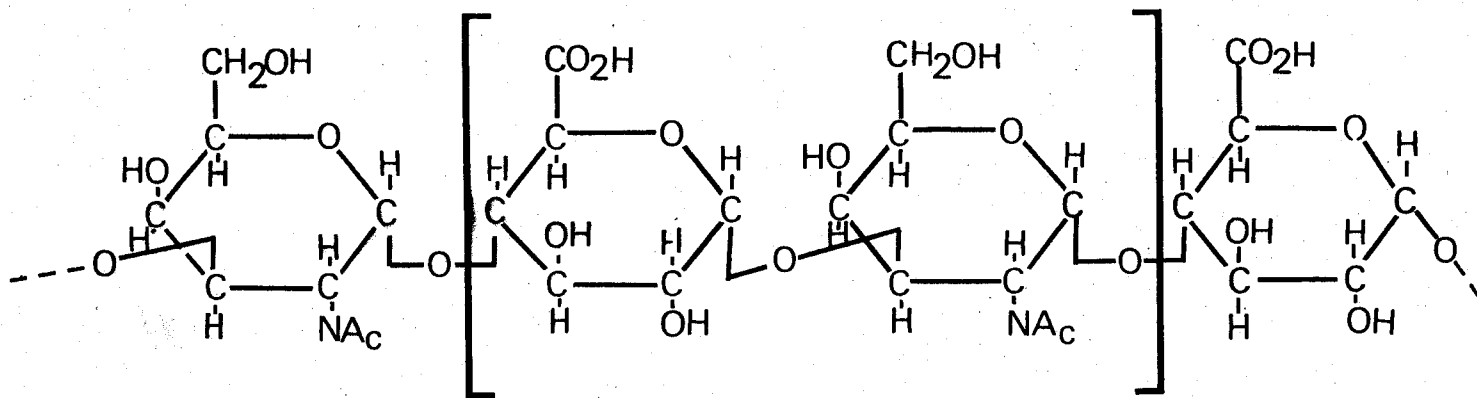
L'étude des polysaccharides synthétisés par les différentes souches de Bacillus, a permis la découverte de sucresaminés de structure particulière.

En 1960, SHARON et JEANLOZ (84) 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.

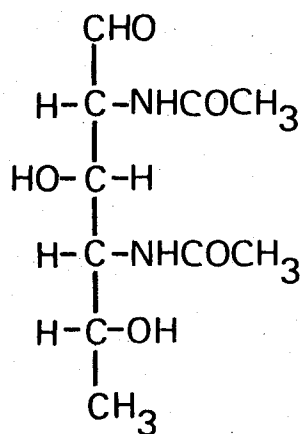
L'hydrolyse sulfurique douce de ce polymère permet la mise en évidence d'un tridéoxyhexose : le 4 acétamido-2-amino-2,4,6 tridéoxyglucose (Figure : 7) : la bacillosamine (HORTON (43)). Par la suite, la présence de cette hexosamine n'a été confirmée que dans les polysaccharides synthétisés par Bacillus 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 (85), la synthèse de cet ose.

#### D - Polysaccharide renfermant de la D-fucosamine

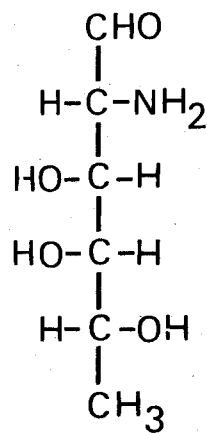
L'étude comparative réalisée par SHARON et al (85), de la composition en monosaccharide des polysaccharides isolés de Bacillus subtilis



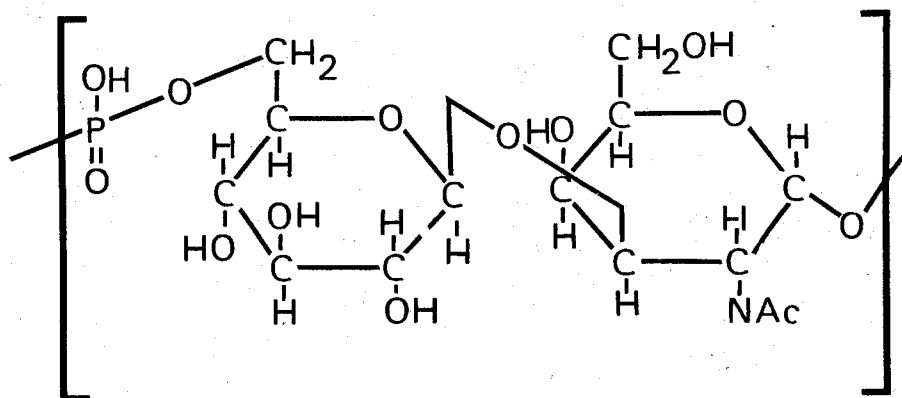
Acide téichuronique



2,4 diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose



D-fucosamine



Polymère à N-acétylgalactosamine

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

et de Bacillus licheniformis ATCC 9945, a permis l'identification de la D-fucosamine. Cette 6-déoxysamine 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 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 (105) 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 (106) confirme que la galactosamine est le marqueur des bactéries sensibles et transformables, car le taux de cette osamine est important dans les parois de bactérie croissant sur un milieu carencé en phosphate.

ELLWOOD (26) 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 compose. Le tableau ( I ) résume les effets de différents facteurs limitants sur la composition de la paroi de Bacillus subtilis (ELLWOOD et TEMPEST (28)).

Les ions  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^-$  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.

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 (28) )

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.
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	21	11.5	4.8	35 - 52	23	tr.	tr.
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	21	12.5	4.9	45 - 53	23	tr.	tr.
K <sup>+</sup>	15.3	10.5	4.3	39 - 46	20	tr.	tr.
Mg <sup>2+</sup>	17.8	12.5	6.9	62 - 74	32	tr.	tr.
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	17	10.5	0.5	tr.	tr.	25	17

tr. traces

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





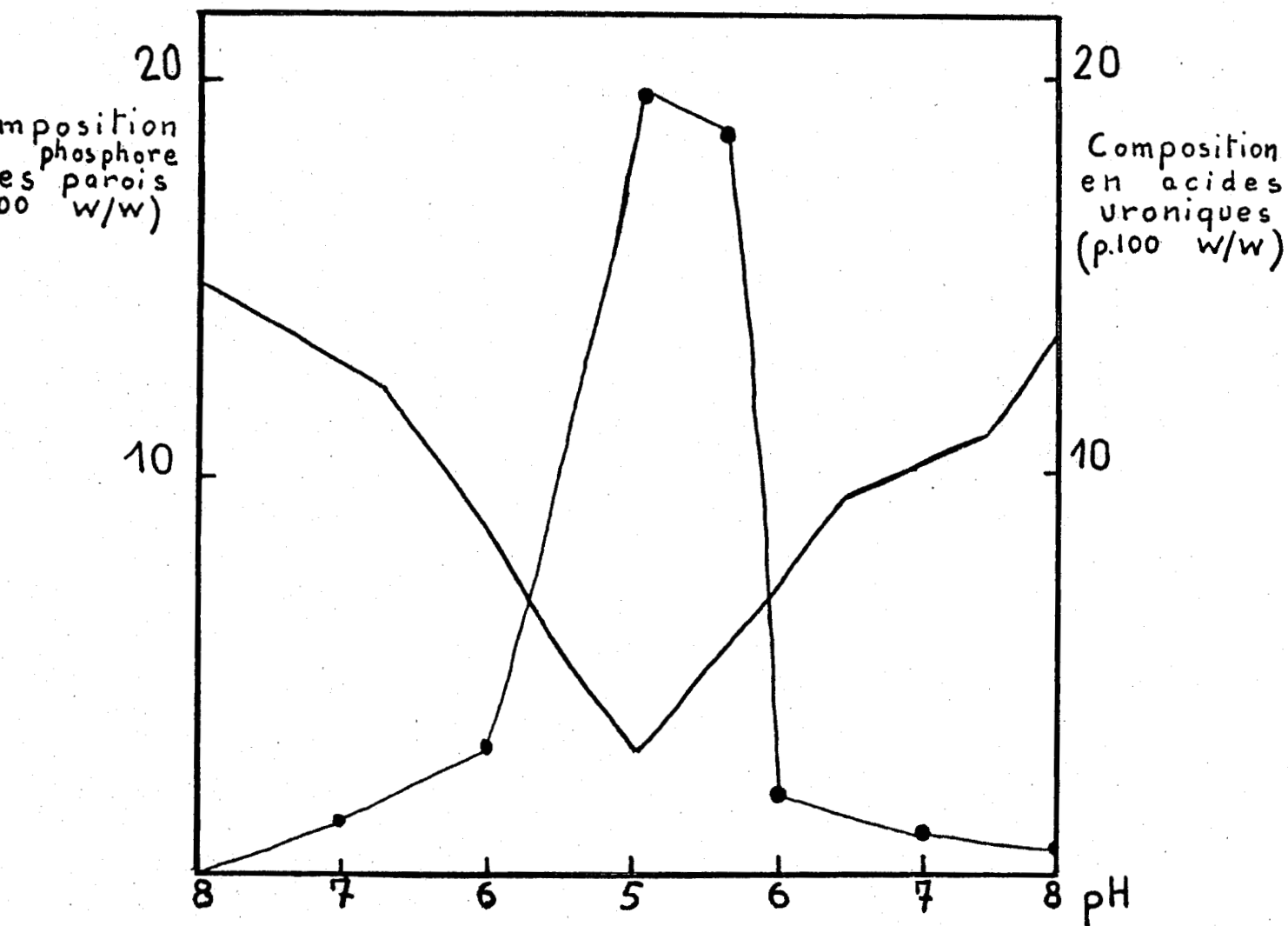


Figure 8 : Influence du pH du milieu de culture sur la composition en Phosphore et en Acides uroniques de parois de *Bacillus Subtilis* (variété Niger)

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 (65)).

Les facteurs physiques du milieu interviennent également. ELLWOOD et TEMPEST (27) 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 conclusion quant à l'influence de la bactérie sur la structure du milieu.

Récemment, (CHENG et al (16)) 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 mucopolysaccharidase N-acétylmuramylhydrolase dont l'action a été observée pour la première fois en 1922 par FLEMING (33), a été cristallisée 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 (82)), JOLLES et al (50) et CANFIELD (15)).

#### 2 - Mode d'action du lysozyme

SALTON (31) a démontré que le lysozyme hydrolysait la chaîne polysaccharidique du peptidoglycane des bactéries Gram-positives. L'enzyme catalyse la coupure des liaisons N-acétylmuramyl  $\beta$ 1-4 N-acétylglucosaminique et des chaînons disaccharidiques sont libérés (Fig.4). En 1957, BERGER et WEISER (9) ont montré que le lysozyme possédait une activité secondaire  $\beta$  - N-acétylglucosaminidasique.

De nombreux substrats ont été préparés pour le dosage de l'activité du lysozyme : peptidoglycane partiellement hydrolysé (JOLLES (53); SALTON (83), LEYH-BOUILLE et al (58)), des dérivés de la chitine : 6-O-glycol chitine

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

	Lysozyme Bacillus subtilis (TAKAHARA (89))	Lysozyme Bacillus subtilis (CKADA (74))	Lysozyme Blanc d'oeuf de poule (JOLLES et al (50))
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'éthylène glycol-chitine	0	0	+

(HAMAGUCHI et FUNATSU (40)) et 6-O-carboxyméthylchitine (MATSUSHIMA et al (63), HAYASHI et al (42)). Le dosage de l'activité du lysozyme est réalisé selon trois méthodes : la mesure de la lyse des parois de Micrococcus lysodeikticus, 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 (51)), la salive (PETIT et JOLLES (77)) et les larmes (JOLLES et JOLLES (52)). Le lysozyme est présent chez le fœtus et le nouveau-né (GLYNN et al (38)).

Le Lysozyme peut être facilement préparé à partir d'oeufs de différentes espèces d'oiseaux et JOLLES et al (50) et CANFIELD (14) ont déterminé, dès 1963, la structure primaire du lysozyme du blanc d'oeuf de poule.

Dans le règne végétal, IWATA (48) a montré l'existence d'une enzyme hydrolysant les parois bactériennes, dans une préparation d' $\alpha$ -amylase d'orge.

Enfin, de nombreux lysozymes ont été isolés de micro-organismes. TAKAHARA (89) ainsi que OKADA et KITAMATA (74) 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'oeuf 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'oeuf 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 glycanne 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 (18) a mis en évidence dans les grains d'orge, la présence d'une endo-N-acétylglucosaminidase qui, avec une endo-N-acétylmuranyl hydrolase, est capable de lyser les parois bactériennes.

### b) Règne animal

L'endo-N-acétylglucosaminidase, isolée par NISHIGAKI et al (73) 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  $\text{GlcNAc}^{\beta 1-4}\text{GlcNAc}$  du glycopeptide  $\text{Asn}(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_6$ . La mise en évidence d'une activité d'endo $\beta$ -N-acétylglucosaminidase dans le foie humain a été réalisée par BOERSMA et al (12).

Récemment, TARENTINO et MALBY (93) ont décrit l'existence d'une endo-N-acétylglucosaminidase dans les tissus de l'oviducte de poule.

Enfin, STIRLING (88) a isolé du foie humain une chitobiase de masse moléculaire faible (25-50 000 daltons) qui hydrolyse la liaison O-glycosidique du chaînon disaccharidique  $\text{GlcNAc}^{\beta 1-4}\text{GlcNAc}$  et qui est inactive sur le 4-méthyl-ombelliféryl-N-acétyl- $\beta$ -glucosaminide.

### c) Règne bactérien

La découverte que les endo $\beta$ -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 (72) 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 $\beta$ -N-acétylglucosaminidase D de Diplococcus pneumoniae, décrite

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

Enzymes	pH optimum	Masse moléculaire	Références
<i>Bacillus subtilis</i>	5	60 000	FAN et BECKMAN ( 31 )
<i>Streptomyces griseus</i>	5,5 à 6	28 000	TARENTINO et MALEY (92)
<i>Clostridium perfringens</i>	5,5		CHIEN et al (18)
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	6,5		KOIDE et MURAMATSU ( 55 )
Foie de Porc	7		NISHIGAKI et al ( 73 )
Oviducte de Poule	5,5	56 000	TARENTINO et MALEY ( 93 )

par MURAMATSU (71) est active sur les glycopeptides des immunoglobulines de Myélome de souris. KOIDE et MURAMATSU (55) ainsi que ITO et al (46) ont montré la nécessité de la présence d'un résidu de mannose non substitué branché sur l'ose en 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 (94). La liaison  $\beta$ -1-4-N-acétylglucosaminide du résidu di-N-acétylchitobiose présent dans de nombreuses glycoprotéines est hydrolysée par cette enzyme. TARENTINO et MALEY (92) 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 (18) ont mis en évidence une endo- $\beta$ -N-acétylglucosaminidase. Cette enzyme hydrolyse le glycopeptide  $\text{Asn}(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_5$  en libérant le chaînon  $\text{AsnGlcNAc}$ .

Enfin, FAN et BECKMAN (31) ont montré que Bacillus subtilis synthétise une endo- $\beta$ -N-acétylglucosaminidase qui hydrolyse le peptidoglycane de Micrococcus lysodeikticus.

### 3 - Propriétés physicochimiques des endo-N-acétylglucosaminidases

Quelques propriétés physico-chimiques des endo- $\beta$ -N-acétylglucosaminidases d'origines diverses, ont été comparées à celles de Bacillus subtilis et sont résumées dans le tableau IV.

### 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 (93) ont comparé les spécificités d'action des endo- $\beta$ -N-acétylglucosaminidases de Diplococcus pneumoniae et de Streptomyces plicatus. L'endo-glycosidase 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



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

Nature du glycopeptide	L S. griseus TARENTINO et al (95)	H ARAKAWA et al (4)	D D. pneumoniae TARENTINO et MALEY (93)	Bacillus subtilis FAN et BECKMAN (31)
Asn(GLNac) <sub>2</sub> Man	+	-	-	-
Asn(GLNac) <sub>2</sub> Man <sub>5</sub>	-	+	+	+
Asn(GLNac) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> Fuc	-	-	+	-
Asn(GLNac) <sub>2</sub> (Man) <sub>3</sub> GLNac	-	-	+	+
Peptidoglycane				+



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- $\beta$ -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- $\beta$ -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- $\beta$ -N-acétylglucosaminidase (FAN et BECKMAN (31)). Cette enzyme est inactive sur le p-nitrophényl-N-acétylglucosaminide.

## II - L'endo- $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase

### A - Définition

L'endo- $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase de Diplococcus pneumoniae, isolée par ENDO et KOBATA (29), a la propriété d'hydrolyser les glycopeptides en libérant des chaînons Gal- $\beta$ -1-3-GalNAc avec la N-acétylgalactosamine en position terminale réductrice.

### B - Spécificité d'action

Cette enzyme hydrolyse les glycannes des glycoprotéines désialylées des membranes érythrocytaires humaines. Son substrat spécifique est le glycopeptide Gal  $\beta$ (1-3)GalNAc  $\alpha$ 1-Ser ou Thr.

### C - Propriétés physicochimiques

Le Ph optimum d'activité de l'endo- $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase est de 6. Elle est inhibée à 60 p 100 par le p-chloromercuribenzènesulfonate 1 mM et à 63 p 100 par l'éthylènediamine tétracétique 2,5 mM. Elle perd 50 p 100 de son activité à pH 5,5 et à pH 7.

### III - L'endo-galactosaminidase

#### A - Définition

L'endo-galactosaminidase hydrolyse les liaisons o-glycosidique d'un polysaccharide et conduit à la formation de chaînons possédant une galactosamine en position terminale réductrice. Ce type d'enzyme a été isolé d u milieu de culture de Streptomyces griseus par REISSIG et al (79).

#### B - Spécificité d'action

L'endo-galactosaminidase de Streptomyces griseus (79) hydrolyse les liaisons GalNH<sub>2</sub>-GalNH<sub>2</sub> 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 physico-chimiques

L'enzyme de Streptomyces griseus a un pH optimum d'action de 5,4 et conserve 50 p 100 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.

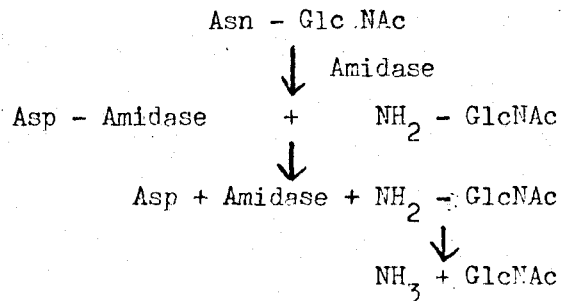
Nous étudierons les deux types mis en évidence : la 4'-L-Aspartylglycosylamine amido hydrolase et l'endo-N-acétylmuramyl-L-alanine amidase.

#### 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 (90) :



## 2 - Répartition

Cette enzyme a été mise en évidence par MURAKAMI et EYLAR (70) dans l'épididyme de porc et de bouc. LEE et al (57) l'ont caractérisée dans les émulsions d'amande douce et MAKINO et al (62) chez *Proteus vulgaris*. L'enzyme a été purifiée et isolée du sérum de porc par MAKINO et al (61) et de l'oviducté de poule par PLUMMER et al (78).

## 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<sub>2</sub> 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.

## 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 (60)) possède une masse moléculaire de 31 000 daltons alors que celle de l'oviducté de poule isolée par TARENTINO et MALEY (91) 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  $\text{NH}_2$  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 GRUYSEN et al (37). FAN et BECKMAN (30) 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 (31)).

### 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 (31), 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 (31).

MATERIEL et METHODES

\*\*\*\*\*

Préparation et analyse de l'extrait  
macromoléculaire ou mucus isolé à  
partir des milieux de fermentation

La mise au point du procédé de préparation du mucus extrait du milieu de fermentation "Amylase Bactérienne", a été réalisée en collaboration avec la Société RAPIDASE. Afin d'obtenir un extrait macromoléculaire homogène, nous avons traité 170 l du milieu de fermentation 895 ayant une viscosité de 35 centipoises.

I - Préparation du mucus

Le mucus a été préparé suivant la méthode décrite dans la figure 9 .

A - Filtration sur perlites et terre de diatomées

La viscosité du milieu de fermentation est telle qu'une dilution est nécessaire pour pouvoir réaliser les opérations de filtration : les 170 l du moût de fermentation sont dilués à 680 l.

La filtration sur perlites et terre de diatomées permet d'obtenir une phase clarifiée suffisamment épurée de débris macroscopiques et des germes bactériens. C'est cette phase que nous traitons pour isoler le mucus visqueux.

B - Filtration stérile

La phase clarifiée précédemment, renferme des germes bactériens qui sont éliminés par une opération de filtration sur cartons stériles C<sub>5</sub> et E.K.S. Du toluène est additionné au filtrat pour éviter les infections bactériennes au cours des opérations suivantes. Le volume du filtrat stérile est de 540 l.

C - Ultrafiltration

Le filtrat stérile est concentré sur membrane Amicon 50000. Le filtrat est supprimé et la phase résiduelle est alors lavée cinq fois pour éliminer les micromolécules ainsi que certaines enzymes, amylases et protéases, dont la masse moléculaire est inférieure à 50000 daltons. Le volume de la phase résiduelle concentrée est de 24,5 l.

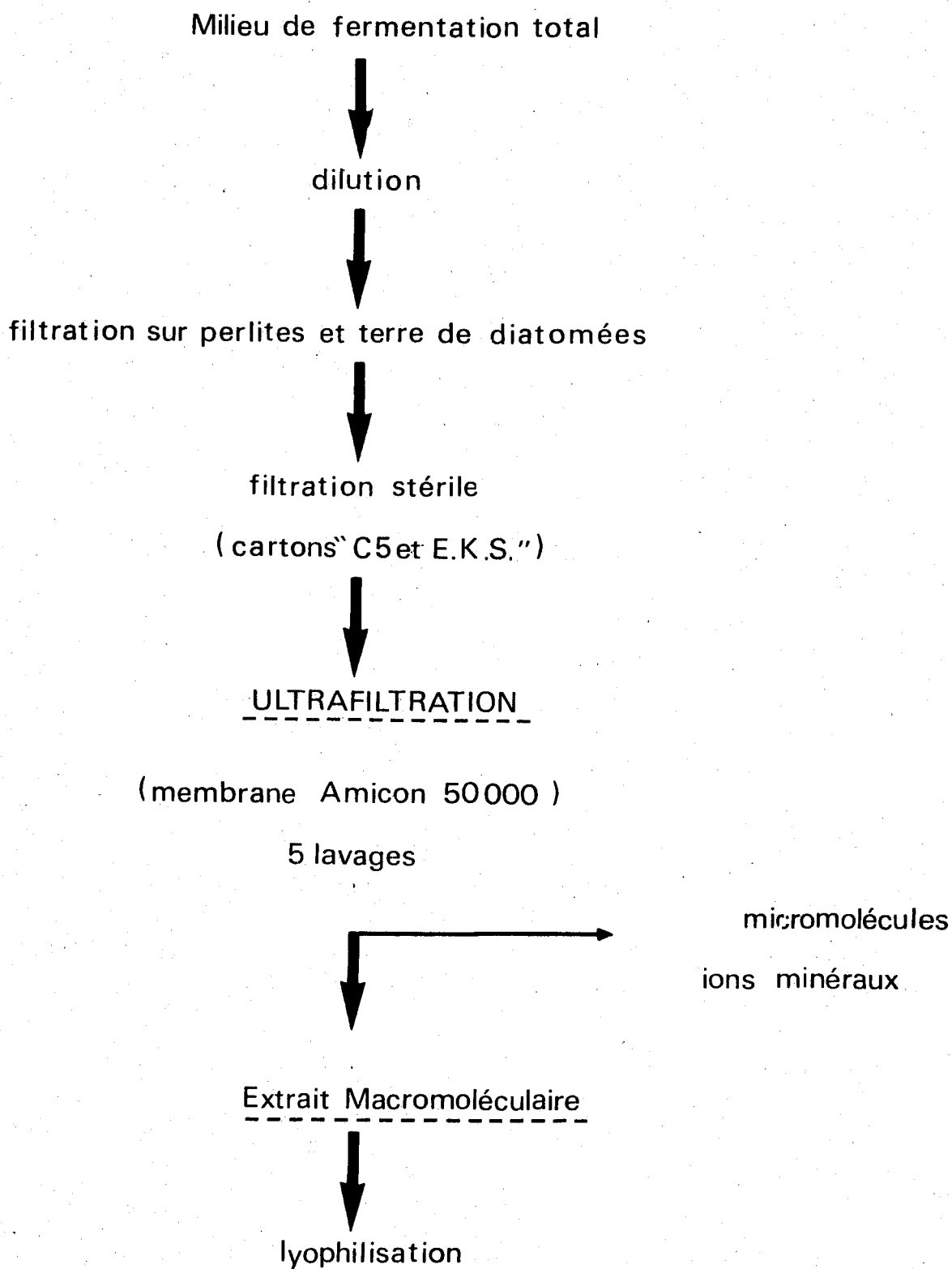


Figure 9 : schéma de la préparation de l'extrait visqueux



## D - Lyophilisation

Le mucus macromoléculaire visqueux est lyophilisé et est placé à 4°C afin d'assurer sa conservation. Les différentes analyses seront réalisées sur ce matériel.

## II - Fractionnement du mucus sur colonne d'échangeur d'ions

Le fractionnement du mucus sur colonne échangeur d'anions, type DOWEX 1 x 2, est réalisé selon les techniques préconisées par HAMADA et al (39).

### A - Mode opératoire

La résine utilisée est un échangeur d'anions du type DOWEX 1 x 2, 200 - 400 mesh, forme H<sup>+</sup>. La régénération de la colonne est réalisée par le passage d'HCL 1 N (5 fois le volume de la colonne). La résine est ensuite lavée par de l'eau distillée, jusqu'à ce que l'effluent soit à un pH de 6,8.

1 mg de mucus lyophilisé, repris par 10 ml d'eau distillée, est injecté sur la colonne de DOWEX 1 x 2 (3 x 70 cm). La colonne est lavée par le passage de 500 ml d'eau distillée puis elle est éluée par un gradient linéaire de molarité croissante, de 0 à 1 M, en acide chlorhydrique (flacons de 800 ml). Le débit d'éluion de la colonne est de 15 ml/h et les fractions recueillies ont un volume de 5 ml.

### B - Isolement des fractions

Les différentes fractions repérées selon les méthodes décrites page 40, sont collectées et l'acide chlorhydrique est neutralisé par de la soude 0,5 N. Les fractions sont ensuite dialysées contre 100 fois leur volume d'eau distillée et elles sont lyophilisées.

## III - Méthodes analytiques d'étude du mucus

### A - Dosage et identification des glucides

#### 1 - Méthodes colorimétriques de dosage des monosaccharides

Un extrait sec est réalisé sur chaque échantillon pour pouvoir donner une valeur pondérale exacte. Les méthodes colorimétriques qui seront décrites ont été utilisées pour le repérage des fractions obtenues à partir du mucus par chromatographie sur colonne d'échangeur d'ions (DOWEX 1 x 2).

a) dosage des oses neutres

Les oses neutres sont dosés par la méthode à l'orcinol de TILLMANS et PHILIPPI (97) modifiée par RIMINGTON (80). Ce dosage est réalisé simultanément avec celui des acides uroniques afin d'éliminer les interférences, selon le principe décrit par MONTREUIL et SPIK (68). La composition en monosaccharides des témoins est celle des produits à étudier.

La méthode au phénol-sulfurique (68) n'a été utilisée que pour le repérage des composés glucidiques obtenus au cours des différents fractionnements.

b) dosage des acides uroniques

Le dosage des acides uroniques est effectué selon la méthode de DISCHE (24) au carbazol, les interférences dues aux oses neutres sont éliminées selon la méthode décrite par MONTREUIL et SPIK (68).

c) dosage des hexosamines

Pour la détermination de la composition centésimale en hexosamines, nous avons utilisé la méthode colorimétrique d'ELSON - MORGAN modifiée (MONTREUIL et SPIK (68)) après hydrolyse chlorhydrique.

L'hydrolyse est effectuée en tubes scellés sous vide par l'acide chlorhydrique redistillé 4 N pendant 4 heures à 100°C.

2 - Procédés d'identifications des monosaccharidesa) procédé d'hydrolyse $\alpha$  - libération des monosaccharides neutres et acides

Afin d'identifier les monosaccharides, les produits sont hydrolysés par HCL 2 N, pendant 2 heures à 100°C.

 $\beta$  - libération des hexosamines

Les hexosamines sont mises en évidence après hydrolyse chlorhydrique 4N, 4h, 100°C.

b) procédé de purification

Les hydrolysats dilués sont chromatographiés sur colonnes couplées de DOWEX 50 x 8, 15-50 mesh, forme acide et de DUOLITE A 102 D, 25-50 mesh, forme formiate (69).

c) identification des monosaccharides par chromatographie sur papier

Les hydrolysats purifiés sont chromatographiés sur papier Whatman 3 dans le solvant de FISCHER et NEBEL (32) : pyridine /acétate d'éthyle/ acide acétique/eau ( 5 : 5 : 1 : 3) pendant 18 heures. Les monosaccharides neutres et acides sont révélés par les réactifs à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (77) et au nitrate d'argent de TREVELYAN (99). Les osamines sont mises en évidence à l'aide de réactifs à la ninhydrine.

3 - Procédé de détermination de la composition molaire glucidique

La composition molaire glucidique des fractions polysaccharidiques a été établie par chromatographie en phase gazeuse selon le procédé de ZANETTA et al (107) adapté au laboratoire par FOURNET (34).

Les polysaccharides sont méthanolysés par le mélange méthanol/HCl 0,5 N pendant 24 heures à une température de 80°C. Les dérivés O-méthylglycosidés sont pertrifluoracétylés par le mélange anhydride trifluoroacétique/dichlorométhane (1 : 1) et sont ensuite chromatographiés sur colonne d'OV 210 sur Varaport 30. La longueur de la colonne de verre est de 3 m, le diamètre intérieur est de 1/4". Le gaz vecteur est l'azote. La température est programmée de 110 à 230°C à raison de 1°C/mn. Le témoin interne utilisé est le mésoinositol.

B - Dosage des protéines et identification des acides aminés

1 - Dosage des protéines

Le taux de protéines du mucus et de ses différentes fractions a été estimé selon deux méthodes :

a) dosage de l'azote par la méthode de KJELDAHL

Le dosage fait sur des échantillons de sérum-albumine, permet de déterminer le rendement de l'opération. La teneur en azote protéinique est calculée en tenant compte de la valeur de l'azote glucidique des osamines.

b) dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al (59)

Le taux de protéines est déterminé en fonction d'une gamme étalon de sérum-albumine.

## 2 - Identification des acides aminés

L'identification des acides aminés est réalisée après hydrolyse par HCl 5,6 N redistillé, sous vide, à 105°C, pendant 24 heures. Les échantillons sont ensuite analysés à l'aide de l'Auto-analyseur Beckman Multichrom selon le principe général de SPACKMAN et al (87).

### C - Dosage du phosphore

Le phosphore organique est dosé suivant la méthode de ALLEN (2) après minéralisation des échantillons. Cette méthode est également utilisée lors des fractionnements pour le repérage des composés phosphorylés.

### D - Mise en évidence des glycérophosphates

#### 1 - Hydrolyse et purification

##### a) hydrolyse chlorhydrique

Un échantillon de la fraction V est hydrolysé par HCl 2 N pendant deux heures à 100°C pour libérer les monosaccharides. L'acide chlorhydrique est évaporé sous vide en dessiccateur en présence de soude.

##### b) dégradation alcaline

Le résidu sec est ensuite traité par la soude 0,5 N à 100°C pendant 1 h. La solution est ensuite neutralisée par de l'acide formique.

##### c) purification

La solution neutralisée, diluée, est chromatographiée sur une colonne de DUCLITE A 102 D (1 x 20 cm), forme formiate. La fraction correspondant au lavage de la colonne par l'eau, est éliminée. La colonne est ensuite éluée par de l'HCl 1 N. Cette solution est évaporée à siccité.

#### 2 - Chromatographie sur papier

Les glycérophosphates sont chromatographiés sur papier W 3, préalablement lavé à l'eau distillée, dans le système solvant : butanol/pyridine/eau (6 : 4 : 3) (HAMADA et al (39)) pendant 15 h.

Le chromatogramme est révélé par le réactif de HANES et ISHERWOOD (41). Les composés phosphorés apparaissent sous forme de taches bleues sur fond blanc après exposition à la lumière (MONTREUIL (67)).

## E - Etude viscosimétrique

### 1 - 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°C pendant 2 heures. Les mesures des temps d'écoulement sont réalisés par l'intermédiaire d'un dispositif photoélectrique.

### 2 - Mode opératoire

Dans le but d'obtenir un écoulement régulier dans le tube viscosimétrique, 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, pH 6,5. La solution la plus concentrée a un titre C de 15 mg/ml. Les dilutions réalisées automatiquement sont : C, 2C/3, C/2, C/3, C/4. La viscosité intrinsèque est déterminée graphiquement en extrapolant à concentration nulle la courbe:

$$\frac{t - t^0}{t^0 C}$$

avec:

t: temps d'écoulement de la solution

t<sup>0</sup>: temps d'écoulement du solvant

C: concentration en g/ml

## IV - Etude de la fraction F<sub>IV</sub>

La fraction F<sub>IV</sub>, isolée du mucus par chromatographie d'échange d'ions, présente une viscosité importante et elle est le substrat de l' "ENZYME X". C'est pourquoi nous nous sommes plus particulièrement attachés à son étude.

### A - Purification

L'étude des profils d'élution obtenus montre que la

fraction  $F_{IV}$  est contaminée par les fractions  $F_{III}$  et  $F_V$ . Pour purifier la fraction  $F_{IV}$ , il est nécessaire de rechromatographier cette fraction sur la colonne de DOWEX 1x2 dont les caractéristiques ont été décrites précédemment.

Après neutralisation et dialyse, la fraction  $F_{IV}$  obtenue après un premier fractionnement, est concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à un volume de 10 ml. Cette solution est déposée sur la colonne qui est stabilisée par le passage de 300 ml d'eau distillée. La colonne est ensuite éluée par un gradient linéaire en acide chlorhydrique de 0 à 0,5 N (flacons de 800 ml). La conduite du fractionnement est identique à celle décrite pages 39-40 et la fraction  $F_{IV}$  repurifiée est traitée de manière similaire.

#### B - Détermination de la masse moléculaire

La masse moléculaire de la fraction  $F_{IV}$  a été déterminée à l'équilibre de sédimentation selon la méthode décrite par CHERVENKA (17). L'expérimentation a été réalisée avec l'Ultracentrifugeuse analytique BECKMAN modèle E. L'ultracentrifugation s'est déroulée à 20°C pendant 24 h à 10000 t/mn. Les échantillons ont une concentration de 0,5 mg/ml dans le tampon Tris - HCl de pH 7,25, 0,1 M.

#### C - Composition en oses

Les caractères particuliers de viscosité et de masse moléculaire de la fraction  $F_{IV}$ , ainsi que la difficulté d'établir une composition centésimale exacte en oses neutres et en acides uroniques, nous ont conduit à employer des techniques permettant d'une part d'obtenir une hydrolyse quantitative des liaisons O - glycosidiques et d'autre part de rechercher la présence de constituants glucidiques particuliers.

##### 1 - Réduction des acides uroniques

Les liaisons uronosidiques sont parmi les plus stables. La réduction des acides uroniques en leurs homologues oses neutres diminue la stabilité de la liaison et permet d'employer les techniques classiques d'hydrolyse des liaisons O-glycosidiques.

##### a) Réduction de l'acide glucuronique libre

Le principe général de la réduction de l'acide glucuronique

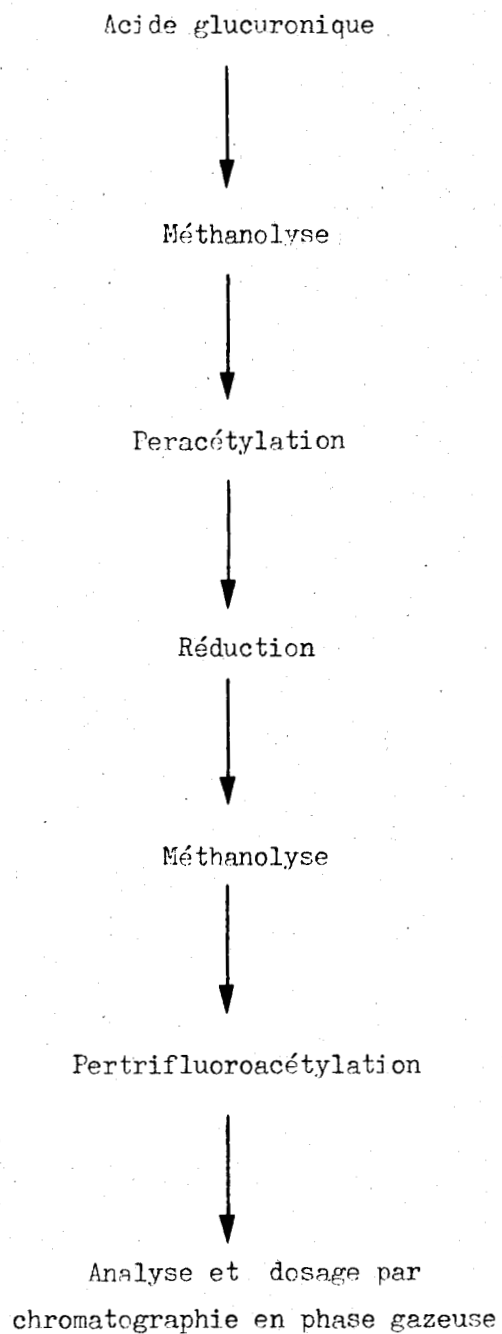


Figure : 10 Schéma général de la réduction de l'acide glucuronique

en glucose, consiste en la réduction de la fonction carboxylique du carbone 6 sans réduction de la fonction carbonyle réductrice du carbone 1.

Pour cela, 1 mg d'acide glucuronique est O - méthylglycosidé par le mélange méthanol - HCl 0,5 N pendant 24 h à 80°C. Ce dérivé glycosidique est ensuite peracétylé, après séchage sous courant d'azote, par le mélange pyridine - anhydride acétique 1:1 (V/V) pendant 1 nuit à 20°C. La peracétylation permet la solubilisation du composé dans le tétrahydrofurane qui est le solvant de la réduction.

Après séchage sous courant d'azote, le résidu sec obtenu est repris par 1 ml de tétrahydrofurane et est introduit dans un ballon réacteur à 3 entrées. L'entrée du ballon est reliée à un réfrigérant droit surmonté d'un piège à CaCl<sub>2</sub>. La seconde voie permet de maintenir l'ensemble sous atmosphère d'azote. Les différents réactifs sont introduits à l'aide d'une seringue dans le réacteur par la troisième entrée qui est munie d'un septum. L'appareillage est purgé par l'azote pendant 15 mn.

La réduction proprement dite consiste en l'addition de 0,5 ml x 3 de borane - méthyl - sulfide (B.M.S) fourni par la firme Aldrich. Ce réactif est introduit à l'aide d'une seringue goutte à goutte dans le ballon. Le mélange est ensuite maintenu sous agitation constante pendant 4h. à la température ambiante. L'arrêt de la réduction est effectuée par l'addition de méthanol anhydre, goutte à goutte, pendant 1h sous agitation. La solution est ensuite séchée sous courant d'azote.

Le résidu sec obtenu est alors méthanolysé dans les conditions décrites précédemment et le glucose formé est dosé par chromatographie en phase gazeuse.

#### b) Réduction des acides uroniques de la fraction F<sub>IV</sub>

Le protocole de la réduction des acides uroniques de la fraction F<sub>IV</sub> est décrit par la figure 11 .

Le polysaccharide est méthanolysé et les liaisons O - glycosidiques les plus labiles sont rompues. Les fonctions semi - aldéhydiques des oses et osides sont méthyl-estérifiées et ainsi protégées. Les produits sont ensuite peracétylés et sont solubilisés dans le tétrahydrofurane. La réduction par le B.M.S est identique à celle de l'acide glucuronique et les monosaccharides sont dosés par chromatographie en phase gazeuse. Le témoin interne, mésoinositol, subit toutes les opérations de la réduction .



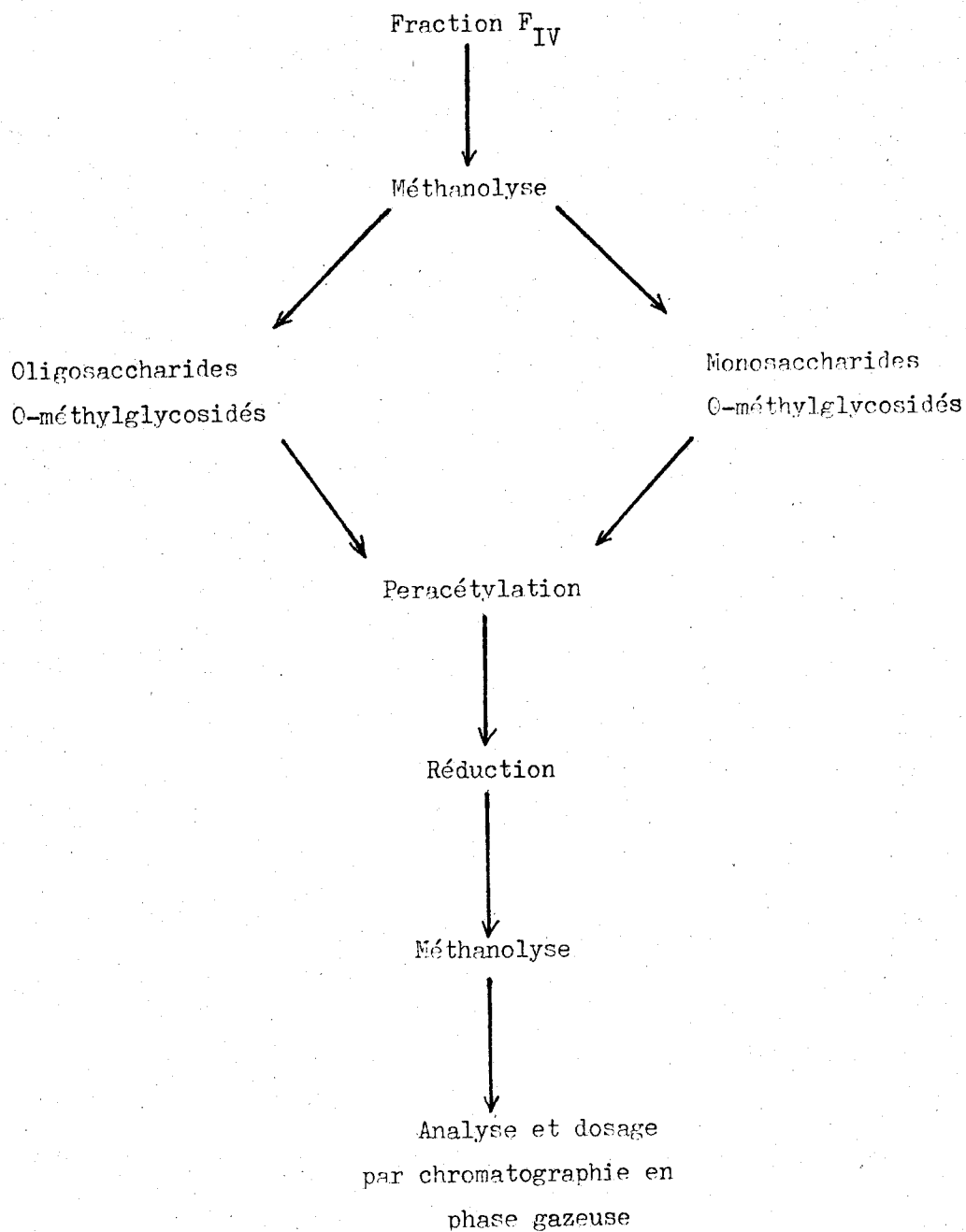


Figure : 11 Schéma général de la réduction des acides uroniques de la fraction F<sub>IV</sub>



2 - Mise en évidence du 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucosea) Isolément et purification

La mise en évidence, l'isolément et la purification du 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose ont été réalisés à partir de la fraction F<sub>IV</sub> selon le procédé mis au point par SHARON et JEANLOZ (84) (Figure 12). Nous avons traité de manière comparative 132 mg du polysaccharide synthétisé par Bacillus licheniformis (ATCC 9945) et 3 mg du 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose. Ces deux produits nous ont été obligeamment fournis par le Dr. SHARON.

Les différentes étapes de la préparation du diacétamidohexose ont été les suivantes :

α. Hydrolyse sulfurique

Les polysaccharides de Bacillus licheniformis, de Bacillus subtilis (fraction F<sub>IV</sub>) et le 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose sont hydrolysés par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, sous reflux à 100°C pendant 6 h. L'hydrolyse est réalisée de manière à ce que la concentration des polysaccharides et du diacétamidohexose ne dépasse pas 15 mg/ml.

β. Chromatographie d'échange d'ions sur colonne de DCWEX 50 × 8 selon BOAS ( 11)

La résine échangeuse d'ions est le Dowex 50 × 8 (25 - 50 mesh). Les dimensions des colonnes utilisées sont de 3 × 40 cm.

Après dilution des hydrolysats sulfuriques et leur injection sur la colonne de Dowex 50 × 8, celle-ci est éluée par :

- 500 ml d'eau distillée : fraction A (F<sub>A</sub>)
- 300 ml d'HCl 0,5 N : fraction B (F<sub>B</sub>)
- 300 ml d'HCl 1 N : fraction C (F<sub>C</sub>)
- 300 ml d'HCl 2 N : fraction D (F<sub>D</sub>)

L'acide chlorhydrique des fractions est éliminé sous forme d'azéotrope avec de l'éthanol absolu, par distillation sous pression réduite à l'évaporation rotatif.

L'opération est répétée trois fois.

γ. Chromatographie d'échange d'ions sur colonne de DOWEX 50 × 8 selon GARDELL (35)

La résine échangeuse d'ions est le Dowex 50 × 8 (200 - 400 mesh) stabilisée dans 1'HCl 0,3 N. Les dimensions des colonnes sont : 0,5 × 100 cm.

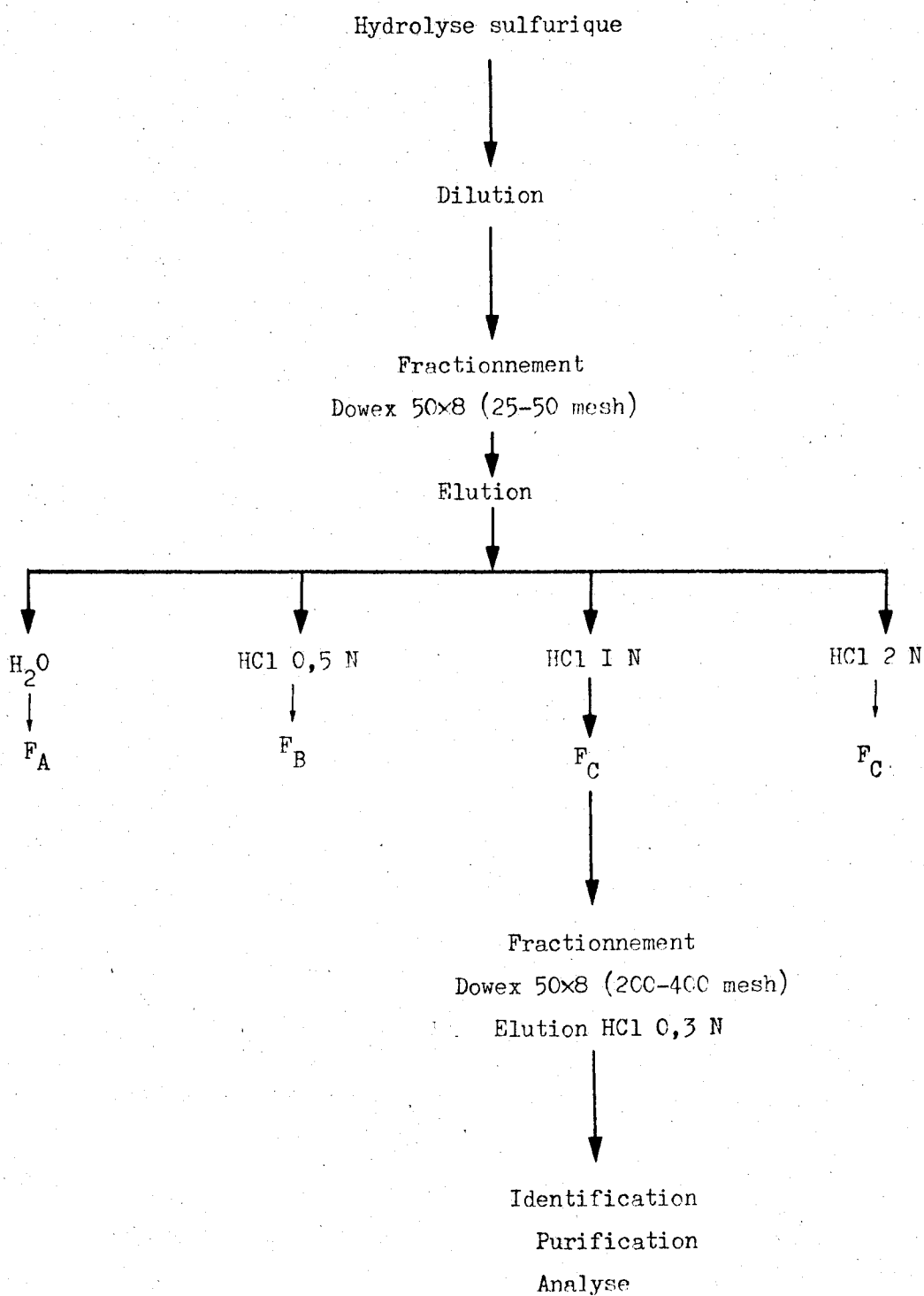


Figure : 12 Schéma général de la mise en évidence du 2,4-acétamido-2,4,6-tridéoxyglucose selon SHARON et al (84 )

L'échantillon à analyser est repris par 100  $\mu$ l d'HCl 0,3 N et est chromatographié sur la colonne. Cette colonne est éluée par de l'HCl 0,3 N. Le débit est de 7,5 ml/h et les fractions recueillies sont de 2,5 ml.

Après séchage sous vide en présence de soude, les fractions sont reprises par 1 ml d'eau bidistillée. Une prise d'essai de 100  $\mu$ l est réalisée, sur laquelle nous effectuons le dosage d'ELSON-MORGAN modifié.

b) Identification par chromatographie et électrophorèse du papier

$\alpha$ - Chromatographie sur papier

Les différentes fractions isolées par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de DOWEX 50  $\times$  8 selon GARDELL sont chromatographiées sur papier W<sub>2</sub> dans les systèmes solvants de PARTRIDGE (75) et de FISCHER et NEBEL (32).

Les durées de chromatographie sont respectivement de 48 h dans le cas de l'utilisation du solvant de PARTRIDGE et 18 h dans le système solvant de FISCHER et NEBEL. Les chromatogrammes sont révélés par le réactif au nitrate d'argent et par le réactif à la ninhydrine.

$\beta$ - Electrophorèse

Les électrophorèses sont réalisées sur papier W<sub>2</sub> en utilisant le tampon de MICHL (66) à pH 3,9. Les conditions opératoires sont : tension 10 Volt/cm, durée : 4 h.

Les électrophorogrammes sont révélés par le réactif à la ninhydrine et par le réactif au nitrate d'argent.

c) Identification et caractérisations du 2,4-diacétamido-2,4,6-trid'oxyglucose par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse

$\alpha$ - Préparation des alditols peracétates

Le composé glucidique isolé par chromatographie d'échange d'ions selon GARDELL est le 2-amino-4-acétamido-2,4,6-trid'oxyglucose (SHARON et JEANLOZ (34)). Son étude par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse nécessite sa modification en peracétyl-2,4-diacétamido-2,4,6-trid'oxyglucitol deutéré. La première étape du traitement du produit est sa N-acétylation. Nous avons adopté le procédé de N-acétylation de WHITE (100).

1 mg du produit est dissous dans 90  $\mu$ l de méthanol anhydre. 30  $\mu$ l d'anhydride acétique sont additionnés à la solution ainsi que 2 mg d'acétate d'argent. Le mélange est conservé 6 h à la température du laboratoire et à l'obscurité.

Le mélange est filtré sur laine de verre qui est ensuite lavée abondamment par du méthanol anhydre. Le filtrat est séché sous courant d'azote.

La deuxième étape consiste en la réduction par le borodutérure de sodium du résidu sec.

Le produit obtenu précédemment est dissous dans 1 ml d'eau bidistillée. 10 mg de borodutérure de sodium sont ajoutés à la solution qui est conservée une nuit à la température du laboratoire. La solution est alors neutralisée et amenée à pH 4 par la projection de Dowex 50 x 8 (25-50 mesh, forme acide). La solution neutralisée est filtrée sur laine de verre. Le filtrat est séché à l'évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris plusieurs fois par 5 ml de méthanol anhydre et séché sous vide afin d'éliminer l'acide borique.

La synthèse du peracétyl-2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucitol deutéré est réalisée en traitant le produit réduit par 300  $\mu$ l du mélange pyridine/anhydride acétique (1 : 1) pendant 1 nuit à la température ambiante. La pyridine et l'anhydride acétique sont éliminés par séchage sous courant d'azote.

#### $\beta$ - Identification par chromatographie en phase gazeuse

L'identification du peracétyl-2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucitol deutéré préparé à partir des polysaccharides de Bacillus subtilis et Bacillus licheniformis, a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un chromatographe Varian aerograph modèle 1200. La colonne utilisée est une colonne en verre d'OV 17 3 p 100 sur chromosorb W (A-W) DMCS (100-120 mesh). Cette colonne a une longueur de 3 m et le diamètre intérieur est de 2 mm. Le gaz vecteur est l'azote et son débit est de 20 ml/mn. La température de la colonne est de 230°C. L'injecteur et le détecteur sont à une température de 230°C.

#### $\gamma$ - Caractérisation par chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse

L'étude du peracétyl-2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucitol deutéré a été réalisée par spectrométrie de masse. L'appareil utilisé est un spectromètre Perkin-Elmer modèle 270 B couplé à un chromatographe en phase gazeuse Varian aerograph modèle 1520 B.

Les expérimentations ont été réalisées dans les conditions suivantes :

- la spectrométrie de masse a été réalisée sous une énergie d'ionisation de 70 eV et un courant d'ionisation de 80 A. La température de la chambre d'injection est de 170°C.

- la température de la colonne de chromatographie en phase gazeuse est de 230°C.

Les spectres de masse ont été enregistrés au maximum d'intensité des pics chromatographiques.

Ce travail a pu être réalisé grâce à la collaboration scientifique du Dr. MAYER du Max-Planck Institut de Freiburg. L'analyse des résultats obtenus a été faite en collaboration avec le Dr. FOURNET.

### 3 - Mise en évidence de la présence de résidus d'hexosamines non acétylés dans la fraction F<sub>IV</sub>

La désamination nitreuse des hexosamines non acétylées conduit à la formation du 2,5 anhydrohexose correspondant. Lorsqu'une hexosamine qui se situe à l'intérieur d'une chaîne polysaccharidique est désaminée, la liaison O-glycosidique est rompue avec la formation du 2,5 anhydrohexose en position terminale réductrice (HOOK et al (43)). Le schéma réactionnel est indiqué dans la figure 13.

#### a) Mode opératoire

3,5 mg de la fraction F<sub>IV</sub> sont incubés, à température ambiante, dans 800 µl d'une solution de nitrite de sodium-acide acétique (3,9 N/0, 28 M) préparée extemporanément, pendant 10 mn.

L'incubation est ensuite neutralisée par 8 ml d'acide acétique 1 M. La solution est dessalée par passage sur une colonne de Dowex 50 x 8 (25-50 mesh) forme acétate. L'élution est réalisée par de l'acide acétique 1 M. L'effluent est ensuite séché à l'évaporateur rotatif.

#### b) Mise en évidence par chromatographie de tamisage moléculaire des produits de dégradation

La fraction F<sub>IV</sub>, ayant subi la désamination nitreuse, est chromatographiée sur une colonne d'Ultrogel ACA 34. Le gel est stabilisé dans le tampon phosphate 10 mM, pH 6,7. Les dimensions de la colonne sont de 1 X 80 cm. Le débit est de 4 ml/h, les fractions sont de 2 ml. La colonne a été préalablement étalonnée par le passage d'une solution de la fraction F<sub>IV</sub> native et du Bleu dextran dans les mêmes conditions.

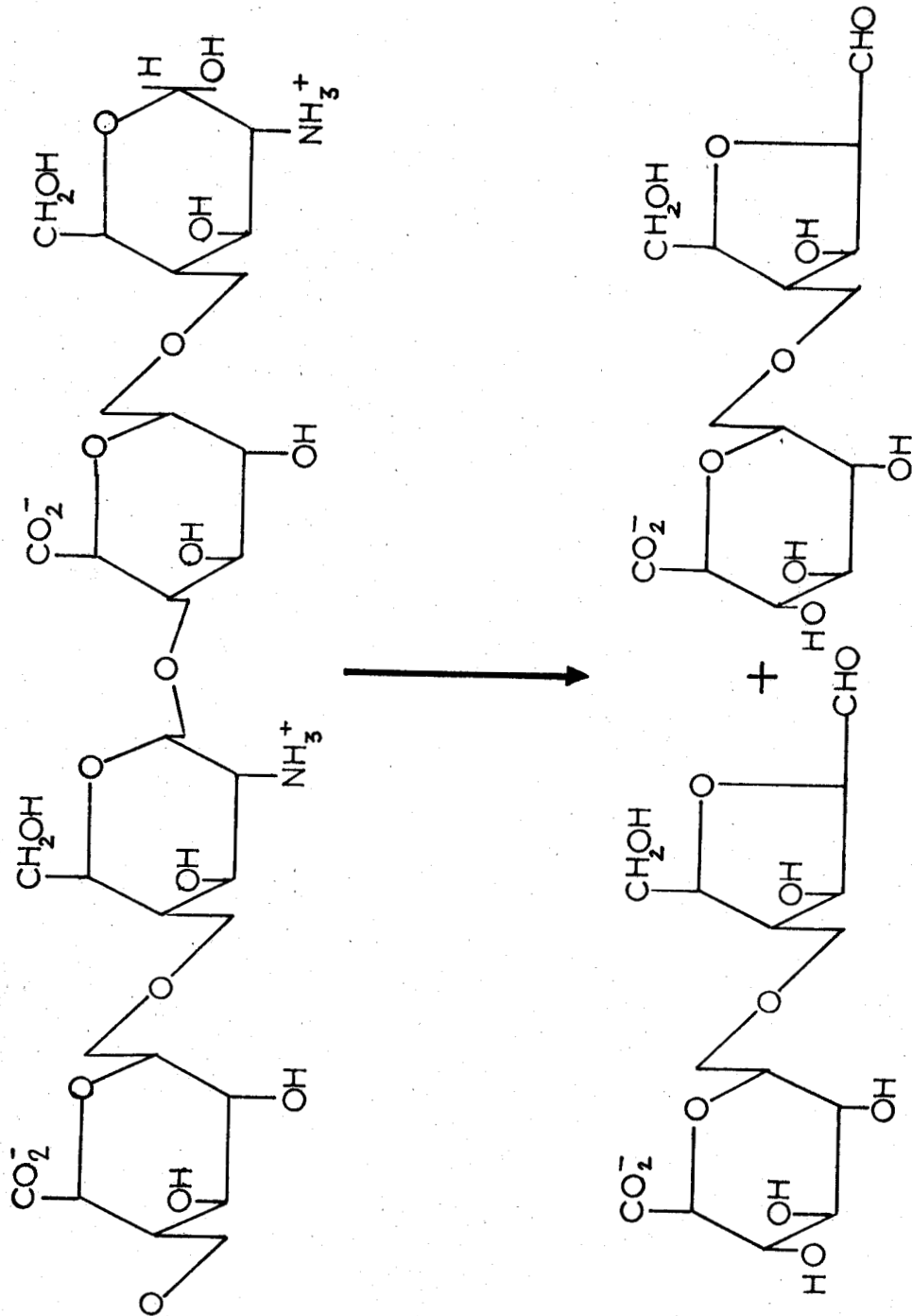


Figure 13 : Schéma de la désamination nitreuse de l'héparine selon HOOK et al (43)

## V - Hydrolyse enzymatique de la fraction F<sub>IV</sub>

L' " Enzyme X " utilisée par la Société RAPIDASE se présente sous la forme d'une poudre atomisée soluble dans les solvants aqueux. Une solution enzymatique a la propriété de diminuer la viscosité des moûts de fermentation visqueux de Bacillus subtilis.

Nous exposerons brièvement le procédé de purification de l' " Enzyme X " que nous avons mis au point en collaboration avec DELEBASSEE. Les méthodes employées pour montrer que la fraction F<sub>IV</sub> est le substrat spécifique de l'enzyme seront décrites avec plus de précisions.

### A - Isolement et purification de l'enzyme

#### 1 - Définition de l'activité enzymatique

La force enzymatique d'une solution est déterminée par la mesure de l'abaissement de 15 p 100 de la viscosité d'un moût de fermentation de Bacillus subtilis ( comprise entre 17 et 35 centipoises ). La valeur de 100 unités correspond arbitrairement à la quantité d'enzyme nécessaire pour faire baisser la viscosité de 15 p 100 en 1 h à 40 °C.

#### 2 - Purification de l' " Enzyme X "

Nous purifions l' " Enzyme X " à partir de la poudre atomisée préparée industriellement par la Société RAPIDASE. Les différentes étapes de la préparation de cette enzyme sont décrites dans la figure 14 .

##### a) Précipitation acétonique

100 g d'enzyme atomisée ( 10 000 u/g ) sont dissous dans une solution aqueuse d'éthylène diamine tétraacétique ( EDTA )  $10^{-3}$  M et de phényl méthyl sulfonyl fluorure ( PMSF )  $10^{-4}$  M. L'EDTA inhibe les protéases neutres et le PMSF les protéases alcalines qui dégradent l' " Enzyme X " en solution.

Un volume d'acétone froid , -10 °C , est additionné lentement pendant 1 h sous agitation douce. La précipitation est totale après un séjour de 4 h à une température de -10 °C. Le précipité est recueilli par centrifugation. Toutes ces opérations se déroulent à la température de -10 °C.



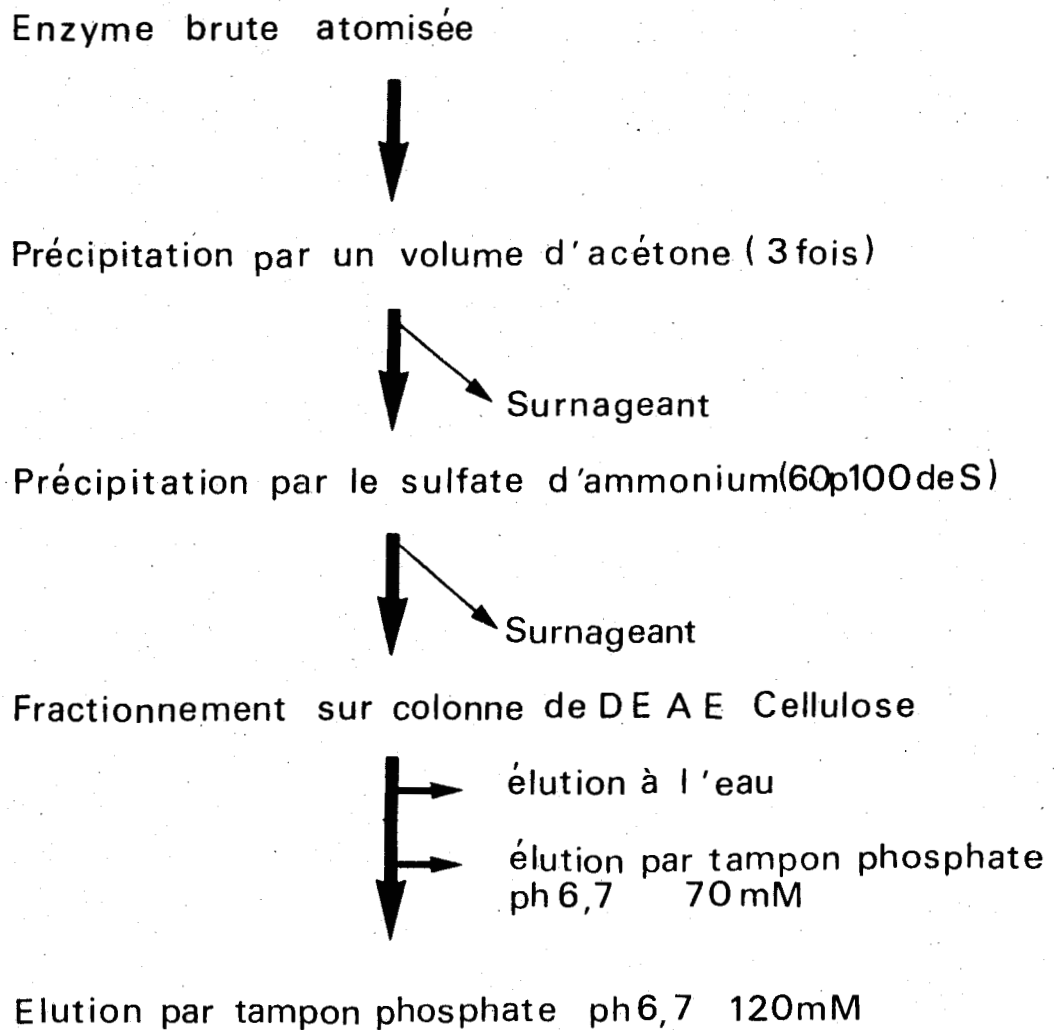


Figure 14: Schéma de la purification de l'enzyme



L'opération est répétée encore deux fois dans des conditions identiques.

b) Précipitation par le sulfate d'ammonium

Le précipité obtenu précédemment, est repris par 100 ml d'eau distillée renfermant de l'EDTA  $10^{-3}$  M et du PMSF  $10^{-4}$  M. Cette solution est alors amenée à 60 p 100 de saturation en sulfate d'ammonium par l'addition, sous agitation constante, de 150 ml d'une solution saturée de  $SC_4(NH_4)_2$ . Après une nuit à 4 °C, le précipité est recueilli par centrifugation : 13 000 t/m, 1 h, centrifugeuse Beckman JA 21. Le précipité est redissous dans un volume minimum de la solution aqueuse contenant de l'EDTA  $10^{-3}$  M et du PMSF  $10^{-4}$  M. Cette solution est dialysée pendant 24 h à 4°C contre une solution identique.

c) Fractionnement sur colonne de DEAE-Cellulose

90 ml de l'adialysat sont amenés à 100 ml par l'addition de tampon phosphate 100 mM, pH 6,7. Cette solution est ensuite chromatographiée sur une colonne de DEAE-Cellulose (2,5 x 30 cm) équilibrée dans le tampon phosphate 10 mM, pH 6,7.

La colonne est éluée par un tampon phosphate 10 mM, pH 6,7 puis par des tampons phosphate pH 6,7 : 70 mM, et 120 mM. Le débit d'élution de la colonne est de 40 ml/h, les fractions recueillies ont un volume de 20 ml.

L'activité enzymatique des fractions est repérée par la mesure de la baisse de viscosité de 15 p 100, en 1 h à 40° C d'un moût visqueux. Cette manipulation est réalisée à l'aide d'un viscosimètre Epprecht type MS-r-1 équipé d'une cuve de 150 ml.

B - Mise en évidence de l'activité endoglycosidasique de la fraction enzymatique purifiée

1 - Conditions d'hydrolyse

a) pH

L'hydrolyse enzymatique de la fraction  $F_{IV}$  a été réalisée dans les conditions de pH déterminées par DELEBASSE (23). Le tampon utilisé est un tampon phosphate, 10 mM, pH 6,7.

b) Température

La fraction  $F_{IV}$  est mise à incuber en présence de la solution enzymatique à 37 °C.

c) Durée d'hydrolyse enzymatique

Pour la mise en évidence de l'activité endoglycosidasique, nous avons choisi une durée d'hydrolyse de 24 h.

d) Mode opératoire

4 mg de la fraction  $F_{IV}$  sont dissous dans 2,2 ml d'eau bidistillée et 0,2 ml d'une solution enzymatique ayant un titre de 3000 unités par ml y sont ajoutés. L'hydrolyse est conduite dans les conditions opératoires décrites précédemment. Une goutte de chloroforme est additionnée pour éviter les infections bactériennes. L'hydrolyse enzymatique est arrêtée par chauffage de l'incubateur à 100 °C pendant 5 mn.

2 - Détermination de la viscosité intrinsèque de la fraction  $F_{IV}$  hydrolysée

La viscosité intrinsèque de la fraction  $F_{IV}$  hydrolysée est déterminée selon la méthode décrite page : 43 .

3 - Etude par chromatographie de tamisage moléculaire des produits de dégradation

La fraction  $F_{IV}$  hydrolysée est chromatographiée sur une colonne de Biogel P-150 stabilisée dans le tampon phosphate pH 6,5 , 10 mM. Les dimensions de la colonne sont de 1x60 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, la fraction  $F_{IV}$  native et par une quantité d'enzyme égale à celle ayant été utilisée pour l'hydrolyse.

4 - Mise en évidence de la diminution de la masse moléculairea) Ultracentrifugation analytique

La fraction  $F_{IV}$  dépolymérisée par l'enzyme est dialysée pendant 3 jours contre de l'eau distillée puis lyophilisée. L'expérimentation a été réalisée avec l'ultracentrifugeuse analytique Beckman modèle E. Les échantillons à

analyser sont dissous dans le tampon Tris- HCl 0,1 M , pH 7,25. Les expérimentations sont réalisées sur : la fraction  $F_{IV}$  native (2 mg/ml), la fraction  $F_{IV}$  hydrolysée (2mg/ml) et la fraction  $F_{IV}$  hydrolysée contenant la fraction native comme marqueur. La vitesse de rotation est de 48 000 t/mn à 20 °C.

b) Détermination de la masse moléculaire par chromatographie de tamisage moléculaire

L'hydrolysate enzymatique de la fraction  $F_{IV}$  a été chromatographié sur une colonne d'Ultrogel AcA 34 (0,8 × 80 cm) qui est stabilisée dans le tampon phosphate 200 mM , pH 6,8. Cette colonne a été étalonnée par le Bleu dextran 2000, la Sérotransferrine, la Sérum albumine bovine, la  $\beta$  globuline et le cytochrome C.

C - Mise en évidence de l'activité endo-N-acétylhexosaminidase de la solution enzymatique

Après hydrolyse enzymatique de la fraction  $F_{IV}$  , il est possible de mettre en évidence, par la méthode colorimétrique de REISSIG et al (MONTREUIL et SPIK ( 68)), l'apparition de résidu de N-acétylhexosamine en position terminale réductrice.

1- Principe

Les N-acétylhexosamines, en position terminale réductrice, dont la fonction alcoolique en 4 est libre, donnent, par chauffage en milieu alcalin, des chromogènes que l'on peut identifier et caractériser.

2- Mode opératoire

L'expérimentation a été réalisée de manière à suivre la baisse de viscosité de la fraction  $F_{IV}$  et l'apparition de groupements N-acétylhexosaminyles en position réductrice.

140 ml d'une solution à 0,04 p 100 de la fraction  $F_{IV}$  , dans le tampon phosphate-citrate 10 mM, pH 6,5 , sont hydrolysés par 2 ml de la solution enzymatique ayant un titre de 3000 U/ml. La température d'incubation est de 25°C.

Les viscosités sont mesurées à l'aide d'un viscosimètre de type Epprecht MS-r-1, aux temps : 0, 1 mn, 2 mn, 5 mn, 10 mn, 15 mn, 30 mn, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 20 h, et 24 h.

Des prises d'essai de 0,4 ml sont réalisées. Ces solutions sont additionnées de 0,2 ml de tampon borate puis placées au bain-marie bouillant pendant 3 mn pour arrêter l'hydrolyse enzymatique. Les N-acétylhexosamines sont alors dosées colorimétriquement.

TRAVAUX PERSONNELS

\*\*\*\*\*

Etude de la préparation et analyse  
physico-chimique du mucus

Le terme de mucus a été donné à l'extrait macromoléculaire isolé des milieux de fermentation visqueux de Bacillus subtilis. Les études antérieures de BETHENCOURT et PLOUVIER (10) et de DELEBASSEE et SAMOR (22) ont montré que les moûts de fermentation pouvaient donner des mucus différents. Ces résultats disparates étaient dus au fait que les méthodes d'isolement du mucus et les quantités de milieu de fermentation traitées, étaient trop faibles. La nature des composants et la viscosité des moûts varient également d'une fermentation à l'autre. Aussi, nous avons choisi de traiter une grande quantité (170 l) d'un moût de fermentation unique : la fermentation 895, présentant une viscosité de 35 centipoises. Nous nous sommes donc attachés, dans un premier temps, à la mise au point d'un procédé de préparation du mucus, puis nous en avons fait son étude physico-chimique.

I - Etude de la préparation du mucus

A - Analyse qualitative du procédé d'isolement du mucus

Les différentes étapes de la préparation du mucus : filtration sur terre de diatomées et perlites, filtration stérile et ultrafiltration sur membrane Amicon 50 000, nous ont permis d'obtenir un extrait macromoléculaire. La méthodologie employée évite le recours à des procédés chimiques d'isolement qui risquent de dénaturer les composants du milieu de fermentation. Nous avons préparé un mucus unique et les méthodes employées reproduisent celles qui sont utilisées pour la préparation de l' $\alpha$  - amylase : ce mucus colmate les filtres employés par la Société RAPIDASE et présente une viscosité élevée.

B - Analyse quantitative

170 litres de la fermentation 895 ont subi les diverses étapes de préparation du mucus. La viscosité du milieu de fermentation total est de 35 centipoises. Nous exprimons cette viscosité en centipoises car il est impossible de calculer la viscosité intrinsèque d'un milieu aussi hétérogène. La solution concentrée sur membrane Amicon 50 000, lavée cinq fois, a un volume de 24,5 l.

La lyophilisation de cette solution donne 120 g d'une poudre contenant 10 p 100 d'eau de condensation. Ce mucus lyophilisé, donne des solutions aqueuses dont la viscosité intrinsèque est de 258,5 ml/g. Ces solutions sont légèrement pigmentées. Le mucus est par contre, insoluble dans les solvants organiques tels que : éther éthylique, méthanol, acétone, tétrahydrofurane.

### C - Conclusions

Le procédé de préparation utilisé, ultrafiltration, nous a permis d'isoler des milieux de fermentation de Bacillus subtilis, un composant de nature macromoléculaire. Les micromolécules, éliminées par les cinq lavages successifs du concentré sur membrane Amicon ne confèrent aucune viscosité à ces effluents et elles ne provoquent pas de phénomènes de colmatage des filtres. C'est le mucus macromoléculaire responsable de la viscosité que nous étudierons.

## II - Etude physico-chimique du mucus

Nous avons essayé de caractériser le mucus par l'étude de sa composition centésimale en glucides, en protéines et en phosphore.

### A - Composition centésimale glucidique

Les résultats apportés par l'analyse de la composition centésimale en glucide (tableau V) montrent que le mucus renferme 49,2 p 100 de composés glucidiques. Près de la moitié de ces glucides, 24,3 p 100, sont des monosaccharides neutres. Par contre, le taux d'acides uroniques est relativement faible : 4,5 p 100. Les résidus de N-acétylhexosamines en quantité importante (20,4 p 100), sont caractéristiques des mucus très visqueux (BETHENCOURT et PLOUVIER (10), DELEBASSEE et SAMOR (22)).

### B - Composition en azote et protéines

L'analyse de la composition centésimale glucidique, montre qu'il existe un indosé de 50,8 p 100. Nous avons cherché à expliquer cet indosé par l'identification d'autres composants, en particulier la présence de protéines.

La teneur en azote du mucus a été déterminée par la méthode de KJELDAHL après minéralisation des échantillons et les résultats obtenus



Tableau V : 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.



sont résumés dans le Tableau V . La teneur en azote total de 7,15 p 100, laisse préjuger de la présence d'une quantité importante de protéines. La valeur approchée du taux de protéine, 30,6 p 100, a été calculée en multipliant le taux d'azote protidique, obtenu par soustraction de l'azote glucidique des hexosamines du taux d'azote total, par le facteur 6,25 déterminé pour la sérum albumine.

#### C - Composition en phosphore du mucus

Nous avons recherché la présence de composés minéraux dans le mucus, en particulier le phosphore. Le taux de phosphore minéral, 5 p 100 de la masse du mucus, a été déterminé après la destruction des échantillons et dosage selon la méthode de ALLAN ( 2 ). Le dosage du phosphore libre par cette même méthode s'est révélé négatif. Le phosphore est donc lié aux molécules organiques. D'autre part, les travaux de BURGER ET GLASER (13 ) ont montré que Bacillus subtilis synthétise des acides glycéro-téichoïques. Or BETHENCOURT et PLOUVIER (10 ) avaient montré la présence de glycérol dans les mucus élaborés par Bacillus subtilis souche Rapidase. Nous exprimerons donc le taux de phosphore en taux de glycérol-phosphate, soit 8,9 p 100 du poids sec du mucus étudié (Tableau V ).

#### D - Conclusions

L'analyse des résultats (réunis dans le Tableau V ) de la composition centésimale en glucides, protéines et en phosphore organique, montre l'hétérogénéité du mucus. Nous remarquerons cependant, que ce mucus est riche en glucides et en constituants chargés électronégativement : acides uroniques et phosphore. Le phosphore est le seul composant minéral du mucus car la recherche d'autres éléments minéraux, en particulier les sulfates, s'est révélée négative.

L'ensemble de ces résultats ne nous permet pas de caractériser le constituant qui est responsable de la viscosité importante du mucus. Aussi, nous essaierons de trouver les éléments nécessaires à son identification par le fractionnement du mucus et l'étude des différentes fractions ainsi obtenues.

Fractionnement du mucus par chromatographie d'échange d'ions  
Etude physico-chimique des différents constituants isolés

La présence dans le mucus de constituants chargés électro-négativement, nous a conduit à employer les techniques de chromatographie proposées par HAMADA et al (39) pour le fractionnement d'hétéropolysaccharides à glycérol-phosphate.

Le mucus 895 a été fractionné par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Dowex 1x2, forme  $\text{Cl}^-$ , 200-400 mesh. Une étude qualitative et quantitative a été réalisée sur ce type de fractionnement ainsi que sur les différentes fractions obtenues.

I - Fractionnement du mucus 895 par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Dowex 1x2

Après divers essais, les meilleurs résultats de fractionnement du mucus ont été obtenus grâce à l'éluion de la colonne de Dowex 1x2 par un gradient linéaire de molarité croissante (0 à 1 M) en acide chlorhydrique. Le profil d'éluion est montré dans la figure 16.

A - Etude du profil d'éluion

L'échantillon du mucus 895 à analyser est dissous dans de l'eau distillée et est déposé sur la colonne. L'éluion de cette colonne par 300 ml d'eau distillée nous permet d'isoler la fraction  $F_I$ . Le repérage des oses totaux par un microdosage au phénol-sulfurique et l'absorbance des protéines à 280 nm, montrent la nature glycoprotidique de cette fraction. La fraction  $F_I$  isolée, rechromatographiée sur une colonne identique préalablement régénérée, n'est pas retenue. Ce résultat prouve que nous n'avons pas à faire à un phénomène de saturation des sites échangeurs d'ions de la résine.

Quatre autres fractions:  $F_{II}$ ,  $F_{III}$ ,  $F_{IV}$  et  $F_V$ , sont ensuite isolées en éluant la colonne par le gradient de molarité en acide chlorhydrique (Tableau VI).

La fraction  $F_{II}$  est éluée en début de gradient. Son absorbance à 280 nm montre sa nature peptidique. Elle ne possède pas de glucides.

Pour une molarité en acide chlorhydrique de 0,075 M, il est possible d'isoler une fraction glycoprotidique: la fraction  $F_{III}$ . Le repérage selon

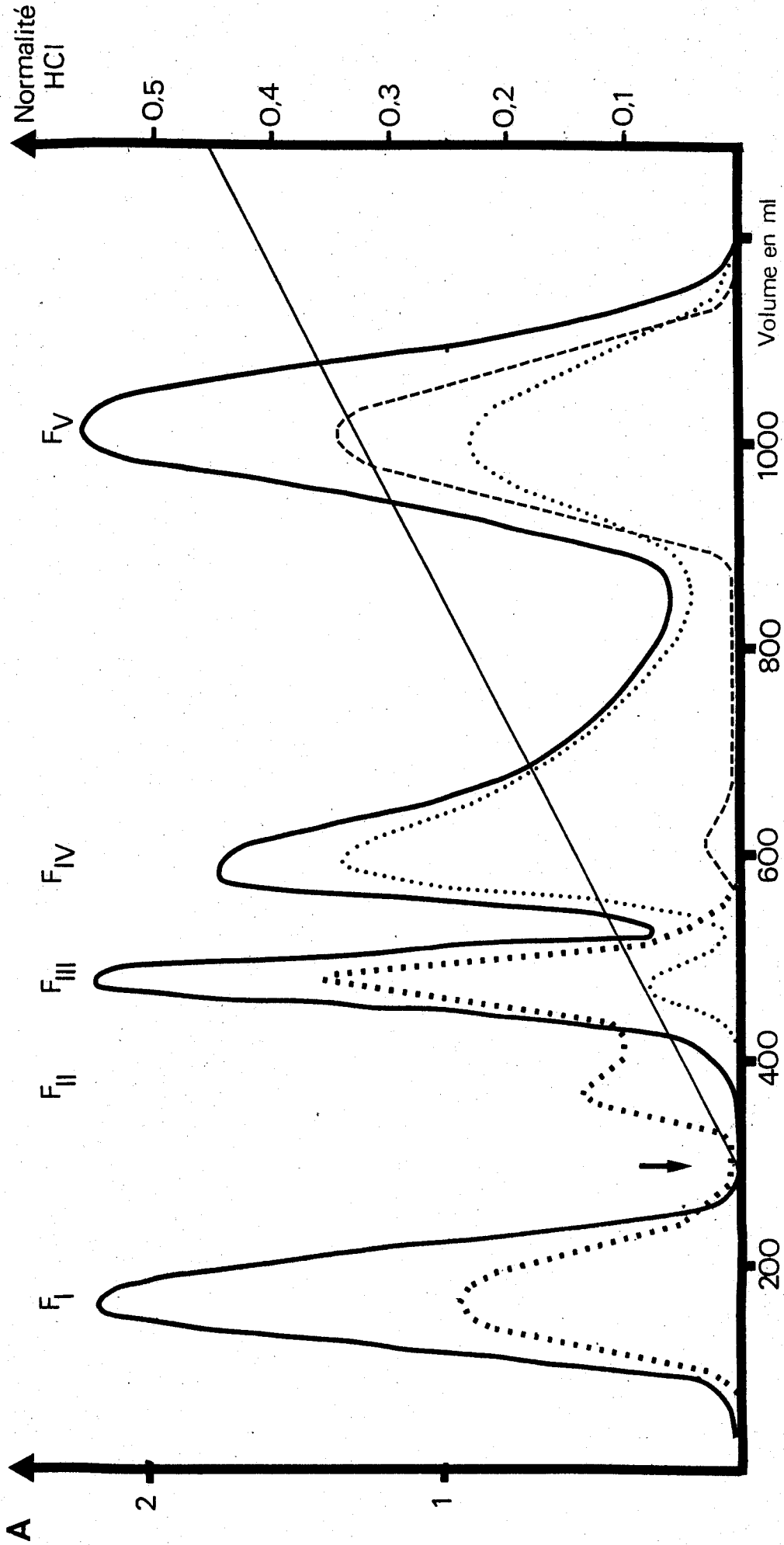


Figure 16 Chromatographie du mucus 895 sur colonne de Dowex 1x2

- A 492 (oses totaux)
- ..... A 280 (proteines)
- ..... A 520 (osamines)
- A 725 (phosphore)



la méthode de ALLEN ( 2 ) montre que cette fraction contient très peu de phosphore. Par contre, elle est riche en hexosamines.

Lorsque la molarité en acide chlorhydrique atteint une valeur de 0,14 M, la fraction  $F_{IV}$  est éluée de la colonne. C'est une fraction polysaccharidique constituée de glucides neutres, d'hexosamines et d'acides uroniques. Cette fraction présente en outre une grande viscosité et le profil d'éluion n'est pas symétrique.

La fraction la plus retenue sur la colonne d'échangeur d'ions est la fraction  $F_V$ . Elle est éluée pour des molarités en acide chlorhydrique de 0,325 M. La fraction  $F_V$  est caractérisée par sa richesse en phosphore et en oses neutres. Cet hétéropolysaccharide acide possède en outre des acides uroniques et des hexosamines.

#### B - Etude quantitative du fractionnement du mucus 895 par chromatographie d'échange d'ions

L'acide chlorhydrique des fractions éluées est neutralisé par de la soude 0,5 N. Après dialyse et lyophilisation, la somme des masses des fractions recueillies représente 80 p 100 de la masse de mucus déposé sur la colonne. Le pourcentage de récupération de chaque fraction est indiqué dans le Tableau VI. Les fractions  $F_I$ ,  $F_{IV}$  et  $F_V$  sont, pondéralement, les plus importantes et elles représentent respectivement : 24 p 100, 13,5 p 100 et 34 p 100 de la masse du mucus, les fractions  $F_{II}$  et  $F_{III}$  n'en représentant, quant à elles, que 2,6 et 4,6 p 100.

#### C - Conclusions

Le fractionnement du mucus 895 par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Dowex 1x2, 200 - 400 mesh, nous permet d'isoler cinq fractions, ce qui prouve l'hétérogénéité du mucus. Le rendement de l'opération, 80 p 100 de récupération de la masse traitée au départ, est satisfaisant.

Les diverses tentatives de fractionnement sur colonne de DEAE-Cellulose ou par chromatographie de tamisage moléculaire, colonne de Biogel P 300 et Sepharose 4B, ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats positifs car les solutions de mucus qui sont déposées sur ces colonnes sont trop visqueuses. Par contre, les fractions  $F_I$ ,  $F_{II}$ ,  $F_{III}$  et  $F_V$  sont nettement individualisées par chromatographie sur colonne de Dowex 1x2. Cependant, la fraction  $F_{IV}$  qui présente une viscosité élevée, est contaminée par les fractions  $F_{III}$  et  $F_V$ . Son étude physico-chimique nécessite une purification.

Le fractionnement qui a été mis au point, est un procédé rapide qui permet de caractériser facilement un mucus visqueux par l'étude du profil d'éluion obtenu.

Tableau : VI Molarité en HCl d'élution des fractions et bilan pondéral du fractionnement par chromatographie d'échange d'ions ( c olonne de Dowex 1x2 )

	F <sub>I</sub>	F <sub>II</sub>	F <sub>III</sub>	F <sub>IV</sub>	F <sub>V</sub>
Molarité d'élution en HCl	0	0,035	0,075	0,14	0,325
Pourcentage de récupération	24	2,6	4,6	13,5	34,3



Les méthodes utilisées pour le repérage des fractions, montrent que les compositions chimiques de chacune d'elles sont très différentes ; nous en avons fait une analyse physico-chimique plus approfondie.

## II - Analyse physico-chimique des fractions

### A - Analyse comparative de la composition chimique des fractions

#### 1 - Etude comparative de la composition en glucides

##### a) Composition centésimale glucidique

Les résultats de la composition centésimale glucidique des fractions  $F_I$ ,  $F_{III}$ ,  $F_{IV}$  et  $F_V$  sont exposés dans le tableau VII.

##### $\alpha$ -Composition en monosaccharides neutres

La majeure partie des constituants glucidiques de la fraction  $F_I$  sont des monosaccharides neutres : 74 p 100. Les fractions  $F_{III}$  et  $F_V$  ont un taux d'oses neutres important, respectivement 47,8 et 32,8 p 100. La fraction  $F_{IV}$  est la plus pauvre en glucides neutres : 23,4 p 100.

##### $\beta$ -Composition en acides uroniques

Les acides uroniques de la fraction  $F_I$ , non retenue sur la colonne de Dowex 1 x 2, sont à l'état de traces. Les fractions  $F_{III}$  et  $F_{IV}$  possèdent un taux moyen d'acides uroniques : 4,4 et 3,5 p 100 respectivement. Par contre, la fraction  $F_V$ , fortement retenue sur la colonne, en est très riche (11,4 p 100).

##### $\gamma$ -Composition en N-acétylhexosamines

Les résultats du tableau VII sont exprimés en taux de N-acétylhexosamine. La fraction  $F_{IV}$ , polysaccharidique, en est très riche (51,5 p 100), contrairement aux fractions  $F_I$  et  $F_{III}$  dont les taux de N-acétylhexosamine sont respectivement de 2,9 et 6,4 p 100. La fraction  $F_V$  est caractérisée par un taux, 11,8 p 100 de N-acétylhexosamine, taux voisin de celui des acides uroniques.

Tableau VII : Composition centésimale des fractions du mucus 895

	F <sub>I</sub>	F <sub>II</sub>	F <sub>III</sub>	F <sub>IV</sub>	F <sub>V</sub>
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





## b) Identification des constituants glucidiques

Chacune des fractions a été hydrolysée par l'acide chlorhydrique et purifiée selon les techniques décrites dans le chapitre "Matériels et Méthodes". Les monosaccharides libérés sont mis en évidence par chromatographie de partage sur papier dans les conditions décrites page 41 . Les résultats obtenus sont schématisés dans la figure 17 .

### - Fraction F<sub>I</sub>

Le seul monosaccharide neutre caractérisé est le mannose, et la glucosamine est le seul sucre aminé.

### - Fraction F<sub>III</sub>

La fraction F<sub>III</sub> renferme du mannose, deux hexosamines : la glucosamine et la galactosamine, et de l'acide glucuronique.

### - Fraction F<sub>IV</sub>

La composition en monosaccharide neutre de cette fraction est la plus complexe puisqu'elle renferme du mannose et du galactose dans les proportions 1/5. Les oses aminés sont la glucosamine et la galactosamine. Les acides uroniques sont très difficilement libérés par hydrolyse chlorhydrique et nous n'avons pu caractériser que l'acide glucuronique. La chromatographie sur papier de l'éluat neutre des colonnes de Duolite A 102 D et de Dowex 50 x 8, montre qu'il existe des oligosaccharides. Cette hydrolyse ne serait donc pas complète à cause des liaisons uronosidyls qui sont très stables.

### - Fraction F<sub>V</sub>

Cet hétéropolysaccharide ne possède que du glucose et de la glucosamine. L'acide uronique qu'il est possible de doser et de caractériser est l'acide glucuronique.

## c) Composition molaire glucidique

Les rapports molaires glucidiques ont été réalisés par dosage en chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides libérés par méthanolyse (mélange méthanol-HCl 0,5 N). Les résultats sont résumés dans le tableau VIII.

### - Fraction F<sub>J</sub>

Elle est caractérisée par la présence de 33 résidus de mannose pour 2 résidus de N-acétylglucosamine.

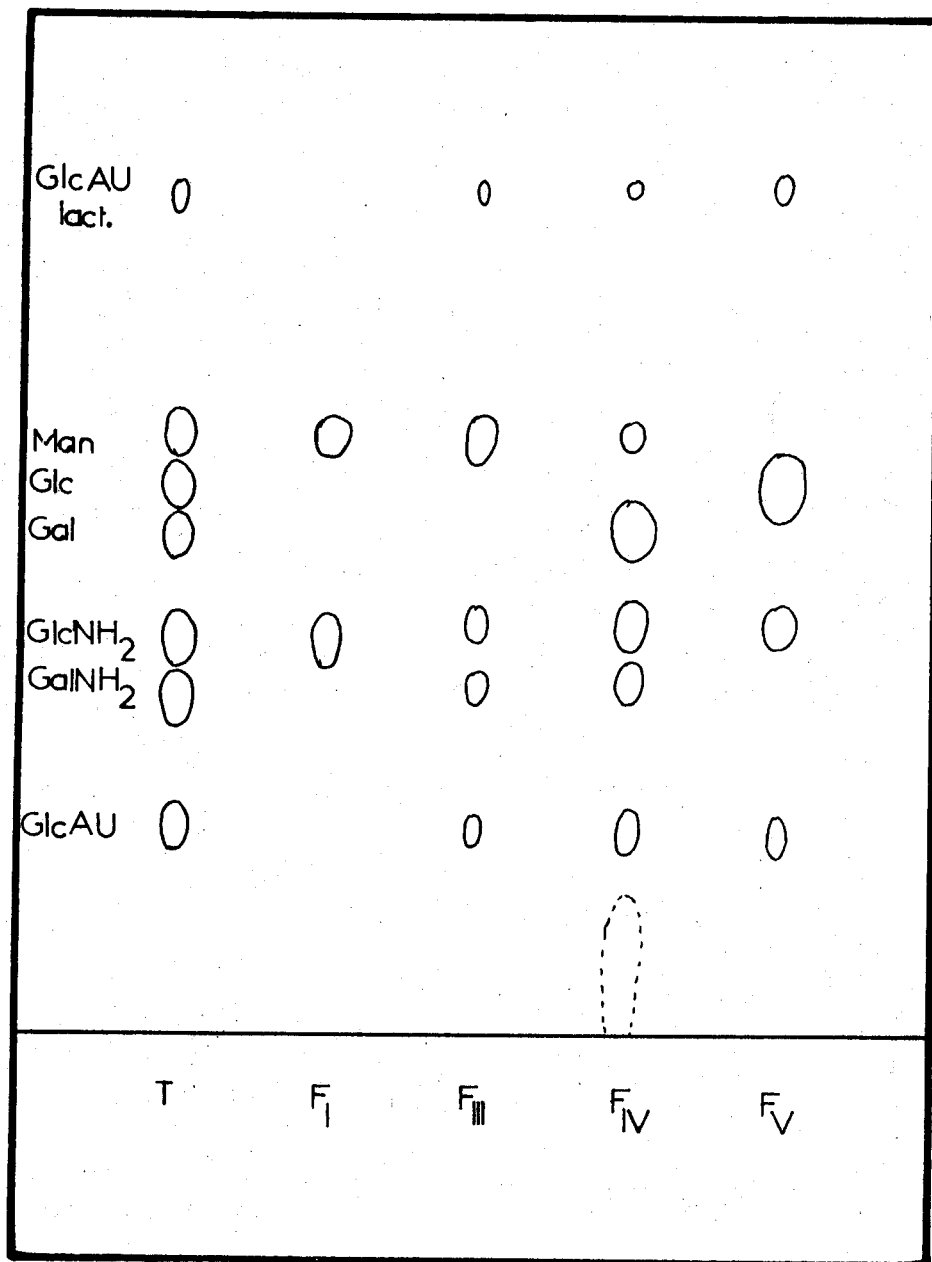


Figure 17 Chromatographie des hydrolysats chlorhydriques des fractions F<sub>I</sub>, F<sub>III</sub>, F<sub>IV</sub> et F<sub>V</sub> sur papier W<sub>3</sub> dans le solvant de FISHER et NEBEL (32)



Tableau VIII Analyse comparative de la composition molaire glucidique des fractions  $F_I$ ,  $F_{III}$ ,  $F_{IV}$  et  $F_V$

	$F_I$	$F_{III}$	$F_{IV}$	$F_V$
Glc				20
Man	33	20	1	
Gal			5	
GlcNAc	2	2	2	2
GalNAc		2	3	
GlcNH <sub>2</sub>		6		
GalNH <sub>2</sub>		+		

- Fraction F<sub>III</sub>

Beaucoup plus hétérogène que la fraction F<sub>I</sub>, la fraction F<sub>III</sub> est constituée de 20 résidus de mannose pour 2 résidus de N-acétylglucosamine et 2 résidus de N-acétylgalactosamine. Elle renferme en outre, 6 résidus de glucosamine non acétylée. La galactosamine non acétylée est mise en évidence mais le nombre de résidus n'a pas pu être calculé.

- Fraction F<sub>IV</sub>

La chromatographie sur papier montre que l'hydrolyse de ce polysaccharide n'est pas complète car il existe dans cette molécule des acides uroniques dont les liaisons O-glycosidiques sont très stables. Nous décrivons donc ici, une composition molaire estimée car le pourcentage de libération des monosaccharides par méthanolyse est faible.

Le nombre de résidus de mannose est faible. Il existe, en effet, 1 résidu de mannose pour 5 résidus de galactose. La fraction F<sub>IV</sub> renferme en outre, 3 résidus de N-acétylgalactosamine pour 2 résidus de N-acétylglucosamine.

La composition de la fraction F<sub>IV</sub> est donc très hétérogène.

- Fraction F<sub>V</sub>

Cette fraction diffère essentiellement des précédentes par la présence de 20 résidus de glucose pour 2 résidus de N-acétylglucosamine. Il est possible de mettre en évidence l'acide glucuronique et le glycérol par chromatographie en phase gazeuse mais ces constituants n'ont pas été dosés par cette méthode.

2 - Etude de la composition en protéine et en acides aminés des fractions F<sub>I</sub>, F<sub>II</sub> et F<sub>III</sub>

a) Composition en protéine

Pour compléter la composition centésimale, nous avons dosé le taux de protéines des fractions par la mesure du taux d'azote selon KJELDAHL. Les valeurs du taux de protéines indiquées dans le tableau VIII, ont été déterminées en tenant compte de l'azote glucidique.

Le taux de protéines de la fraction F<sub>I</sub> est relativement faible (18,5 p 100) comparativement à celui de la fraction F<sub>II</sub> : 97,2 p 100. La fraction F<sub>III</sub> qui est une glycoprotéine acide contient : 39 p 100 de protéine. La présence de 2,2 p 100 de protéine dans la fraction F<sub>IV</sub> peut être considérée comme étant une contamination de cette fraction par la fraction F<sub>III</sub>. La fraction F<sub>V</sub> n'est composée que de glucides.

Tableau : IX Composition en acides aminés des fractions F<sub>I</sub>, F<sub>II</sub> et F<sub>III</sub>  
 (l'acide aspartique est pris comme référence = 100)

	F <sub>I</sub>	F <sub>II</sub>	F <sub>III</sub>
CySC <sub>3</sub> H	0	3	0
Asp	100	100	100
Thr	60	50	54
Ser	115	47	62
Glu	87	89	100
Pro	49	32	38
Gly	129	61	65
Ala	88	61	88
Val	52	45	39
Met	3	7	14
Ileu	64	55	43
Leu	34	35	16
Tyr	53	30	24
Phe	45	35	28
Lys	0	52	53
Hist	84	24	0
Arg	47	32	20

### b) Composition en acides aminés

Nous avons réalisé cette étude qualitative afin d'essayer de caractériser les fractions glycoprotéiniques et protéiniques.

Les résultats du tableau IX sont exprimés en nombre de résidus d'acides aminés, l'acide aspartique ayant été pris comme référence car les fractions  $F_{II}$  et  $F_{III}$ , par leur comportement chromatographique sur colonne de Dowex  $1 \times 2$ , possèdent un caractère acide. L'acide aspartique est présent, en quantité importante, dans toutes les fractions que nous avons étudiées. Il ne nous a pas été possible de noter les différences importantes car la composition en acides aminés des fractions étudiées, est sensiblement indentique bien que très complexe. Notons, cependant, que si la fraction  $F_I$  possède de l'acide glutamique en proportion relativement importante, elle est caractérisée par un nombre élevé de résidus de sérine, de glycoColle et l'absence de lysine. Cette fraction renferme, un nombre important de résidus d'histidine. Les fractions  $F_I$  et  $F_{II}$  sont riches en acides aspartique et en acide glutamique. La fraction  $F_{II}$  est la fraction la plus pauvre en sérine et la fraction  $F_{III}$ , dont le taux d'acide aspartique et d'acide glutamique est identique, ne contient pas d'histidine. Ces deux fractions possèdent de la lysine contrairement à la fraction  $F_I$ .

### 3 - Analyse de la composition en phosphore et en glycérophosphate de la fraction $F_V$

La fraction  $F_V$  possède un taux de phosphore important : 16,75 p 100. Ce résultat est donné dans le tableau X en pourcentage de glycérophosphate, soit 29,4 p 100, nous avons montré en effet précédemment, que tout le phosphore du mucus est lié aux molécules organiques.

L'analyse des produits par chromatographie de l'hydrolyse chlorhydrique puis de la dégradation alcaline de la fraction  $F_V$  selon les procédés décrits dans le chapitre "Matériel et Méthodes", page 42, nous permet de caractériser le glycérophosphate. Nous avons pu mettre en évidence, le glycérol par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse de la fraction  $F_V$  par le mélange méthanol-HCl 0,5 N à 80°C pendant 24 h et trifluoroacétylation des dérivés O-méthylglycosidés par les méthodes décrites page 41.

### B - Analyse de la viscosité intrinsèque des fractions isolées par fractionnement du mucus

Afin d'identifier de manière précise le ou les constituants responsables de la viscosité, nous avons étudié les propriétés viscosimétriques du mucus et de ses fractions isolées après chromatographie d'échange d'ions sur

Tableau X : 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 XI : 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

colonne de Dowex 1 x 2.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XI et ils montrent que la fraction  $F_{IV}$  possède la viscosité intrinsèque la plus élevée. La viscosité intrinsèque des autres fractions est négligeable par rapport à celle du mucus et de la fraction  $F_{IV}$ . L'hétéropolysaccharide ou fraction  $F_{IV}$ , est le constituant qui confère au mucus ses propriétés viscosimétriques.

### III - Conclusions

Le fractionnement du mucus par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Dowex 1 x 2, est un procédé simple pour caractériser les mucus visqueux synthétisés par Bacillus subtilis. Les cinq fractions isolées se différencient par leur comportement chromatographique sur colonne de Dowex 1 x 2, par leur composition chimique et par leur propriété viscosimétrique.

Les cinq fractions constituant le mucus peuvent être classées, de part leur composition chimique, en fractions de nature glycoprotidique, protidique, polysaccharidique.

Les fractions  $F_I$  et  $F_{III}$ , de nature glycopeptidique, se différencient par leur composition en N-acétylhexosamines. La fraction  $F_I$  ne possède que de la N-acétylglucosamine alors que la fraction  $F_{III}$  est constituée de N-acétylglucosamine et de N-acétylgalactosamine en proportion équimolaire. Des résidus de glucosamine et de galactosamine non acétylés ont été mis en évidence dans la fraction  $F_{III}$ . Par ailleurs, la présence de résidus d'acide glucuronique permet d'expliquer le comportement chromatographique de cette fraction  $F_{III}$  sur la colonne de Dowex 1 x 2. Le taux en monosaccharides neutres de ces fractions est élevé. Seul le mannose a pu être mis en évidence.

La fraction  $F_{II}$  est une protéine et la présence de nombreux résidus d'acides aminés acides (acide glutamique et acide aspartique) provoque sa rétention sur la colonne de Dowex 1 x 2.

La fraction  $F_{IV}$  est un polysaccharide de composition glucidique complexe. Il ne nous a pas été possible, dans un premier temps, d'établir une composition centésimale complète : l'indosé est de 17,9 p 100 (tableau X). L'analyse comparative de la composition molaire (tableau VIII) et de la composition centésimale glucidique (tableau X) montre que ce polysaccharide est riche en N-acétylglucosamine, en N-acétylgalactosamine et en acide glucuronique. La présence dans ce polymère, de liaisons de type uronosidyl, très stables vis à vis des agents d'hydrolyse, ne nous permet pas de donner une composition molaire glucidique exacte. En ce qui concerne les monosaccharides neutres présents dans ce polymère, nous avons cependant pu mettre en évidence, la présence de galactose et de mannose. L'analyse comparative des propriétés viscosimétriques des fractions isolées du mucus 895, montre que la fraction  $F_{IV}$  possède la viscosité la plus élevée.



La fraction F<sub>V</sub>, fortement retenue sur la colonne de Dowex 1x2 et éluée en fin de gradient, est un hétéropolysaccharide dont le taux d'oses neutres est de 32,8 p 100. Nous avons caractérisé le glucose comme étant le seul monosaccharide neutre. Cette fraction est également riche en N-acétylglucosamine et en acide glycuronique (pourcentage respectif de 11,4 et 11,8 p 100). Mais le phosphore organique de ce composé, ainsi que le glycérol mis en évidence, nous permettent d'assimiler cet hétéropolysaccharide aux acides téichoïques isolés de Bacillus subtilis. L'indosé, 14,6 p 100, de la composition centésimale globale (Tableaux X) peut être expliqué par la présence de nombreux résidus d'acides glucuroniques engagés dans des liaisons O-glycosidiques.

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que la fraction F<sub>IV</sub>, polysaccharide de composition glucidique complexe et dont la viscosité intrinsèque est la plus élevée, est le constituant responsable de la viscosité des moûts de fermentation de Bacillus subtilis. Cependant, l'analyse plus approfondie de cette substance nécessite une repurification que nous décrivons dans le chapitre suivant.

Analyse physico-chimique de la fraction $F_{IV}$
--

La fraction  $F_{IV}$ , de nature polysaccharidique, est isolée du mucus 895 par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Dowex 1x2. Cette substance confère au mucus ses propriétés visqueuses. Cependant, l'étude du profil d'éluion montre que la fraction  $F_{IV}$  est contaminée par les fractions  $F_{III}$  et  $F_V$  : il est donc nécessaire de la repurifier avant d'aborder son étude physico-chimique.

I - Purification de la fraction  $F_{IV}$  par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Dowex 1x2

La nature macromoléculaire et la grande viscosité de la fraction  $F_{IV}$ , ont limité le choix des procédés de purification. Les meilleurs résultats ont été obtenus en rechromatographiant la fraction  $F_{IV}$  sur la colonne de Dowex 1x2 selon le procédé précédemment décrit à la page 44.

La fraction  $F_{IV}$ , qui est obtenue par le fractionnement du mucus 895 sur la colonne d'échangeur d'ions, est neutralisée, dialysée et concentrée par distillation sous pression réduite à l'évaporateur rotatif. La solution est alors déposée sur la colonne de Dowex 1x2 qui a été régénérée. Après le lavage par 300 ml d'eau distillée, la colonne est éluee par un gradient en acide chlorhydrique de 0 à 0,5 M. L'étude du profil d'éluion réalisé par le repérage des glucides et des protéines, montre que la fraction  $F_{IV}$  est éluee de la colonne pour des molarités en HCl comprises entre 0,1 et 0,12 M. Elle se présente sous la forme d'un pic symétrique bien que très étalé ( Figure 18 ). Cependant, cette fraction est nettement séparée de la fraction glycoprotidique précédente.

La fraction  $F_{IV}$  repurifiée, après neutralisation de l'acide chlorhydrique par la soude 0,05 M, dialyse et enfin lyophilisation, se présente sous la forme d'une poudre blanche très hygroscopique. Ce produit est conservé en présence d'anhydride phosphorique. Les solutions aqueuses de la fraction  $F_{IV}$  sont limpides et très visqueuses. Une solution de la fraction  $F_{IV}$  à une concentration de 0,5 p 100 dans de l'eau distillée, possède un pH de 4,25 ce qui montre le caractère acide du polysaccharide repurifié.

II - Propriétés physiques de la fraction  $F_{IV}$

A - Solubilité

La fraction  $F_{IV}$  est soluble dans les solvants aqueux tamponnés

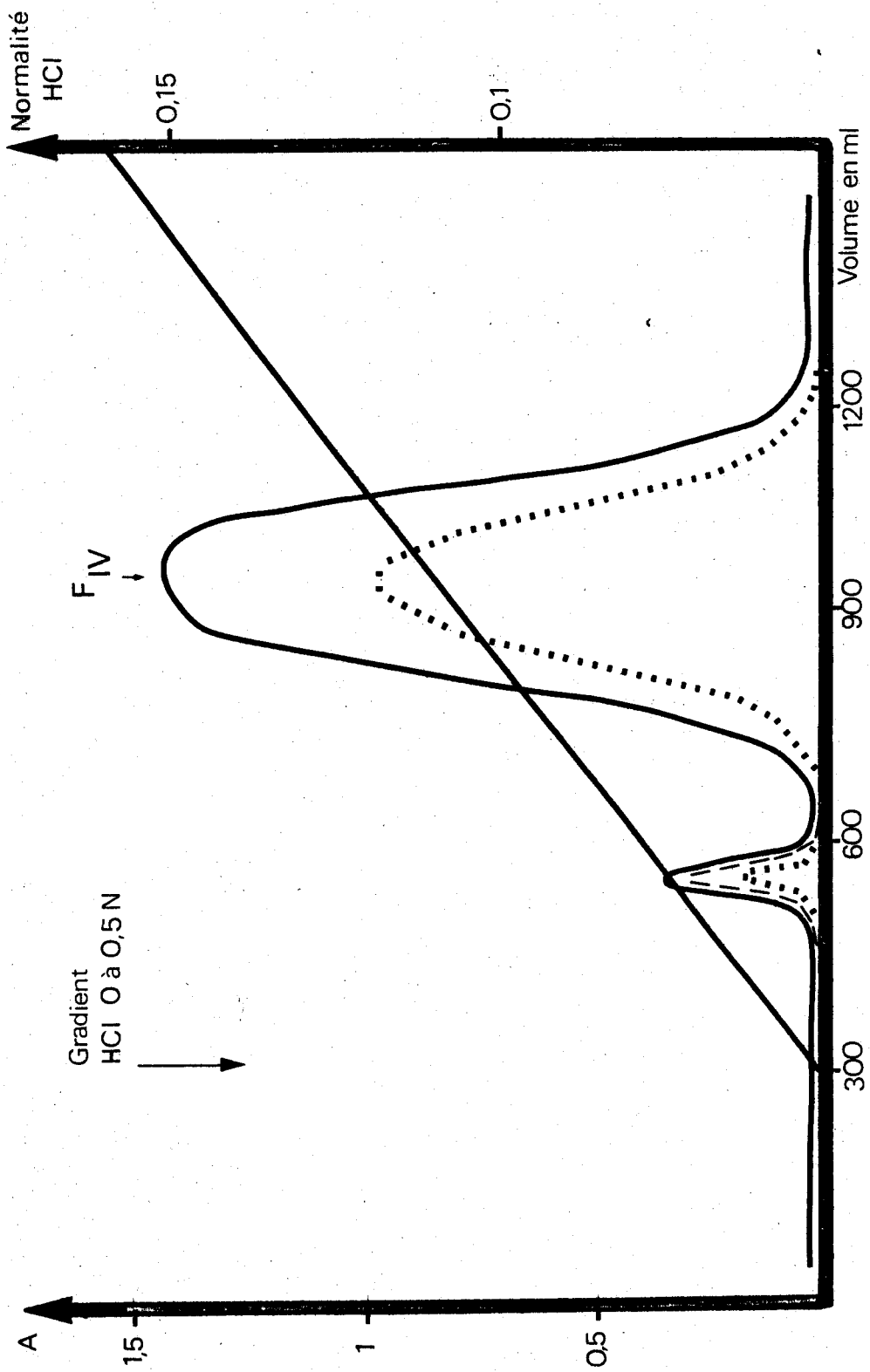


Figure 18 Repurification de la fraction F<sub>IV</sub> par chromatographie sur colonne de Dowex 1X2



ou non. Elle est totalement insoluble dans les solvants organiques comme l'éther éthylique, l'acétone, le méthanol et le tétrahydrofurane. En milieu alcoolique froid à pH 5, cette substance floccule. Cependant, il ne nous a pas été possible d'utiliser cette propriété pour repurifier la fraction  $F_{IV}$ . En effet, les fractions  $F_{III}$  et  $F_V$  qui contaminent la fraction  $F_{IV}$  obtenue par un premier fractionnement du mucus 895 sur la colonne de Dowex 1x2, précipitent dans les mêmes conditions.

#### B - Masse moléculaire

Il ne nous a pas été possible d'établir la masse moléculaire de la fraction  $F_{IV}$  par chromatographie de tamisage moléculaire car les échantillons analysés possèdent une viscosité trop importante : la viscosité intrinsèque de la fraction  $F_{IV}$  est de 323 ml/g. En effet, sur des gels macromoléculaires de type Sephadex ou Biogel, cette fraction est éluée des colonnes sous la forme d'un pic dissymétrique très étalé.

Nous avons utilisé la technique de l'ultracentrifugation analytique de CHERVENKA ( 17 ) pour tenter d'apprécier la masse moléculaire du polysaccharide. Les calculs donnent une valeur de :  $1\ 050\ 000 \pm 50\ 000$  daltons. Ce résultat permet d'expliquer les difficultés de filtration rencontrées au cours de la préparation industrielle de l' $\alpha$ -amylase et confirme la nature macromoléculaire de la substance polysaccharidique visqueuse présente dans les moûts de fermentation de Bacillus subtilis.

#### III - Propriétés chimiques de la fraction $F_{IV}$

Nous avons tenté d'établir la composition chimique de la fraction  $F_{IV}$  qui a été repurifiée par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Dowex 1x2.

##### A - Composition centésimale

La purification de la fraction  $F_{IV}$  est caractérisée par le fait que le taux de phosphore et de protéine diminue (Tableau XII). La composition centésimale en monosaccharides varie peu. Nous remarquons cependant que le taux en monosaccharides neutres augmente légèrement alors que celui des N-acétylhexosamines et des acides uroniques reste inchangé. L'indosé atteint une valeur de 19 p 100. La difficulté d'obtenir une composition centésimale rigoureuse est due au caractère macromoléculaire du polysaccharide étudié et à la résistance de certaines liaisons o-glycosidiques. Les valeurs de composition centésimale données dans le Tableau sont donc approximatifs.

Tableau XII 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 XIII Composition molaire glucidique de la fraction  $F_{IV}$  repurifiée

Composition molaire en	
Gal	5
Man	1
GalNAc	3
GlcNAc	2



## B - Composition molaire glucidique

Les valeurs de la composition molaire glucidique de la fraction F<sub>IV</sub> repurifiée sont identiques à celles trouvées pour la fraction F<sub>IV</sub> obtenue par un premier fractionnement du mucus 895. Les monosaccharides en quantité la plus importante sont la N-acétylgalactosamine et le galactose. Cette composition, établie par chromatographie en phase gazeuse, nous permet également d'identifier les monosaccharides libérés par la méthanolyse. C'est ainsi que nous montrons qu'il n'existe pas de glucose dans le polysaccharide. Mais les valeurs de la composition molaire glucidique, résumées dans le Tableau XIII, sont approximatives car la méthanolyse ne provoque pas la rupture quantitative des liaisons glycosidiques du polysaccharide. En moyenne, le pourcentage de libération des monosaccharides est de 40 p 100. Cependant, plusieurs expérimentations réalisées dans des conditions similaires ont donné des résultats identiques. Les valeurs que nous donnons peuvent être considérées, en quelque sorte, comme statistiques et représentatives de la composition glucidique du polysaccharide.

La difficulté d'obtenir une hydrolyse quantitative des liaisons O-glycosidiques, en particulier celles dans lesquelles sont engagés les acides uroniques, nous a conduit à mettre au point un procédé original de modification de la structure chimique du polysaccharide dans le but de réaliser un bilan glucidique complet.

## C - Mise en évidence de la réduction des acides uroniques

Les liaisons uronosidyles sont parmi les plus difficiles à rompre par les moyens classiques d'hydrolyse. Seule la réduction de la fonction carboxylique des acides uroniques permet d'obtenir des chaînes polysaccharidiques modifiées qui deviennent sensibles à l'action des agents d'hydrolyse.

Notre travail a consisté à rendre quantitative la réduction des acides uroniques et à pouvoir doser les produits réduits. La fraction F<sub>IV</sub> ne possède pas de glucose et le seul acide uronique mis en évidence est l'acide glucuronique. C'est pourquoi, nous avons mis au point la technique (décrite page 45) qui permet de réduire l'acide glucuronique en son homologue ose neutre : le glucose. Le polysaccharide réduit devient alors sensible à l'action des divers agents chimiques qui rompent les liaisons glycosidiques.

### 1 - Résultats de la réduction de l'acide glucuronique libre

Pour rendre quantitative la méthode de réduction par le Borane-Méthyl-Sulfide (BMS), nous avons choisi de traiter comme modèle l'acide glucuronique.

Tableau XIV Réduction de l'acide glucuronique témoin et de l'acide glucuronique de la fraction F<sub>IV</sub>

Pourcentage de la réduction en glucose de :

Cycles de réduction	Acide glucuronique témoin	*Acide glucuronique de la fraction F <sub>IV</sub>
Cycle I	96	40,4
Cycle II	—	49,04
Cycle III	—	59,24

\*Pourcentage de réduction exprimé en fonction du taux d'acide glucuronique de la fraction F<sub>IV</sub> native



La méthanolyse qui est la première étape du protocole mis au point, conduit à la formation du dérivé o-méthyl glycosidé de l'acide glucuronique. La fonction carbonyle du carbone 1 est ainsi protégée et ne peut pas être réduite. La réduction provoque la transformation de la fonction carboxylique en une fonction alcoolique et nous obtenons le dérivé o-méthyl glycosidé du glucose. Cet oside est dosé par chromatographie en phase gazeuse (CPG), selon le procédé décrit page 41 .

L'analyse des résultats obtenus en CPG, montre que la réduction de 5,15 micromoles d'acide glucuronique conduit à la formation de 4,83 micromoles de glucose. Le rendement de l'opération est de 93,8 p 100 après un cycle de réduction. Le dosage des produits par les méthodes colorimétriques de dosage des oses neutres et des acides uroniques (page 40 ), donne un pourcentage de 96 p 100 (Tableau XIV ).

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que la méthode de réduction de l'acide glucuronique est quantitative et cela après un seul cycle de réduction.

## 2 - Résultats de la réduction de l'acide glucuronique de la fraction F<sub>IV</sub>

Le polysaccharide est dépolymérisé par une méthanolyse : les fonctions réductrices des monosaccharides et des oligosaccharides libérés sont o-méthyl-glycosidés et ne seront pas réduites par le BMS. Les résultats relatifs à la réduction de l'acide glucuronique de la fraction F<sub>IV</sub>, résumés dans le Tableau XIV sont préliminaires et encore fragmentaires. Le pourcentage de réduction de l'acide glucuronique en glucose a été établi en utilisant les méthodes colorimétriques de dosage des oses neutres et acides (page 40 ). Les résultats exposés sont fonction de la diminution du taux d'acides uroniques au cours des cycles de réduction.

Un premier cycle de réduction aboutit à une baisse de 40,4 p 100 du taux d'acides uroniques, ce qui nous a conduit à en réaliser un second au cours duquel 14,5 p 100 des acides résiduels sont réduits; le pourcentage de réduction à la fin du second cycle est donc de 49,04 p 100. Le troisième cycle aboutit à un pourcentage final de réduction de 59,24 p 100. Il semble donc, qu'après la réduction d'environ 40 p 100 des acides uroniques, la réaction atteint un palier. Nous analysons actuellement les produits issus de la réduction du polysaccharide et il apparait que des hexosamines puissent être dégradées au cours de cette réduction.

### D - Isolément, purification et analyse du 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxy-glucose

Les caractères particuliers du polysaccharide étudié nous ont amené à rechercher des composés glucidiques inhabituels. SHARON et JEANLOZ ( 84 )



ont mis en évidence la présence d'un diaminohexose, la bacillosamine, dans un polysaccharide synthétisé par Bacillus licheniformis ATCC 9945. Ce sucre n'a été mis en évidence que dans les polysaccharides de Bacillus licheniformis alors que Bacillus subtilis synthétiserait la D-fucosamine (SHARON et al ( 85 )). Nous avons pu caractériser ce composant dans le polysaccharide isolé des moûts de fermentation de Bacillus subtilis souche Rapidase.

#### 1 - Isolément et purification du 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose

Nous avons employé les méthodes mises au point par SHARON et JEANLOZ ( 84 ) pour isoler la bacillosamine des polysaccharides de Bacillus licheniformis ATCC 9945.

L'hydrolyse sulfurique de la fraction  $F_{IV}$  conduit à la libération du 2-amino-4-acétamido-2,4,6-tridéoxyglucose. Selon ces auteurs, ce type d'hydrolyse provoque préférentiellement la désacétylation de la fonction acétamido du carbone 2. La substance glucidique ainsi libérée possède une fonction amine non acétylée et est retenue sur la colonne de Dowex 50x8 (25-50 mesh). L'élution de cette colonne par successivement, de l'eau, de l'HCl 0,5 , 1 et 2 N nous permet d'isoler les fractions:  $F_A$ ,  $F_B$ ,  $F_C$ ,  $F_D$ . La fraction  $F_A$  n'a pas été étudiée car elle renferme de l'acide sulfurique. La chromatographie sur la colonne de Dowex 50x8, 200-400 mesh (GARDELL ( 35 )) de la fraction  $F_B$ , montre qu'elle est constituée de glucosamine et de galactosamine. La fraction  $F_C$  possède de la glucosamine et de la galactosamine et elle est enrichie en diaminohexose. Cet ose ne se trouve qu'à l'état de trace dans la fraction  $F_D$ .

Nous avons chromatographié sur la colonne de Dowex 50x8, 200-400 mesh, et dans des conditions identiques, les fractions  $F_C$  préparées à partir des hydrolysats sulfuriques des polysaccharides de Bacillus subtilis souche Rapidase, de Bacillus licheniformis ATCC 9945 et du 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose (Fig. 19). Le repérage des fractions par la méthode de dosage des hexosamines (ELSON-MORGAN ( 68 )) permet de mettre en évidence trois fractions :  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ . Les fractions  $P_1$  et  $P_2$  correspondent respectivement à la glucosamine et à la galactosamine; la fraction  $P_3$  possède un comportement chromatographique sur papier identique au 2-amino-4-acétamido-2,4,6-tridéoxyglucose. Ce résultat a été vérifié par électrophorèse sur papier.

Le calcul des  $R_{GlcNH_2}$  (rapport du volume d'élution correspondant à une substance chromatographiée sur la colonne de Dowex 50x8, sur le volume d'élution de la glucosamine) montre que les fractions  $P_3$  des hydrolysats des polysaccharides de Bacillus subtilis, de Bacillus licheniformis et du diacétamidohexose,

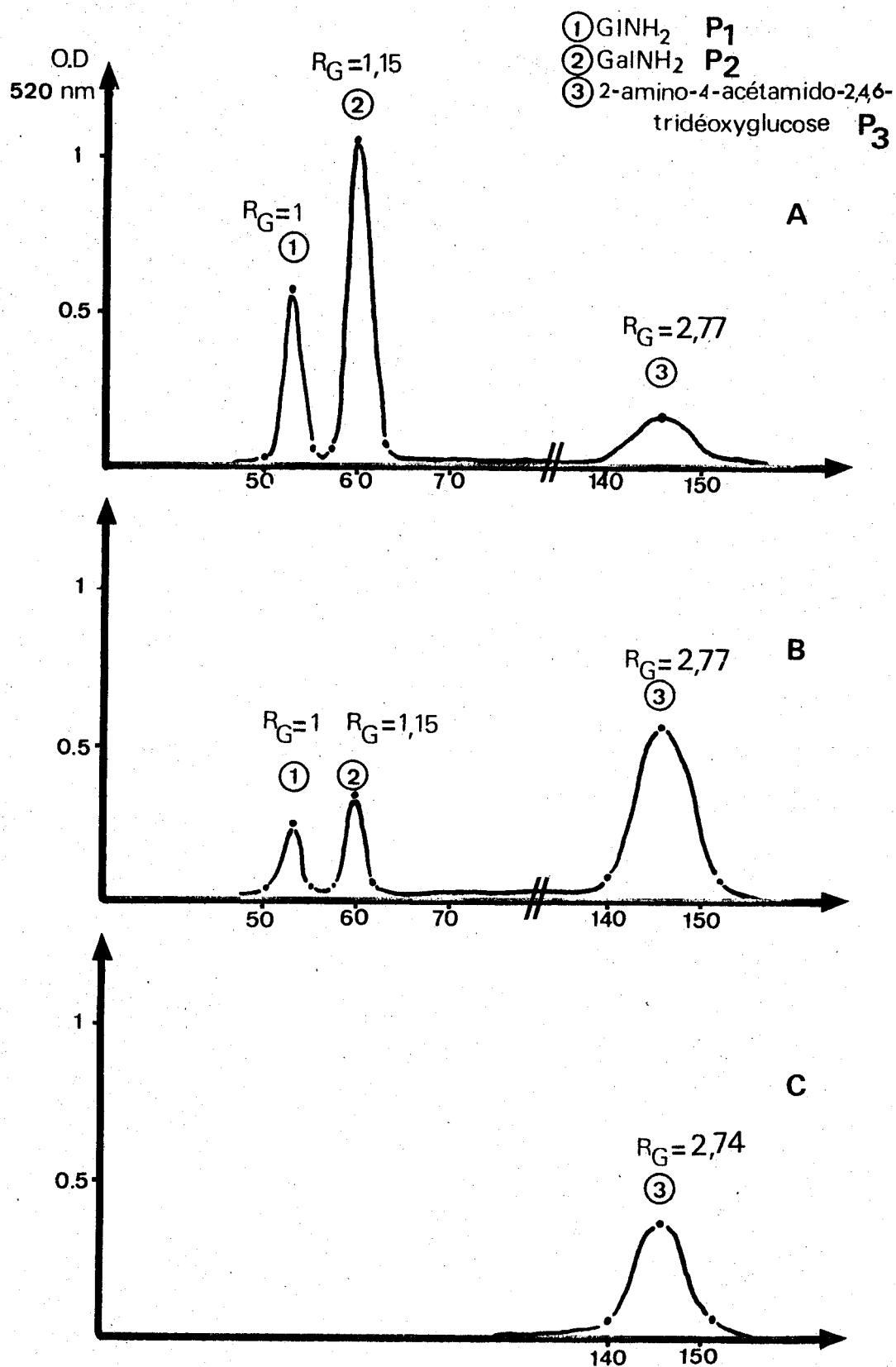


Figure :19 Chromatographie sur colonne de Dowex 50x8 ( Gardell ( ) ) des hydrolysats sulfuriques de:

- A\_ polysaccharide *Bacillus subtilis*
- B\_ polysaccharide *Bacillus licheniformis*
- C\_ 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose

sont identiques ( Figure 19 ).

## 2 - Caractérisation du peracétyl-2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucitol deutéré par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse

Nous avons peracétylé puis réduit par le borodeutérure de sodium le 2-amino-4-acétamido-2,4,6-tridéoxyglucose afin de l'étudier par chromatographie en phase gazeuse et par spectrométrie de masse.

### a) Chromatographie en phase gazeuse

Les produits analysés par CPG, ont été préalablement purifiés par chromatographie sur papier comme il a été décrit page 50.

Le peracétyl -2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucitol deutéré, isolé du polysaccharide de Bacillus licheniformis ATCC 9945 donne un pic unique sur les diagrammes obtenus en CPG sur colonne de silicone OV<sub>17</sub> (Figure 20 ). Le dérivé glucidique isolé de Bacillus subtilis souche Rapidase donne deux pics. Le pic ayant le temps de rétention le plus faible correspond exactement à celui obtenu à partir de l'ose synthétisé par Bacillus licheniformis.

### b) Analyse par spectrométrie de masse

L'analyse des diaminohexoses a été réalisée par spectrométrie de masse afin de confirmer qu'ils étaient strictement identiques. La différence de temps de rétention existant entre les substances identifiées sur les diagrammes de CPG du diaminohexose isolé de Bacillus subtilis est suffisante pour pouvoir réaliser une étude en spectrométrie de masse.

L'étude comparative des spectres de masse (Figure 20) prouve que les deux substances ont en commun les fragments primaires : fragments m/e 301, 288, 158, 145. Ces fragments résultent de la coupure sélective de la molécule au niveau des carbones portant une fonction acétamido (Figure 20). Ces fragments primaires donnent des fragments secondaires présents dans le spectre des deux produits étudiés (Tableau XV ).

Le fragment primaire m/e 301 donne, par la perte d'une molécule d'acide acétique, le fragment secondaire m/e 241. La perte successive d'acide acétique et de cétène aboutit à la formation du fragment m/e 139. Le fragment primaire m/e 301 correspond à la rupture de la liaison entre les carbones 1 et 2 de la molécule.

Ce résultat est confirmé par la présence d'un fragment primaire m/e 145 qui donne les fragments secondaires m/e 85 par perte d'acide acétique.

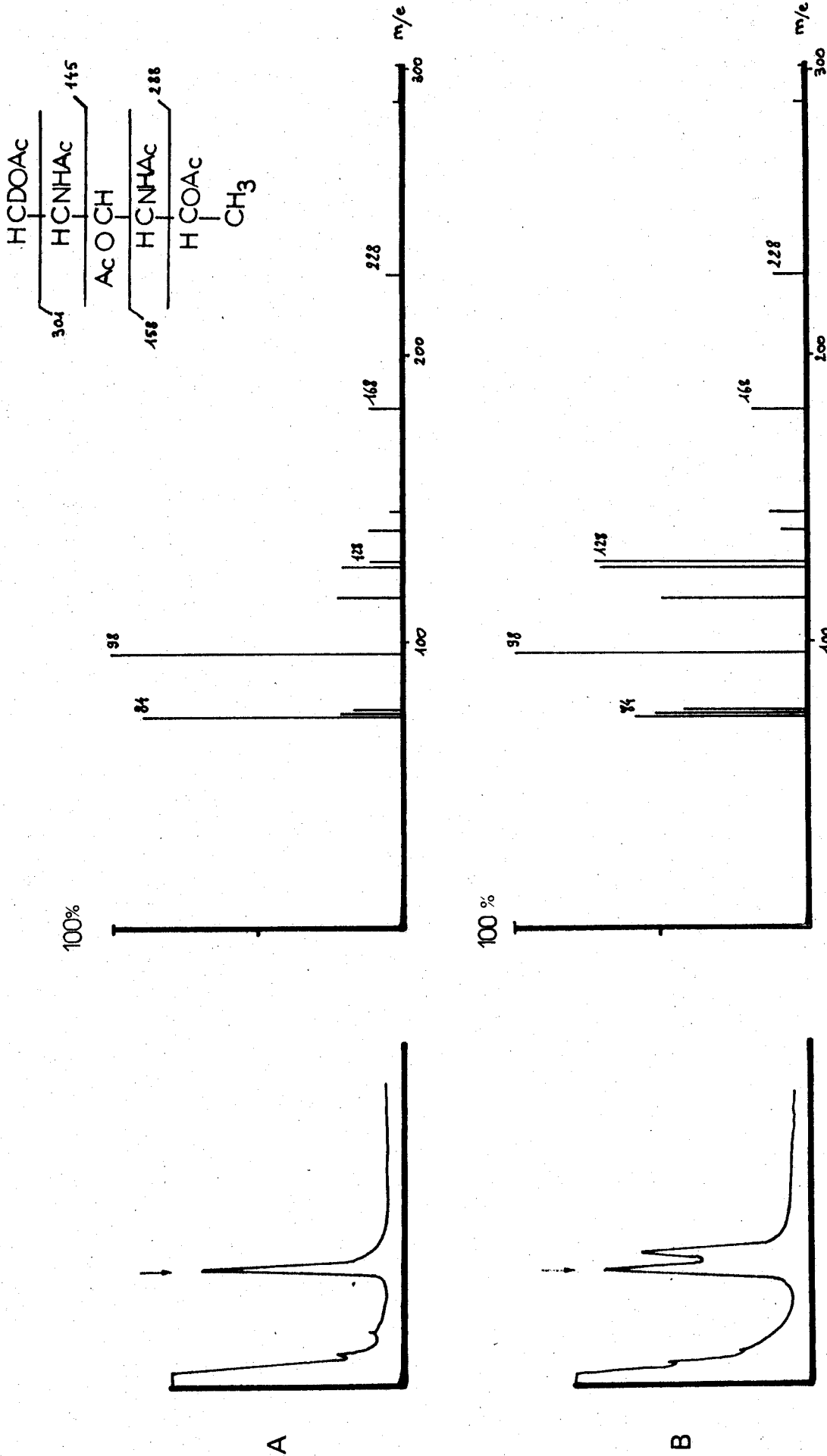


Figure 20 Diagrammes de CPG et spectres de masse du dérivé acétylé du 2,4-diacétamido-2,4,6-trideoxyglucitol de :

- A - *Bacillus licheniformis*
- B - *Bacillus subtilis*

BUS  
ULLE

Tableau XV Fragments primaires et secondaires caractéristiques  
 des spectres de masse des dérivés peracétylés du  
 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucitol deutéré de  
Bacillus licheniformis ATCC 9945 et Bacillus subtilis

	m/e
	301
Fragments	288
Primaires	158
	145
	139
Fragments	98
Secondaires	85
	84



Un atome d'azote est donc lié sur le carbone 2 de la molécule.

La présence d'un résidu d'azote sur le carbone 4 est confirmée par l'étude du fragment primaire m/e 288 qui donne le fragment secondaire m/e 168 par la perte successive de deux molécules d'acide acétique. L'élimination d'un cétène conduit à la formation du fragment m/e 126 qui donne par le même mécanisme le fragment m/e 84. L'examen des spectres montre que le fragment m/e 288 se dédouble en m/e 287. Le phénomène serait dû à un mauvais échange avec le deutérium, ce qui expliquerait la perte de masse de 1 des fragments secondaires observés.

La présence du fragment m/e 158 qui donne le fragment secondaire m/e 98 par l'élimination d'une molécule d'acide acétique, prouve que l'atome d'azote est sur le carbone 4. Le fragment m/e 158 ne peut être expliqué que par la présence d'un atome lié au carbone 4 et une fonction 6 - désoxy.

L'ensemble de ces résultats confirme la structure proposée par SHARON et JEANLOZ ( 84 ) du diaminohexose isolé des polysaccharides de Bacillus licheniformis ATCC 9945 et montre le diaminohexose synthétisé par Bacillus subtilis souche Rapidase possède la même structure chimique.

#### E - Mise en évidence de la présence de résidus d'hexosamines non acétylées dans la fraction F<sub>IV</sub>

Les hexosamines non acétylées, traitées par le mélange nitrite de sodium - acide acétique, sont désaminées et donnent le 2,4-anhydrohexose correspondant. Si l'osamine non acétylée est située à l'intérieur de la chaîne polysaccharidique, la réaction se produit avec la rupture de la liaison o-glycosidique dans laquelle l'hexosamine est engagée.

La fraction F<sub>IV</sub> ainsi traitée, est chromatographiée sur une colonne d'Ultrogel AcA 34. Le profil d'élution (Figure 21) montre que la fraction F<sub>IV</sub> désaminée par le mélange nitrite de sodium - acide acétique, possède, en effet, une masse moléculaire inférieure à la fraction F<sub>IV</sub> native. Nous pouvons donc supposer que des résidus d'hexosamines non acétylées sont situés à l'intérieur de la chaîne polysaccharidique.

#### IV - Conclusions

Les profils d'élution obtenus au cours de la purification par chromatographie d'échange d'ions sur la colonne de Dowex 1 x 2, montre que la fraction F<sub>IV</sub> est un polysaccharide. La masse moléculaire importante de la fraction F<sub>IV</sub> est en accord avec le procédé d'isolement employé pour préparer le mucus 895.

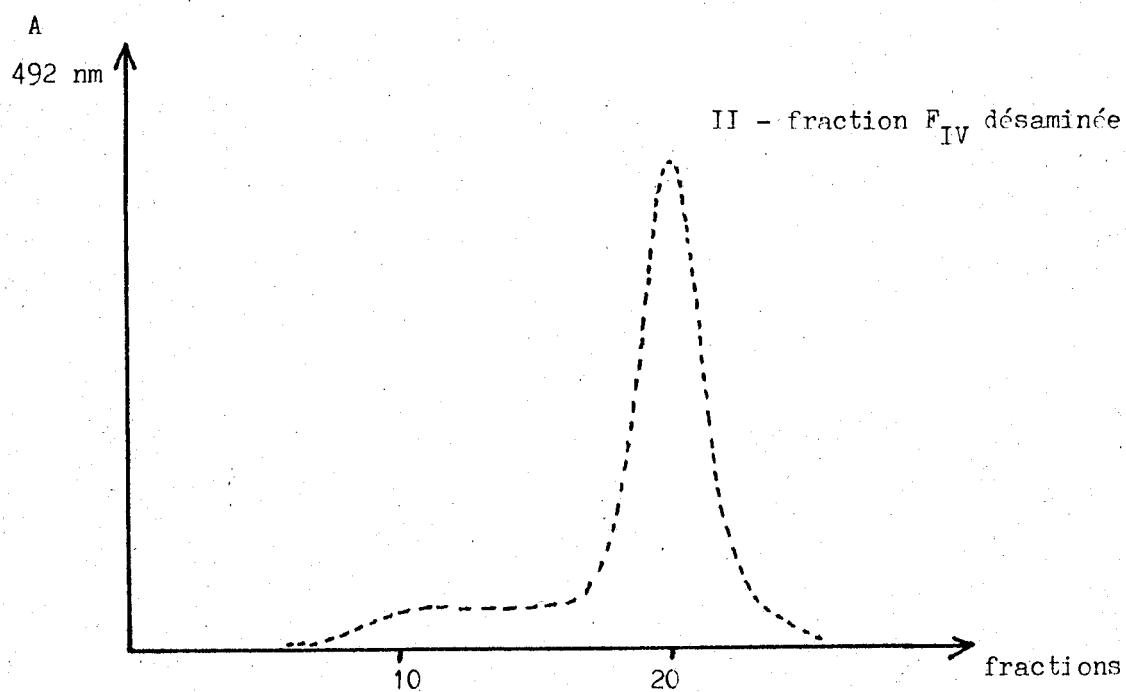
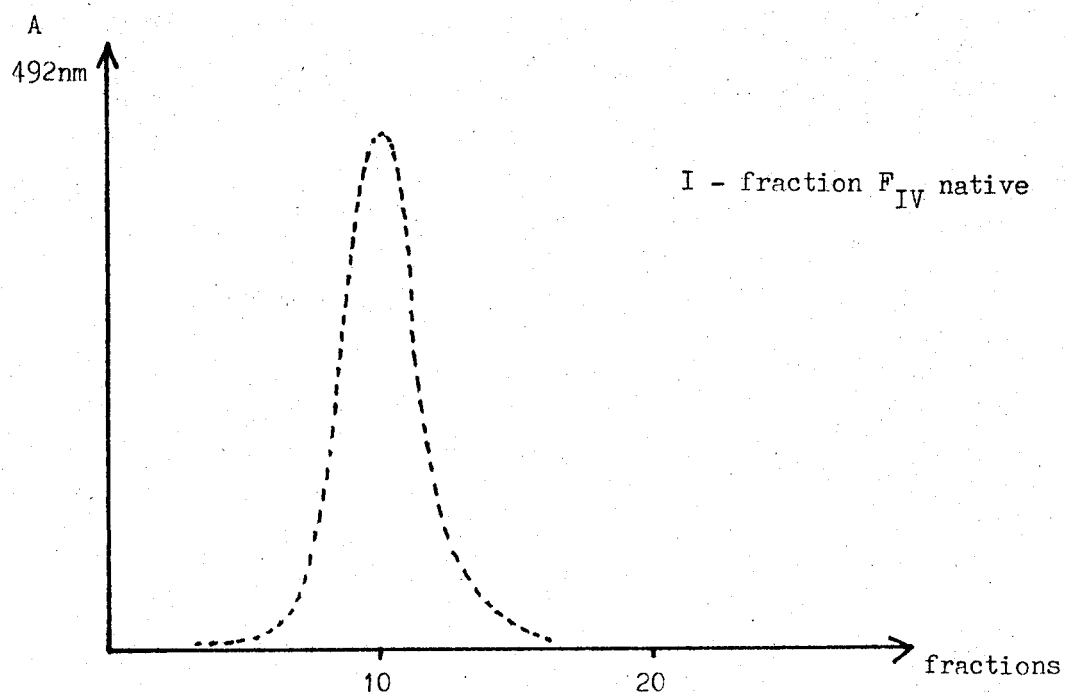


Figure 21 Chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne d'Ultrogel AcA 34 des produits de la désamination nitreuse de la fraction  $F_{IV}$



La viscosité intrinsèque élevée est la preuve que le polysaccharide est responsable de la viscosité des moûts de fermentation de Bacillus subtilis souche Rapidase. Ces deux propriétés physiques expliquent les problèmes rencontrés au cours des opérations de filtration.

L'étude chimique du polysaccharide montre qu'il possède une composition complexe. Mais, la nature macromoléculaire du polysaccharide, la présence de résidus d'hexosamines non acétylées et d'acide glucuronique ne nous permettent pas d'obtenir une hydrolyse quantitative des liaisons glycosidiques. Nous avons cependant réduit 60 p 100 de l'acide glucuronique du polysaccharide et ces résultats sont en cours d'étude. La composition molaire glucidique qui est donnée, est fragmentaire et approximative.

Le caractère hétérogène de la composition glucidique est encore accentué par la présence du 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose ou bacillosamine. Ce diacétamidohexose est un constituant des parois de Bacillus licheniformis ATCC 9945 (SHARON et al (85)) et cet argument est en faveur de l'origine pariétale de la fraction F<sub>IV</sub>.

L'ensemble de ces résultats nous a permis d'identifier le composé responsable de la viscosité des moûts de fermentation, d'envisager son origine et de commencer son étude chimique et structurale. Il nous restait cependant, à montrer que le polysaccharide purifié est le substrat de l'"Enzyme X". Ces résultats sont exposés dans le chapitre suivant.



Hydrolyse enzymatique de  
la fraction F<sub>IV</sub>

Nous avons abordé cette étude pour montrer que la fraction F<sub>IV</sub>, responsable de la viscosité des moûts de fermentation de Bacillus subtilis souche Rapidase, était le substrat de l' "Enzyme X". Ce travail a débuté en collaboration avec DELEBASSEE ( 23 ) par l'isolement et la purification de l' "Enzyme X". L'analyse des produits de la dépolymérisation enzymatique de la fraction F<sub>IV</sub>, nous a permis de caractériser l' "Enzyme X" comme étant une endoglycosidase et plus particulièrement une endo-N-acétylhexosaminidase.

### I - Isolement et purification de l' "Enzyme X"

L' "Enzyme X" synthétisée par Bacillus subtilis souche Rapidase est très instable si elle est conservée sous forme non purifiée. Enfin, pour des raisons techniques, il est plus intéressant, à l'échelon industriel, d'utiliser cette enzyme sous la forme de poudre atomisée.

#### A - Préparation de la poudre "Enzyme X" atomisée

C'est à partir de ce substrat que nous avons purifié l' "Enzyme X". Le milieu de fermentation total subit dans un premier temps une opération de floculation qui permet d'éliminer la majorité des cellules. Le surnageant est filtré stérilement sur carton C<sub>5</sub> et E.K.S. et l'éluat est atomisée en présence d'un agent de stabilisation : l'albumine.

#### B - Purification de l'enzyme

Les étapes successives de la purification de l'enzyme ont été décrites dans le chapitre Matériel et Méthodes.

##### 1 - Inhibition des protéases

Les différents essais de conservation de l'enzyme en solution aqueuse, nous ont conduit à utiliser des inhibiteurs des protéases alcalines

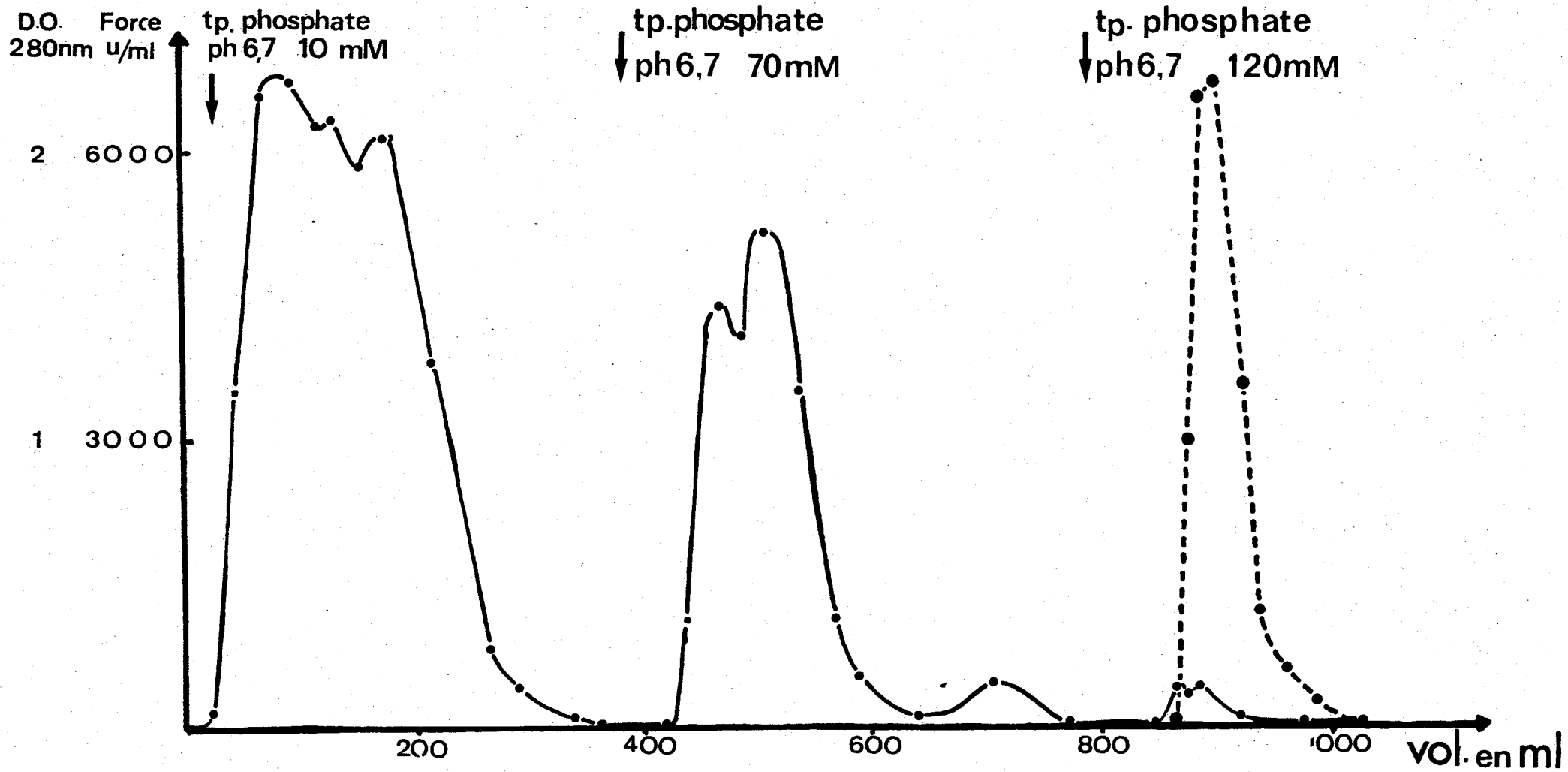


Figure 22: Chromatographie de l'enzyme X sur colonne de DEAE Cellulose

- Proteines (Absorbance à 280nm)
- Activité enzymatique

Tableau XVI Degré de purification de l' " Enzyme X " au cours du fractionnement

---

Degré de purification

---

Enzyme atomisée	1
Précipité acétonique	6
Précipité sulfate d'ammonium	12
Chromatographie DEAE-Cellulose	410

---



et acides. Les solutions d'"Enzyme X" renferment de l'EDTA et du PMSF et elles peuvent ainsi être traitées car la perte de l'activité enzymatique est faible.

## 2 - Résultats

Le degré de purification de l'enzyme après précipitation acétonique est de 6. La précipitation au sulfate d'ammonium permet de purifier 12 fois l'enzyme (Tableau XVI).

La chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose du précipité au sulfate d'ammonium nous permet d'isoler une fraction, éluée par le tampon phosphate 120mM, pH 6,7, qui renferme l'activité enzymatique, (Figure 22). Le degré de purification atteint 410.

Les solutions d'enzyme purifiée par cette méthode sont actives et peuvent être conservées à + 4°C. Cependant, l'enzyme perd toute activité lorsqu'elle est lyophilisée.

## II - Dépolymérisation enzymatique de la fraction F<sub>IV</sub>

### A - Mise en évidence de la diminution de la viscosité

Une solution du mucus 895 est rapidement hydrolysée et la viscosité baisse sensiblement. Notre travail s'est plus particulièrement porté sur l'étude de la baisse de viscosité de la fraction F<sub>IV</sub>. La fraction F<sub>IV</sub> native possède une viscosité intrinsèque de 323 ml/g. Après une hydrolyse de 24 h à 37° C, la viscosité intrinsèque du polysaccharide est de 93,12 ml/g (Tableau XVII).

### B - Mise en évidence de l'activité endoglycosidasique

La chromatographie sur papier des hydrolysats enzymatiques de la fraction F<sub>IV</sub> ne mettent pas en évidence, la libération de monosaccharides. Aussi avons-nous cherché à caractériser les produits de dégradation de la fraction F<sub>IV</sub>, par chromatographie de tamisage moléculaire, ultracentrifugation analytique et par la détermination de la masse moléculaire des chaînes polysaccharidiques libérés.

#### 1 - Chromatographie de tamisage moléculaire

La fraction F<sub>IV</sub> est mise à incuber en présence d'enzyme dans les conditions décrites page 56. L'hydrolysate de la fraction F<sub>IV</sub> est chromatographié sur une colonne de Biogel P 150 qui a été étalonnée par la fraction F<sub>IV</sub>

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

	$F_{IV}$ Native	$F_{IV}$ Dépolymérisée
Masse moléculaire	1 050 000	19 500
$[\eta]$ en ml/g	323	93,12

BUS  
LILLE

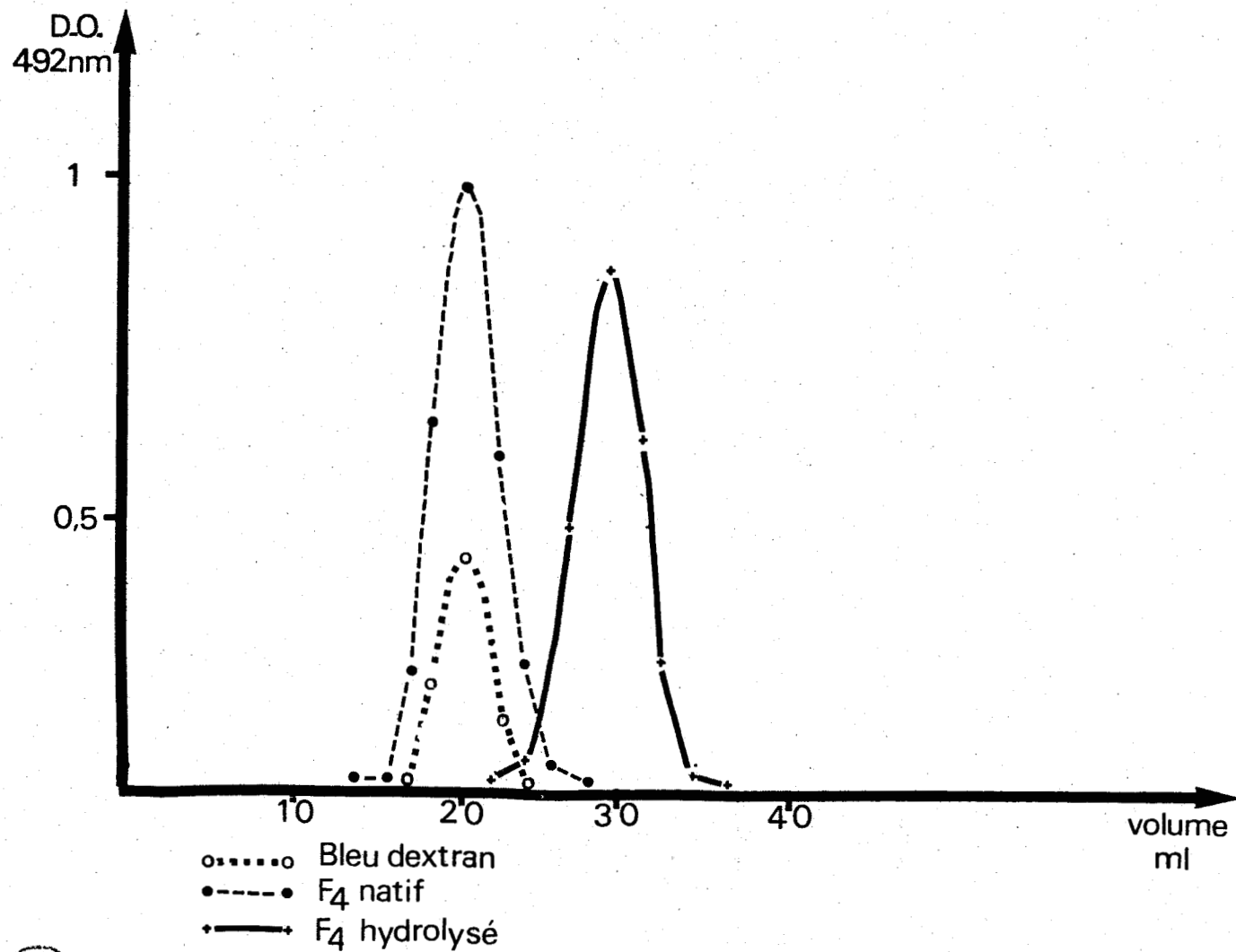


Figure 23: chromatographie sur Biogel P150 de l'hydrolysate enzymatique de la fraction 4



native et le bleu dextran. Le profil d'éluion montre que la fraction  $F_{IV}$  est éluée en même temps que le Bleu dextran. Par contre, la fraction  $F_{IV}$  hydrolysée est retardée sur la colonne mais elle conserve un caractère macromoléculaire (Figure 23).

## 2 - Ultracentrifugation analytique

Les résultats apportés par l'analyse des diagrammes obtenus par ultracentrifugation analytique confirme ceux obtenus par chromatographie de tamisage moléculaire. La fraction  $F_{IV}$  hydrolysée possède une masse moléculaire inférieure à celle de la fraction native (Figure 24).

## 3 - Détermination de la masse moléculaire de la fraction $F_{IV}$ hydrolysée

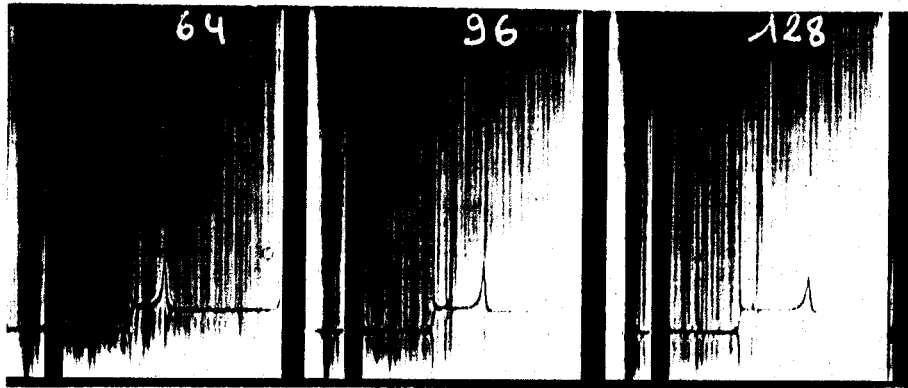
L'hydrolyse de la fraction  $F_{IV}$  par l'"Enzyme X" purifiée, conduit à la formation d'un polysaccharide de masse moléculaire estimée à 19500 daltons. Ce résultat n'est pas rigoureusement exacte car la colonne d'Ultrogel AcA 34 utilisée, a été calibrée avec des substances de nature protidique. Nous possédons, cependant, un ordre de grandeur du polysaccharide formé.

## C - Mise en évidence de l'activité endo-N-acétylhexosaminidasique

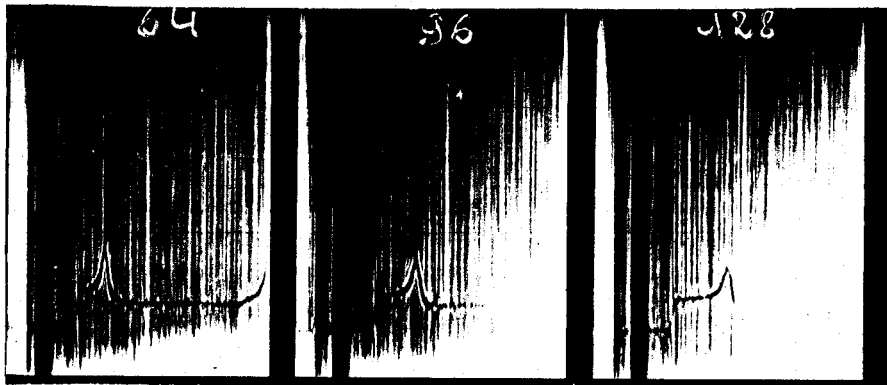
L'activité endo-N-acétylhexosaminidasique a été établie par la méthode colorimétrique de dosage des N-acétylhexosamines situées en position terminale réductrice (REISSIG et al ( 68)). Nous avons suivi l'apparition des N-acétylhexosamines en position réductrice en fonction de la baisse de viscosité de la fraction  $F_{IV}$  (Figure 25 ). L'augmentation des groupements N-acétylhexosamines réducteurs terminaux est directement en relation avec la baisse de viscosité du polysaccharide. Après 5 heures d'hydrolyse, la viscosité du polysaccharide atteint un palier et nous n'observons plus d'augmentation de N-acétylhexosamines en position terminale réductrice.

## III - Conclusion

L'"Enzyme X" que nous avons isolée et purifiée des moûts de fermentation de Bacillus subtilis souche Rapidase, est active sur la fraction  $F_{IV}$  purifiée. Elle dépolymérise ce polysaccharide et libère des chaînes de masse moléculaire élevée. Elle est inactive sur les autres fractions du mucus 895. Son substrat



I - fraction  $F_{IV}$  native



II - fraction  $F_{IV}$  dépolymérisée



Figure 24 : Diagrammes des fractions  $F_{IV}$  native et  $F_{IV}$  dépolymérisée obtenus par ultracentrifugation analytique.



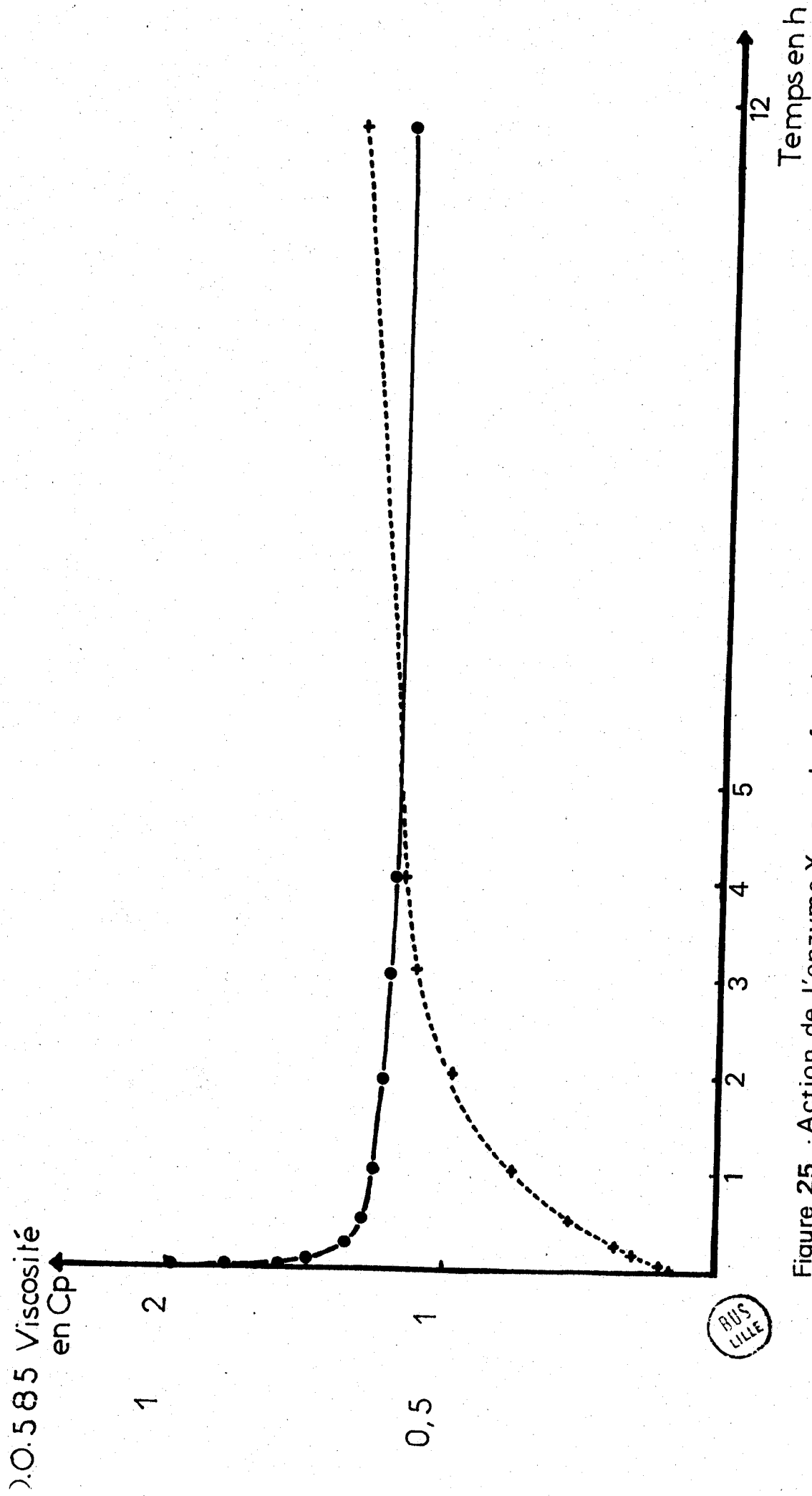


Figure 25 : Action de l'enzyme X sur la fraction visqueuse du mucus

● — Viscosité  
 † - - - - Dosage des groupements N-acetyl osamine réducteurs terminaux

BUS LILLE

spécifique est la fraction F<sub>IV</sub>.

Le nombre de coupure enzymatique peut être évalué à 50. L'étude des produits de dégradation nous permet de conclure que cette enzyme est une endo-N-acétylhexosaminidase.

Il nous reste maintenant à mettre en évidence l'ose en position terminale réductrice après l'hydrolyse enzymatique de la fraction F<sub>IV</sub>. Ce résultat sera obtenu lorsque l'hydrolyse des liaisons glycosidiques sera réalisée quantitativement.

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

---

A l'origine de mes travaux se situent les deux problèmes technologiques posés par la Société Rapidase de Seclin :

1° - Celui de l'identification de la substance visqueuse qui apparaît parfois dans les moûts de fermentations de Bacillus subtilis, souche Rapidase, destinés à l'isolement d'une  $\alpha$ -amylase et qui provoque le colmatage des filtres et la perte des préparations ;

2° - Celui de l'isolement, de la purification et de l'identification de l'"Enzyme X" dont l'absence dans les moûts est responsable de l'apparition de la viscosité de ces derniers.

Nous avons abordé ces deux problèmes en nous proposant de réaliser, dans un premier temps, l'isolement et la purification de la substance visqueuse et dans un second temps, de l'utiliser comme substrat spécifique de l'"Enzyme X".

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude sont les suivantes :

1° - Dans une première phase, nous avons mis au point, en collaboration avec les Laboratoires de la Société Rapidase, un procédé d'ultrafiltration sur membrane Amicon 50000, qui nous a permis de préparer, à partir du milieu de fermentation brut, une fraction hétérogène d'un "mucus" qui renferme le composé visqueux, puisqu'il possédait une viscosité intrinsèque élevée et était sensible à l'action de l'"Enzyme X", Cette préparation est utilisée à l'échelon industriel pour déterminer l'activité enzymatique X au cours de la fermentation.

L'analyse de la composition centésimale du mucus montre qu'il s'agit d'une substance de nature glucidique et protidique, hétérogène, riche en N-acétylhexosamines, en acides uroniques et en composés phosphorylés. La mise en évidence de composés anioniques nous a guidé dans le choix des procédés de fractionnement du mucus destinés à en isoler la substance visqueuse.

2° - Le fractionnement du mucus a été réalisé par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Dowex 1 x 2, à l'aide d'un gradient d'acide

chlorhydrique croissant linéairement de 0 à 1 M qui fournit 5 fractions bien caractéristiques.

3° - L'étude de la composition chimique de ces 5 fractions, a fourni les résultats suivants : les fractions  $F_I$  et  $F_{III}$  sont de nature glycoprotidique ; la fraction  $F_{II}$  est protéidique ; les fractions  $F_{IV}$  et  $F_V$  sont des polysaccharides ; la fraction  $F_V$ , riche en glycérophosphates, renferme des acides téichoïques.

4° - L'analyse comparative des propriétés viscosimétriques de chacune de ces fractions, montre que la fraction  $F_{IV}$  possède la viscosité intrinsèque la plus élevée ( $[\eta] = 323 \text{ ml/g}$ ). Elle est donc le support de la viscosité des milieux de fermentations de Bacillus subtilis souche Rapidase.

5° - La fraction  $F_{IV}$  a été purifiée par une seconde chromatographie sur la colonne de Dowex 1 x 2, avec un gradient d'éluion en acide chlorhydrique plus étalé : de 0 à 0,5 M. Nous avons ainsi obtenu une fraction homogène.

6° - Cette fraction purifiée est constituée par un polysaccharide dont la masse moléculaire, déterminée par ultracentrifugation analytique est de  $1000000 \pm 50000$  daltons. Sa viscosité intrinsèque est de  $323 \text{ ml/g}$ . Il est constitué de 24 p 100 de monosaccharides neutres, de 51,5 p 100 de N-acétylhexosamines, de 3,5 p 100 d'acides uroniques, et de 0,92 p 100 de reste phosphoryles. Il persiste donc un indosé de 19 p 100.

7° - Les monosaccharides neutres ont été identifiés au galactose et au mannose, l'acide uronique à l'acide glucuronique et les hexosamines (dont une partie est sous forme non acétylée,) à la N-acétylgalactosamine, à la N-acétylglucosamine et au 2,4-diacétamido-2,4,6-tridéoxyglucose (bacillosamine). Ce dernier sucre n'avait, jusqu'à présent, été mis en évidence que dans les glucides élaborés par Bacillus licheniformis ATCC 9945 (SHARON et JEANLOZ (24)). Nous en avons confirmé la structure chimique par spectrométrie de masse.

8° - La nature macromoléculaire du polysaccharide aussi, et surtout, la présence d'acides uroniques et d'hexosamines non acétylées nous ont empêché d'hydrolyser quantitativement les liaisons glycosidiques et de déterminer

avec précision, la composition molaire en monoaccharides du composé et les rapports molaires que nous proposons doivent être considérés comme très approximatifs et provisoires : galactose 5, mannose 1, acide glucuronique 1, N-acétylglucosamine 6, N-acétylgalactosamine 9, bacillosamine 1. La présence de la bacillosamine nous fournit un renseignement précieux sur l'origine du polysaccharide visqueux car il a été démontré que ce glucide est un constituant des polymères de paroi chez Bacillus licheniformis ATCC 9945. Par analogie, nous pouvons donc supposer que notre polysaccharide est d'origine pariétale et que son apparition dans le milieu de fermentation, est liée à une lyse bactérienne. Cette hypothèse est étayée par les faits suivants :

- La viscosité augmente lorsque la fermentation atteint cinquante heures d'âge, c'est-à-dire que la culture bactérienne est proche de la phase de lyse ;

- La fraction  $F_V$  que nous avons isolée du mucus renferme des acides téichoïques dont on sait qu'ils sont des constituants des parois de nombreuses bactéries.

9° - L'"Enzyme X" a pour substrat spécifique le polysaccharide. Nous l'avons purifiée par fractionnement sur colonne de DEAE - cellulose après précipitation par sulfate d'ammonium de la préparation enzymatique industrielle.

Au cours de cette purification, nous avons observé que des protéinases étaient responsables de l'instabilité de l'"Enzyme X" en solution. Leur inhibition par l'EDTA et par le P.M.S.F. nous a permis d'isoler une enzyme active et purifiée 400 fois. Ce résultat a conduit la Société Rapidase à préparer une poudre "Enzyme X", atomisée, stable, qui est utilisée à l'échelon industriel pour diminuer la viscosité des moûts de fermentation.

10° - L'activité endoglycosidasique de l'"Enzyme X" a été démontrée par la mise en évidence de la diminution de la masse moléculaire du polysaccharide purifié. Nous avons prouvé que l'endoglycosidase est une endo-N-acétylhexosaminidase en caractérisant les résidus de N-acétylhexosamines apparus en position terminale réductrice.

11° - Les problèmes que la Société Rapidase nous avait soumis : l'isolement de la substance responsable de la viscosité des moûts de fermentation et la caractérisation de l'"Enzyme X", sont donc partiellement résolus. Toutefois, de nombreuses recherches sont encore nécessaires pour établir la composition chimique exacte et la structure du polysaccharide ainsi que la nature précise de

l'endo-N-acétylhexosaminidase. D'autre part, l'origine pariétale du polysaccharide pourra être déterminée par des études en microscopie électronique. Enfin nous nous proposons de réticuler le polysaccharide dont nous possédons des quantités importantes et de l'utiliser comme support d'affinité en vue d'isoler et de purifier industriellement l'"Enzyme X".

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

- 1 - ABRAHAM E.P., ROBINSON R., *Nature*, 1937, 140, 24 (p.25)
- 2 - ALLEN R.J.L., *Biochem. J.*, 1940, 74, 858 (p.42, 67)
- 3 - ANDERSON A.T. et ARCHIBALD A.R., *Biochem. J.*, 1975, 151, 115 (p.16)
- 4 - ARAKAWA W. et MURAMATSU T., *J. Biochem.*, 1974, *J. Biochem.*, 1974, 76, 307 (p.31)
- 5 - ARCHIBALD A.R., BADDILEY J. et BUCHANAN J.G., *Biochem. J.*, 1961, 80, 254 (p.14)
- 6 - ARCHIBALD A.R. et BADDILEY J., *Biochem. J.*, 1965, 95, 1964 (p.14, 16)
- 7 - ARMSTRONG J.J., BADDILEY J. et BUCHANAN J.G., *Biochem. J.*, 1960, 76, 610 (p.14, 16)
- 8 - BADDILEY J., *Essays Biochem.*, 1972, 18, 35 (p.14)
- 9 - BERGER L.R. et WEISER R.S., *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 26, 517 (p.25)
- 10 - BETHENCOURT M. et PLOUVIER R., *DEA Fac. Sci. Lille* 1973 (p.61, 62, 64)
- 11 - BOAS N.F., *J. Biol. Chem.*, 1953, 204, 553 (p.48)
- 12 - BOERSMA A., LAMBLIN G., ROUSSEL P., DEGAND P. et BISERTE G., *CR. Acad. Sc. Paris*, 1976, 281, 1269 (p.28)
- 13 - BURGER M.M. et GLASER L., *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 3168 (p.14, 64)
- 14 - CANFIELD R.E., *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 2691 (p.27)
- 15 - CANFIELD R.E., *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 2698 (p.25)
- 16 - CHENG K.J., HIRONAKA R., JONES G.A., NICAS T. et COSTERSON J.W., *Can. J. Microbiol.* 1976, 22, 450 (p.24)
- 17 - CHERVENKA C.H., *Anal. Biochem.*, 1970, 34, 24 (p.44)
- 18 - CHIEN S.F., YEVICH J., LI S.C., LI Y.I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, 65, 683 (p.29, 30)
- 19 - CUMMINS C.S. et HARRIS H., *J. Gen. Microbiol.*, 1959, 177, 327 (p.11)
- 20 - DAVISON A.L., BADDILEY J., HOFSTAD T., LOSNEGARD N., CEDING P., *Nature*, 1964, 202, 872 (p.18)
- 21 - De BOER R., KRUYSSSEN F.J. et WOUTER T.M., *Eur. J. Biochem.*, 1976, 62, 1 (p.16)
- 22 - DELEBASSEE D. et SAMOR B., *DEA Fac. Sc. Lille*, 1974, (p.61, 62)
- 23 - DELEBASSEE D., *Thèse Doc. 3° Cycle Lille*, 1977 (p. 56, 95)
- 24 - DISCHE Z., *Biochem. Z.*, 1927, 189, 77 (p.40)
- 25 - DUCKWORTH M., ARCHIBALD A.R., BADDILEY J., *Biochem. J.*, 1972, 130, 691 (p.19)
- 26 - ELLWOOD D.C., *Biochem. J.*, 1970, 118, 367 (p.21, 22)
- 27 - 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)

- 28 - ELLWOOD D.C. et TEMPEST D.W., J. Gen. Microbiol., 1972, 73, 395 (p.21)
- 29 - ENDO Y. et KOBATA A., J. Biochem., 1976, 80, 1 (p.32)
- 30 - FAN D.P. et BECKMAN M.M., J. Bacteriol., 1972, 109, 1258 (p.35)
- 31 - FAN D.P. et BECKMAN M.M., J. Bacteriol., 1973, 114, 804 (p.29, 30, 31, 32, 35)
- 32 - FISCHER F.G. et NEBEL H.J., Z. Physiol. Chem., 1955, 303, 10 (p.41, 50, 72)
- 33 - FLEMING A., Proc. Roy. Soc. (LONDON), 1922, B.93, 306 (p.25)
- 34 - FOURNET B., Thèse Doc: es Sci. Lille 1973 (p.41)
- 35 - GARDELL S., Acta Chem. Scand., 1953, 7, 207 (p.48, 87)
- 36 - GHUYSEN J.M., STROMINGER J. et TIPPER D.J., Extracellular and Supporting Structures 1968, Vol. A-26, Comprehensive Biochemistry, FLORKIN et STOTZ ed. (p.12)
- 37 - GHUYSEN J.M., DIERICK L., COYETTE J., LEY-BOUILLE M., GUINAND M. et CAMPELL J.N., Biochemistry, 1969, 8, 213 (p.35)
- 38 - GLYNN A.A., MARTIN W. et ADINOFFI M., Nature, 1970, 225, 77 (p.27)
- 39 - HAMADA N., FUKUMOTO J., YAMAMOTO T., Agr. Biol. Chem., 1971, 35, 1052 (p.16, 39, 42, 65)
- 40 - HAMAGUCHI K. et FUNATSU M., J. Biochem., 1959, 46, 1659 (p.27)
- 41 - HANES C.S. et ISHERWOOD F.A., Nature, 1949, 164, 1107 (p.42)
- 42 - HAYASHI K., FUJIMOTO N., KUGIMIYA M. et FUNATSU M., J. Biochem., 1969, 65, 401, (p. 27)
- 43 - HOOK M., LINDHAL U., IVERIUS P.H., Biochem. J., 1974, 137, 33 (p.52, 53)
- 44 - HORTON D., The Amino Sugars, 1969, Vol IA, 186, JEANLOZ R.W. ed., Acad. Press Inc. (p.19)
- 45 - HUGHES R.C., PAVLIK J.G., ROGERS H., TANNER P.J., Nature (London), 1968, 219, 643, (p.12)
- 46 - HUGHES R.C. et THURMANS D.F., Biochem. J., 1970, 117, 441 (p.18)
- 47 - ITO S., MURAMATSU T., KOBATA A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 63, 938, (p.30)
- 48 - IWATA S., Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 1974, 48, 187 (p.27, 28)
- 49 - JANCZURA E., PERKINS H. R., ROGERS J., Biochem. J., 1961, 80, 82 (p.27, 28)
- 50 - JOLLES J., JAUREGUI-ADELL J., BERNIER I. et JOLLES P., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 78, 668 (p. 25, 26, 27)
- 51 - JOLLES J. et JOLLES P., Nature, 1961, 192, 1187 (p.27)
- 52 - JOLLES J. et JOLLES P., Biochemistry, 1967, 6, 411, (p.27)
- 53 - JOLLES P., Angew. Chem. Intern. Ed. Engl., 1964, 3, 28 (p. 25)
- 54 - KELEMEN M.V. et ROGERS H. J., Proc. Acad. Sci. US, 1971, 68, 982 (p.12)
- 55 - KOIDE N. et MURAMATSU T., J. Biol. Chem., 1974, 249, 4897 (p.29, 30)
- 56 - LAMBERT P.A., HANCOCK I.C. et BADDILEY J., Biochem. J., 1975, 149, 519 (p.18)
- 57 - LEE Y.C., WU Y.C. et MONTGOMERY R., Biochem. J., 1964, 91, 9 (p.31)
- 58 - LEY-BOUILLE M., GHUYSEN J.M., TIPPER D.J. et STROMINGER J.L., Biochemistry, 1966, 5, 3079 (p.25)
- 59 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR L. et RANDALL R.J., J. Biol. Chem., 1951, 193, 265 (p. 25)



- 60 - MAHADHAVAN S. et TAPPEL A.L., J. Biol. Chem., 1967, 242, 4568 (p.34)
- 61 - MAKINO M., KOJIMA T., YAMASHINA I., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1966, 24, 961 (p.34)
- 62 - MAKINO M., KOJIMA T., OHGUSHI T. et YAMASHINA I., J. Biochem, 1968, 63, 186 (p.34)
- 63 - MATSUSHIMA Y., HARA S., MIMAHARA T. et ENUMERA Y., Seikagaky (Japanese), 1965, 37, 616 (p.27)
- 64 - MAUCK J. et GLASER L., J. Biol. Chem., 1972, 247, 1180 (p.18)
- 65 - MEERS J.L. et TEMPEST D.W., J. Gen. Microbiol., 1970, 63, 325 (p.24)
- 66 - MICHL H., Monatsch. Chem., 1951, 82, 489 (p.50)
- 67 - MONTREUIL J., Thèse Doc. es Sci. Lille, 1952 (p.42)
- 68 - MONTREUIL J. et SPIK G., "Microdosages des Glucides", Fasc. I, Fac. Sci. Lille ed., 1963 (p.40, 58, 87, 101)
- 69 - MONTREUIL J. et SPIK G., Monographie n° II, Fac. Sci. Lille ed., 1968, (p.40)
- 70 - MURAKAMI M. et EYLAR E.H., J. Biol. Chem., 1965, 240, 556 (p.34)
- 71 - MURAMATSU T., J. Biol. Chem., 1971, 246, 5535 (p.30)
- 72 - NAKAJIMA T., BALLOU C.E., J. Biol. Chem., 1974, 249, 7685 (p.28)
- 73 - NISHIGAKI M., MURAMATSU T., KOBATA A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, 59, 638 (p.28, 29)
- 74 - OKADA S. et KITAHATA S., J. Ferment. Technol., 1973, 51, 705 (p.26, 27)
- 75 - PARTRIDGE S.M., Biochem. J., 1948, 42, 248 (p.50)
- 76 - PARTRIDGE S.M., Biochemical Society Symposia, 1949, 3, 52 (p.41)
- 77 - PETIT J.F. et JOLLES P., Nature, 1963, 200, 168 (p.27)
- 78 - PLUMMER T.H., TARENTINO A., MALEY F., J. Biol. Chem., 1968, 243, 51 (p.53)
- 79 - REISSIG J.L., LAI W.H. et GLASGOW J.E., Can. J. Biochem., 1975, 53, 1237 (p.33)
- 80 - RIMINGTON C., Biochem. J., 1940, 34, 931 (p.40)
- 81 - SALTON M.R.J., Nature, 1952, 170, 746 (p.25)
- 82 - SALTON M.R.J. et GHUYSEN J.M., Biochim. Biophys. Acta, 1959, 36, 252 (p.25)
- 83 - SALTON M.R.J., Ann. Rev. Biochem., 1965, 34, 143 (p.25)
- 84 - SHARON N. et JEANLOZ R.J.L., J. Biol. Chem., 1960, 235, 1 (p.11, 19, 48, 49, 50, 86, 92, 94)
- 85 - SHARON N., SHIF I. et ZEHAVI V., Biochem. J., 1964, 93, 210 (p.19, 87)
- 86 - SHIBAEV V.N., DUCKWORTH M., ARCHIBALD A.R., BADDILEY J., Biochem. J., 1973, 135, 383 (p.19)
- 87 - SPACKMAN D.H., STEIN W.A. et MOORE S., Anal. Chem., 1958, 30, 1190 (p.42)
- 88 - STIRLING J.L., FEBS Letters, 1974, 39, 171 (p.28)
- 89 - TAKAHARA Y., MACHIGAKI E. et MURAO S., Agr. Biol. Chem., 1974, 38, 2357 (p. 26)
- 90 - TANAKA M., KWOHONO M. et YAMASHINA I., J. Biochem., 1973, 73, 1285 (p.34)
- 91 - TARENTINO A.L. et MALBY F., Arch. Biochem. Biophys., 1969, 130, 295 (p.34)
- 92 - TARENTINO A.L. et MALBY F., J. Biol. Chem., 1974, 249, 811 (p.29, 30)
- 93 - TARENTINO A.L. et MALBY F., J. Biol. Chem., 1976, 251, 6537 (p.28, 29, 30, 31)
- 94 - TARENTINO A.L., PLUMMER T.H., MALBY F., J. Biol. Chem., 1972, 247, 2629 (p. 30)

- 95 - TARENTINO A.L., PLUMMER T.H., MALEY F., J. Biol. Chem., 1974, 249, 818 (p.31)
- 96 - TEMPEST D.W., DICKS J.W., ELLWOOD D.C., Biochem. J., 1968, 106, 237 (p.19)
- 97 - TILLMANS J. et PHILIPPI K., Biochem. Z., 1929, 215, 36 (p.40)
- 98 - TREVELYAN W.E., PROCTER D.P., HARRISSON J.S., Nature, (London), 1950, 166, 444, (p. 41)
- 99 - WARD J., Biochem. J., 1973, 133, 395 (p.12)
- 100 - WHITE T., J. Chem. Soc., 1940, 239, 428 (p. 50)
- 101 - WICKEN A.J. et BADDILEY J., Biochem. J., 1963, 87, 54 (p.18)
- 102 - WICKEN A.J., Biochem. J., 1966, 99, 108 (p.14)
- 103 - WRIGHT J. et HECKELS J.E., Biochem. J., 1975, 147, 187 (p.19)
- 104 - WYKE A.W. et WARD J.B., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 65, 877 (p.18)
- 105 - YOUNG F.E., SPIZIZEN J., CRAWFORD I.P., J. Biol. Chem., 1963, 238, 31 (p.19)
- 106 - YOUNG F.E., Nature (London), 1965, 207, 104 (p.21)
- 107 - ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C. et VINCENDON G., J. Chromatogr., 1972, 69, 291, (p. 41)