

50376
1987
69

50376
1987
69

N° d'ordre : 111

T H E S E

présentée

à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN BIOCHIMIE APPLIQUEE

par

Patrice PELLERIN



**CARACTERISATION DES OLIGOSACCHARIDES
DE METHANOTHRIX SOEHNGENII**

Mise en évidence de liaisons covalentes avec les protéines

Exemplaire corrigé après avis du jury

Présentée le 15 Mai 1987 devant la Commission d'Examen

Président : B. FOURNET
Rapporteurs : P. SAUTIERE
G. STRECKER
Examineurs : G. ALBAGNAC
P. DEBEIRE
A. VERBERT

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur **Philippe DEBEIRE** à la Station de Technologie Alimentaire (Directeur : Monsieur Guy **ALBAGNAC**) de l'**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE**.

RESUME

Nous avons étudié les glucides de la souche FE de *Methanothrix soehngeni*, bactérie méthanogène dominante dans les digesteurs anaérobies. Les cellules sont dépourvues d'exopolysaccharides solubles mais contiennent 2% de glycogène intracellulaire.

Methanothrix est entourée d'une gaine protéique très résistante aux agents protéolytiques, chaotropiques et dénaturants, qui contient, dans le cas de la souche FE, 7% de glucides (Rha/Rib/Fuc : 5/1/1). Nous avons montré que le milieu de culture et le mode de lyse des cellules ont une incidence sur la composition glucidique des préparations de gaine et avons constaté une grande variabilité entre les souches de *Methanothrix*.

Les oligosaccharides de 15 à 30 résidus sont liés de manière covalente aux peptides. La gaine ne peut être solubilisée que par l'hydrazine anhydre à chaud. Nous avons utilisé des temps d'hydrazinolyse inférieurs à 5 min pour solubiliser une fraction glycoprotéique (50% du poids sec) contenant 20% de glucides. Sa masse moléculaire supérieure à 1 000 kDa indique la présence de nombreuses sous-unités puisque les sous-unités peptidiques ont une masse de 16 kDa.

Nos travaux constituent la première description d'une glycoprotéine chez une bactérie méthanogène.

SUMMARY

We studied the carbohydrates of the strain FE of *Methanothrix soehngenii*, a methanogen which predominates in anaerobic digestors. The cells are devoided of any exopolysaccharide but contain 2% of intracellular glycogen.

Methanothrix is surrounded by a proteic sheath which presents a strong resistance to proteolytic, chaotropic and denaturant reagents and contains, in the case of the strain FE, 7% of carbohydrates (Rha/Fuc/Rib : 5/1/1). We have shown that the culture medium and the cell lysis procedure can modify the glucidic composition of the sheath preparations. There is also a great variability between different strains of *Methanothrix*.

The oligosaccharides of 15 to 30 residues are covalently linked to the peptides. The sheath is soluble in anhydrous hydrazine, we used hydrazinolysis times of less than 5 min to solubilize a glycoproteic fraction (50% of the dry weight) containing 20% of carbohydrates. Its molecular weight above 1,000 kDa indicates the presence of numerous subunits. The major peptide has a molecular weight of 16 kDa.

We report the first description of a glycoproteic in a methanogenic bacteria.

A Monsieur le *Professeur J. MONTREUIL*,

Je voudrais vous exprimer ma gratitude pour m'avoir permis de faire partie de la "famille de la Biochimie lilloise". J'y ai rencontré un environnement scientifique et humain qui m'a fait découvrir le métier de chercheur ; croyez en ma plus profonde reconnaissance.

A Monsieur le *Professeur B. FOURNET*,

Tout au long de ma thèse, vous m'avez permis de bénéficier du savoir-faire et de l'équipement de votre laboratoire. Votre présence à la présidence du jury de cette thèse témoigne de l'intérêt que vous portez à mes travaux ; je vous prie de croire en l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur *G. ALBAGNAC*, Directeur de Recherche à l'I.N.R.A.,

En m'accueillant à la Station de Technologie Alimentaire, vous m'avez permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possibles. Vous avez toujours su m'encourager, en particulier lors de la rédaction de ce mémoire, je sais que vous continuerez à le faire pour les années à venir ; veuillez trouver ici mes plus vifs remerciements et le témoignage de mon attachement.

A Monsieur *P. SAUTIERE*, Directeur de Recherche au C.N.R.S.,

Votre haute compétence dans le domaine des protéines rend très précieuse votre participation à ce jury en tant que rapporteur et permet d'équilibrer sa composition "glucidique" ; je vous en suis très reconnaissant.

A Monsieur *G. STRECKER*, Directeur de Recherche au C.N.R.S.,

J'ai toujours apprécié votre disponibilité et votre enthousiasme scientifique, je suis très heureux que vous ayez accepté de juger cette thèse en tant que rapporteur ; soyez en vivement remercié.

A Monsieur le *Professeur A. VERBERT*,

Vous m'avez toujours manifesté votre amitié lors de mon D.E.A. comme lors de mes "séjours" au laboratoire de Chimie Biologique depuis le début de mes travaux de thèse. Votre présence dans ce jury est pour moi un grand honneur ; je vous en suis très reconnaissant.

A Monsieur **P. DEBEIRE**, Chargé de Recherche à l'I.N.R.A.,

Par ta disponibilité jamais démentie, ta passion de la précision et du travail de qualité, ton sens de la discussion critique et du partage de tes connaissances, mais aussi et surtout par ton amitié et ta bonne humeur, tu as su me montrer comment doit se faire le métier de chercheur. Je te suis très reconnaissant pour toute l'amitié et la confiance que tu m'as témoignées et espère en avoir été digne. Que ce mémoire soit l'occasion pour moi de te remercier très sincèrement.

A Madame **M. LOONIS**,

Je voudrais te témoigner ma reconnaissance pour l'excellent travail que tu as réalisé lors de ces derniers mois, je sais que tu y as mis toute ta patience et ton sens du travail bien fait ; je te dis toute ma gratitude.

Ces trois années de travail ont été possibles grâce à de nombreux échanges scientifiques et amicaux, je tiens à remercier tout particulièrement :

Messieurs **H.C. DUBOURGIER**, **J.L. ROUSTAN**, **E. SAMAIN**, **J.P. TOUZEL** et **D. VERRIER** pour l'intérêt avec lequel ils ont suivi mes travaux et les nombreux conseils et idées qu'ils m'ont donnés.

Monsieur **P. BOULANGER**, pour sa disponibilité et sa compétence dans la réalisation des travaux en chromatographie en phase gazeuse et en spectrométrie de masse.

Monsieur **B. GRUSON**, pour l'esprit d'amitié et de complémentarité qui a régné entre nous.

Madame **A. HONVAULT**, pour sa précieuse collaboration en spectrométrie de masse.

Monsieur **Y. KARAMANOS**, pour ses conseils et son aide dans les dosages des acétates d'alditols.

Monsieur **J.P. LEPOUTRE**, pour les nombreux dosages d'acides aminés qu'il a réalisés.

Monsieur **J.F. MIGDAL**, pour la qualité des photographies présentées dans ce mémoire.

Monsieur **G. PRENSIER**, pour l'ensemble des travaux microscopiques qu'il a réalisés et la collaboration fructueuse qui en a résulté.

Madame **C. VASSEUR**, pour la bonne humeur, la rigueur et l'efficacité avec lesquelles elle a réalisé la frappe et la mise en forme de ce mémoire.

Tous mes amis du laboratoire de Chimie Biologique qui m'ont toujours réservé un excellent accueil.

Mes camarades de la Station de Technologie Alimentaire, en particulier Mademoiselle **J. THOMAS** et Monsieur **A. RAMIREZ-LOPEZ**, pour leur amitié.

ABBREVIATIONS

ADP-Glc	Adénosine diphosphate glucose
AMP	Adénosine 5'-phosphate
Ara	Arabinose
ATFA	Acide trifluoroacétique
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
C.P.G./S.M.	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
D.O.	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
Gal NH ₂	Galactosamine
Glc	Glucose
Glc Nac	N-acétyl-D-glucosamine
Glc NH ₂	Glucosamine
Man	Mannose
NAD	Nicotinamide-adénine dinucléotide
Rha	Rhamnose
Rib	Ribose
SDS	Sodium dodécyl sulfate
Tal Nac A	Acide N-acétyl-L-talosaminuronique
UDP-Glc	Uridine diphosphate glucose
Xyl	Xylose

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	
GENERALITES	
CHAPITRE I	
LES POLYSACCHARIDES DES BACTERIES METHANOGENES	
I.- LES EXOPOLYSACCHARIDES	23
II.- LES POLYMERES DE RESERVE	24
III.- L'ANABOLISME DES BACTERIES METHANOGENES	25
A.- Synthèse de l'acétyl-CoA	27
B.- Néoglucogénèse et synthèse des acides aminés	28
C.- Le méthanophosphagène	28
IV.- CONCLUSION	30
CHAPITRE II	
LES PAROIS DES BACTERIES METHANOGENES	
I.- LA PSEUDOMUREINE	33
A.- Etude structurale des Méthanobactériales	
B.- Etude biochimique de la pseudomuréine	33
1.- Composition	
2.- Structure	
3.- Stabilité	
4.- Biosynthèse	
II.- LA METHANOCHONDROÏTINE	38
A.- Etude structurale des <i>Methanosarcinae</i>	
B.- Etude biochimique de la méthanochondroïtine	40
1.- Composition	
2.- Structure	
3.- Stabilité	
III.- LES ENVELOPPES PROTEIQUES DE SURFACE	42
A.- Etude ultrastructurale	
B.- Etude biochimique	43
1.- Composition	
2.- Stabilité	
IV.- LES GAINES PROTEIQUES RIGIDES	45
A.- Etude ultrastructurale	
1.- <i>Methanospirillum hungatei</i>	45
2.- <i>Methanothrix</i>	47
B.- Etude biochimique	47
1.- Composition	
2.- Stabilité	
Conclusion	48

CHAPITRE III
LES GLYCOPROTEINES BACTERIENNES

I.-	LES GLYCOPROTEINES DES ARCHEBACTERIES	53
	A.- Les glycoprotéines de l'enveloppe cellulaire des <i>Halobacteria</i>	
	1.- Structure des glycannes	
	2.- Biosynthèse des glycannes	
	3.- Rôle biologique	
	B.- Les glycoprotéines des autres Archéobactéries	58
II.-	LES GLYCOPROTEINES DES EUBACTERIES	61

MATERIEL ET METHODES

I.-	CULTURES DE <i>METHANOTHRIX SOEHNGENII</i>	64
	A.- Choix du milieu de culture	
	B.- Culture de masse	
	C.- Suivi de la culture	65
	1.- Dosage du méthane	
	2.- Dosage de l'acétate résiduel	
	3.- Dosage de la biomasse	
	4.- Dosage des sulfures	
II.-	METHODOLOGIE UTILISEE DANS LA RECHERCHE D'EXOPOLYSACCHARIDES	66
	A.- A partir du milieu de culture	
	B.- A partir des cellules	
	1.- Tentatives d'extraction des exopolysaccharides	
	2.- Suivi de la lyse bactérienne : dosage de l'activité acétate thiokinase	
III.-	PREPARATION DE L'ENVELOPPE DE <i>METHANOTHRIX SOEHNGENII</i> FE	69
	A.- Préparation	
	B.- Microscopie électronique	
IV.-	METHODES DE DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE DE L'ENVELOPPE	
	A.- Détermination de la composition centésimale en C, H, O, N, en cendres et en lipides	70
	1.- Composition globale	
	2.- Pourcentage de cendres	
	3.- Pourcentage de lipides	
	B.- Détermination de la composition en acides aminés et protéines	
	1.- Composition en acides aminés	
	2.- Dosage des protéines	
	C.- Détermination de la composition centésimale et molaire en glucides	71
	1.- Dosages colorimétriques	
	2.- Détermination de la composition molaire en monosaccharides	
V.-	METHODES D'ETUDE DE LA LIAISON GLYCANNE-PROTEINE ET DE LIBERATION DE LA COPULE GLUCIDIQUE	74
	A.- Expériences de β -élimination	74

B.- Expériences d'attaque alcaline	74
C.- Expériences d'hydrazinolyse	75
D.- Expériences d'extraction des glucides aux solvants organiques	
E.- Expériences de solubilisation des protéines	
1.- Tentative de solubilisation par réduction des ponts disulfures	
2.- Solubilisation par traitement rapide à l'hydrazine	
VI.- METHODES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES D'ANALYSE DES OLIGOSACCHARIDES ET DES PROTEINES	78
A.- Analyse des oligosaccharides	78
1.- Chromatographie sur couche mince	
2.- Chromatographie de tamisage moléculaire	
3.- Chromatographie d'échange d'ions	
B.- Analyse des protéines	79
1.- Electrophorèse en gel de polyacrylamide	
2.- Chromatographie de tamisage moléculaire	
3.- Chromatographie d'échange d'ions	
VII.- METHODES D'ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES OLIGOSACCHARIDES PARIETAUX	
A.- Méthylation des oligosaccharides	81
B.- Hydrolyses acides partielles	82

RESULTATS

CHAPITRE I

RECHERCHE DES EXOPOLYSACCHARIDES SOLUBLES DE *METHANOTHRIX SOEHNGENII* FE

I.- ABSENCE D'EXOPOLYMERES DANS LE MILIEU DE CULTURE	85
II.- RECHERCHE D'EXOPOLYSACCHARIDES SOLUBLES PAR EXTRACTION SUR LES CELLULES	
A.- Extraction par agitation mécanique	86
B.- Identification du polysaccharide soluble	
III.- CONCLUSION	88

CHAPITRE II

ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES ASSOCIES A LA FRACTION PARIETALE INSOLUBLE

I.- DETERMINATION DE LA COMPOSITION DES PREPARATIONS D'ENVELOPPE CELLULAIRE DE <i>METHANOTHRIX SOEHNGENII</i> FE	90
A.- Composition globale	
B.- Composition en acides aminés	93
C.- Composition en monosaccharides	95
D.- Conclusion	99
II.- ETUDE DE LA LIBERATION DES GLUCIDES DE L'ENVELOPPE DE <i>METHANOTHRIX SOEHNGENII</i> FE, MISE EN EVIDENCE DE LEUR NATURE GLYCANNIQUE	101
A.- Extraction par les solvants organiques	
B.- Utilisation des méthodes classiques de rupture des liaisons glycannes-protéines	103
1.- Expériences de β -élimination	
2.- Expérience d'attaque alcaline	
3.- Expérience d'hydrazinolyse	

C.- Etude des oligosaccharides libérés par hydrazinolyse	106
1.- Séparation des oligosaccharides	
2.- Résultats préliminaires sur la structure primaire des oligosaccharides	
3.- Hydrolyse acide partielle	
D.- Conclusion	112
III.- MISE EN EVIDENCE DE LA NATURE GLYCOPROTEINIQUE DE L'ENVELOPPE DE <i>METHANOTHRIX SOEHNGENII</i> FE	114
A.- Etude de l'effet de l'hydrazine	114
1.- Cinétique d'hydrazinolyse de la gaine de <i>Methanothrix soehngeni</i> FE	
2.- Cinétique d'hydrazinolyse du fibrinogène bovin	
B.- Solubilisation de la glycoprotéine majeure	117
1.- Tentative de solubilisation de la gaine par réduction des ponts disulfures	
2.- Solubilisation de la gaine par traitement rapide à l'hydrazine et étude préliminaire de la fraction glycoprotéique	
C.- Conclusion	

CONCLUSION

<u>Annexe</u> : LE GLYCOGENE CHEZ <i>METHANOTHRIX</i>	117
---	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION

La nécessité de retenir le maximum de biomasse active dans les digesteurs anaérobies a provoqué le développement de nouveaux procédés, filtres anaérobies et lits fluidisés, dans lesquels les bactéries se fixent et se développent sur des supports inertes (VERRIER, 1984). Nos travaux s'inscrivent dans le cadre des recherches menées à la Station de Technologie Alimentaire, qui visent à une meilleure compréhension de la structure et du mode de formation des biofilms méthanogènes. La tâche majeure qui nous a été confiée était d'entreprendre l'étude des polymères de surface de bactéries méthanogènes modèles jouant un rôle dans l'agrégation des cellules.

Notre choix s'est porté sur *Methanothrix soehngeni* FE, une souche isolée au laboratoire et qui sert de modèle à D. VERRIER pour l'étude de l'adhésion des bactéries méthanogènes aux supports et à B. GRUSON pour l'étude de l'anabolisme des méthanogènes acétoclastes.

On connaît quatre espèces de *Methanothrix* :

- *soehngeni*, une espèce mésophile décrite par HUSER *et al.* (1982).
- *concilii*, décrite par PATEL (1984), ses caractéristiques physiologiques et biochimiques sont identiques à celles de *soehngeni* (TOUZEL, communication personnelle).
- *thermoacetophila*, décrite par NOZHEVNIKOVA *et al.* (1984), pousse entre 50 et 70°C, cette souche n'est pas disponible dans les collections de microorganismes.
- une espèce thermophile, dont la souche CALS-1 a été décrite par ZINDER *et al.* (1987), pousse à 60°C.

Ces bactéries acétoclastes possèdent une forte affinité pour

l'acétate (le K_s apparent est de 0,7 mM). Aussi, en dépit d'un temps de doublement de plus de 70 h et d'un faible rendement de croissance (1,15 g/mole d'acétate consommé), *Methanothrix* domine dans les digesteurs anaérobies mésophiles (VERRIER, 1984) et thermophiles (ZINDER et al., 1984), traitant des eaux résiduelles d'industries agro-alimentaires. Dans ce type de fermenteur, 70% du méthane formé provient de l'acétate, le rôle de *Methanothrix* est donc fondamental dans la production de méthane et dans l'épuration (il élimine les dernières traces d'acétate). Dans les procédés à cellules fixées, il intervient dans l'adhésion initiale sur les supports comme dans la stabilisation des granules (VERRIER et ALBAGNAC, 1985 ; DUBOURGUIER et al., 1985).

Ce mémoire rapporte les travaux que nous avons réalisés sur les glucides de *Methanothrix soehngeni* FE, qui sont présents sous forme de réserve intracellulaire ou associés à la paroi. L'étude des oligosaccharides de la paroi et de leurs liaisons avec les protéines a constitué l'essentiel de nos travaux.

Avant de décrire les résultats de nos recherches, nous rappellerons les connaissances acquises sur les polysaccharides et les différents types de parois des bactéries méthanogènes, ainsi que sur les glycoprotéines bactériennes.

La première partie de nos travaux a fait l'objet de la publication et des communications suivantes :

Publication :

P. PELLERIN, B. GRUSON, G. PRENSIER, G. ALBAGNAC and P. DEBEIRE.

Glycogen in *Methanothrix*.

Arch. Microbiol. (1987) 146:377-381.

Communication :

P. PELLERIN, B. GRUSON, P. DEBEIRE and G. ALBAGNAC.

The occurrence and identification of glycogen in *Methanothrix* sp. Preliminary studies on its biosynthetic pathway.

- Biologie des bactéries anaérobies. LILLE - 17-18 Juin 1986.

et :

- Microbial growth on C1 compounds. Vth International Symposium. HAREN 11-16

Août 1986.

GENERALITES

La place à part des bactéries méthanogènes dans le monde vivant fut rapportée par WOESE et FOX (1977) sur la base de l'analyse des catalogues des ARN ribosomiaux. Les bactéries halophiles extrêmes et thermoacidophiles leur ont été rattachées depuis pour former le règne des Archéobactéries, qui présente des caractéristiques intermédiaires entre les Eucaryotes et les Eubactéries et des caractéristiques uniques comme la nature des lipides membranaires.

Les méthanogènes constituent un groupe très homogène pour son métabolisme énergétique spécifique et obligatoire, qui implique la présence de certains coenzymes caractéristiques pour le transport des dérivés monocarbonés jusqu'au méthane. Par contre, elles présentent une très grande diversité de morphologies et de type d'enveloppes cellulaires, les catalogues des ARN 16 S révèlent une variété supérieure à celle rencontrée pour le règne des Eubactéries (WHITMAN, 1985 ; FEWSON, 1986).

Les polysaccharides connus à ce jour chez les bactéries méthanogènes sont, soit sous forme libre, extra ou intracellulaire, soit associés aux parois. Dans ces généralités, nous rappellerons tout d'abord les quelques connaissances acquises sur les polysaccharides solubles. Bien que leur présence dans les digesteurs anaérobies ait été rapportée par de nombreux auteurs, on ne sait encore presque rien sur leur nature. Du glycogène intracellulaire a été isolé chez quelques espèces (KÖNIG *et al.*, 1985a). Puis nous décrirons les quatre grands types d'enveloppes cellulaires des méthanogènes. Des polysaccharides sont présents en tant que constituants principaux dans le cas des *Methanosarcinae* ou bien associés à la paroi chez les autres genres. La présence de glycoprotéines a été rapportée pour

certaines espèces (KANDLER et KÖNIG, 1985) depuis que l'on sait que les protéines de surface des Archébactéries peuvent être glycosylées (MESCHER et STROMINGER, 1976 a). Aussi, nous rappellerons les connaissances actuelles sur les glycoprotéines bactériennes, certaines sont bien caractérisées, pour d'autres aucune indication sur la liaison glycane-protéine n'est disponible. Chez *Halobacterium salinarium* (MESCHER et STROMINGER, 1976 b), la présence des glycanes est indispensable au maintien de la morphologie cellulaire.

C H A P I T R E I

LES POLYSACCHARIDES DES BACTERIES METHANOGENES

Les études en microscopie électronique réalisées sur les biofilms méthanogènes (BOCHEM *et al.*, 1982 ; VERRIER, 1984 ; DOLFING *et al.*, 1985 ; (DUBOURGUIER *et al.*, 1985 ; LEQUERICA et TOLDRA, 1986) montrèrent la présence de nombreux exopolymères fibrillaires et d'inclusions cytoplasmiques (Figure 1 ; page 21). Pour DOLFING *et al.* (1985) les boues méthanogènes contiennent 7% de glucides dont seulement 2% sont exocellulaires. Ils donnèrent la composition des polysaccharides libérés par agitation en présence d'EDTA ou après autoclavage des granules (Tableau I ; page 22). Dans ces granules, *Methanothrix* représente 30% des cellules totales.

Les études de polysaccharides réalisées sur les biofilms sont limitées par l'impossibilité de connaître la provenance exacte des molécules étudiées.

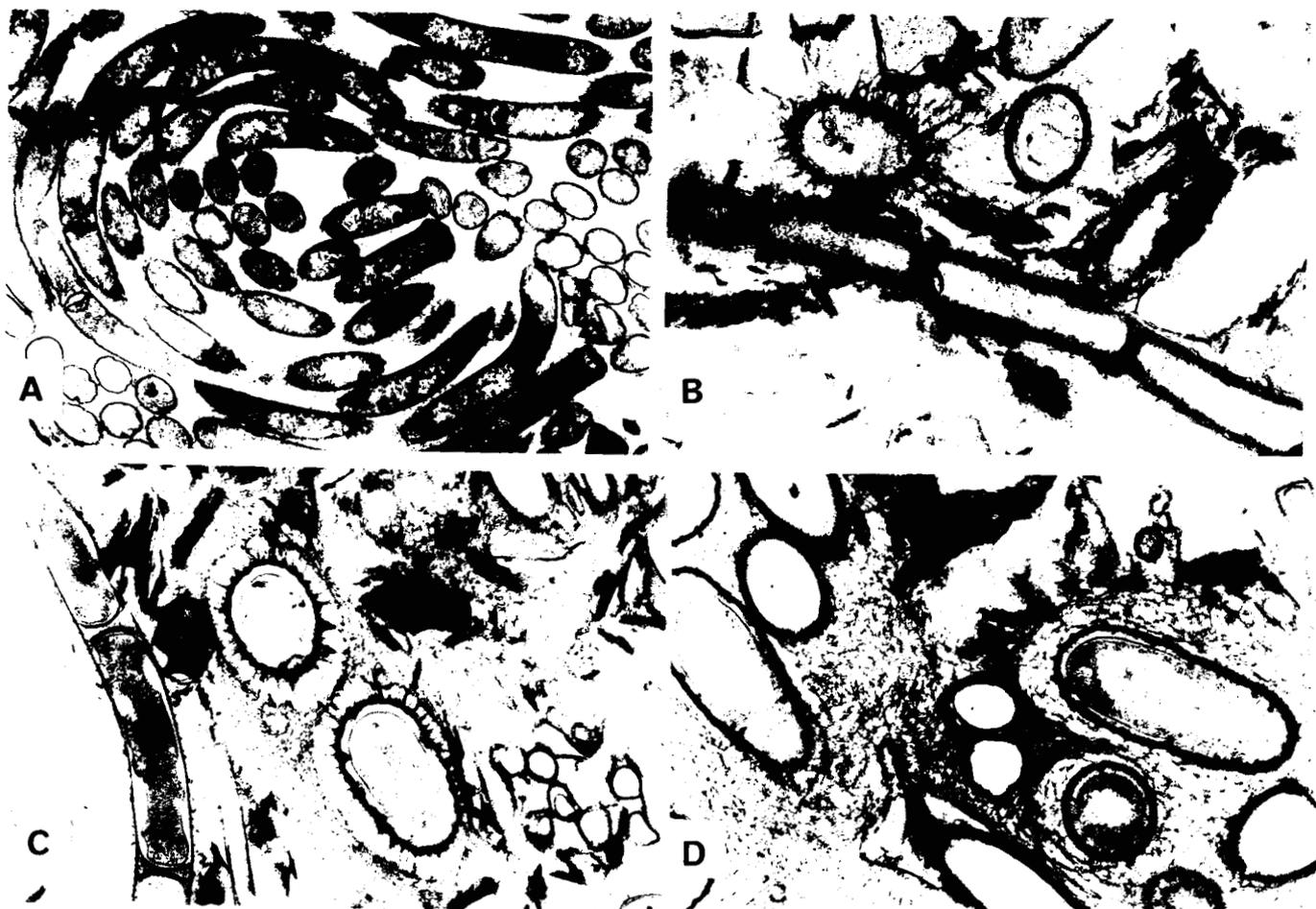


Figure 1 : Coupes ultrafines de biofilms méthanogènes qui montrent la présence de micro-colonies de *Methanothrix* (A), de bactéries entourées de polymères fibrillaires (B, D) ou capsulaires (D) (d'après DUBOURGUIER et al., 1985).



Figure 5 : Coupe ultrafine de *Methanobacterium thermoautotrophicum* TC5E, la paroi est constituée d'une seule couche dense aux électrons, de manière analogue aux Eubactéries Gram +.



TABLEAU I

Composition en monosaccharides (en pourcentage des glucides totaux)
des fractions extraites des granules méthanogènes ou par traitement à l'EDTA
(d'après DOLFING *et al.*, 1985)

Component	Treatment method	
	Autoclaving ^a	EDTA ^b
Rhamnose	20.5	20.3
Ribose	6.0	0.0
Arabinose	1.5	2.8
Xylose	0.8	0.0
Mannose	11.9	11.5
Galactose	28.1	37.8
Glucose	31.1	27.7

^a Autoclaving for 10 min at 120°C.

^b Incubation with 1% EDTA for 5 h at 4°C.



I. - LES EXOPOLYSACCHARIDES

Les exopolysaccharides bactériens, présents sous forme de capsules ou de couches visqueuses, peuvent disparaître lorsque les bactéries sont cultivées au laboratoire (COSTERTON *et al.*, 1978, 1981). En effet, ces polymères qui apportent un avantage sélectif (fixation, protection, captage des nutriments) dans un environnement naturel, peuvent représenter une dépense inutile d'énergie dans des conditions optimales de croissance.

Par opposition aux nombreuses descriptions d'exopolysaccharides dans les biofilms méthanogènes, peu de descriptions en ont été faites chez les cultures pures de souches méthanogènes. La présence de capsules chez *Methanogenium aggregans* et *Methanobacterium uliginosum* a été rapportée respectivement par OLLIVIER *et al.* en 1985 et KÖNIG (1984), des exopolymères sont présents en outre chez *Methanosarcina barkeri* (ZHILINA, 1976) et *mazei* (ROBINSON, 1986) et chez *Methanotherix concilii* (PATEL, 1984).

Methanlobus tindarius forme des agrégats dans certaines conditions, les fibres observées entre les cellules pourraient être de nature protéique (KÖNIG et STETTER, 1982).

On ne dispose, à ce jour, d'aucune information concernant la composition de ces exopolymères.

II. - LES POLYMERES DE RESERVE

Des inclusions cytoplasmiques de réserve ont été observées chez *Methanoplanus limicola*, *Methanogenium tatii*, *Methanosphaera stadtmaniae* et *Methanoplanus endosymbiosus* respectivement par WILDGRUBER *et al.* (1982), ZABEL *et al.* (1984), MILLER et WOLIN (1985) et VAN BRUGGEN *et al.* (1986).

SCHERER et BOCHEM (1983) étudièrent l'ultrastructure de 12 souches de *Methanosarcina* et distinguèrent deux types d'inclusions cytoplasmiques : des polyphosphates et des granules aux limites irrégulières, dont la structure "en rosette" est analogue à celle des inclusions de glycogène (TOUZEL *et al.*, 1985). *Methanosarcina thermophila* TM1 accumule 20 mg de glycogène par gramme de protéines cellulaires, dans des conditions de croissance en limitation d'azote (MURRAY et ZINDER, 1984).

KÖNIG *et al.* (1985a) ont isolé et identifié le glycogène de *Methanlobus tindarius* et de 4 espèces de *Methanococcus*. Chez *Methanlobus*, il est accumulé quand l'azote est limitant pour atteindre 5% du poids sec cellulaire et peut être ré-utilisé pour produire du méthane.

Le glycogène peut donc jouer chez les méthanogènes le rôle de réserve de carbone et d'énergie qu'il occupe chez les Eubactéries (PREISS et WALSH, 1981), permettant ainsi la survie des cellules (STRANGE, 1968) et pourrait donc jouer un rôle important pour le maintien de l'activité potentielle des digesteurs anaérobies.

III. — L'ANABOLISME DES BACTERIES METHANOGENES

Les connaissances acquises sur l'anabolisme des bactéries méthanogènes sont assez fragmentaires. Le mode de fixation de la biomasse carbonée a été étudié principalement chez une espèce hydrogénophile, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, en raison de son faible temps de doublement. La plupart des méthanogènes sont autotrophes car elles utilisent le CO₂ comme source de carbone (THAUER et FUCHS, 1980). Les voies connues de l'assimilation autotrophe du carbone sont le cycle réductif des pentose-phosphates (CALVIN et BASSHAM, 1962) et le cycle réductif des acides tricarboxyliques (EVANS et al., 1966). Les premiers travaux réalisés par DANIELS et ZEIKUS (1978) sur les méthanogènes, indiquèrent le rôle de l'acétyl-CoA en tant que précurseur de la synthèse des composés carbonés.

A. — SYNTHÈSE DE L'ACÉTYL-CoA

L'acétyl-CoA est l'intermédiaire central de la biosynthèse de la biomasse carbonée chez les bactéries méthanogènes, tant chez les hydrogénophiles comme *Methanobacterium thermoautotrophicum* (FUCHS et STUPPERICH, 1980) que chez les acétoclastes comme *Methanococcus barkeri* (WEIMER et ZEIKUS, 1979). Chez *Methanobacterium thermoautotrophicum*, il peut être obtenu par synthèse autotrophe à partir de deux molécules de CO₂ selon le schéma proposé par FUCHS et STUPPERICH (1986) (Figure 2 ; page 26), ou bien par activation de l'acétate par l'acétate thiokinase (FUCHS et STUPPERICH, 1980) :

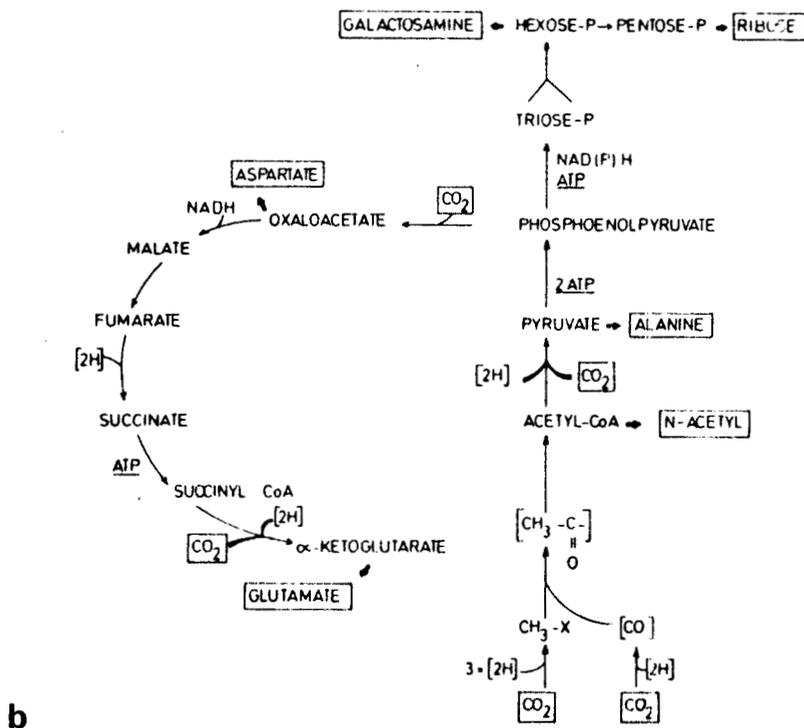
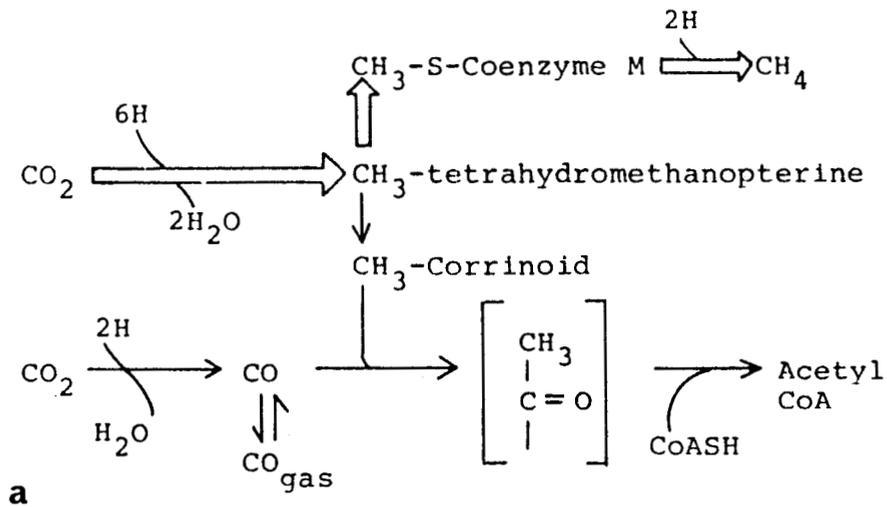


Figure 2 : Voie de l'assimilation autotrophe du CO_2 chez *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

a : synthèse de l'acétyl-CoA à partir de 2 CO_2 (d'après FUCHS et STUPPERICH, 1986)
 b : synthèse des glucides et des précurseurs des acides aminés (d'après FUCHS et STUPPERICH, 1984).



Pour les méthanogènes acétoclastes, l'acétate est activé pour donner l'acétyl-CoA par l'acétate thiokinase dans le cas de *Methanotherix soehngeni* (KÖHLER et ZEHNDER, 1984), par phosphorylation par l'acétate kinase puis action de la phosphotransacétylase chez les *Methanosarcinae* (GRUSON, communication personnelle).

B. - NEOGLUCOGENESE ET SYNTHÈSE DES ACIDES AMINÉS

Le schéma de la biosynthèse des glucides et des acides aminés chez *Methanobacterium thermoautotrophicum* est représenté dans la figure 2 (page 26) d'après FUCHS et STUPPERICH (1984).

Une pyruvate synthase sensible à l'oxygène catalyse la carboxylation à partir de CO₂ de l'acétyl-CoA pour donner le pyruvate, le coenzyme F420 jouant le rôle de donneur d'électrons (JANSEN et al., 1982). La synthèse du phosphoénolpyruvate se fait ensuite sous l'action de la phosphoénolpyruvate synthétase, par consommation de deux liaisons riches en énergie (EYZAGUIRRE et al., 1982). A partir du phosphoénolpyruvate, deux voies métaboliques sont connues :

- La synthèse des hexoses se fait par la néoglucogénèse, par condensation aldolique de deux triose-phosphates.
- Un cycle tricarboxylique incomplet fonctionne dans le sens réductif jusqu'à l'α-cétoglutarate et permet la synthèse des acides aminés par des mécanismes de transamination.

Ces voies métaboliques sont également présentes chez *Methanospirillum hungatei* (EKIEL et al., 1983).

Bien que peu d'informations soient disponibles sur l'anabolisme des

méthanogènes acétoclastes, les travaux d'EKIEL *et al.* (1985) indiquent la présence de la néoglucogénèse chez *Methanotherix concilii*. Le cycle tricarboxylique fonctionne dans le sens oxydatif chez *Methanosarcina barkeri*, d'après le schéma de la figure 3 (page 29) donné par WEIMER et ZEIKUS (1979).

C. - LE METHANOPHOSPHAGENE

Un composé spécifique des méthanogènes, le 2,3-cyclopyrophosphoglycérate ou méthanophosphagène, a été isolé chez *Methanobacterium thermoautotrophicum* par SEELY et FAHRNEY (1983) et KANODIA et ROBERTS (1983). Il représente 5% du poids sec cellulaire. Synthétisé à partir du phosphoglycérate, il sert à la fois de stockage de phosphate et de carbone et semble impliqué dans les mécanismes de régulation métabolique chez les bactéries méthanogènes (EVANS *et al.*, 1985).

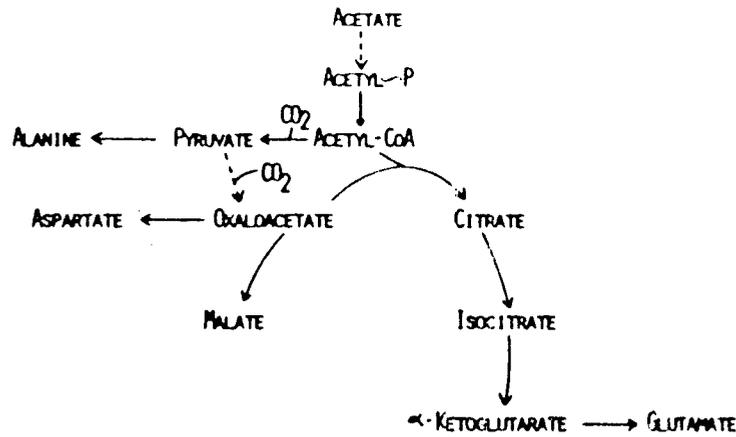


Figure 3 : Voie de l'assimilation de l'acétate pour donner les précurseurs des acides aminés chez *Methanosarcina barkeri* (d'après WEIMER et ZEIKUS, 1979).

TABLEAU II

Les différents types d'enveloppe cellulaire des Archéobactéries (d'après KANDLER et KÖNIG, 1985)

Organism	Rigid sacculus	Proteinous envelope	Polymer
Methanobacteriaceae	+	-	Pseudomurein
Methanothermaceae	+	+	Pseudomurein, protein subunits
Methanosarcina	+	-	Heteropolysaccharide
Methanococcus	-	+	Protein subunits
Methanomicrobium	-	+	Protein subunits.
Methanogenium cariaci	-	+	Protein subunits
Methanogenium marisnigri	-	+	Glycoprotein subunits
Methanoplanus	-	+	Glycoprotein subunits
Methanolobus	-	+	Glycoprotein subunits
Methanotherix	-	sheath ?	(Glyco)protein fibrills
Methanospirillum	-	sheath	(Glyco)protein fibrills
Halococcus	+	-	Sulfated heteropolysaccharide
Halobacterium	-	+	Glycoprotein subunits
Sulfolobus	-	+	Glycoprotein subunits
Thermoproteus	-	+	Glycoprotein (?) subunits
Thermococcus	-	+	Glycoprotein (?) subunits
Thermofilum	-	+	Glycoprotein (?) subunits
Thermodiscus	-	+	Glycoprotein subunits
Desulfurococcus	-	+	Glycoprotein subunits
Pyrodictium	-	+	Glycoprotein subunits
Thermoplasma	-	-	none
Methanoplasma	-	-	none

IV. — CONCLUSION

Les connaissances acquises sur les polysaccharides externes et de réserve des méthanogènes sont donc très fragmentaires. Outre le glycogène qui a été identifié ou isolé chez quelques espèces, des exopolysaccharides sont présents dans les digesteurs anaérobies. Cependant, aucune étude biochimique n'a été réalisée sur ces polymères tant dans les biofilms que chez les cultures pures.

Un certain nombre de polysaccharides sont cependant associés aux parois ou bien en font directement partie. Dans le chapitre suivant, nous décrirons donc les différents types de paroi rencontrés chez les méthanogènes en insistant sur les polysaccharides éventuellement présents.

C H A P I T R E I I

LES PAROIS DES BACTERIES METHANOGENES

L'une des premières caractéristiques qui permet de distinguer les Archéobactéries fut la nature particulière de leurs parois. En effet, le peptidoglycane, qui est le constituant principal des parois des Eubactéries, ne peut être détecté dans la paroi d'aucune Archéobactérie (KANDLER, 1982), au contraire celles-ci présentent une diversité de structures, tant sur le plan morphologique que de la composition chimique (Tableau II ; page 29).

La coloration de Gram ne correspond donc pas aux deux types structuraux des Eubactéries, mais dépend de la rigidité et de la perméabilité de l'enveloppe cellulaire.

La classification des bactéries méthanogènes (BALCH *et al.*, 1979) est basée sur les catalogues des ARN 16 S. La figure 4 de la page 32 donne les relations entre les différents genres de méthanogènes décrits par WHITMAN (1985) et les quatre grands types d'enveloppes rencontrés : la pseudomuréine, une molécule similaire à la muréine des Eubactéries, est spécifique de l'ordre des Méthanobactériales. Toutes les autres méthanogènes possèdent une paroi protéique à laquelle s'ajoutent, une matrice polysaccharidique (la méthanochonchroïtine) dans le cas des *Methanosarcinae*, ou une gaine rigide de nature protéique et glucidique pour les genres *Methanospirillum* et *Methanotherix*.

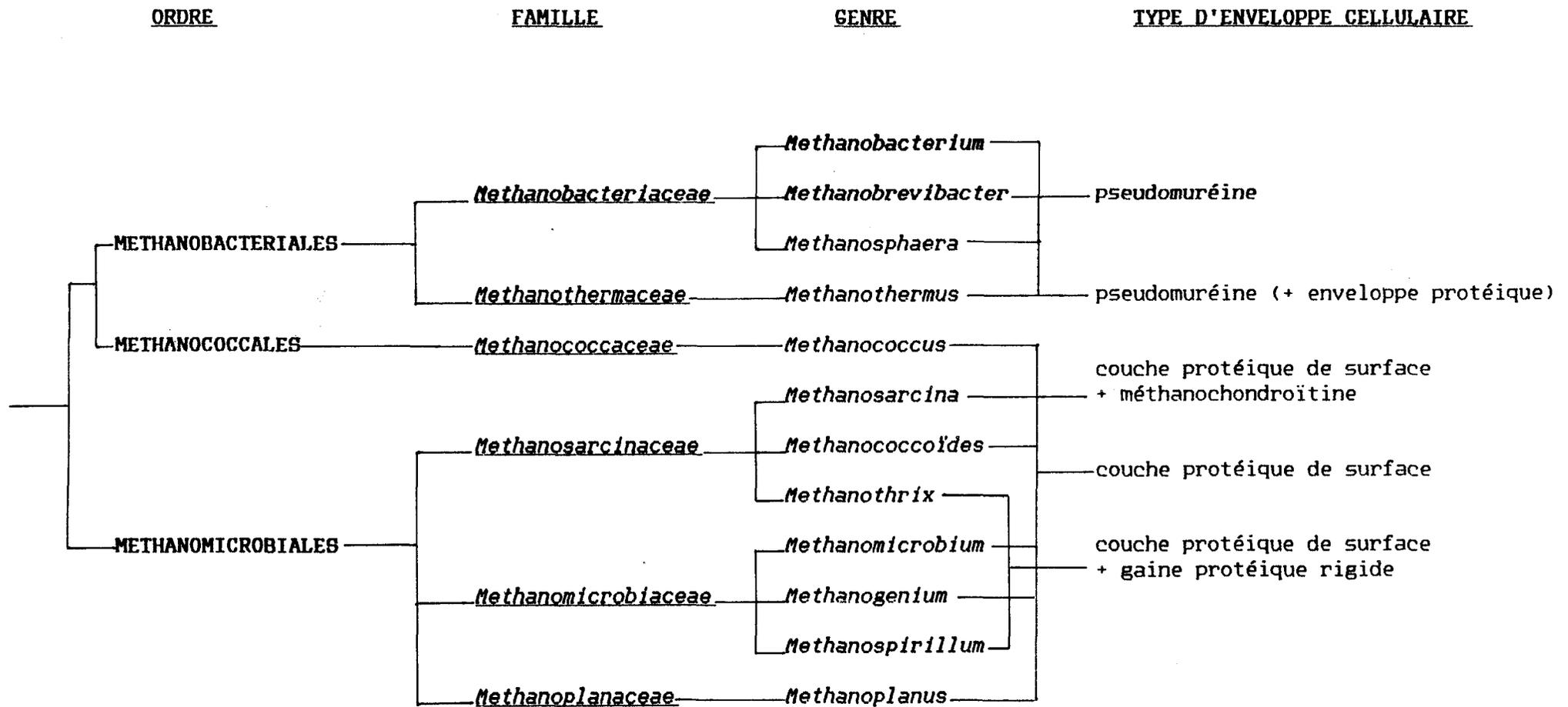


Figure 4 : Relation entre les genres de méthanogènes et les types d'enveloppe cellulaire



I. — LA PSEUDOMUREINE

A. — ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES METHANOBACTERIALES

Ces bactéries possèdent une paroi rigide dont la morphologie est identique à celle des Eubactéries Gram + (Figure 5 ; page 21), possédant une seule couche dense aux électrons, de 10 à 15 nm d'épaisseur (ZEIKUS et BOWEN, 1975a). Elle peut être entourée, dans le cas de *Methanothermus fervidus* d'une enveloppe protéique externe (STETTER et al., 1981).

B. — ETUDE BIOCHIMIQUE DE LA PSEUDOMUREINE

1. — Composition

En 1978, KANDLER et KÖNIG étudièrent la composition chimique de la paroi de *Methanobacterium thermoautotrophicum* qui comprend des résidus de Lys/Ala/Glu/GlcNac (ou GalNac) dans les rapports 1:1,2:2:1. Des similitudes existent donc avec la muréine, mais l'absence de l'acide N-acétyl muramique et l'appartenance des acides aminés à la série L indiquèrent qu'il s'agissait d'un autre type de molécule.

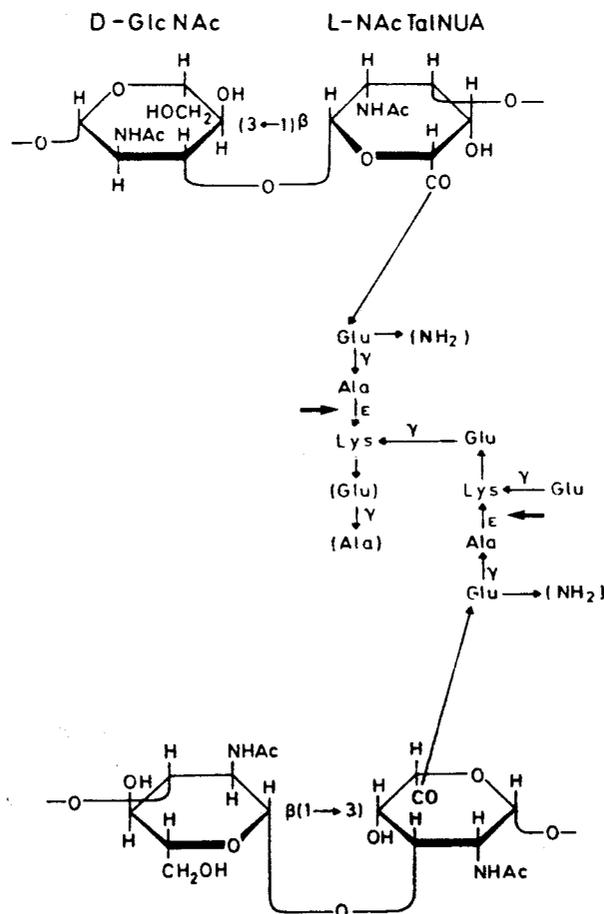
Des différences de composition existent entre les souches (KÖNIG et al., 1982) (Tableau III ; page 34). L'alanine est remplacée par la thréonine chez *Methanobrevibacter ruminantium*, tandis que *Methanobrevibacter smithii* possède des résidus supplémentaires d'ornithine, *Methanosphaera stadtmaniae* se distingue par la présence de sérine.

Les sucres neutres appartiennent à un polysaccharide associé de manière non

TABLEAU III

Composition de la paroi de différentes souches de Méthanobactériales
(d'après KÖNIG *et al.*, 1982)

Species	Amino Acids					N-Acetyl Amino Sugars				Neutral Sugars			Phosphate %, d.W.	
	Ala	Thr	Glu	Lys	Orn	NH ₂	GalNH ₂	GlcNH ₂	TalNUA ¹	Gal	Glc	Man		Rha
<i>Methanobrevibacter</i>														
<i>Mbr. arboriphilus</i> DH11	1.52		2.13	1.00		1.36	0.67		(1.00)			0.02	0.02	4.54
<i>Mbr. arboriphilus</i> AZ	1.17		2.32	1.00		3.92	0.91		(1.00)	○				○
<i>Mbr. smithii</i> PS	1.42		2.04	1.00	0.40	0.81	0.44	0.56	(1.00)	0.11	0.14		0.09	1.0
<i>Mbr. ruminantium</i> M1 ²		0.90	1.85	1.00		0.85	0.80	0.60	(1.00)	0.29	0.02	0.02	0.21	4.65
<i>Mbr. ruminantium</i> M1 ³	0.70	0.40	1.80	1.00		1.00	0.80	0.50	(1.00)	○	○	○	○	○
<i>Methanobacterium</i>														
<i>M. bryantii</i> M.o.H.	1.39		2.39	1.00		1.12	0.45	1.25	(1.00)	0.84	0.09	1.18		0.20
<i>M. bryantii</i> M.o.H.G.	1.32		2.21	1.00		0.84		0.84	(1.00)	0.53	0.26	0.26		○
<i>M. formicum</i> MF	1.51		2.11	1.00		1.53	1.00	1.16	(1.00)	0.76	0.27	0.37	0.62	0.64
<i>M. thermoautotrophicum</i> 1H	1.20		2.27	1.00		0.61	0.16	1.18	(1.00)	0.02	0.13			0.28
<i>M. thermoautotrophicum</i> Marburg	1.32		2.37	1.00		0.77	0.87	0.23	(1.00)	○	○	○	○	○
<i>M. thermoautotrophicum</i> JW 500	1.43		2.36	1.00		1.64	1.29	1.14	(1.00)	○	○	○	○	○
<i>M. thermoautotrophicum</i> JW 501	1.29		2.57	1.00		1.07	0.86	1.07	(1.00)	○	○	○	○	○
<i>M. thermoautotrophicum</i> JW 510	1.25		2.25	1.00		1.25	1.42	1.00	(1.00)	○	○	○	○	○
<i>Methanothermus</i>														
<i>Mth. fervidus</i>	1.47		2.23	1.00		1.64	0.35	0.49	(1.00)		0.01		○	○



BU
LILLE

Figure 6 : Structure de la pseudomuréine (d'après KANDLER, 1982). Les flèches indiquent les sites d'action de l'enzyme lytique de *Methanobacterium wolfei* (d'après KIENER *et al.*, 1987).

covalente au polymère.

2.- Structure

Les hydrolyses partielles réalisées par KANDLER (1979) et KÖNIG et KANDLER (1979a) firent apparaître les analogies structurales existant entre ce polymère et la muréine des Eubactéries. Le nom de pseudomuréine fut alors attribué à ce nouveau type de peptidoglycane. De plus, un sucre inconnu, présent en équimolarité avec la N-acétyl glucosamine et détruit lors des hydrolyses totales, fut mis en évidence. Il fut identifié par dégradation à la ninhydrine (KÖNIG et KANDLER, 1979b) comme étant l'acide N-acétyl talosaminuronique de la série L, un composé auparavant inconnu dans le monde vivant (KÖNIG et KANDLER, 1980).

Ces études permirent à KANDLER (1982) de donner la structure complète de la pseudomuréine (Figure 6 ; page 34). Bien que, d'après cet auteur, ce polymère ne serait pas dérivé de la muréine mais plutôt issu d'une évolution différente des Méthanobactériales, de grandes similitudes existent entre les deux peptidoglycannes :

- Les deux macromolécules sont constituées de chaînes glycaniques, formées par la succession d'une hexosamine et d'un dérivé acide d'une hexosamine lié à un court peptide.
- Les peptides sont liés entre eux par une chaîne de 2 à 5 acides aminés pour former une macromolécule réticulée. Les architectures tridimensionnelles des muréine et pseudomuréine sont similaires, d'après les calculs d'énergie de conformation réalisés par LEPS *et al.* (1984).
- Les deux polymères sont associés à des polysaccharides neutres, par contre les acides teichoïques et teichuroniques sont absents chez les Méthanobactériales.

3.- Stabilité

La résistance de la pseudomuréine aux enzymes protéolytiques (KANDLER et KÖNIG, 1978) est due à la présence de liaisons ϵ et γ aminées, l'absence de l'acide muramique la rend insensible au lysozyme. Par contre, KÖNIG *et al.* (1985b) ont observé un phénomène d'autolyse chez *Methanobacterium wolfei*, la pseudomuréine était alors hydrolysée pour libérer des chaînes glycaniques liées au dipeptide γ -Glu-Ala. L'enzyme lytique produite par cette bactérie a été isolée par KIENER *et al.* (1987) qui l'ont utilisée pour préparer des sphéroplastes de *Methanobacterium thermoautotrophicum*. C'est une peptidase qui hydrolyse les ponts ϵ -Ala-lys de la pseudomuréine (Figure 6 ; page 34).

4.- Biosynthèse

HAMMES *et al.* (1979) étudièrent la sensibilité de 4 espèces de *Methanobacterium* aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la muréine. Ceux qui bloquent la synthèse de l'acide muramique (phosphomycine), de la partie peptidique de la muréine (D-cyclosérine) et les réactions de transpeptidation (vancomycine, pénicilline G) (Figure 7 ; page 37), ne sont d'aucun effet sur la biosynthèse de la pseudomuréine. Par contre, elle est inhibée par les antibiotiques qui se complexent avec les transporteurs polyisoprénoïques intervenant dans la synthèse du polysaccharide (bacitracine, nisine, gardinycine et enduracidine).

Des précurseurs similaires à ceux impliqués dans la synthèse de la muréine ont été isolés chez *Methanobacterium thermoautotrophicum* (KANDLER et KÖNIG, 1985). Il s'agit des UDP-GlcNac, UDP-GalNH₂ et UDP-GlcNac (β 1 \rightarrow 4) TalNacA, l'acide N-acétyl talosaminuronique n'a pas été détecté sous forme de nucléotide-sucré. L'excrétion de L-alanine dans le milieu, observée par SCHÖNHEIT et THAUER (1980) indique la présence de réactions de transpeptidation analogues à celles observées chez les Eubactéries (Figure 8 ; page 37).

Bien que présentant des points communs avec la synthèse de la muréine, le mécanisme complet de la formation de la pseudomuréine reste à déterminer.

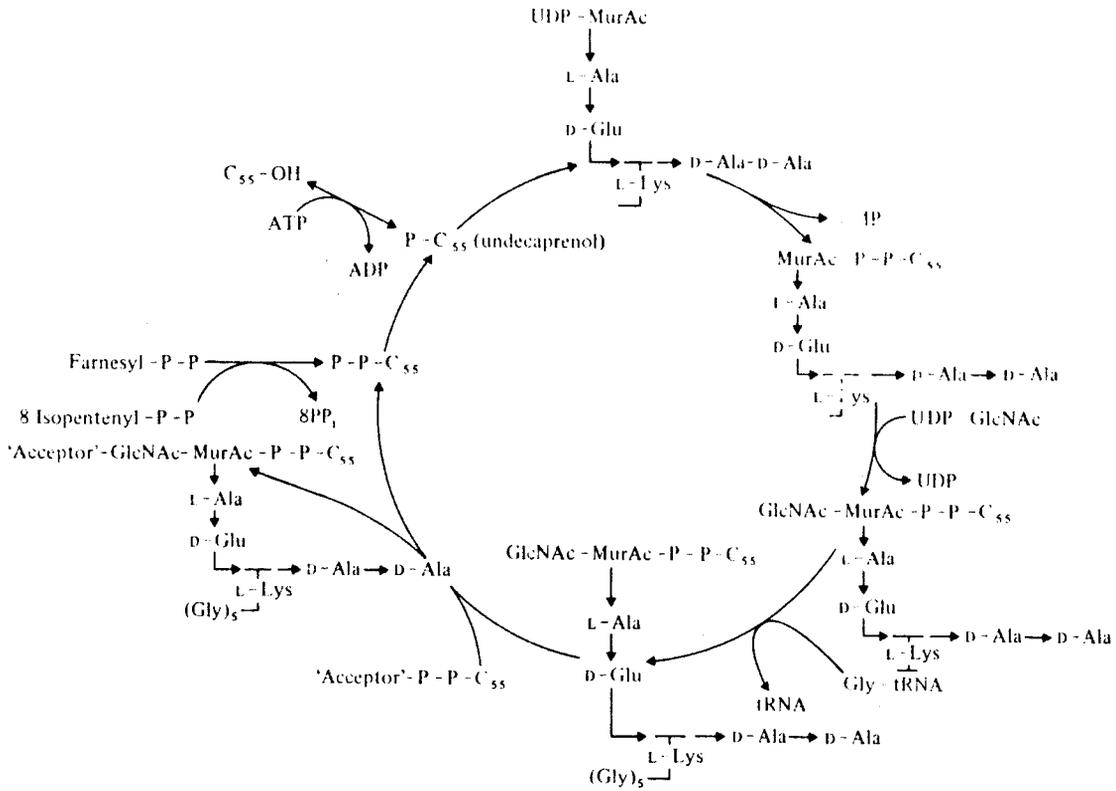


Figure 7 : Biosynthèse du peptidoglycane linéaire de *Staphylococcus aureus* (d'après ROGERS *et al.*, 1980) et action des antibiotiques.

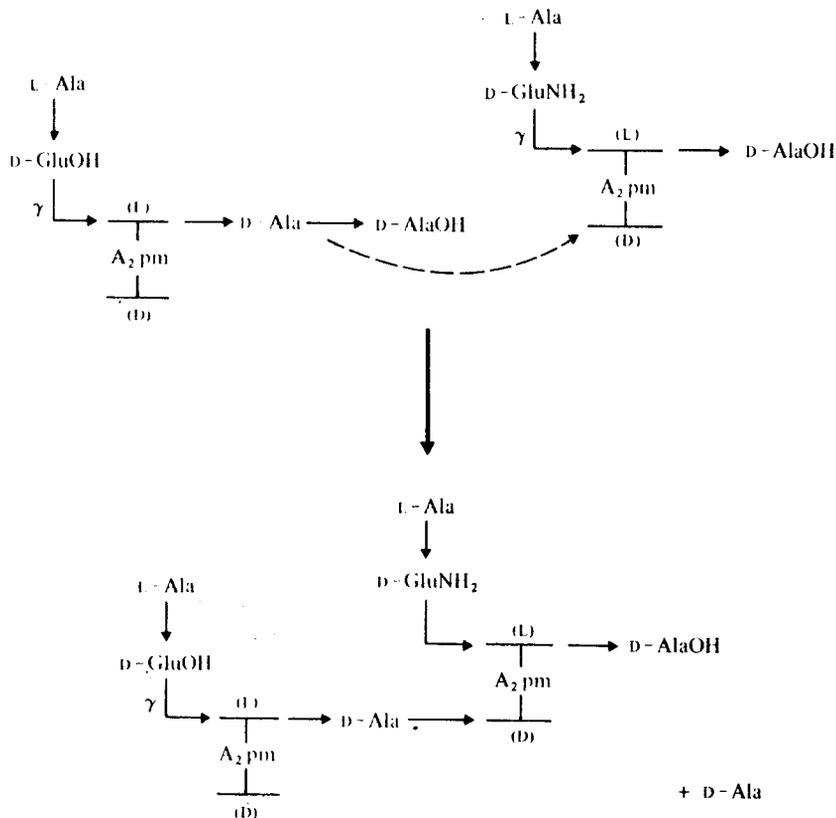


Figure 8 : Réaction de transpeptidation chez *Actinomadura* qui provoque la libération de D-Ala dans le milieu (d'après ROGERS *et al.*, 1980).

II. — LA METHANOCHONDROÏTINE

A. — ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES METHANOSARCINAE

Les *Methanosarcinae* sont des cocci ayant différents degrés d'agrégation et allant jusqu'à former des granules de plusieurs millimètres de diamètre (Figure 9 ; page 39). Les premières descriptions de ZEIKUS et BOWEN (1975a), ZHILINA (1976) et ZHILINA et ZAVARZIN (1979) indiquèrent la présence d'une paroi rigide, très épaisse (jusqu'à 0.2 μm) et analogue à celle des Eubactéries Gram +, bien que présentant une stratification visible en microscopie électronique.

En fait, l'étude de l'organisation de *Methanosarcina mazei* (ROBINSON et al., 1985 ; ALDRICH et al., 1986), révèle plusieurs structures pariétales : chaque cellule individuelle est entourée d'une couche protéique de surface qui constitue la paroi proprement dite (voir page 42). Au-delà se trouve un polysaccharide qui constitue la matrice, il rassemble les cellules au sein d'un agrégat, forme les septations (Figure 10 ; page 39) et fixe le rouge de ruthénium (TOUZEL et al., 1985).

Le vieillissement de la culture se manifeste par la désagrégation de la matrice en fibrilles isolées et le relargage de cellules coccoïdales entourées de la paroi protéique (ROBINSON, 1986).

SOWERS et al. (1984) ont décrit *Methanosarcina acetivorans* comme étant dépourvue de la matrice polysaccharidique mais il semblerait plutôt que cette souche ne forme des agrégats qu'en fin de croissance.



Figure 9

Figure 10

Figure 9 : Granule de *Methanosarcina* souche TM1 en microscopie électronique à balayage (la barre représente 10 μ m).

Figure 10 : Coupe ultrafine de *Methanosarcina mazei*, au-delà de la membrane plasmique se trouve une couche protéique de surface (en gris) puis la matrice dense aux électrons.

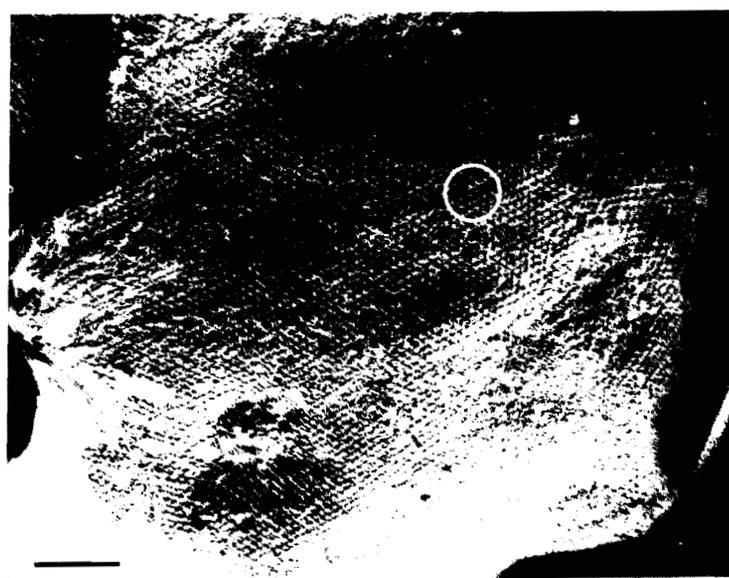
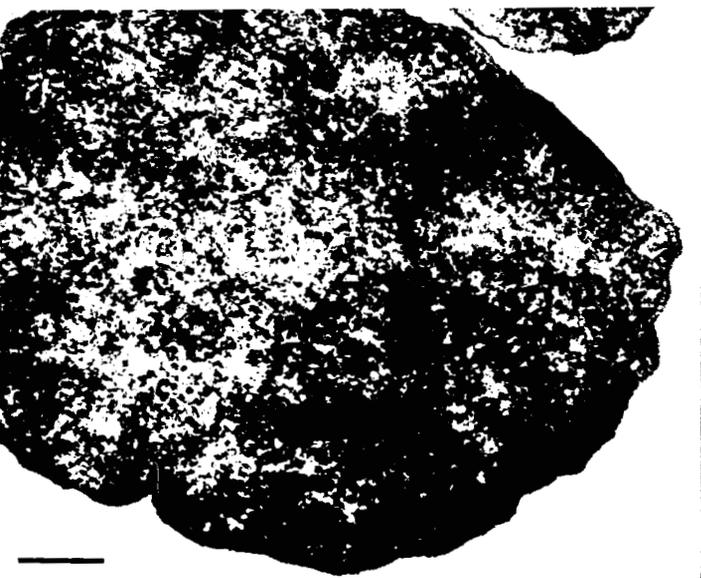


Figure 12

Figure 13

Figure 12 : Coupe ultrafine de *Methanococcus voltae*, la paroi est constituée d'une couche de protéines (la barre représente 200 nm) (d'après KOVAL et JARRELL, 1987).

Figure 13 : La surface de *Methanococcus voltae* étudiée en cryo-décapage montre l'arrangement hexagonal des sous-unités protéiques (cercle) (la barre représente 100 nm) (d'après KOVAL et JARRELL, 1987).



B.- ETUDE BIOCHIMIQUE DE LA METHANOCHONDROÏTINE

1.- Composition

La matrice de *Methanosarcina barkeri* contient moins de 5% d'acides aminés et de sucres neutres (KANDLER et HIPPE, 1977). Elle se compose essentiellement de N-acétyl galactosamine et d'acide glucuronique, le pourcentage de cendres est assez élevé mais comprend de faibles quantités de soufre et de phosphore (Tableau IV ; page 41). La comparaison entre les compositions de différentes souches (KREISL et KANDLER, 1986) montre peu de variations dans les rapports entre les monosaccharides dominants, à l'exception de la souche BRYANT G1 où l'acide galacturonique remplace le glucuronique.

2.- Structure

Une structure partielle du polysaccharide fut proposée en 1986 par KREISL et KANDLER : l'unité de répétition est un trisaccharide contenant deux résidus de N-acétyl galactosamine et un résidu d'acide glucuronique (Figure 11 ; page 41), mais la position et l'anométrie des liaisons des glucosamines restent à déterminer. Malgré l'absence de résidus de sulfate, l'analogie avec la chondroïtine des Mammifères permet à ces auteurs de lui donner le nom de méthanochondroïtine. Ils attribuèrent la présence de 1 à 5% de glucose et de mannose à un contaminant extracellulaire.

3.- Stabilité

Le polysaccharide résiste à l'action de la chondroïtinase AC et de la hyaluronidase (KREISL et KANDLER, 1986). La souche LYC de *Methanosarcina mazei*, décrite par LIU *et al.* (1985), produit une enzyme qui hydrolyse la méthanochondroïtine et provoque ainsi la désagrégation rapide des sarcines. L'enzyme est active sur d'autres souches de *Methanosarcina mazei* et *thermophila*, mais pas sur *barkeri*, son mode d'action n'a pas été démontré.

TABLEAU IV

Composition chimique (en pourcentage du poids sec)
de la paroi de *Methanosarcina barkeri*
(d'après KANDLER et HIPPE, 1977)

Components	Strain 3	Strain Fusaro
Elemental C	25.5	33.5
Analysis N	4.2	4.9
H	3.9	4.8
Ash	38.0	14.0
Amino acids	4.2	2.5
Glucose	9.5	11.0
Galactose	1.8	0.5
Rhamnose	?	?
Galactosamine	16.5	27.0
Uronic acids	8.2	15.0
Phosphate	< 1.0	< 1.0
Sulfate	< 0.5	< 0.5



Figure 11 : Unité de répétition de la méthanocondroïtine

III. - LES ENVELOPPES PROTEIQUES DE SURFACE

Des couches cristallines de protéines sont présentes à la surface de nombreuses espèces bactériennes (SLEYTR, 1975) ; chez les Eubactéries Gram + et Gram -, elles se trouvent, respectivement, à la surface de la couche de peptidoglycane ou de la membrane externe. Bien que très sensibles aux détergents et aux agents chaotropiques et chélatants, elles servent de barrière entre la bactérie et le milieu externe et interviennent dans les phénomènes d'adhésion et de reconnaissance (SLEYTR et MESSNER, 1983). Les protéines les constituant sont souvent glycosylées, nous y reviendrons dans le chapitre III.

A. - ETUDE ULTRASTRUCTURALE

Chez les méthanogènes, les enveloppes protéiques n'accompagnent pas une autre structure pariétale, à l'exception de *Methanothermobacter fermentans*. Elles constituent, au contraire, la paroi elle-même et sont liées directement à la membrane plasmique (KANDLER, 1982). Les bactéries sont alors Gram -, la paroi isolée ne forme pas de saccule rigide et est aisément désintégrée par des forces mécaniques, les détergents et les changements de force ionique (KANDLER et KÖNIG, 1985).

Ce type de paroi est présent seul chez cinq genres de méthanogènes : *Methanococcus* (Figures 12 et 13 ; page 39), *Methanogenium*, *Methanomicrobium*, *Methanolobus* (ou *Methanococcoïdes*) et *Methanoplanus* (Tableau II ; page 29).

B.- ETUDE BIOCHIMIQUE

1.- Composition

JONES *et al.* (1977) furent les premiers à décrire une enveloppe protéique chez une méthanogène, *Methanococcus vannielii*. Outre l'absence des structures pariétales habituelles, ils constatèrent la résistance de la bactérie aux antibiotiques inhibant la synthèse de la muréine. La nature protéique de la paroi fut confirmée par KANDLER et KÖNIG (1978). Les caractéristiques des enveloppes protéiques de bactéries méthanogènes décrites à ce jour sont données dans le Tableau V (page 44).

2.- Stabilité

Les enveloppes protéiques de surface confèrent rigidité et morphologie aux bactéries méthanogènes, rôle qu'elles ne jouent pas chez les Eubactéries (SLEYTR *et al.*, 1986). KÖNIG et STETTER (1986) suggérèrent la prédominance des interactions hydrophobes pour l'assemblage des sous-unités.

Le rôle protecteur de ce type de paroi fut souligné par HAAS *et al.* (1986), qui lièrent la résistance de mutants de *Methanococcus vannielii* aux antibiotiques (virginiamycine, néomycine, bromoéthane sulphonate et bacitracine), à une diminution de perméabilité de l'enveloppe cellulaire.

TABLEAU V

Caractéristiques des enveloppes protéiques de différentes espèces de méthanogènes

Espèce	symétrie	épaisseur en nm	distance de centre à centre en nm	masse moléculaire de la protéine majeure en kDa	coloration par le réactif de SCHIFF
<i>Methanococcus vannielii</i> ^a	tétragonale	18	10,8	60	-
<i>Methanogenium tatii</i> ^b	hexagonale	20	nd	120	+
<i>Methanogenium marisnigri</i> ^c	hexagonale	10	14	117	+
<i>Methanoplanus limicola</i> ^d	hexagonale	nd	14	143	+
<i>Methanoplanus endosymbiosus</i> ^e	hexagonale	nd	15,5	110	+
<i>Methanococcoïdes methylutens</i> ^f	nd	10	nd	nd	nd
<i>Methanolobus tindarius</i> ^g	hexagonale	10	12,4	156	+
<i>Methanococcus voltae</i> ^h	hexagonale	nd	10	76	nd

nd : non déterminé

^a : d'après JONES *et al.* (1977)

^b : d'après ZABEL *et al.* (1984)

^c : d'après ROMESSER *et al.* (1979)

^d : d'après WILDGRUBER *et al.* (1982)

^e : d'après VAN BRUGGEN *et al.* (1986)

^f : d'après SOWERS et FERRY (1983)

^g : d'après KÖNIG et STETTER (1982)

^h : d'après KOVAL et JARREL (1987)



IV. - LES GAINES PROTEIQUES RIGIDES

Deux genres méthanogènes : *Methanospirillum*, hydrogénophile appartenant à la famille des *Methanomicrobiaceae*, et *Methanothrix*, acétoclaste appartenant à la famille des *Methanosarcinaceae* se rejoignent par la nature de leur paroi et par le fait qu'elles poussent à l'intérieur d'une gaine protéique cylindrique pour former des filaments de plusieurs centaines de cellules (Figure 14 ; page 46).

A. - ETUDE ULTRASTRUCTURALE

1.- *Methanospirillum hungatei*

ZEIKUS et BOWEN (1975b) décrivent les premiers l'ultrastructure de *Methanospirillum hungatei* et constatèrent l'absence des structures pariétales typiques des Eubactéries : les cellules poussent à l'intérieur d'une enveloppe cylindrique rigide pour former des filaments, de manière analogue aux bactéries à gaine déjà décrites (MULDER et DEINEMA, 1974). La membrane cytoplasmique est recouverte d'une couche dense aux électrons, de 14 nm d'épaisseur, qui constitue la paroi proprement dite, une matrice granulaire dite "substance adhésive" la relie à la gaine.

L'architecture de la gaine et des septa fut décrite par SHAW *et al.* (1985) et STEWART *et al.* (1985) : la gaine est formée d'une succession d'anneaux (Figure 15 ; page 46) de diamètre régulier (0,5 μm) et de 6 nm d'épaisseur constitués d'une couche protéique amorphe interne et d'une couche cristalline externe. Son élancement se fait par assemblage de sous-unités protéiques au niveau de décrochements dans la structure régulière, pour former de nouveaux anneaux. La

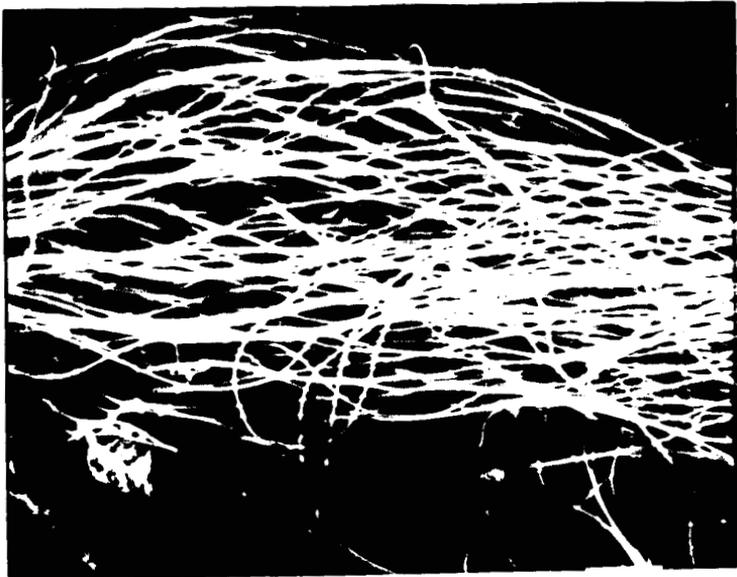


Figure 14

Figure 14 : Filaments de *Methanotherix soehngeni* en microscopie électronique à balayage.



Figure 15

Figure 15 : Cryo-décapage de la surface de *Methanospirillum hungatei* qui montre la succession d'anneaux réguliers qui constituent la gaine (d'après KANDLER et KÖNIG, 1985).

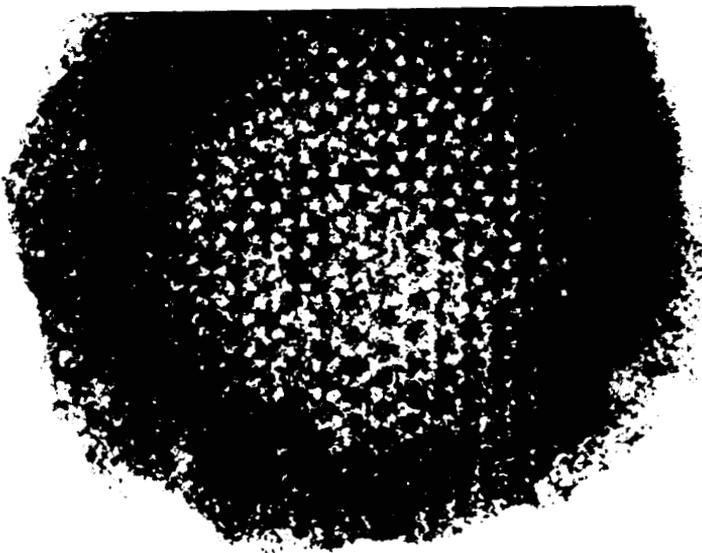


Figure 16

Figure 16 : Septum de *Methanospirillum hungatei* en coloration négative. Les sous-unités protéiques sont associées selon une structure hexagonale (d'après SHAW et al., 1985).



Figure 17

Figure 17 : Coupe ultrafine de *Methanotherix soehngeni*, la membrane plasmique est recouverte d'une couche dense aux électrons, séparée de la gaine cylindrique et des septa par une substance granulaire. La formation d'un double septa permet la cassure du filament.



structure des septa est nettement différente, les sous-unités protéiques forment une structure cristalline avec symétrie hexagonale, de manière analogue aux enveloppes protéiques de surface (Figure 16 ; page 46). Un septum est formé de plusieurs couches cristallines. Les pores laissés par les architectures ont des diamètres respectifs de 2 et 15 nm pour la gaine et les septa.

2.- Methanotherix

L'organisation de la paroi de *Methanotherix* semble équivalente à celle de *Methanospirillum* (ZEHNDER *et al.*, 1980 ; PATEL, 1984), cependant le mode de septation est différent. La gaine est formée d'anneaux de 0,8 μm de diamètre et de 18 nm d'épaisseur (ROUSTAN *et al.*, 1986), le septum auquel BEVERIDGE *et al.* (1986a et b) ont donné le nom de "bouchon espaceur" se forme par réduction de la gaine en spirale (TOUZEL, communication personnelle) (voir partie Résultats, Figure 24 ; page 91). La continuité entre l'enveloppe externe et les septa rend le terme de gaine inapproprié au sens strict du mot (KANDLER et KÖNIG, 1985). On observe fréquemment la formation de doubles ou triples septa (Figure 17 ; page 46), la zone comprise entre eux se fragilise et permet la cassure du filament avec un septum à chaque nouvelle extrémité (BEVERIDGE *et al.*, 1986b).

Ainsi que chez *Methanospirillum*, la membrane cytoplasmique est recouverte d'une couche dense aux électrons qui constitue la paroi proprement dite, séparée de la gaine par une substance adhésive.

B.- ETUDE BIOCHIMIQUE

Les ensembles gaine et septa de *Methanospirillum* et de *Methanotherix*

présentent une stabilité exceptionnelle qui a rendu difficile l'étude biochimique de leurs composés, mais permet de purifier aisément la gaine par décapage des autres structures aux détergents, à la soude 0,1 N ou au dithiothréitol (SPROTT *et al.*, 1979).

1.- Composition

La composition des gaines de *Methanothrix concilii* et de deux souches de *Methanospirillum hungatei* fut donnée par SPROTT et Mc KELLAR (1980) et PATEL *et al.* (1986) (Tableaux VI et VII ; page 49). Le taux en protéines varie de 60 à 70%, la composition en acides aminés des différentes gaines est similaire, à part une augmentation des résidus basiques chez *Methanothrix*. Par contre, le taux de chaque monosaccharide varie d'une souche à l'autre, *Methanothrix soehngeni* ne contient que du glucose et du mannose (KÖNIG et STETTER, 1986), tandis que *Methanothrix concilii* possède en plus du rhamnose, du galactose et du ribose.

D'après KANDLER et KÖNIG (1985), la couche dense aux électrons qui recouvre la membrane plasmique est également de nature protéique.

2.- Stabilité

L'exceptionnelle stabilité de la gaine de *Methanospirillum hungatei* fut rapportée par BEVERIDGE *et al.* (1985) qui n'ont pas pu la dissoudre sous l'action d'enzymes protéolytiques, d'agents détergents, chélatants et dénaturants ou de réducteurs des ponts disulfures. Seuls l'acide performique, les bases et les acides forts permettaient une libération des anneaux, puis des sous-unités les constituant. Quant à *Methanothrix concilii*, sa gaine est encore plus résistante à l'action des alcalis et des détergents (PATEL *et al.*, 1986), les septa restent collés à la gaine dans des conditions (NaOH 1 N) où ils sont détachés chez *Methanospirillum*, ce qui confirme l'existence d'une

TABLEAU VI

Composition en acides aminés (en pourcentage molaire) des gaines de *Methanothrix concilii* et de *Methanospirillum hungatei* souches JF1 et GP1 (d'après PATEL *et al.*, 1986)

Amino acid type	Amino acid	<i>Mtx. concilii</i>	JF1	GP1
Hydrophobic	Met	0.41	0.31	0.36
	Val	6.88	6.70	7.18
	Ile	5.01	4.31	5.17
	Leu	7.51	7.68	6.40
	Tyr	4.88	4.29	2.62
	Phe	3.79	5.12	3.90
	Total	28.48	28.41	25.63
Neutral	Cys ^d	0.69	0.57	0.62
	Thr	7.15	7.95	10.82
	Ser	6.59	7.51	8.18
	Pro	3.87	3.93	3.17
	Gly	8.23	7.23	6.91
	Ala	7.24	12.77	9.46
	Total	33.77	39.96	39.16
Basic	Lys	6.40	5.31	6.72
	His	2.54	0.66	0.81
	Arg	3.34	1.63	1.56
	Total	12.28	7.60	9.09
Acidic	Asx	9.69	14.16	15.05
	Glx	15.80	9.87	11.07
	Total	25.49	24.03	26.12
Protein (% of dry wt.)		61.13	59.73	71.52
Ratio (acidic:basic amino acids)		2.08	3.16	2.87

TABLEAU VII

Composition en monosaccharides (en mg par g de poids sec) des gaines de *Methanothrix concilii* et de différentes espèces de *Methanospirillum hungatei* souches JF1 et GP1 (d'après PATEL *et al.*, 1986)

Carbohydrate	<i>Mtx. concilii</i>	JF1	GP1
Arabinose	ND	49.61	ND
Galactose	2.73	4.46	6.50
Glucose	36.83	5.42	24.30
Mannose	94.62	5.46	3.28
Rhamnose	26.07	4.88	15.34
Ribose	27.39	ND	7.25
Total	187.64	69.83	56.67

NOTE: ND, not detected.



continuité entre ces deux structures chez *Methanotherix*.

Les bases moléculaires de la stabilité de la gaine restent inconnues, d'après BEVERIDGE *et al.* (1985) elle pourrait être due à la présence de liaisons covalentes entre les sous-unités protéiques au sein d'un même anneau, STEWART *et al.* (1985) soulignèrent la proportion importante de la conformation en feuillet β et le grand nombre d'interactions faibles possibles entre deux sous-unités voisines. Les anneaux de la gaine de *Methanospirillum hungatei* souche GP1 se dissocient sous l'action du β -mercapto éthanol alcalin à 90°C et libèrent des peptides de 4,6 et 7 kDa (SPROTT *et al.*, 1986). Ces peptides assurent la cohésion en soudant les anneaux par l'intermédiaire de ponts disulfures.

La présence de structures pariétales si résistantes est surprenante puisque ces deux espèces ne vivent pas dans des environnements extrêmes, au contraire des thermoprotéales dont les parois cristallines possèdent une rigidité comparable (MESSNER *et al.*, 1986). Il faut cependant remarquer que la gaine protéique n'empêche pas la lyse de *Methanospirillum* par le dithiothréitol (SPROTT *et al.*, 1979) ou de *Methanotherix* par le SDS alcalin (TOUZEL, communication personnelle).

Par ailleurs, ROUSTAN *et al.* (1986) ont décrit un bactériophage lytique chez *Methanotherix* qui libérait les anneaux de la gaine et les septa intacts et débarrassés de toute autre structure cellulaire.

CONCLUSION

Les bactéries méthanogènes présentent donc une diversité remarquable de structures et de compositions pariétales, certaines espèces possèdent une seule couche protéique, d'autres présentent au contraire des structures plus

complexes. Ainsi, dans le cas de *Methanospirillum*, quatre types de constituants différents forment respectivement, la paroi, la substance adhésive, la gaine et les "bouchons espaceurs" ou septa.

Cette variété de types structuraux est à rapprocher de celle observée pour les catalogues des ARN 16 S, on y constate en effet plus de différences au sein des méthanogènes qu'il n'en existe pour les règnes des Eubactéries ou des Eucaryotes.

La pseudomuréine et la méthanochoandroïtine ont fait l'objet d'études biochimiques approfondies, il n'en est pas de même des autres types d'enveloppes cellulaires pour lesquels on ne dispose que de quelques données sur les compositions. Un certain nombre d'enveloppes protéiques de surface comportent des glucides, la présence de glycoprotéines a été rapportée à la surface d'autres Archéobactéries.

Dans le cadre d'une étude de polysaccharides associés à l'enveloppe protéique d'une méthanogène, on ne peut donc exclure *a priori* la possibilité de liaisons covalentes avec les protéines. Dans le chapitre suivant, nous décrirons les données disponibles dans la littérature concernant les glycoprotéines bactériennes.

C H A P I T R E I I I

LES GLYCOPROTEINES BACTERIENNES

La glycosylation des protéines est un phénomène universel, pourtant alors que les glycoprotéines sont largement répandues chez les animaux, les plantes et les virus (MONTREUIL, 1982), on en connaît très peu chez les bactéries. A ce jour, les seules glycoprotéines bactériennes décrites proviennent des enveloppes protéiques de surface, bien que l'on ne sache pas si d'autres types de protéines peuvent être glycosylées ou non.

Ce chapitre résume les travaux réalisés sur les glycoprotéines bactériennes. Pour certaines, la nature des glycannes et de leur liaison avec la partie protéique sont connues ; pour d'autres, leur nature glycoprotéinique n'est suggérée que par des colorations de SCHIFF après oxydation à l'acide périodique ou par la présence de glucides dans leur composition.

I. - LES GLYCOPROTEINES DES ARCHEBACTERIES

A. - LES GLYCOPROTEINES DE L'ENVELOPPE CELLULAIRE DES HALOBACTERIA

1.- Structure des glycannes

MESCHER et STROMINGER (1976a) ont étudié la glycoprotéine majeure de l'enveloppe cellulaire de *Halobacterium salinarium*, une Archéobactérie qui vit dans les milieux hypersalins (jusqu'à 5 M de molarité en NaCl). Cette glycoprotéine de 200 kDa de masse, contenait 12% de glucides et libérait deux glycopeptides par hydrolyse trypsique. Le plus lourd, (de 55 kDa de masse) contenait environ 36 di- ou trisaccharides composés de glucose, de galactose et d'acide hexuronique, liés par des résidus de thréonine à la protéine ; ces oligosaccharides étaient libérés par β -élimination alcaline. L'autre glycopeptide contenait un hétéroglycane alcali-stable, composé de glucose/galactose/mannose/glucosamine/osamine dans les rapports 1:8:1:10:6 et qui était lié à la protéine par un résidu d'asparagine.

Ces auteurs proposèrent une structure pour la glycoprotéine (Figure 18 ; page 54) et soulignèrent les similitudes qu'elle présentait avec la glycophorine humaine.

Chez *Halobacterium halobium*, la glycoprotéine majeure de la paroi contient trois types de glycannes dont deux portent des résidus de sulfates (WIELAND et al., 1980). L'oligosaccharide le plus lourd (10 kDa environ) est formé par la répétition d'une unité contenant des résidus de N-acétylgalactosamine/galactose/acide glucuronique/N-acétyl glucosamine/sulfate dans les rapports 1:1:2:1:2 (WIELAND et al., 1981) et est lié à la protéine par une liaison N-

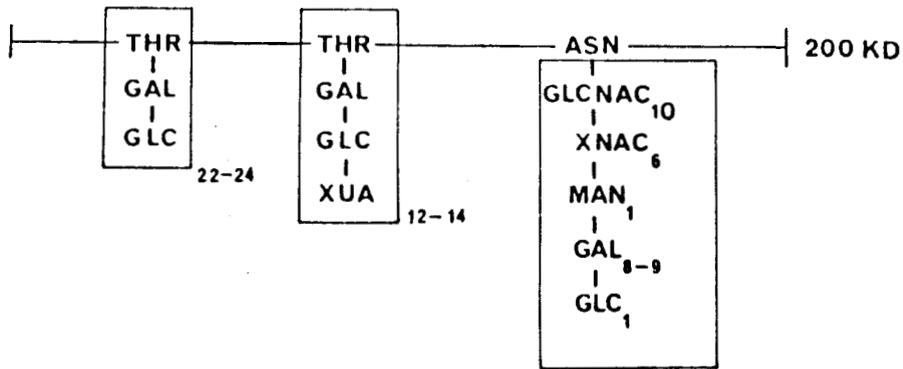


Figure 18 : Structure de la glycoprotéine majeure de l'enveloppe cellulaire de *Halobacterium salinarium* (d'après MESCHER et STROMINGER, 1976a).

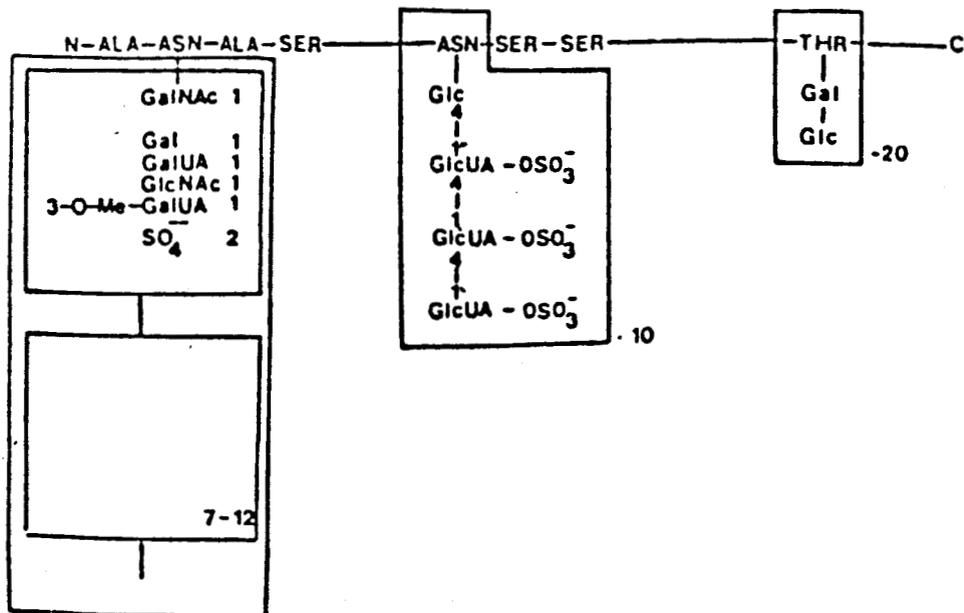


Figure 19 : Structure de la glycoprotéine majeure de l'enveloppe cellulaire de *Halobacterium halobium* (d'après PAUL et al., 1986).



acétyl galactosaminyl-asparagine, ces auteurs lui donnèrent le nom de glycosaminoglycane. Le deuxième type de glycane, formé de résidus de glucose/acide glucuronique/sulfate dans les rapports 1:3:3, se rattache à la chaîne peptidique par une liaison glucosyl-asparagine (WIELAND *et al.*, 1982, 1983). La protéine porte, de plus, 20 disaccharides neutres composés de glucose et de galactose, liés par des résidus de thréonine. PAUL *et al.* (1986) proposèrent un schéma de la glycoprotéine de surface de *Halobacterium halobium* (Figure 19 ; page 54), qui contient donc deux types de liaisons N-glycosidiques originaux par la nature des monosaccharides impliqués et plus classiques par la séquence peptidique acceptrice Asn-X-Ser, et un type de liaison O-glycosidique.

Les flagellines de *Halobacterium halobium* contiennent également des glycannes identiques au tétrasaccharide de la glycoprotéine pariétale, liés de même par l'intermédiaire du glucose (WIELAND *et al.*, 1985).

2.- Biosynthèse des glycannes

Comme pour les Eucaryotes, la biosynthèse des glycannes des *Halobacteria* implique l'activation des monosaccharides et leur transfert sur un précurseur lipidique (MESCHER *et al.*, 1976). L'action de la bacitracine sur *Halobacterium salinarium* permit à MESCHER et STROMINGER (1978) de préciser le mode de biosynthèse : le glycanne de type N-glycosidique est synthétisé sur la face cytoplasmique de la membrane par transfert séquentiel des monosaccharides, à partir de nucléotide-sucres, sur un polyisoprényl pyrophosphate en C55-60. Le transfert du glycanne sur la protéine a lieu à l'extérieur de la cellule, où la bacitracine peut se complexer avec le polyisoprényl pyrophosphate et bloquer ainsi le cycle biosynthétique (Figure 20 ; page 56). WIELAND *et al.* (1980) remarquèrent que seule la biosynthèse du glycosaminoglycane de *Halobacterium halobium* est inhibée par la bacitracine.

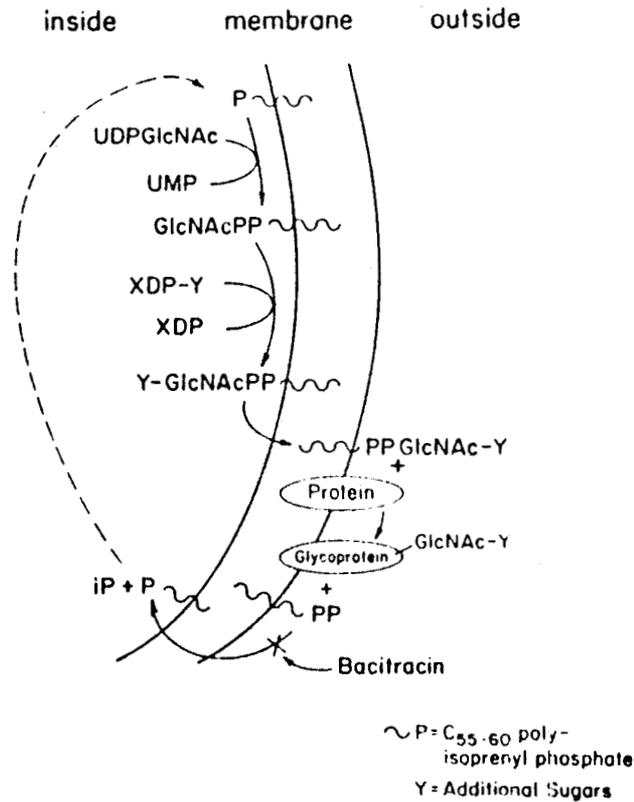


Figure 20 : Formation et attachement sur la protéine de l'hétérosaccharide de type N-glycosidique de *Halobacterium halobium*, la bacitracine se complexe avec le polyisoprényl pyrophosphate à l'extérieur de la cellule (d'après MESCHER, 1981).

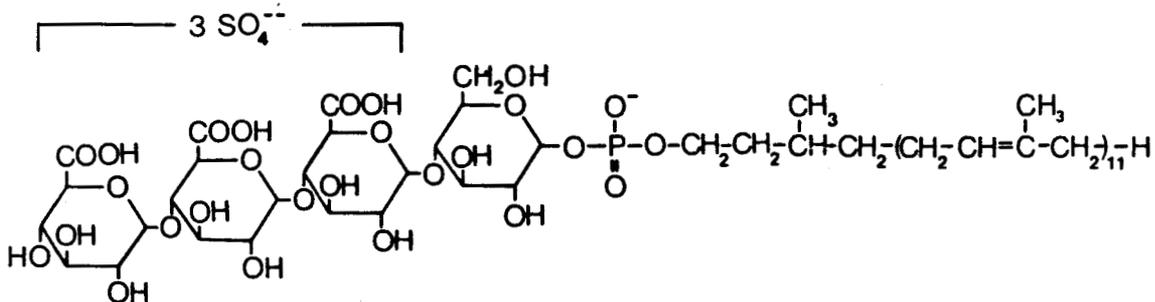


Figure 21 : Structure du précurseur du tétrasaccharide sulfaté de la glycoprotéine de *Halobacterium halobium* (d'après LECHNER *et al.*, 1985a).

En effet, la synthèse du tétrasaccharide a lieu dans la cellule sur un dolichol monophosphate en C60 (Figure 21 ; page 56), l'addition des résidus de sulfate a lieu sur le précurseur lipidique avant le transfert sur la protéine (LECHNER et al., 1985a). L'addition temporaire d'un résidu de 3-O méthyl glucose terminal sert de signal nécessaire pour le transport à travers la membrane et le transfert sur la protéine (LECHNER et al., 1985b, 1986). La biosynthèse des glycoprotéines pariétales des *Halobacteria* semble donc assez complexe, l'élongation des glycanes implique deux transporteurs lipidiques différents : un polyisoprényl pyrophosphate et un dolichol monophosphate. La synthèse des glycanes a lieu sur la face cytoplasmique de la membrane bactérienne, le passage transmembranaire, dans le cas du tétrasaccharide de *Halobacterium halobium*, est provoqué par l'addition d'un résidu de 3-O méthyl glucose qui est éliminé lors du transfert sur la protéine. Comme ce dernier transfert a lieu à la surface de la bactérie, PAUL et al. (1986) la comparèrent à la face luminale du réticulum endoplasmique des Eucaryotes.

La nature et le mode de biosynthèse des glycoprotéines pariétales des *Halobacteria* soulignent certaines relations existant entre les Eucaryotes et les Archéobactéries.

3.- Rôle biologique

Sous l'action de la bacitracine, qui bloque l'addition du glycosaminoglycane sur la protéine, les cellules de *Halobacterium salinarium* perdent leur morphologie en bâtonnet pour devenir sphériques (MESCHER et STROMINGER, 1976b). La glycoprotéine reste présente mais dépourvue du glycane de type N-glycosidique.

L'assemblage des unités protéiques pour constituer l'enveloppe dépend également de la force ionique et de la présence de cations divalents (HECHT et

al., 1986), la conformation de la glycoprotéine est modifiée quand la concentration en NaCl est inférieure à 2 M.

Le rôle des glycosaminoglycannes pour le maintien de la morphologie cellulaire confirme les analogies entre les glycoprotéines de surface des *Halobacteria* et les complexes protéoglycanne-collagène des animaux : les deux molécules possèdent à la fois, un polysaccharide composé d'unités de répétition sulfatées, des disaccharides de glucose et de galactose liés O-glycosidiquement, et des oligosaccharides acides liés N-glycosidiquement (PAUL *et al.*, 1986).

B. - LES GLYCOPROTEINES DES AUTRES ARCHEBACTERIES

Les protéines des enveloppes de nombreuses espèces d'Archéobactéries ont été décrites comme étant glycosylées, comme le montre le Tableau II (page 29) donné par KANDLER et KÖNIG (1985). Cependant, seules les glycoprotéines des *Halobacteria* ont fait l'objet d'une étude biochimique approfondie, pour les autres, la nature des glycannes et des liaisons avec les protéines restent à déterminer.

L'affirmation de la nature glycoprotéinique des parois de certaines espèces ne repose que sur la coloration au réactif de SCHIFF après oxydation à l'acide périodique, après électrophorèse en gel de polyacrylamide. On connaît par contre, la composition en monosaccharides de certaines parois (Tableau VIII ; page 59). Le cas de *Sulfolobus acidocaldarius* souligne les faiblesses de ce type d'analyse : tandis que la paroi totale contient 14% de glucides, la protéine pariétale isolée n'en contient plus que 3% (KÖNIG et STETTER, 1986), les seuls résidus qui restent sur la protéine étant des résidus de glucosamine. De même, KÖNIG *et al.* (1985a) ont isolé du glycogène associé aux préparations

TABLEAU VIII

Composition en monosaccharides (en $\mu\text{mole/mg}$ de poids sec)
des enveloppes cellulaires de différentes espèces d'Archéobactéries

Monosaccharide	E S P E C E S			
	<i>Sulfolobus</i> ^a <i>acidocaldarius</i>	<i>Thermoproteus</i> ^a <i>tenax</i>	<i>Thermoplasma</i> ^b <i>acidophilum</i>	<i>Methanobrevibacter</i> ^a <i>tindarius</i>
Glc	0,24	0,41	0,05	0,05
GlcNH ₂	0,19	0,07	0,01	-
Gal	0,01	-	0,03	-
Man	0,21	0,22	0,52	-
Rha	0,01	0,18	-	0,08
Rib	0,04	-	-	0,09
Xyl	-	-	-	-
Ara	-	0,4	-	-

^a : d'après KÖNIG et STETTER (1986)

^b : d'après YANG et HAUG (1979)

TABLEAU IX

Composition en monosaccharides des enveloppes protéiques de surface
de différentes souches de *Bacillus stearothermophilus*
et de *Desulfotomaculum nigrificans*
(d'après SLEYTR et al., 1986)

	Neutral sugars ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ S-layer)				
	Total	Rhamnose	Mannose	Galactose	Glucose
<i>B. stearothermophilus</i> NRS 2004/3a	30.4	25.5	-	-	4.9
<i>B. stearothermophilus</i> NRS 1536/3c	traces ^a	-	-	-	-
<i>B. stearothermophilus</i> PV 72	traces ^a	-	-	-	-
<i>B. stearothermophilus</i> E4-65	4.0	-	0.9	1.7	1.4
<i>D. nigrificans</i> NCIB 8395	19.8	7.2	-	6.5	6.1
<i>D. nigrificans</i> NCIB 8706	82.8	13.8	28.0	15.0	26.0
<i>D. nigrificans</i> B 200-71	29.5	2.8	6.0	2.9	17.8
<i>D. nigrificans</i> T 206-71	15.0	-	2.7	2.0	10.3

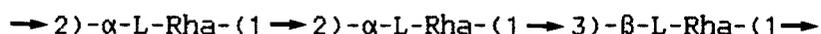
de parois de *Methanlobus tindarius* et de *Methanococcus*.

La possibilité de la présence de glucides associés non covalentiellement aux protéines, lors de la préparation des parois, ne peut donc être exclue. Il paraît donc difficile d'affirmer la nature glycoprotéinique de celles-ci, en l'absence d'aucune indication sur la nature des liaisons glycanne-protéine.

II. - LES GLYCOPROTEINES DES EUBACTERIES

STROBEL *et al.* (1972) ont isolé un glycopeptide phytotoxique secrété par *Corynebacterium sepedonicum* qui contenait une liaison entre un résidu de mannose et une thréonine. De plus, SLEYTR et THORNE (1976) ont décrit la présence de glucides dans les protéines des enveloppes externes de *Clostridium thermosaccharolyticum* et *thermohydrosulfuricum*.

Pourtant, la présence de glycoprotéines a semblé être une particularité des Archéobactéries (KANDLER, 1982 ; MESCHER, 1981) jusqu'aux travaux de KÜPCÜ *et al.* (1984) : la protéine de l'enveloppe externe de la souche NRS 2004/3a de *Bacillus stearothermophilus* contient 4% de glucides et libère, après hydrolyse pronasique, un glycopeptide de 20 kDa. L'hydrazinolyse, au contraire de la β -élimination alcaline, permet la libération d'un polyrhamnosyl formé par la répétition du trisaccharide (CHRISTIAN *et al.*, 1986) :



SLEYTR *et al.* (1986) isolèrent les protéines des enveloppes de différentes souches *Bacillus stearothermophilus* et *Desulfotomaculum nigrificans*, et en dosèrent les monosaccharides (Tableau IX ; page 59). Bien que n'ayant pas déterminé la nature des liaisons glycanne-protéine, ils suggérèrent, par analogie avec la souche NRS 2004/3a, qu'il s'agissait bien de glycoprotéines. La grande diversité des compositions obtenues peut être rapprochée de celle des exopolysaccharides bactériens dont la nature varie en fonction de la souche (SUTHERLAND, 1977). Ces molécules externes étant impliquées dans les contacts entre les bactéries et leur environnement, on pense qu'elles sont modifiées sous l'effet des pressions sélectives exercées

par celui-ci.

MAEBA et al. (1986) isolèrent la protéine de l'enveloppe de *Myxococcus xanthus* et la décrivent comme étant glycosylée, sur la base de la coloration au réactif de SCHIFF à l'acide périodique.

CONCLUSION

La glycosylation des protéines est donc bien un phénomène universel, puisque présent dans les trois règnes du monde vivant. Chez les Eucaryotes, les glycannes interviennent dans la protection des protéines, dans les phénomènes d'adhésion et de reconnaissance ou dans l'augmentation de la rigidité de la membrane de certaines cellules.

Chez les bactéries, on ne connaît des glycoprotéines que dans les enveloppes cellulaires, mais il n'est cependant pas impossible que d'autres protéines soient glycosylées. Les glycannes semblent jouer un rôle dans la stabilisation des surfaces bactériennes, en particulier chez les Archéobactéries dénuées de peptidoglycane rigide. De plus, par analogie avec les glycoprotéines des membranes des cellules eucaryotes, on peut penser que les glycannes bactériens assurent une protection contre les attaques protéolytiques et interviennent dans les mécanismes d'adhésion et de reconnaissance.

MATERIEL ET METHODES

I. - CULTURES DE METHANOTHRIX SOEHNGENII

A. - CHOIX DU MILIEU DE CULTURE

Methanothrix soehngeni souche FE a été cultivé sur milieu BC (Basal Carbonate) décrit par TOUZEL et ALBAGNAC (1983).

La présence d'extrait de levure à un taux de 0,1 g/l est indispensable à la croissance de cette bactérie. Les polymannanes présents dans les levures peuvent interférer lors des dosages des glucides de *Methanothrix*, nous les avons donc éliminés par chromatographie sur colonne de Sephadex G25 (PHARMACIA) 5 x 40 cm.

B. - CULTURE DE MASSE

Methanothrix pousse sur acétate avec un K_s de 0,7 mM et un temps de doublement de 75 h environ. La bactérie a été cultivée successivement en flacons de 2 l, puis en fermenteurs (SETRIC, TOULOUSE) de 50 et de 200 l, à 35°C, selon la chronologie suivante :

- 1^{er} jour : culture en 6 flacons de 1 l.
- 50^{ème} jour : ensemencement du fermenteur 50 l contenant 35 l de milieu.
- 70^{ème} jour : ensemencement du fermenteur 200 l contenant 170 l de milieu.
- 105^{ème} jour : récupération des cellules par centrifugation.

Dans le cas des fermenteurs, le pH a été maintenu à 7,4 par addition

en continu d'acide acétique glacial, le milieu a été dégazé à l'azote trois fois par semaine afin d'éviter l'acidification par le CO_2 produit par la bactérie, le taux en sulfures étant maintenu supérieur à 0,2 mM.

C. - SUIVI DE LA CULTURE

1.- Dosage du méthane

La production de gaz a été mesurée par un compteur volumétrique (SCHLUMBERGER), la composition en a été déterminée tout au long de la culture par injection directe sur colonne d'acier inox 0,3 x 300 cm, remplie de Porapak S à 45°C, le débit de gaz vecteur (Hélium) étant de 30 ml/min.

2.- Dosage de l'acétate résiduel

L'acétate présent dans le milieu de culture a été dosé par chromatographie en phase gazeuse sur colonne d'acier inox 0,3 x 250 cm, remplie de néopentyl glycol adypate à 25% et de H_3PO_4 à 2% sur chromosorb WAW (100/120 mesh) ; placée à 150°C avec un débit de gaz vecteur (azote saturé en acide formique) de 30 ml/min.

3.- Dosage de la biomasse

La biomasse présente dans le milieu a été mesurée parallèlement par mesure de la turbidité à 650 nm et par gravimétrie, une D.O. de 1 correspond à 0,7 g/l de poids sec cellulaire.

4.- Dosage des sulfures

Les dégazages répétés du milieu de culture provoquent le départ des sulfures sous forme gazeuse et nous ont donc obligé à contrôler régulièrement le taux

de sulfures présents dans le milieu par la méthode de SIEGEL (1965), en suivant le protocole suivant :

100 μ l de milieu sont prélevés et ajoutés à un tube contenant 1 ml d'eau, 100 μ l des solutions suivantes sont ensuite ajoutées :

- une solution A à 0,02 M de N,N'-diméthyl-p-phénylène diamine sulfate, dans l'acide chlorhydrique 7,2 N.
- une solution B à 0,03 M de FeCl₃ dans l'acide chlorhydrique 1,2 N.

Le tube est ensuite laissé 20 min à l'obscurité avant la lecture de la D.O. à 650 nm. Un taux de 0,2 mM de sulfures dans le milieu correspond à une D.O. de 0,1.

II. — METHODOLOGIE UTILISEE DANS LA RECHERCHE D'EXOPOLYSACCHARIDES

A. — A PARTIR DU MILIEU DE CULTURE

20 l de surnageant de culture ont été microfiltrés sur cassette 0,22 μ m, puis concentrés jusqu'à 250 ml sur cassette PTGC (exclusion 10 kDa), le système d'ultrafiltration utilisé était du modèle Pellicon (MILLIPORE). Le concentrat a été ensuite additionné de 4 volumes d'éthanol absolu à froid et laissé une nuit à 4°C de manière à précipiter les macromolécules.

B. - A PARTIR DES CELLULES

1.- Tentatives d'extraction des exopolysaccharides

8 g de cellules (en poids sec) ont été agités 15 min à l'ultra-disperseur Polytron (KINEMATICA) dans 200 ml de tampon phosphate 0,2 M, EDTA 2%, ajusté à pH 9 avec de la soude, selon le protocole décrit par RIDEAU et MORFAUX (1976). Après centrifugation à 15 000 g x 15 min, le culot obtenu a été repris par 200 ml de tampon phosphate 0,2 M à pH 7,2, les cellules ont été lysées à la presse de French (AMINCO) à 130 000 kPa. L'homogénat cellulaire ainsi obtenu a été centrifugé à 20 000 g x 30 min.

Les deux surnageants ainsi obtenus ont été filtrés sur filtres Whatman GF/C, puis additionnés de 5% d'acide trichloroacétique à froid afin d'éliminer les protéines et les acides nucléiques, centrifugés et enfin additionnés de 4 volumes d'éthanol absolu à froid. Après une nuit à 4°C, les culots obtenus par centrifugation ont été repris dans le tampon Tris/HCl 25 mM à pH 7,4 ; NaCl 0,6 M et chromatographiés sur colonne d'Ultrogel A4 (IBF) 1,5 x 90 cm équilibrée dans l'eau, afin d'isoler les glucides macromoléculaires.

2.- Suivi de la lyse bactérienne : dosage de l'activité acétate thiokinase

Lors des tentatives d'extraction d'exopolymères par dispersion au Polytron, il était nécessaire de suivre la lyse des cellules pour s'assurer de ne pas extraire les constituants cytoplasmiques de la bactérie. Pour cela, nous avons dosé l'activité de l'acétate thiokinase (EC : 6.2.1.1) dans les extraits obtenus, cette enzyme insensible à l'oxygène est intracellulaire et présente une forte activité dans les lysats à la presse de French.

Le dosage a été réalisé d'après OBERLIES et al. (1980) par mesure au spectrophotomètre à 340 nm de la formation d'AMP à partir d'ATP. La réaction

III. - PREPARATION DE L'ENVELOPPE DE METHANOTHRIX SOEHNGENII FE

A. - PREPARATION

L'enveloppe cellulaire a été préparée après lyse des cellules, soit par deux passages à la presse de French à 130 000 kPa, soit par agitation 1 h à 20°C dans la soude 0,1 N (d'après SPROTT et Mc KELLAR, 1980). Après lyse de 1 g de cellules (poids sec) et centrifugation à 20 000 g x 15 min, les culots obtenus ont été repris dans 30 ml du tampon Tris/HCl 25 mM à pH 7,4 ; NaCl 0,1 M ; MgCl₂ 3 mM ; contenant, respectivement, 30 et 15 mg de déoxyribonucléase et de ribonucléase A (BOEHRINGER MANNHEIM), agités à 37°C pendant 2 h avant une nouvelle centrifugation à 20 000 g x 15 min.

Les culots obtenus ont été, soit dialysés directement et lyophilisés afin de permettre l'analyse de la fraction pariétale globale, soit purifiés par deux traitements successifs par 50 ml de tampon Tris/HCl 25 mM à pH 7,4 ; dithiothréitol 50 mM ; Triton X 100 0,2 %, les surnageants obtenus après centrifugation à 20 000 g x 15 min étant dialysés et lyophilisés.

B. - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les préparations de gaine ont été observées au microscope électronique HITACHI HU 12 A, après coloration négative à l'acétate d'uranyle 4% sur des grilles membranées carbonées.

IV. — METHODES DE DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE DE L'ENVELOPPE

A. — DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE EN C, H, O, N, EN CENDRES ET EN LIPIDES

1.- Composition globale

La composition de la paroi en éléments simples a été déterminée par le Service Central d'Analyses du C.N.R.S. à VERNAISON (Rhône).

2.- Pourcentage de cendres

Les cendres ont été pesées après incinération d'une préparation d'enveloppe cellulaire à 550°C pendant 2 h.

3.- Pourcentage de lipides

Le pourcentage de lipides présents dans les préparations d'enveloppe cellulaire a été déterminé par gravimétrie après 2 extractions au méthanol/chloroforme (2/1 : v/v) à 20°C selon la méthode de BLIGH et DYER (1959).

B.- DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET PROTEINES

1.- Composition en acides aminés

Les compositions en acides aminés ont été déterminées selon la méthode de MOORE et STEIN (1954) et SPACKMAN *et al.* (1958) après hydrolyse à l'acide chlorhydrique 6 N pendant des temps de 24, 48 et 72 h, en tubes hermétiques sous azote. La séparation et le dosage des acides aminés libérés ont été effectués sur analyseur TSM (TECHNICON).

2.- Dosage des protéines

Les protéines solubles ont été dosées selon la méthode de BRADFORD (1976), les protéines insolubles selon la méthode de LOWRY *et al.* (1951) modifiée par PETERSON (1977) qui utilise une solubilisation par le SDS alcalin à chaud. La sérum albumine bovine a été utilisée comme étalon.

C.- DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN GLUCIDES

1.- Dosages colorimétriques

Les sucres neutres et réducteurs ont été quantifiés, respectivement, par la méthode de DUBOIS *et al.* (1956) et de KIDBY et DAVIDSON (1973) en prenant le rhamnose comme étalon. Les acides uroniques ont été dosés par coloration au métahydroxydiphényl (BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN, 1973), l'étalon étant

l'acide glucuronique.

2.- Détermination de la composition molaire en monosaccharides

a.- Cinétique d'hydrolyse

La labilité des glucides à l'hydrolyse acide a été étudiée en réalisant des incubations de préparations de l'enveloppe cellulaire à 105°C pendant 1 h, à 0,5% dans des solutions d'acide trifluoroacétique allant de 0,1 N à 4 N. Après élimination du culot par centrifugation à 20 000 g x 15 min et de l'acide à l'évaporateur rotatif, les monosaccharides libérés ont été dosés sous forme d'oses réducteurs, en prenant le rhamnose comme témoin. L'hydrolyse a également été suivie par chromatographie sur plaques Silicagel (MERCK) dans le système solvant : butanol/acide acétique/eau (2/1/1 : v/v) (PALO et SAVOLAINEN, 1972).

b.- Dosage des monosaccharides sous forme de dérivés trifluoroacétylés après méthanolyse

La composition molaire en monosaccharides a été déterminée après méthanolyse et trifluoroacétylation, selon la méthode de ZANETTA et al. (1972). Les méthanolyses ont été réalisées est dans un tube hermétique contenant 1 ml de méthanol/HCl 0,5 N anhydre et 3 mg de préparation de gaine ou 250 µg de polysaccharides, pendant 16 h à 80°C. Pour la gaine, il a été nécessaire de centrifuger le culot obtenu et de délipider le surnageant par 3 fois 1 ml d'heptane, le contenu du tube est alors évaporé sous azote avant addition de 50 µl de dichlorométhane et 50 µl d'anhydride trifluoroacétique. Après 16 h à 20°C, les dérivés trifluoroacétylés ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de verre 0,3 x 300 cm, remplie de silicone OV 210 à 5% sur Chromosorb W (H1) 100 mesh, avec un gradient de température de 100 à 220°C (2°C/min) et un débit de gaz vecteur (azote) de 10 ml/min.

c.- Dosage des monosaccharides sous forme d'acétates d'alditols après hydrolyse

Les monosaccharides libérés par hydrolyse acide peuvent être analysés après réduction et acétylation (SAWARDEKER *et al.*, 1965).

L'hydrolyse de 100 µg de polysaccharides est réalisée par 1 ml d'acide trifluoroacétique 2 N, dans un tube hermétique placé 1 h à 105°C. Après refroidissement, l'acide est éliminé à l'évaporateur rotatif (BUCHI) par 3 additions de 3 ml de méthanol.

La réduction est effectuée dans le ballon d'évaporation, le résidu étant repris par 100 µl d'eau amenée à pH 10 par addition de soude, contenant 500 µg de borohydrure de potassium. Après 2 h de réduction, la solution est neutralisée par de l'acide acétique jusque pH 5, évaporée de nouveau, 5 additions successives de méthanol permettant d'éliminer les borates formés.

Le résidu est transféré dans un tube, lyophilisé et repris par 10 µl de pyridine et 50 µl d'anhydride acétique. Après 16 h à 20°C, la solution est évaporée sous azote et reprise dans le dichlorométhane (0,05 µg de monosaccharides par µl). Les acétates d'alditols sont alors analysés sur colonne capillaire Chrompack CP Sil 5 CB 0,32 mm x 50 m, avec un gradient de température de 130 à 230°C (2°C/min) précédé d'un plateau de 15 min à 130°C. La pression d'entrée du gaz vecteur (azote) est de 0,45 bars.

U. - METHODES D'ETUDE DE LA LIAISON GLYCANNE-PROTEINE ET DE LIBERATION DE LA COPULE GLUCIDIQUE

A. - EXPERIENCES DE β -ELIMINATION

La soude 0,05 N à 45°C permet la rupture des liaisons O-glycosidiques, le protocole utilisé, décrit par CARLSON (1968), prévoit d'effectuer la réaction en milieu réducteur pour éviter la dégradation récurrente des glycanes libérés.

1 g de préparation d'enveloppe cellulaire a été repris par 60 ml de tampon alcalin, NaOH 0,05 M ; NaBH₄ 1 M ; et agité 24 h à 45°C sous reflux. La solution a été alors neutralisée jusque pH 5,5 par addition d'acide acétique et centrifugée à 20 000 g x 15 min. Les ions borates du surnageant ainsi obtenu ont été éliminés à l'évaporateur rotatif comme décrit précédemment, puis par passage sur une colonne de Biogel P₂ (BIO-RAD) 4 x 50 cm, équilibrée dans l'eau. La fraction dessalée a été lyophilisée.

Nous avons réalisé une expérience témoin en omettant la soude lors du traitement.

B. - EXPERIENCES D'ATTAQUE ALCALINE

L'action de la soude 1 N à 100°C provoque la libération des glycanes de type N-glycosidique, le protocole utilisé a été décrit par LEE et SCOCCA (1972) : 100 mg du culot, obtenu après une première étape de β -élimination réductive, ont été repris par 5 ml de tampon NaOH 1 M ; NaBH₄ 1 M ; et agités

6 h à 100°C sous reflux. Après neutralisation par l'acide acétique et centrifugation à 20 000 g x 15 min, le surnageant a été traité comme décrit ci-dessus, la fraction polysaccharidique obtenue a été lyophilisée.

C. - EXPERIENCES D'HYDRAZINOLYSE

L'hydrazine anhydre à 100°C coupe les liaisons amides et esters et provoque donc la libération des glycanes liés aux protéines sur des résidus d'asparagine (BAYARD et MONTREUIL, 1974). Nous avons utilisé des temps d'hydrazinolyse de 20 h comme l'ont décrit ces auteurs. Nous avons par ailleurs réalisé une cinétique de libération des glucides sur la préparation de gaine de *Methanotherix* et sur le fibrinogène bovin (SIGMA).

Des tubes hermétiques contenant chacun 200 mg de préparation protéique et 2 ml d'hydrazine anhydre (PIERCE) ont été placés à 105°C pendant des temps allant de 20 min à 20 h. L'hydrazine a été éliminée par évaporation sous azote puis par passage 72 h en dessiccateur sous vide, en présence d'acide sulfurique. Les culots obtenus ont été repris par 2 ml d'acide acétique à 1%, après centrifugation à 20 000 g x 15 min les surnageants ont été dessalés par chromatographie sur colonne de Biogel P₂ (BIORAD) 2,5 x 30 cm équilibrée dans l'eau.

Les polysaccharides obtenus après le dessalage sur colonne de Biogel P₂ ont été N-réacétylés dans 1 ml de solution de NaHCO₃ à saturation, par 4 additions successives de 50 µl d'anhydride acétique pendant 2 h. Ils ont été à nouveau chromatographiés sur cette même colonne.

D.- EXPERIENCES D'EXTRACTION DES GLUCIDES AUX SOLVANTS ORGANIQUES

Nous avons tenté d'extraire les glucides de l'enveloppe de *Methanothrix* par des solvants organiques des polysaccharides (MOYE, 1972), dans les conditions suivantes :

50 mg de préparation d'enveloppe cellulaire ont été traités respectivement :

- par 1 ml de diéthylène glycol, sous agitation à 4°C pendant 48 h.
- par 1 ml de diméthyl sulfoxyde (DMSO), sous agitation à 20°C pendant 7 h.
- par 1 ml de diméthyl formamide, sous agitation à 40°C pendant 24 h.
- par 1 ml de phénol à 85%, sous agitation à 85°C pendant 6 h.

Un témoin a été placé dans 1 ml d'eau à 4°C pendant 48 h sous agitation.

Le surnageant phénolique a été additionné d'un volume d'eau nécessaire à l'obtention d'un système biphasique phénol/eau (50:50 ; v/v). Dans un tel système, la phase aqueuse contient les glucides tandis que les protéines se trouvent à l'interphase (WESTPHAL et JANN, 1965). Les deux phases ont été séparées. Le culot obtenu a été traité une deuxième fois au phénol.

Les différentes solutions ont été centrifugées à 20 000 g x 15 min. Les surnageants obtenus ont été dialysés et lyophilisés, les culots conservés en l'état à -20°C.

E. - EXPERIENCES DE SOLUBILISATION DES PROTEINES

1.- Tentative de solubilisation par réduction des ponts disulfures

200 mg de préparation d'enveloppe cellulaire ont été traités par 40 ml de tampon Tris/HCl 300 mM à pH 8,6 ; EDTA 5 mM ; urée désionisée 8 M ; β -mercaptoéthanol 0,5 M ; après dégazage à l'azote, sous agitation à 37°C pendant une semaine. Après centrifugation à 15 000 g x 15 min, le culot a subi une nouvelle étape de réduction, les protéines présentes dans le surnageant ont été alkylées 3 h à 20°C après addition de 300 mg d'acide iodoacétique dissous dans 2 ml de NaOH 2 N. L'étape de réduction a été répétée cinq fois sur les culots, les surnageants alkylés ont été dialysés puis lyophilisés.

2.- Solubilisation par traitement rapide à l'hydrazine

Un tube contenant 240 mg de préparation d'enveloppe cellulaire et 1 ou 2 ml d'hydrazine anhydre a été chauffé pendant sept minutes pour atteindre 90°C. Le tube a été alors refroidi, son contenu a été dilué par addition de 9 ml d'eau et amené à pH 8,5 par addition de 6 ml d'acide sulfurique à 10%. La solution a été centrifugée à 2 000 g x 10 min afin d'éliminer les protéines qui se sont réinsolubilisées, puis dialysée contre de l'eau distillée et lyophilisée. Le lyophilisat a été repris dans 6 ml de tampon Tris/HCl 20 mM à pH 8, centrifugé à nouveau avant d'être chromatographié sur les colonnes de tamisage moléculaire.

Une expérience témoin a été réalisée par traitement à 100°C de 200 mg de préparation de gaine dans le sulfate d'hydrazine 4 M à pH 7.

VI. - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES D'ANALYSE DES OLIGOSACCHARIDES ET DES PROTEINES

A. - ANALYSE DES OLIGOSACCHARIDES

1.- Chromatographie sur couche mince

Les oligosaccharides obtenus par hydrazinolyse ont été analysés sur plaques de Silicagel (MERCK) dans le système solvant :

Ethanol/n-butanol/pyridine/acide acétique/eau (100/10/10/3/30 : v/v) (BAYARD *et al.*, 1979).

Les oligosaccharides obtenus après hydrolyse partielle ont été analysés sur plaques de Silicagel dans le système solvant :

n-butanol/acide acétique/eau (2/1/1 : v/v) (PALO et SAVOLAINEN, 1972).

Les plaques ont été révélées au réactif à l'orcinol sulfurique (200 mg d'orcinol dans 100 ml d'acide sulfurique à 20%).

2.- Chromatographie de tamisage moléculaire

a.- A basse pression

Les oligosaccharides libérés par hydrazinolyse ont été chromatographiés sur colonne de Séphacryl S 200 (PHARMACIA) 2,5 x 90 cm équilibrée dans l'eau ou sur colonne d'Ultrogel ACA 34 (I.B.F.) 1,3 x 90 cm équilibrée dans le tampon Tris/HCl 20 mM à pH 8.

b.- A haute pression

Après hydrazinolyse, les oligosaccharides ont été séparés sur colonne de TSK SW (CHROMPACK) 0,75 x 60 cm, équilibrée dans une solution de NaCl 0,1 M, avec un débit de 0,3 ml/min.

3.- Chromatographie d'échange d'ions

A basse pression

Le produit majeur obtenu après la séparation sur la colonne de Séphacryl S 200 a été injecté sur colonne de 40 ml de Dowex 1 x 2, forme Cl⁻ (BIORAD) équilibrée dans l'eau. La fraction retenue a été élevée par un tampon de formate d'ammonium 1 M et dessalée sur la colonne de Biogel P₂ (Biorad) 2,5 x 30 cm.

B.- ANALYSE DES PROTEINES

1.- Electrophorèse en gel de polyacrylamide

a.- En conditions dénaturantes

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide en présence de SDS, ont été réalisées selon la méthode de KERCKAERT (1978) avec un gradient d'acrylamide de 7 à 15%, précédé d'un gel de concentration à 5%. Les échantillons sont dissous dans un tampon Tris/HCl 3 mM à pH 8,9 ; SDS 5% ; β -mercaptoéthanol 5% ; glycérol 20% ; à 100°C pendant 5 min. Le tampon d'électrophorèse est un Tris/glycocolle 20 mM à pH 8,3 ; SDS 1%.

b.- En conditions non dénaturantes

Le protocole expérimental est identique, cependant, on omet le SDS et le β -mercaptoéthanol, tant pour la dissolution de l'échantillon que pour l'électrophorèse.

c.- Révélation des électrophorèses

Après migration, les électrophorèses sont révélées dans le mélange isopropanol/acide acétique/eau (20/25/55 : v/v) contenant 0,02% de bleu de Coomassie R 250 pour les protéines, ou par le réactif de Schiff après oxydation à l'acide périodique pour la détection des chaînes glycaniques.

La détermination des masses moléculaires est réalisée par comparaison avec des protéines calibrées (PHARMACIA).

2.- Chromatographie de tamisage moléculaire

Les protéines solubilisées à l'hydrazine ont été chromatographiées sur colonnes de Séphacryl S 200 (PHARMACIA) 1,3 x 90 cm, d'Ultrogel AcA 34 (I.B.F.) 1,3 x 90 cm ou de Trisacryl GF 2000 (I.B.F.) 1,8 x 45 cm, équilibrées dans un tampon Tris/HCl 20 mM à pH 8.

3.- Chromatographie d'échange d'ions

Les protéines solubilisées ont été séparées sur colonne de 25 ml de DEAE agarose (BIORAD) équilibrée dans un tampon Tris/HCl 20 mM à pH 8. Les protéines retenues ont été éluées par un gradient linéaire de NaCl de 0 à 1 M.

VII. — METHODES D'ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES OLIGOSACCHARIDES PARIETAUX

A. — METHYLATION DES OLIGOSACCHARIDES

La méthylation avant hydrolyse permet l'analyse des points de liaisons des oses, le procédé utilisé a été décrit par FINNE *et al.* (1980) et FOURNET *et al.* (1981).

Un tube contenant 200 µg de glucides et 100 µl de diméthylsulfoxyde est soumis à sonication pendant 30 min avant l'addition, sous azote, de 150 µl de base de méthylation à 40°C, le lithium méthylsulfinyl carbanion, préparé selon la méthode de PAZ PARENTE *et al.* (1985). Le tube est soumis à sonication 1 h puis laissé une nuit à 20°C après addition de 200 µl d'iodure de méthyle. 2 ml d'eau, des cristaux de thiosulfate de sodium (qui décompose l'excès d'iodure de méthyle) et 3 fois 300 µl de chloroforme sont alors ajoutés. Les phases chloroformiques sont prélevées, rassemblées dans un tube à méthanolyse et extraites par 12 fois 3 ml d'eau, afin d'éliminer tout le diméthyl sulfoxyde.

La solution est évaporée sous courant d'azote et lyophilisée, la méthanolyse est alors réalisée à 80°C pendant 16 h après addition de 200 µl de méthanol/HCl 1,5 N anhydre. Après une nouvelle évaporation sous azote, 20 µl de pyridine et 50 µl d'anhydride acétique sont ajoutés, le tube est laissé 16 h à 37°C, le résidu obtenu après évaporation est repris dans le méthanol.

Les monosaccharides partiellement méthylés et acétylés sont analysés

sur colonne capillaire 0,02 x 250 cm, remplie de silicone OV 101, avec un gradient de température de 120 à 240°C (2°C/min) et un débit de gaz vecteur (hélium) de 1ml/min. En sortie de colonne, les produits sont analysés en spectrométrie de masse sur un appareil RIBERMAG GC MS R 10-10 à filtre quadripolaire.

B. - HYDROLYSES ACIDES PARTIELLES

Les hydrolyses acides partielles des oligosaccharides ont été réalisées dans des tubes hermétiques, par l'acide trifluoroacétique 0,01 N à 105°C. L'acide a été éliminé à l'évaporateur rotatif (BÜCHI) par additions successives de méthanol.

RESULTATS

La culture de *Methanothrix soehngeni* FE nous a permis de disposer de quantités suffisantes de cellules pour réaliser nos travaux sur les glucides solubles ou associés à la gaine insoluble. Les dégazages réguliers du milieu de fermentation à l'azote ont permis d'y maintenir le taux d'acide acétique à un niveau satisfaisant et donc une croissance assez rapide. Nous avons récolté 265 g de cellules en poids sec (avec un rendement de 1,15 g/mole d'acide acétique consommée), une telle culture de masse n'avait pas été réalisée auparavant.

Dans un premier temps, nous avons cherché la présence de polysaccharides dans le surnageant de culture ou à la surface de la bactérie, ce qui nous a conduit à l'isolement de glycogène intracellulaire. Puis, nous avons étudié les oligosaccharides de la fraction pariétale insoluble et avons cherché à savoir s'ils étaient liés par des liaisons covalentes aux protéines. Nous avons enfin réussi à solubiliser la glycoprotéine majeure de la gaine.

C H A P I T R E I

RECHERCHE DES EXOPOLYSACCHARIDES SOLUBLES DE METHANOTHRIX SOEHNGENII FE

Les exopolysaccharides bactériens peuvent être présents sous forme de couche visqueuse (ou "slime") ou bien associés à la cellule pour former une capsule. Dans le premier cas, on peut les isoler directement dans le milieu de culture, après centrifugation des cellules. Les polysaccharides capsulaires doivent être isolés par extraction chimique, en présence d'agents chélatants ou d'acides, ou par agitation mécanique (GEHR et HENRY, 1983).

I. - ABSENCE D'EXOPOLYMERES DANS LE MILIEU DE CULTURE

Après concentration à 200 ml de 20 l de surnageant de culture, aucune fraction précipitable à l'éthanol à froid n'a été obtenue. Les faibles traces de glucides et de protéines détectées dans le surnageant, respectivement 1 et 3 mg pour 15 g de cellules en poids sec, peuvent provenir d'un faible pourcentage de cellules lysées. La bactérie n'excrète donc pas d'exopolymères dans le milieu.

II. - RECHERCHE D'EXOPOLYSACCHARIDES SOLUBLES PAR EXTRACTION SUR LES CELLULES

A. - EXTRACTION PAR AGITATION MECANIQUE

Nous avons tenté d'extraire d'éventuels polysaccharides solubles, présents à la surface de la bactérie, soit par un décapage à l'ultra-disperseur Polytron en milieu chélatant, soit par une lyse totale à la presse de French. Le dosage de l'activité acétate thiokinase libérée a permis de connaître le taux de lyse provoqué par le traitement au Polytron.

Le Tableau X (page 87) donne pour chaque extraction l'activité enzymatique, les protéines et les glucides libérés. La dispersion au Polytron a provoqué la lyse de 9% des cellules et la libération de 10,5% des glucides solubles totaux. La perte de glucides due à la précipitation à l'acide trichloroacétique correspond à l'élimination des résidus de ribose et de déoxyribose des acides nucléiques.

Les polysaccharides libérés par agitation au Polytron l'ont donc été proportionnellement à la lyse des cellules, cela ne suffisait pourtant pas à affirmer leur nature intracytoplasmique.

B. - IDENTIFICATION DU POLYSACCHARIDE SOLUBLE

Les polysaccharides extraits par traitement au Polytron ou à la presse de French ont été chromatographiés sur colonne d'Ultrogel A4. Dans les deux cas, nous avons détecté un pic majeur représentant plus de 80% du produit

TABLEAU X

Extraction des polysaccharides solubles de *Methanothrix soehngeni* FE
et contrôle de la lyse cellulaire par mesure de l'activité acétate thiokinase

	Extraction par agitation au Polytron	Extraction par lyse à la presse de French
GLUCIDES		
Extraits totaux (en mg)	30	285
Solubles dans l'acide trichloroacétique à 5% (en mg)	21	140
Précipités à l'éthanol (en mg)	17	125
PROTEINES ET ACTIVITES ENZYMATIQUES		
Protéines extraites (en mg)	190	2 500
Activité spécifique (en pkat/mg)	6,3	5,2
Activité totale (en μ kat)	1,2	13



chromatographié. Son volume d'élution correspondait à celui d'une protéine de 1 600 kDa.

L'étude de ce polysaccharide majeur (il constitue 95% des glucides libérés par lyse à la presse de French) nous a montré qu'il s'agissait de glycogène. Son identification et l'étude de sa biosynthèse ont été décrites dans un article paru dans *Archives of Microbiology* (voir Annexe ; page 129). Le glycogène de *Methanothrix soehngeni* est bien présent sous forme d'inclusions cytoplasmiques, ainsi que l'ont montré les études de microscopie électronique.

III. - CONCLUSION

Les études de microscopie électronique réalisées au laboratoire sur les biofilms méthanogènes avaient suggéré la présence d'exopolymères chez *Methanothrix* (DUBOURGUIER *et al.*, 1985). Or les travaux que nous avons réalisés sur une culture pure de *Methanothrix soehngeni* FE, y ont montré l'absence de polymères solubles, tant dans le milieu de culture qu'associés à la surface de la bactérie. Nos tentatives de décapage des cellules nous ont conduit au seul polysaccharide soluble présent : du glycogène, dont l'origine intracellulaire a été confirmée par le suivi enzymatique de la lyse et par l'étude de microscopie électronique.

C H A P I T R E I I

ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES
ASSOCIES A LA FRACTION PARIETALE INSOLUBLE

L'absence de polysaccharides solubles à la surface de *Methanothrix soehngeni* FE nous a conduit à nous intéresser aux glucides associés à la paroi. Les compositions de la gaine publiées par PATEL *et al.* (1986) et KÖNIG et STETTER (1986) rapportent la présence de 15 à 20% de glucides. Les photographies réalisées par G. PRENSIER, dans le cadre de l'étude du glycogène, révèlent une fine couche colorée au réactif de THIERY à la surface de la bactérie (voir publication en annexe ; page 133).

Nous avons isolé la gaine de *Methanothrix soehngeni* FE selon différentes méthodes de lyse et de décapage, et déterminé sa composition dans les différents cas. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux décrits dans la littérature.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la fraction glucidique associée à l'enveloppe cellulaire, nous avons étudié la nature de l'interaction entre les glycannes et les protéines insolubles. Pour cela, nous avons déterminé les modes d'extraction possibles de la fraction glucidique et cherché à savoir s'il était nécessaire d'hydrolyser des liaisons covalentes ou si une simple solubilisation suffisait. Par traitement rapide à l'hydrazine, nous avons solubilisé la fraction glycoprotéique majeure de la gaine. Nous avons par ailleurs entrepris l'étude de la structure primaire des oligosaccharides isolés, en collaboration avec le laboratoire du Professeur B. FOURNET.

I. — DETERMINATION DE LA COMPOSITION DES PREPARATIONS D'ENVELOPPE CELLULAIRE DE METHANOTHRIX SOEHNGENII FE

A. — COMPOSITION GLOBALE

La composition chimique a été déterminée sur une préparation de fraction pariétale globale, c'est à dire après hydrolyse des acides nucléiques sur le culot de lyse à la presse de French. Le culot final alors obtenu représente environ 10% du poids sec total des cellules.

L'étude microscopique du culot en coloration négative révèle la présence des constituants de l'enveloppe, gaine et septa, assez fragmentés (Figure 22 ; page 91). Quelques cellules contiennent cependant des débris cytoplasmiques. Les acides aminés constituent 80% du poids sec ce qui confirme la nature essentiellement protéique de la gaine. La fraction glucidique de la paroi correspond à 0,7% du poids des cellules, aucune trace d'acide uronique n'a été détectée par dosage colorimétrique.

Les compositions chimiques des gaines de *Methanospirillum* et *Methanothrix* décrites dans la littérature sont données, pour comparaison avec la souche FE, dans le Tableau XI (page 92). Les gaines de *Methanospirillum hungatei* GP1 et JF1 et de *Methanothrix concilii* GP6, dont la composition est donnée par PATEL *et al.* (1986), ont été purifiées par traitement au SDS 2% à 100°C, ce qui n'est pas le cas de la fraction globale de la souche GP1 décrite par SPROTT et Mc KELLAR (1980). Une partie des 11% de lipides alors présents provient de débris membranaires, le reste (3% du poids sec) est spécifique de la gaine (SPROTT *et al.*, 1986). La gaine de la souche FE contient un taux de

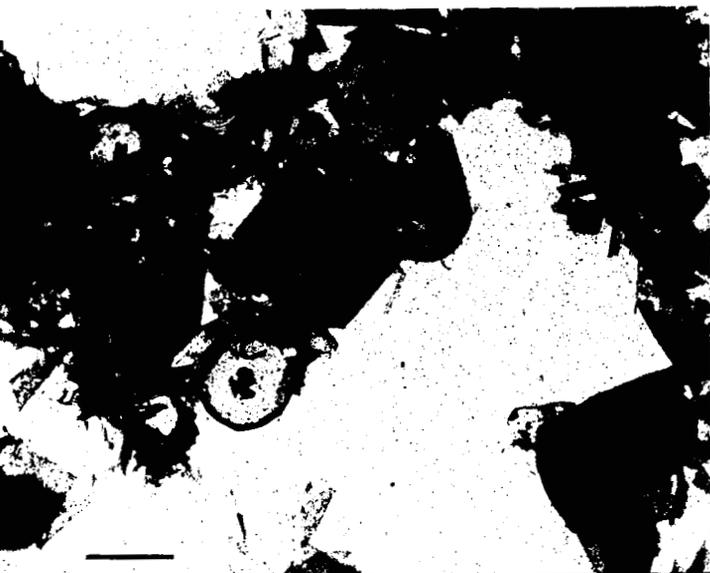


Figure 22

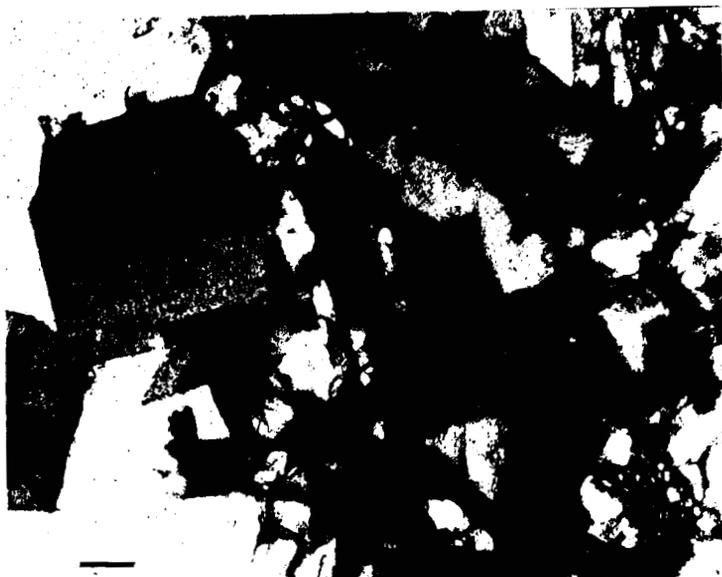


Figure 23

Figure 22 : Préparation de l'enveloppe de *Methanotherix soehngeni*, observée en coloration négative. Les constituants (gaine et septa) sont fragmentés par le passage à la presse de French (la barre représente 1 μ m).

Figure 23 : Préparation de l'enveloppe, après les décapages au Triton X 100 et au DTT, observée en coloration négative (la barre représente 0,5 μ m).



Figure 24

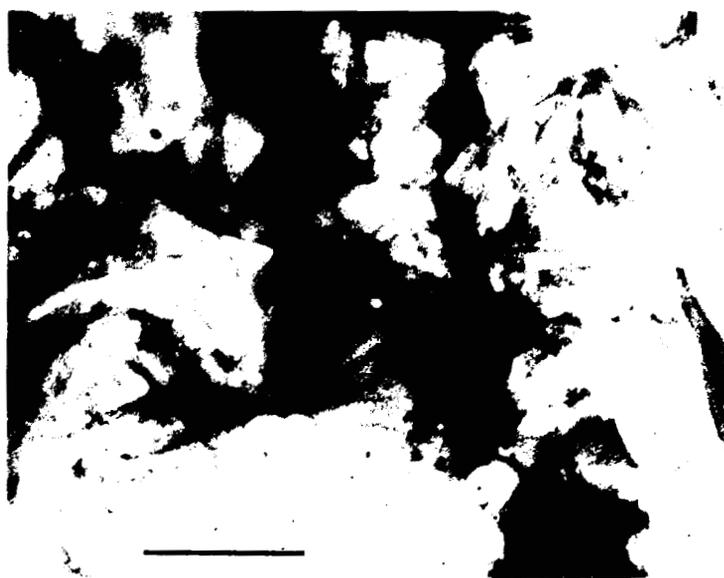


Figure 26

Figure 24 : Saccule isolée, présente dans les préparations de l'enveloppe. Les anneaux de la gaine et la structure en spirale du septum sont visibles (la barre représente 0,5 μ m).

Figure 26 : Culot obtenu après deux traitements de la gaine au phénol, observé en coloration négative. Les structures organisées en anneaux ou en spirale ont disparu (la barre représente 0,5 μ m).

TABLEAU XI

Composition chimique des préparations des enveloppes cellulaires de différentes souches de *Methanospirillum* et de *Methanotherix* (en pourcentage du poids sec)

Composants	<i>Methanospirillum hungatei</i>		<i>Methanotherix concilii soehngeni</i>	
	GP1 ^a	JF1 ^b	GP6 ^b	FE
C	47,8	46,5	43,9	49,4
N	11,1	12,6	9,7	13,2
O	nd	nd	nd	26,1
H	6,9	6,1	6,1	7,4
C/N	4,3	3,7	4,5	3,7
P	1,3	nd	nd	0,1
S	nd	nd	nd	0,8
Acides aminés	69,6	59,7	61,1	81
Glucides	6,6	6,9	18,8	7
Lipides	11,1	nd	nd	4
Cendres	4,5	nd	nd	2
Total	91,8	66,6	79,9	94

nd : non déterminé

^a : d'après SPROTT et Mc KELLAR (1980)

^b : d'après PATEL et al. (1986)



protéines plus important, mais les compositions des autres souches donnent une valeur totale de 80% du poids sec environ.

L'analyse élémentaire de l'enveloppe de *Methanotherix soehngeni* FE est plus proche de celle des souches de *Methanospirillum* que de *Methanotherix concilii*. Il faut cependant remarquer que toutes ces gaines ont été préparées de différentes manières, soit par lyse en milieu alcalin, suivie ou non d'un décapage au SDS, soit par lyse à la presse de French. Le mode de lyse peut avoir une incidence sur la composition chimique comme nous le montrerons dans le paragraphe suivant.

B. - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

La composition en acides aminés a été déterminée sur des préparations de gaine de *Methanotherix soehngeni* FE, obtenues par lyse à la soude 0,1 N ou à la presse de French, suivie ou non de décapages successifs au Triton X 100 à 0,2%, puis au Triton X 100 à 0,2% ; DTT 50 mM à 37°C. Ces traitements ont permis d'extraire, respectivement 5,5 et 6% des protéines et 6,6 et 15% des glucides de la fraction pariétale globale.

Le culot final obtenu a été étudié en coloration négative au microscope électronique (Figures 23 et 24 ; page 91). Les structures de la gaine et des septa sont toujours présentes, par contre les saccules obtenues ne contiennent plus de débris cytoplasmiques.

Les compositions obtenues sont données dans le Tableau XII (page 94), parallèlement aux compositions données pour *Methanotherix soehngeni* Opfikon (KÖNIG et STETTER, 1986) et pour *Methanotherix concilii* GP6 (PATEL *et al.*, 1986). La majorité des acides aminés est présente dans des proportions

TABLEAU XII

Composition en acides aminés (en pourcentage molaire) des préparations de gaine de différentes souches de *Methanothrix* et des fractions solubilisées par le Triton X 100 et le DTT

	<i>Methanothrix concilii</i> ^a	<i>Methanothrix soehngeni</i> Opfikon ^b	<i>Methanothrix soehngeni</i> FE			
			Préparation globale	après décapages au Triton X 100 et au DTT	extrait au Triton X 100, 0,2%	extrait au Triton X 100, 0,2% ; DTT 50 mM
ASP	9,7	12,5	10,8	10,5	7,7	9,5
GLU	15,8	16,7	11,8	10,3	8,5	10,8
THR	7,1	9,4	6,1	6,3	3,5	6,1
SER	6,6	7,4	6,4	5,5	3,3	5,5
PRO	3,9	2,7	3,7	4,1	4,2	4,7
GLY	8,2	13,7	9,8	9,7	9,0	9,7
ALA	7,2	6,8	9,2	10,1	10,7	10,1
VAL	6,9	6,7	6,7	7,7	10,3	8,3
LEU	7,5	5,1	6,3	7,8	10,2	8,8
ILE	5,0	2,7	5,4	6,6	9,2	7,8
CYS	0,7	0,2	0,6	0,6	0,4	0,4
MET	0,4	0,2	2,0	0,7	2,9	1,3
TYR	4,9	3,3	3,9	3,8	2,3	3,7
HIS	2,5	3,5	1,8	1,5	1,5	1,1
PHE	3,8	2,0	3,3	3,0	4,2	3,5
LYS	6,4	4,4	6,4	6,3	8,5	6,8
ARG	3,3	2,4	3,6	3,8	2,9	1,4

^a : d'après PAIEL *et al.* (1986)

^b : d'après KÖNIG et STETTER (1986)



similaires, la souche FE semble cependant plus proche de GP6 que de Opfikon. Les différences les plus notables concernent les résidus d'acide glutamique, de glycine, d'alanine et d'isoleucine.

Le mode de lyse des cellules n'influence pas la composition en acides aminés des préparations de parois obtenues, les différences entre des préparations après lyse à la soude et à la presse de French sont minimales et ne dépassent pas l'intervalle d'erreur du dosage. De même, les extraits au Triton X 100 et au DTT représentent environ 10% des protéines en poids et affectent peu la composition du culot insoluble. Les protéines extraites ont par contre une nature nettement différente avec un accroissement important du taux en acides aminés hydrophobes. Nous avons calculé les facteurs d'hydrophobicité moyenne $H\bar{\theta}$ (BIGELOW, 1967), obtenus à partir des valeurs d'hydrophobicité des acides aminés données par NOZAKI et TANFORD (1971).

Les protéines de la gaine donnent une valeur de $H\bar{\theta}$ égale à 0,98 kcal/mole ce qui correspond aux valeurs obtenues pour les protéines de surface des bactéries, ou pour les protéines fibrillaires (collagène) des Eucaryotes.

Les protéines extraites au Triton X 100 à 0,2% puis au Triton X 100 à 0,2% ; DTT 50 mM ont des valeurs respectives de $H\bar{\theta}$ de 1,27 et 1,14 kcal/mole, proches des valeurs des protéines membranaires. Ces traitements permettent donc bien de purifier la préparation de gaine en éliminant le matériel membranaire et cytoplasmique contaminant.

C.- COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES

Les monosaccharides ont été déterminés parallèlement aux acides aminés, sur les mêmes préparations de gaine. Les résidus dominants sont le

rhamnose, le fucose, le ribose et le glucose. On détecte de plus quelques traces de galactose, de mannose ; d'un hexose et d'une osamine dont les natures exactes restent à déterminer.

Avant de déterminer la composition molaire, nous avons réalisé une cinétique d'hydrolyse acide. La présence de résidus de pentoses et de méthylpentoses suggère une grande labilité des liaisons osidiques à l'hydrolyse acide. La libération des résidus est en effet très rapide comme l'indique le dosage des oses réducteurs (Figure 25 ; page 97). Une heure d'hydrolyse à 105°C par l'acide trifluoroacétique 2 N permet 96% de libération des glucides, c'est dans ces conditions que nous avons dosé les résidus sous forme d'acétates d'alditols. Les méthanolyses ont été réalisées pendant un temps de 16 h à 80°C avant trifluoroacétylation des monosaccharides libérés. Nous avons en effet déterminé la composition par ces deux méthodes différentes, les résultats obtenus dans les deux cas étaient similaires.

Au contraire des taux en acides aminés qui ne sont pas modifiés, les proportions relatives en monosaccharides sont nettement différentes selon le mode de lyse (en milieu alcalin ou à la presse de French) (Tableau XIII ; page 98). La lyse à la soude provoque un doublement du pourcentage de glucides dû uniquement à un accroissement de la proportion de glucose (il représente alors 62% des résidus glucidiques) provenant du glycogène contaminant (page 107). Les décapages au Triton et au DTT affectent peu la composition glucidique de la paroi (Tableau XIII ; page 98), ils permettent d'extraire essentiellement des hexoses (glucose, galactose et mannose) qui représentent 21% des glucides de la fraction pariétale globale. Ces hexoses proviennent donc, au moins en partie, du matériel membranaire et cytoplasmique contaminant, tandis que les résidus de rhamnose, de ribose et de fucose sont bien spécifiques de la gaine insoluble.

Dans le Tableau XIV (page 98) nous donnons la composition glucidique

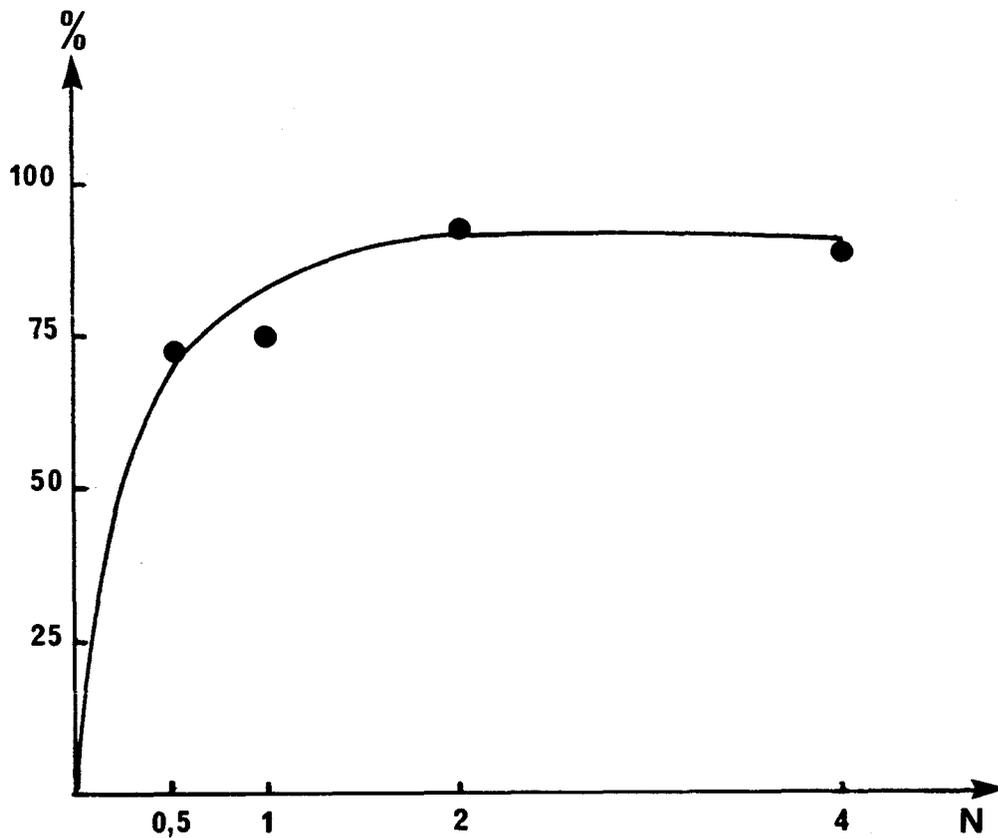


Figure 25 : Libération des oses réducteurs de la gaine (en pourcentage du total), après 1 h d'hydrolyse par différentes concentrations en acide trifluoroacétique.

TABLEAU XIII

Composition molaire des monosaccharides présents dans les préparations de gaine et dans les fractions solubilisées au Triton X 100 et au DTT

Mono-saccharide	LYSE	L Y S E A L A P R E S S E D E F R E N C H			
	A LA SOUDE	préparation globale	après décapages au Triton X 100 et au DTT	extrait au Triton X 100 0,2%	extrait au Triton X 100, 0,2% ; DTT 50 mM
Rha	5 ^a	5 ^a	5 ^a	-	0,33
Fuc	1,1	1,1	0,9	-	-
Rib	1,2	0,6	0,8	-	0,2
Glc	16,2	1,3	1,1	1 ^b	1 ^b
Gal	1,2	0,2	0,1	0,34	0,1
Man	1,1	0,4	0,3	0,2	0,2
Hexose	0,5	0,4	0,4	-	-
Osamine	0,6	0,4	0,2	-	-

Les rapports molaires ont été calculés :

^a sur la base de 5 résidus de rhamnose

^b sur la base de 1 résidu de glucose

TABLEAU XIV

Comparaison entre les compositions centésimales en monosaccharides des gaines de différentes souches de *Methanospirillum* et *Methanothrix* (en pourcentage du poids sec)

Monosaccharide	<i>Methanospirillum hungatei</i>		<i>Methanothrix concilii</i> / <i>soehngeni</i>		
	GP1 ^a	JF1 ^a	GP6 ^a	Opfikon ^b	FE
Ara	-	4,96	-	-	-
Gal	0,65	0,44	0,27	-	0,11
Glc	2,45	0,54	3,68	4,68	1,03
Man	0,33	0,55	9,46	10,4	0,28
Rha	1,53	0,49	2,61	-	4,1
Rib	0,72	-	2,74	-	0,6
Fuc	-	-	-	-	0,71
Osamine	0,03	-	-	-	2,3
Total	5,71	6,98	18,76	15,12	7,06

^a : d'après PATEL et al. (1986)

^b : d'après KÖNIG et STETTER (1986)



des gaines des différentes souches de *Methanospirillum* et de *Methanotherix* décrites dans la littérature, en comparaison avec la souche FE. Contrairement aux acides aminés dont les taux sont assez stables d'une souche à l'autre, chaque monosaccharide varie dans des proportions importantes. Les résidus dominants sont le glucose et le mannose chez *Methanotherix* GP6 et Opfikon, le glucose et le rhamnose chez *Methanospirillum* GP1 et l'arabinose chez *Methanospirillum* JF1. La souche FE présente la composition glucidique la plus complexe, le rhamnose étant le résidu dominant.

L'explication de ces disparités peut résider dans les différents modes de préparation des gaines utilisés. Les gaines des souches GP1, JF1 et GP6 ont été préparées après lyse cellulaire à la soude (PATEL *et al.*, 1986) ce qui provoque un accroissement du glycogène contaminant (voir page 107). Ceci peut expliquer les taux de glucose importants dosés par ces auteurs. De même, les taux élevés de mannose rencontrés peuvent être dus à la présence d'extrait de levure dans les milieux de culture des bactéries. Au cours de travaux préliminaires, nous avons en effet constaté que les polymannanes de l'extrait de levure contaminaient les préparations de paroi.



D. - CONCLUSION

L'étude de la composition chimique de la gaine de *Methanotherix soehngeni* FE révèle une composition glucidique particulière, en opposition avec les acides aminés, lorsqu'on la compare aux compositions décrites dans la littérature pour d'autres souches de *Methanospirillum* et de *Methanotherix*. Nous avons montré que le mode de lyse cellulaire a une incidence sur la fraction glucidique et permet d'expliquer une partie des variations décrites dans la littérature.

Les actions conjuguées du Triton X 100 et du dithiothréitol sur la fraction pariétale globale ont permis de solubiliser et d'éliminer 10% des protéines et 20% des glucides (essentiellement des hexoses neutres) appartenant à du matériel membranaire ou cytoplasmique. La fraction insoluble obtenue contient en majorité des résidus de fucose, de ribose et de rhamnose, ce dernier représente 58% des glucides de l'enveloppe cellulaire.

Tous les travaux décrits dans la suite de ce mémoire ont été réalisés sur des préparations de gaine purifiées.

A propos des glucides de la gaine de *Methanotherix soehngeni* FE, nous avons cherché à savoir s'ils sont présents sous forme oligo- ou polysaccharidique. Nous avons également étudié les différentes méthodes permettant leur libération à partir de la gaine.

II. - ETUDE DE LA LIBERATION DES GLUCIDES DE L'ENVELOPPE DE METHANOTHRIX SOEHNGENII FE, MISE EN EVIDENCE DE LEUR NATURE GLYCANNIQUE

Nous avons étudié les différents procédés qui permettent d'extraire les glucides à partir de la fraction protéique insoluble. Après avoir essayé leur solubilisation par des solvants organiques, nous avons utilisé les méthodes classiques de rupture des liaisons glycanes-protéines. Dans chaque cas, nous avons déterminé la composition molaire de la fraction libérée.

L'étude des glucides obtenus après hydrazinolyse a prouvé leur nature oligosaccharidique. Nous avons entrepris l'étude de la structure primaire des deux glycannes majeurs.

A. - EXTRACTION PAR LES SOLVANTS ORGANIQUES

Nous avons utilisé quatre solvants organiques des polysaccharides décrits par MOYE (1972) : le diéthylène glycol, le diméthylsulfoxyde, le diméthyl formamide et le phénol. Les rendements d'extraction des glucides et les compositions molaires des fractions solubilisées sont données dans le Tableau XV (page 102). A l'exception du phénol qui a permis l'extraction de 20% des glucides, les solvants utilisés sont moins efficaces qu'un simple traitement à l'eau pendant 48 h. Pour chaque type de monosaccharide, les rendements d'extraction sont donnés dans le Tableau XVI (page 102). Les oses spécifiques de la gaine (le rhamnose, le ribose et le fucose) qui représentent 75% des résidus glucidiques totaux, ont donc été peu affectés par les solvants

TABLEAU XV

Rendement d'extraction et composition en monosaccharides (en pourcentage molaire) des fractions solubilisées, à partir de la gaine, par les solvants organiques

Monosaccharide	FRACTION EXTRAITE PAR				
	eau	diéthylène glycol	diméthyl sulfoxyde	diméthyl formamide	phénol
Rha	12,8	22,5	20,5	26,5	46,5
Fuc	-	2,0	-	4,1	5,7
Rib	-	1,2	-	2,0	3,5
Glc	79,9	40,9	68,4	41,4	26,8
Gal	-	8,2	-	9,1	0,3
Man	2,4	8,6	4,1	12,4	2,9
Hexose	5,0	13,9	6,8	4,1	14,2
Osamine	-	2,4	-	-	-
Rendement d'extraction des glucides totaux (en pourcentage)	12	7	6	6,5	20,1

TABLEAU XVI

Rendement d'extraction (en pourcentage) des monosaccharides de la gaine par les solvants organiques

Monosaccharide	EXTRAIT PAR				
	eau	diéthylène glycol	diméthyl sulfoxyde	diméthyl formamide	phénol
Rha	2,8	2,7	2,2	2,9	16,1
Fuc	-	1,2	-	2,2	11,1
Rib	-	0,7	-	1,1	7,0
Glc	86	24,6	35,4	22,6	67,7
Gal	-	41,6	-	42	16,2
Man	8,7	17,2	7,1	22,6	16,2
Hexose	15	22,9	9,7	6,2	63,1
Osamine	-	7	-	-	33,2



organiques tandis que les hexoses neutres ont été solubilisés avec des rendements pouvant atteindre 85%.

Le cas du traitement au phénol est légèrement différent car le rendement de l'extraction atteint 20% des glucides de la gaine tandis que les protéines restaient en suspension. Après centrifugation, nous avons vérifié si une partie des protéines était solubilisée. Après addition d'eau de manière à obtenir un système biphasique, l'interphase ne contenait pas de protéines visibles. Sur les 20% de glucides extraits, un tiers se trouve dans la phase aqueuse. Un nouveau traitement du culot protéique par le phénol à chaud n'a pas permis l'extraction de quantités détectables de glucides.

Tandis que près de 70% des résidus de glucose ont été extraits par le phénol à chaud, ces rendements ne dépassent pas 16% pour les résidus de rhamnose, de ribose et de fucose. L'examen en coloration négative du culot final obtenu (Figure 26 ; page 91) révèle la présence de débris de la gaine avec un aspect très désorganisé.

L'impossibilité d'extraire les 80% de glucides restant, au cours du second traitement au phénol, confirme la présence d'une fraction glucidique majeure spécifique de la gaine qui ne peut être solubilisée indépendamment des protéines.

B. - UTILISATION DES METHODES CLASSIQUES DE RUPTURE DES LIAISONS GLYCANNES-PROTEINES

L'impossibilité d'extraire les glucides de la gaine de *Methanotherix soehngeni* FE par les solvants organiques ou les traitements par les détergents (page 96), nous a amené à utiliser les méthodes permettant la rupture d'éventuelles liaisons covalentes entre les glucides et les protéines

insolubles. La labilité des liaisons osidiques des pentoses et des méthylpentoses à l'hydrolyse acide, nous a empêché d'utiliser les acides pour libérer les glucides sous forme d'oligosaccharides. Nous avons donc utilisé des méthodes d'hydrolyse alcaline ou d'hydrazinolyse.

1.- Expérience de β -élimination

La soude 0,05 N provoque la libération des glycanes liés O-glycosidiquement, l'addition de borohydrure de sodium permettant d'éviter une dégradation récurrente des glycanes libérés. Un traitement d'une préparation de gaine de *Methanothrix soehngeni* FE a permis la solubilisation de 6% du poids sec et de 2,8% des glucides totaux. De plus, le témoin au borohydrure de sodium 1 M en l'absence de soude, a donné les mêmes rendements d'extraction. Ces résultats indiquent l'absence de liaisons O-glycosidiques.

2.- Expérience d'attaque alcaline

La soude molaire à 100°C provoque une coupure des liaisons peptidiques, acétamido et N-glycosidiques, le borohydrure de sodium 1 M empêchant la dégradation des glycanes libérés. Le traitement d'un culot ayant subi préalablement une étape de β -élimination a permis la solubilisation de 27% du poids sec et de 85% des glucides totaux. La composition molaire en monosaccharides libérés est donnée dans le Tableau XVII (page 105), elle est voisine de celle de la gaine mais présente cependant un affaiblissement des taux de glucose et de ribose. L'attaque alcaline permet donc l'extraction quantitative des glucides de la gaine insoluble de *Methanothrix soehngeni* FE.

3.- Expérience d'hydrazinolyse

L'hydrazine anhydre à 100°C permet la libération quantitative des glycanes de type N-glycosidique, la rupture des liaisons peptidiques et amides.

TABLEAU XVII

Composition molaire en monosaccharides de la gaine
et des fractions extraites par attaque alcaline ou hydrazinolyse

Monosaccharides	préparation de gaine	FRACTION EXTRAITE PAR	
		attaque alcaline	hydrazinolyse
Rha	5	5	5
Fuc	0,9	0,9	1,1
Rib	0,8	0,3	1,2
Glc	1,1	0,6	1,4
Gal	0,1	-	0,1
Man	0,3	0,1	0,3
Hexose	0,4	0,3	0,2
Osamine	0,2	-	-
Rendement d'extraction des glucides totaux (en pourcentage)	100	85	96

Les rapports molaires ont été calculés sur la base de 5 résidus de rhamnose



La gaine de *Methanothrix soehngeni* FE se solubilise en quelques minutes dans l'hydrazine à chaud, un tel résultat n'avait été obtenu avec aucun autre solvant, tant dans le cadre de nos expériences que dans les travaux décrits par BEVERIDGE *et al.* (1985) et PATEL *et al.* (1986). Après évaporation de l'hydrazine et reprise du culot par l'acide acétique (voir Matériel et Méthodes, page 75), seuls les glucides ont été solubilisés. Leur composition molaire est donnée dans le Tableau XVII (page 105), elle est très voisine de celle de la gaine mais présente néanmoins un léger accroissement en fucose et en ribose.

L'hydrazinolyse permet donc la libération quantitative des glucides de la gaine, nous avons utilisé cette méthode sur plusieurs grammes de préparation d'enveloppe afin d'isoler des quantités suffisantes de matériel glucidique.

C.- ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES LIBERES PAR HYDRAZINOLYSE

Les glucides présents dans la gaine de *Methanothrix soehngeni* FE se trouvent sous forme oligosaccharidique et peuvent être séparés par chromatographie de gel-filtration ou d'échange d'ions. L'étude des chromatogrammes en couche mince (Figure 27 ; page 110) ne permet pas d'observer une différence après N-réacétylation des oligosaccharides libérés par hydrazinolyse, cette étape a donc été omise dans les travaux décrits dans ce chapitre. Nous avons entrepris l'étude de la structure primaire des deux glycanes majeurs.

1.- Séparation des oligosaccharides

Les glucides totaux de la gaine de *Methanothrix soehngeni* FE obtenus par

hydrazinolyse ont été chromatographiés sur colonne de TSK-SW ou de Séphacryl-S 200 pour donner 3 pics selon le profil de la figure 28 (page 108).

Les deux produits présents dans le pic majeur B, mal séparés en gel-filtration, ont été résolus par passage sur colonne de Dowex 1 x 2.

Le produit mineur, de plus haut poids moléculaire, est retenu sur la colonne, tandis que le produit majeur correspond à la fraction neutre. Les pourcentages relatifs des quatre fractions obtenues, leur composition molaire et les masses moléculaires en équivalent-protéines, obtenues après calibration de la colonne de TSK-SW, sont données dans le Tableau XVIII (page 109). Le chromatogramme des différentes fractions sur plaque de Silicagel est donnée dans la figure 27 (page 110).

Nous n'avons pas déterminé la nature des résidus chargés permettant la séparation des deux fractions B_{acide} (B_A) et B_{neutre} (B_N) sur la colonne de Dowex 1 x 2.

2.- Résultats préliminaires sur la structure primaire des oligosaccharides

Nous avons entrepris l'étude de la structure primaire des fractions A, B_A et B_N isolées par tamisage moléculaire et chromatographie d'échange d'ions.

a.- Identification de la fraction A

La fraction A est constituée de glucose à plus de 95%, elle a été identifiée comme étant du glycogène analogue à celui isolé dans la fraction soluble après lyse de *Methanothrix soehngeni* FE (voir page 88). Le taux de glycogène présent dans les préparations de gaine varie selon le mode de lyse des cellules (voir page 96), en outre il peut être extrait à 85% pendant 48 h d'agitation dans l'eau (voir page 102). Nous pouvons donc considérer qu'il s'agit d'un contaminant provenant du glycogène intracellulaire.

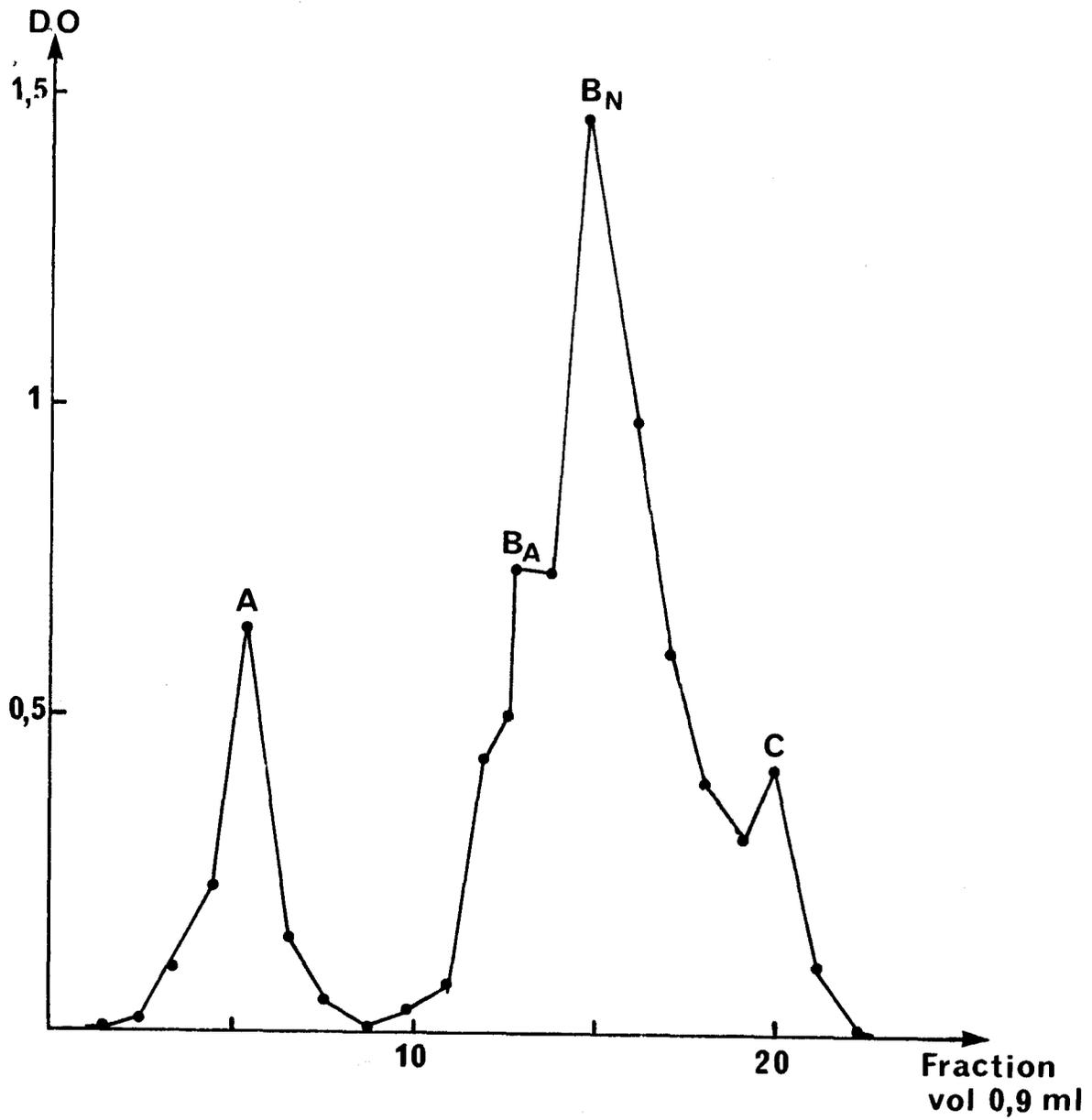


Figure 28 : Séparation des trois fractions glucidiques de la gaine sur colonne de TSK-SW, détection des glucides à 490 nm par dosage au phénol-sulfurique.

TABLEAU XVIII

Pourcentage relatif, composition molaire en monosaccharides et masse moléculaire en équivalent-protéine des fractions glucides extraites par hydrazinolyse et séparées par chromatographie de tamisage moléculaire et d'échange d'ions

	A	F R A C T I O N		C
		B _{acide}	B _{neutre}	
Pourcentage de la fraction glucidique solubilisée	12	27	47	14
Monosaccharide				
Rha	5	5	5	5
Fuc	1,2	0,1	1,3	0,8
Rib	1,21	3	0,5	0,4
Glc	260	0,1	0,2	1
Gal	-	trace*	0,2	trace
Man	2	0,3	0,3	0,3
Hexose	-	trace	0,1	0,4
Osamine	-	-	-	-
Masse moléculaire en équivalent-protéine (en kDa)	> 1 000	12	7,5	3,3

Les rapports molaires ont été calculés sur la base de 5 résidus de rhamnose

* : inférieur à 0,05

TABLEAU XIX

Composition molaire des éthers méthyliques présents dans le méthanolysat du produit B_{acide} perméthylé

Ether méthylique	B _{acide}
(2, 3, 5) - Me ₃ - Rib	1,0
(2, 5) - Me ₂ - Rib	7,0
(5) - Me ₁ - Rib	2,2
(2, 3, 4) - Me ₃ - Rha	1,8
(3, 4) - Me ₂ - Rha	20



Les rapports molaires ont été calculés sur la base de 20 résidus de (3, 4) - Me₂ - Rha

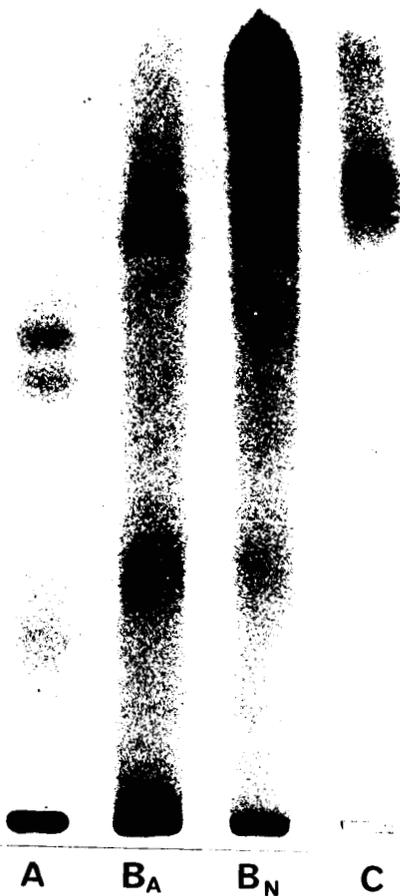


Figure 27

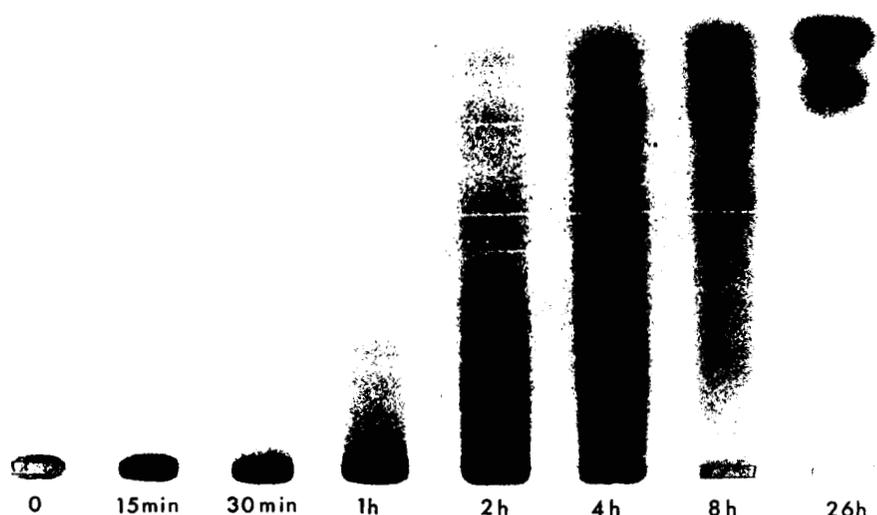


Figure 29

Figure 27 : Comportement chromatographique sur couche mince des quatre fractions glucidiques de la gaine, séparées par chromatographie de gel-filtration et d'échange d'ions.

Figure 29 : Suivi de la cinétique d'hydrolyse du produit B_N par chromatographie sur couche mince

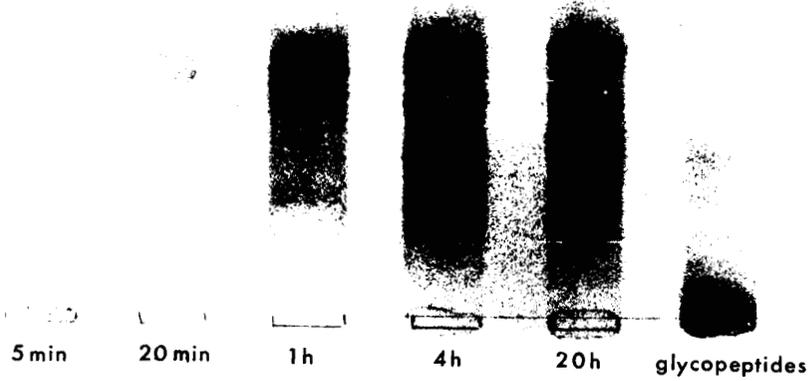


Figure 30

Figure 30 : Suivi de la cinétique d'hydrazinolysse des glycanes du fibrinogène bovin par chromatographie sur couche mince.

Figure 31 : Protéines de la gaine, solubilisée par le traitement au β-mercapto éthanol, analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (HM et BM sont les témoins de masse moléculaire).



Figure 31

b.- Etude structurale de la fraction B_{acide}

La fraction B_A se compose essentiellement de résidus de ribose et de rhamnose (Tableau XVIII ; page 109). Son volume d'élution sur la colonne de TSK-SW suggère une taille de 20 à 30 monosaccharides, ce qui est en accord avec l'absence de migration en chromatographie sur couche mince (Figure 27 ; page 110) : la majeure partie du produit reste au point de dépôt, seule une légère fraction migre avec un R_F de 0,7. La révélation à l'orcinoïl donne une couleur bleue, due au taux élevé de ribose.

L'analyse en C.P.G./S.M. des dérivés partiellement méthylés et acétylés est rendue difficile par l'absence de témoins connus de pentoses et de méthyl pentoses. La relative simplicité de la composition en monosaccharides nous a cependant permis d'identifier chaque pic et de proposer une composition molaire des éthers méthyliques obtenus (Tableau XIX ; page 109) pour une chaîne de 30 résidus environ, en omettant les dérivés des monosaccharides mineurs. Ces résultats suggèrent la présence de branchements sur des résidus de ribose, de chaînes linéaires constituées de rhamnose (substitué en C2) et de ribose (substitué en C3), de la présence de ribose et de rhamnose en position terminale.

c.- Etude structurale de la fraction B_{neutre}

La composition de la fraction B_N est plus complexe que celle de la fraction B_A (Tableau XVIII ; page 109) car elle comprend des résidus de rhamnose, de fucose, de ribose ainsi que d'hexoses (glucose, galactose, mannose) ces derniers étant présents en quantités plus importantes. Le volume d'élution sur la colonne de TSK-SW indique une taille de 15 à 20 monosaccharides. Pourtant, la majeure partie du produit migre avec un R_F de 0,92 en chromatographie sur Silicagel. La présence d'une légère coloration bleue au point de dépôt indique la présence de fraction B_A résiduelle.

L'analyse en C.P.G./S.M. des dérivés partiellement méthylés et acétylés a été rendue difficile par l'impossibilité d'identifier les pics correspondant aux dérivés du rhamnose et du fucose. Il semble en fait que ces deux composés possèdent des temps de rétention très voisins. Malgré la complexité des chromatogrammes, et en fonction de la composition molaire en monosaccharides majeurs de cette fraction, nous pouvons proposer la présence de rhamnose (substitué en C2 et en C3), de fucose (substitué en C3) et de ribose (substitué en C3).

3.- Hydrolyse acide partielle

Nous avons réalisé une cinétique d'hydrolyse acide de la fraction B_N. La figure 29 (page 110) donne le chromatogramme sur couche mince pour des temps d'hydrolyse de 15 minutes à 26 h dans l'acide trifluoroacétique 0,01 N. Des temps compris entre 4 h et 8 h permettent d'obtenir des oligosaccharides de différentes tailles. La séparation de ces fragments en vue de leur identification est en cours.

D. - CONCLUSION

La gaine de *Methanotherix soehngeni* FE contient donc des oligosaccharides très difficiles à extraire sous l'action de solvants organiques. Nous avons vérifié que ces glucides étaient solubles dans les solvants utilisés, l'impossibilité de les extraire à partir de la gaine indique donc la présence d'interactions fortes avec les protéines, qui sont restées insolubles dans tous les cas. Ces études avec les solvants ont permis de confirmer la présence d'une fraction glucidique (qui représente 20% des glucides totaux) aisément extractible et essentiellement composée d'hexoses

neutres, tandis que les 80% insolubles résistent à un 2^{ème} traitement au phénol à chaud.

Les glucides totaux ont été libérés dans des conditions permettant la coupure de liaisons de type N-glycosidique, nous y reviendrons dans le chapitre suivant. Nous avons entrepris l'étude des oligosaccharides ainsi libérés. La fraction glucidique totale contient environ 15% de glycogène, ce résultat vient confirmer les observations faites au chapitre I sur la variabilité du taux de glucose en fonction du mode de lyse cellulaire.

Deux oligosaccharides majeurs ont été séparés par chromatographie de gel-filtration et d'échange d'ions, la nature des résidus chargés reste à déterminer. Nous avons entrepris l'étude de leur structure primaire, rendue difficile par la nature des résidus présents. En effet, bien qu'il soit possible d'utiliser les méthodes classiques de détermination de la structure des glycanes des Eucaryotes, nous avons été confrontés à un problème majeur : l'absence des produits de référence. L'obtention des unités de répétition par hydrolyse acide partielle est en cours de réalisation et nous permettra de simplifier le problème.

III. - MISE EN EVIDENCE DE LA NATURE GLYCOPROTEINIQUE DE L'ENVELOPPE DE METHANOTHRIX SOEHNGENII FE

De toutes les méthodes d'extraction des glucides de la gaine de *Methanothrix soehngeni* FE étudiées au chapitre précédent, seules l'attaque alcaline et l'hydrazinolyse ont permis une libération quantitative des glycannes. La différence entre ces deux procédés est que l'hydrazinolyse à 100°C permet également une solubilisation des protéines. Nous avons cherché si les glucides avaient été extraits par simple effet de solvant ou bien par rupture d'éventuelles liaisons N-glycosidiques. Nous avons réalisé une cinétique de libération des glycannes de la gaine, en utilisant comme témoin une glycoprotéine : le fibrinogène bovin (DEBEIRE et al., 1985).

Nous avons par ailleurs entrepris l'étude des protéines solubilisées par le traitement à l'hydrazine de manière à apporter la preuve de leur nature glycoprotéinique.

A. - ETUDE DE L'EFFET DE L'HYDRAZINE

1.- Cinétique d'hydrazinolyse de la gaine de *Methanothrix soehngeni* FE

L'hydrazine permet la solubilisation complète de la gaine en quelques minutes, nous avons étudié la cinétique de libération des glucides de 20 min à 20 h. Dans chaque cas, l'hydrazine a été éliminée par évaporation à l'azote, nous avons alors extrait les glucides libérés en les reprenant dans l'acide acétique 1% à partir du culot protéique réinsolubilisé. Tandis que 20 min

d'hydrazinolyse permettent de récupérer 58% des glucides totaux, l'extraction est quantitative à partir du temps 1 h. Les compositions molaires des polysaccharides libérés aux temps 20 min, 8 h et 20 h sont données dans le Tableau XX (page 116). A partir de 1 h, la fraction soluble représente plus de 95% des glucides totaux, aussi la composition en monosaccharides varie peu (elle est similaire à celle de la gaine initiale). Seule l'osamine est dégradée lentement et passe de 0,22 à 0,02 résidus pour 5 résidus de rhamnose. L'analyse des glucides présents dans les culots insolubles (Tableau XX ; page 116) ne révèle pas d'extraction préférentielle au cours du temps. En effet, le culot au temps 20 min présente la même composition glucidique que la gaine initiale. Au delà de 1 h, les culots ne contiennent plus que 4% des glucides initiaux, les rapports molaires en monosaccharides y présentent peu de signification.

L'hydrazine nous a permis de solubiliser complètement et rapidement la gaine de *Methanotherx soehngeni* FE. Par ailleurs les oligosaccharides ont été détachés de la protéine en 1 h. La rapidité de cette libération nous a intrigué puisque TAKASAKI *et al.* (1982) et MICHALSKI *et al.* (1985) ont indiqué la nécessité de temps d'hydrazinolyse supérieurs à 8 h pour permettre une rupture quantitative des liaisons de type N-glycosidique.

2.- Cinétique d'hydrazinolyse du fibrinogène bovin

Afin de disposer d'un témoin nous permettant d'évaluer la vitesse de libération des glycanes de type N-glycosidique, nous avons réalisé une cinétique d'hydrazinolyse sur le fibrinogène bovin. Cette glycoprotéine contient environ 2% (en poids sec) de glycanes de type N-acétyllactosaminique (DEBEIRE *et al.*, 1985).

Comme décrit précédemment, nous avons extrait les glucides dans l'acide acétique 1%, à partir du culot obtenu par évaporation de l'hydrazine. La

TABLEAU XX

Composition molaire en monosaccharides des fractions solubles et insolubles obtenues au cours de la cinétique d'hydrazinolyse

Monosaccharide	Fractions solubles après hydrazinolyse			Culots obtenus après hydrazinolyse	
	20 min	8 h	20 h	20 min	8 h
Rha	5	5	5	5	5
Fuc	0,9	1,1	1,1	0,9	11
Rib	1,1	1,3	1,2	0,9	1
Glc	1,2	1,6	1,4	1,5	6,2
Gal	0,1	0,1	0,1	0,1	1,5
Man	0,2	0,3	0,3	0,4	1,7
Hexose	0,4	0,3	0,2	0,3	0,5
Osamine	0,2	0,1	trace*	0,2	-
Pourcentage des glucides totaux	58	96	97	42	4

Les rapports molaires ont été calculés sur la base de 5 résidus de rhamnose

* : inférieur à 0,05



fraction glucidique soluble contenait 80% du total après un traitement à 90°C pendant 5 min, l'extraction est quantitative pour un traitement de 20 min à 105°C. Après N-réacétylation, les glycanes libérés ont été analysés par chromatographie sur couche mince (Figure 30 ; page 110), parallèlement à une préparation de glycopeptides du fibrinogène bovin (obtenue d'après DEBEIRE *et al.*, 1985). De même que les glycopeptides, la fraction libérée après 5 min d'hydrazinolyse présente une traînée à partir du point de dépôt, ce qui est en faveur de la non-libération des glycanes. A partir du temps 20 min, les produits migrent avec des R_f compris entre 0,1 et 0,25. On observe cependant l'apparition progressive des 4 bandes spécifiques des glycanes du fibrinogène bovin. Il est difficile de dire si cette évolution est due à la perte d'acides aminés ou bien à la dégradation de la N-acétylglucosamine impliquée dans la liaison avec l'asparagine comme l'ont montré MICHALSKI *et al.* (1985). Néanmoins, nous pouvons proposer que des glycanes de type N-glycosidique peuvent être libérés de la protéine après un traitement d'une heure par l'hydrazine à 105°C. La cinétique de libération des oligosaccharides de la gaine de *Methanothrix soehngeni* FE est donc compatible avec la présence de liaisons covalentes avec les protéines.

B.- SOLUBILISATION DE LA GLYCOPROTEINE MAJEURE

Bien que l'étude des différents procédés permettant d'extraire les glucides de la gaine de *Methanothrix soehngeni* FE indique la présence de liaisons glycanes-protéines de type N-glycosidique, ces preuves ne sont pas suffisantes pour affirmer la nature glycoprotéinique de la gaine. Nous avons donc tenté de mettre en évidence une identité de comportement

chromatographique entre les oligosaccharides et les protéines solubilisées par réduction des ponts disulfures ou par un traitement rapide à l'hydrazine.

1.- Tentative de solubilisation de la gaine par réduction des ponts disulfures

L'oxydation à l'acide performique ne permet pas une solubilisation complète de la gaine de *Methanotherix soehngeni* FE au bout de 24 h d'incubation à 0°C, contrairement aux résultats obtenus par BEVERIDGE *et al.* (1985) sur la souche GP1 de *Methanospirillum hungatei*. Les résidus de cystéine ne sont donc pas les seuls responsables du maintien de l'insolubilité.

Nous avons cependant tenté de solubiliser une préparation de gaine par réduction des ponts disulfures dans des conditions drastiques. Cinq cycles successifs d'une semaine de réduction, suivie du blocage des fonctions thiols par alkylation à l'acide iodoacétique, n'ont permis de solubiliser que 20% des protéines et 33% des glucides totaux. Les protéines solubilisées ont été analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Figure 31 ; page 110).

Hormis une bande majeure à 16 kDa, une grande variété de bandes mineures peut être observée. Cette très grande hétérogénéité pourrait être due à des alkylations plus ou moins complètes des protéines solubilisées. Par ailleurs, seule la fraction protéique de 16 kDa a été colorée par le réactif de SCHIFF. D'après STEWART *et al.* (1985) et SPROTT (communication personnelle) la sous-unité protéique de base de la gaine de *Methanospirillum hungatei* a une masse moléculaire d'environ 20 kDa. Ces résultats restent néanmoins à confirmer.

2.- Solubilisation de la gaine par traitement rapide à l'hydrazine et étude préliminaire de la fraction glycoprotéique

a.- Solubilisation

Notre but était d'utiliser l'hydrazine pour solubiliser la gaine de

Methanotherx soehngeni FE en évitant la rupture de liaisons glycanes-protéines. Nous avons donc chauffé progressivement une suspension de gaine dans l'hydrazine. Au bout de sept minutes environ, une température de 95°C a été atteinte, la solution étant alors parfaitement limpide. Après dilution dans l'eau, la gaine est restée entièrement soluble, par contre la neutralisation à l'acide sulfurique dilué provoque la formation d'un culot. Un nouvel insoluble est ensuite obtenu après la dialyse et la lyophilisation. L'étude des culots en microscopie électronique a révélé la disparition totale de la structure caractéristique de la gaine.

L'expérience a été répétée deux fois pour donner des rendements de solubilisation différents : 25% des protéines et 85% des glucides sont restés solubles au cours d'une première expérience utilisant 1 ml d'hydrazine ; un traitement plus court dans 2 ml d'hydrazine a permis d'obtenir 50% des protéines et 100% des glucides dans la fraction soluble. Parallèlement, nous avons montré que l'action du sulfate d'hydrazine 4 M à pH 7 et à 100°C, ne permet pas la libération de protéines solubles à partir de la préparation de gaine.

b.- Etude de la fraction glycoprotéique par tamisage moléculaire

Les différentes fractions solubles obtenues après les deux traitements rapides à l'hydrazine ont donné des profils chromatographiques différents :

La figure 32 (page 120) donne les profils d'élution sur la colonne de Séphacryl S 200, des glucides et des protéines, solubilisés dans 1 ml d'hydrazine. Le pic majeur correspond à une masse moléculaire de 150 kDa et contient, respectivement, 60 et 67% des protéines et des glucides. Au delà d'un massif dont le sommet correspond à une masse de 55 kDa, on observe deux pics distincts : l'un contient 25% des glucides pour une masse de 18 kDa en

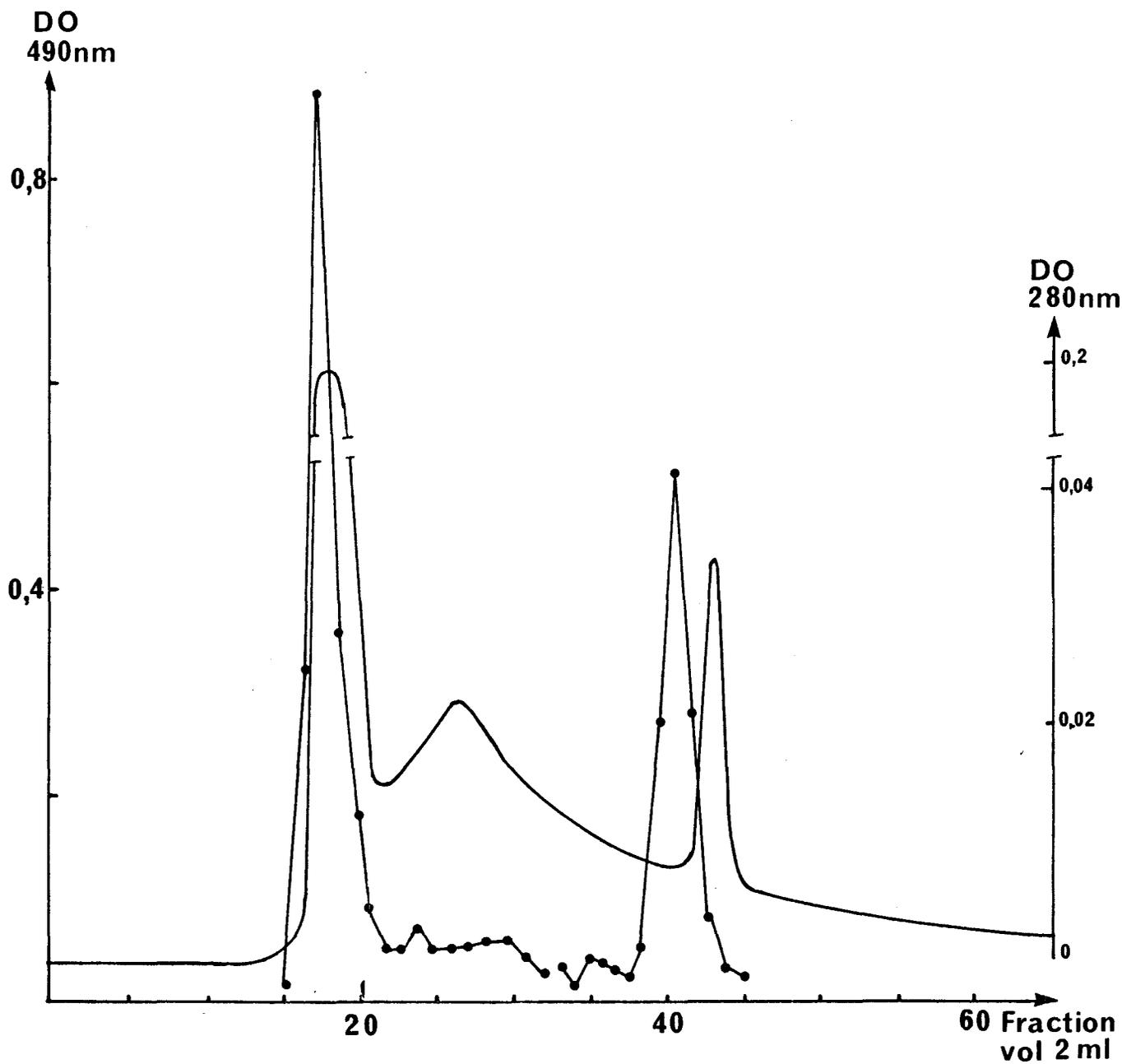


Figure 32 : Profil chromatographique de la fraction glycoprotéique, solubilisée dans 1 ml d'hydrazine, sur colonne de Séphacryl S 200. (—) détection des protéines à 280 nm ; (—●—) détection des glucides à 490 nm par dosage au phénol-sulfurique.

équivalent-protéines, l'autre contient 10% des protéines, son volume d'élution indique une masse de 16 kDa. A l'exception de ces deux derniers pics, les chromatogrammes des glucides et des protéines se superposent.

Les profils d'élution sur la colonne d'AcA 34 des glucides et des protéines, solubilisés dans 2 ml d'hydrazine, sont donnés dans la figure 33 (page 122). Plus de 90% du produit a été exclu sur la colonne. Le pic exclu a été chromatographié sur la colonne de Trisacryl GF 2000, il correspond à une masse moléculaire supérieure à 1 000 kDa. Ce produit a subi une nouvelle hydrazinolyse pendant 1 h, dans les conditions décrites page 75, puis a été chromatographié à nouveau sur la colonne d'AcA 34. La figure 33 (page 122) donne les profils d'élution obtenus : la deuxième hydrazinolyse a permis de libérer les oligosaccharides de la gaine, les volumes d'élution correspondent à ceux décrits page 108. Les peptides sont complètement dégradés, les hydrazides d'acides aminés sont élués au volume total de la colonne.

c.- Etude de la fraction glycoprotéique par électrophorèse en gel de polyacrylamide

Nous avons vainement tenté de soumettre la fraction glycoprotéinique à une électrophorèse dans des conditions dénaturantes ou non. La majeure partie du produit s'est insolubilisée dans le gel de concentration, ne permettant pas d'observer de bandes protéiques au delà. Ce résultat est en accord avec la taille très importante du produit.

C. - CONCLUSION

La cinétique de libération des glycanes du fibrinogène bovin est semblable à celle obtenue pour les oligosaccharides de la gaine. Dans ce cas,

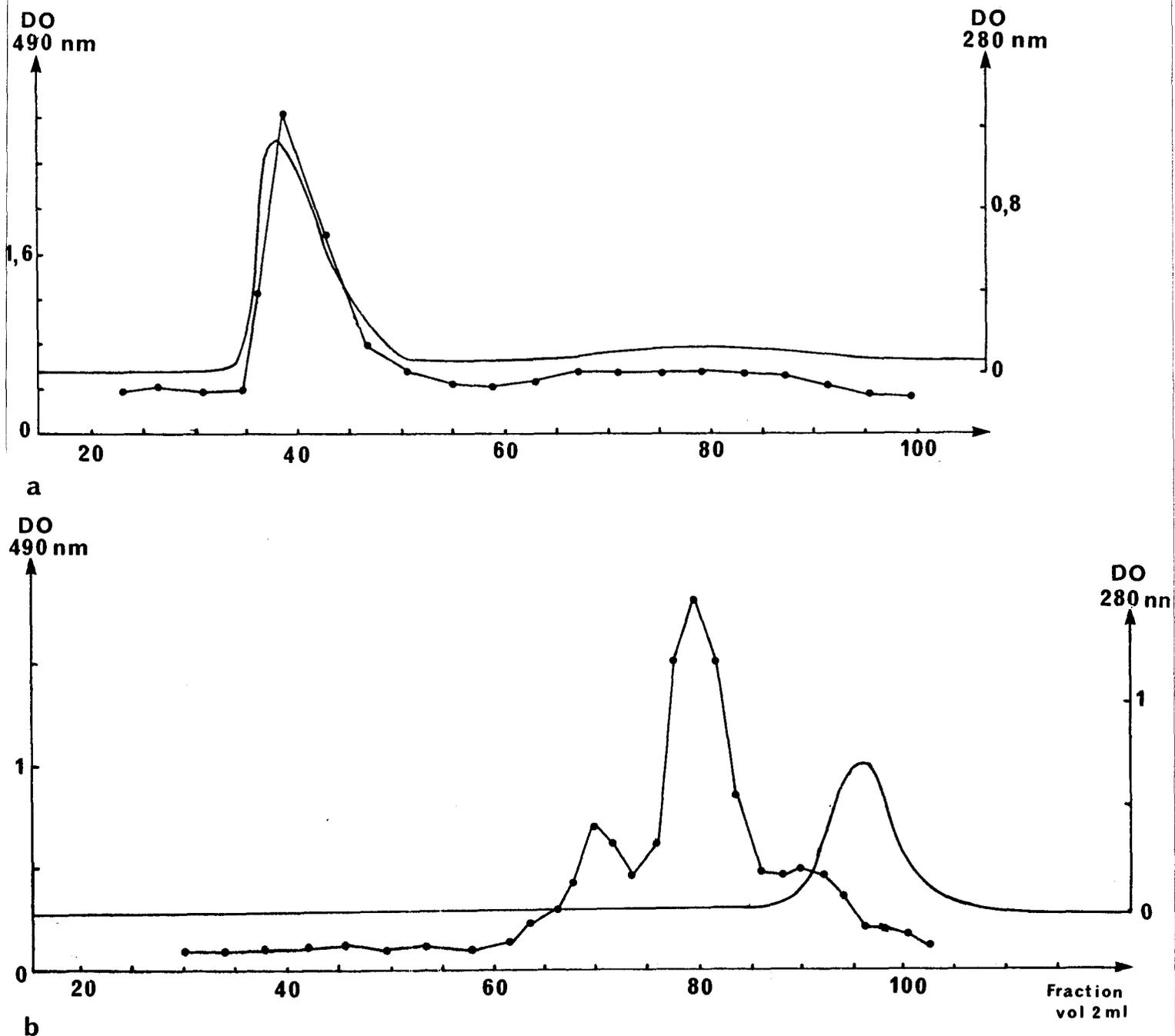


Figure 33 : Profil chromatographique sur colonne d'Ultrogel AcA 34 : (a) de la fraction glycoprotéique solubilisée dans 2 ml d'hydrazine, (b) du pic exclu, récupéré puis traité à nouveau par l'hydrazine pendant 1 h à 105°C. (—) détection des protéines à 280 nm, (—●—) détection des glucides à 490 nm par dosage au phénol sulfurique.

l'effet de l'hydrazine n'est pas un simple effet de solubilisation mais est bien dû à une coupure chimique. L'hydrazine permet par ailleurs la solubilisation totale de la gaine en quelques minutes. Après neutralisation, une fraction contenant de 25 à 50% des protéines et la totalité des glucides reste en solution.

La nature glycoprotéinique de cette fraction est confirmée par l'identité des profils chromatographiques des glucides et des protéines en tamisage moléculaire. La taille de cette glycoprotéine, comparée à celles des oligosaccharides et des peptides suggère qu'elle est constituée de l'association de nombreuses sous-unités. Un temps de traitement à l'hydrazine légèrement supérieur provoque une diminution parallèle du rendement de solubilisation des protéines et de la masse moléculaire de la fraction soluble. Il semble donc que les glycannes soient indispensables à la solubilité de la macromolécule, leur pourcentage y varie de 17 à 22%.

Le traitement de la glycoprotéine par l'hydrazine pendant 1 h permet d'obtenir les oligosaccharides étudiés dans la partie II (page 107) de ce chapitre.

Les causes de l'insolubilité de la gaine de *Methanothrix* restent inconnues, nous pouvons cependant suggérer qu'elle est due à des associations covalentes entre les sous-unités glycaniques et peptidiques. Le tout forme une macromolécule, peut être similaire au peptidoglycane des Eubactéries ou aux protéoglycannes des cartilages. Les ponts disulfures ne semblent pas jouer de rôle prépondérant pour le maintien de la structure insoluble, au contraire des liaisons de type N-glycosidique qui sont coupées par l'hydrazine.

Après traitement au β -mercapto éthanol comme à l'hydrazine, nous avons identifié un peptide de 16 kDa environ, qui pourrait constituer la sous-unité peptidique de la gaine, en accord avec STEWART *et al.* (1985).

CONCLUSION

Les travaux que nous avons réalisés à la Station de Technologie Alimentaire ont été entièrement consacrés à *Methanotherix soehngeni*, une méthanogène acétoclaste qui domine dans les digesteurs anaérobies. Nous avons réussi à cultiver cette bactérie "fastidieuse" (son temps de doublement est de 70 h) en fermenteur de 200 l. Cette culture nous a permis de disposer de quantités suffisantes de cellules.

Nous avons tout d'abord constaté l'absence d'exopolymères solubles dans le milieu de culture comme à la surface de la bactérie. Les observations microscopiques de micro-colonies de *Methanotherix* dans les biofilms méthanogènes, réalisées par DUBOURGUIER *et al.* (1985), y avaient révélé la présence d'exopolymères fibrillaires. La disparition de telles molécules dans les cultures pures des bactéries est un phénomène connu (COSTERTON *et al.*, 1978, 1981).

Par ailleurs, la recherche des exopolymères nous a conduit à l'isolement de glycogène intracellulaire, qui représente 2% du poids sec des bactéries. Ce polymère de réserve avait été isolé chez des espèces de méthanogènes hydrogénophiles (KÖNIG *et al.*, 1985a), sa description chez une acétoclaste n'avait jusqu'alors pas dépassé le stade de la microscopie électronique.

Nous nous sommes alors intéressés aux glucides présents dans la fraction pariétale insoluble de la bactérie. *Methanotherix soehngeni* possède une gaine cylindrique très rigide, composée à 80% d'acides aminés, dont

l'étude a été entreprise par PATEL *et al.* (1986) et KÖNIG et STETTER (1986). Nous avons montré que le milieu de culture et le mode de lyse des cellules peuvent avoir une influence sur la composition glucidique des préparations de gaine. Ceci permet d'expliquer, en partie, les variations de composition en monosaccharides constatées par ces auteurs. Il semble néanmoins que cette diversité soit aussi un reflet des différences entre les souches.

L'étude des procédés permettant de libérer les glucides de la fraction insoluble a révélé la présence d'interactions fortes entre ceux-ci et les protéines. En effet, seules les méthodes de rupture des liaisons de type N-glycosidique ont permis leur extraction quantitative. La fraction glucidique totale contient du glycogène contaminant (12% du total environ) et des oligosaccharides composés essentiellement de rhamnose, de fucose et de ribose.

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus sur la structure primaire des deux glycannes majeurs, isolés par chromatographie de tamisage moléculaire et d'échange d'ions, indiquent que le rhamnose est substitué en C2 et en C3, le fucose en C3 et le ribose en C3 (avec un branchement possible en C2). Cette étude a été rendue difficile par l'absence de produits de référence, l'obtention de fragments de deux à quatre monosaccharides par hydrolyse acide permettra de résoudre ce problème. La simplification des chromatogrammes facilitera en effet l'identification des différents produits.

Le traitement par l'hydrazine à chaud permet à la fois la libération des glycannes et la solubilisation totale de la gaine. Nous avons vérifié, par comparaison avec le fibrinogène bovin, une glycoprotéine étudiée par DEBEIRE *et al.* (1985), que la cinétique de libération des glycannes était compatible avec la présence de liaisons covalentes avec les protéines. Après solubilisation de la gaine par traitement rapide à l'hydrazine, nous avons obtenu une fraction de très haute masse moléculaire (supérieure à 1 000 kDa) contenant 20% de glucides. Un traitement de cette fraction pendant 1 h à

l'hydrazine a permis de libérer les glycanes. Une tentative de solubilisation de la gaine par réduction des ponts disulfures n'a donné qu'un faible rendement (inférieur à 20%), la bande majeure obtenue par électrophorèse en gel de polyacrylamide correspond à une masse moléculaire de 16 kDa, proche des valeurs données par STEWART *et al.* (1985) pour la sous-unité de base de la gaine de *Methanospirillum hungatei*.

Ces résultats nous permettent de donner une hypothèse pour expliquer la stabilité de la gaine : celle-ci n'est pas assurée par des ponts disulfures mais plutôt par des liaisons covalentes entre glycanes et protéines pour former une macromolécule réticulée, peut être comparable à la muréine bactérienne ou aux protéoglycanes des cartilages. Des travaux récents montrent que la protéine solubilisée est sensible à l'action de la protéinase K ce qui nous permettra d'obtenir les glycopeptides.

Depuis les travaux de MESCHER et STROMINGER (1976a) qui ont décrit la première glycoprotéine d'une Archéobactérie, la nature glycoprotéinique des enveloppes de nombreuses espèces de méthanogènes a été rapportée (KANDLER et KÖNIG, 1985). Nos résultats donnent pour la première fois la preuve de la glycosylation d'une protéine de surface d'une méthanogène. De plus, le protocole suivi (tentatives d'extraction spécifique des glucides, puis de solubilisation d'une fraction homogène contenant glycanes et protéines) pourrait être appliqué aux protéines de surface d'autres espèces bactériennes.

ANNEXE

LE GLYCOGENE CHEZ METHANOTHRIX

Le rôle du glycogène comme réserve de carbone et d'énergie est reconnu chez de nombreuses Eubactéries (PREISS et WALSH, 1981). Peu de descriptions en ont été faites chez les Archéobactéries et son rôle exact reste à déterminer. En effet, les travaux préliminaires de KÖNIG *et al.* (1985a) sur la consommation de glycogène pour produire du méthane chez *Methanobolus tindarius*, paraissent insuffisants pour affirmer son rôle de réserve énergétique.

Nous avons identifié le glycogène isolé chez *Methanothrix soehngeni* FE sur la base de sa composition, de son spectre infra-rouge, de la coloration à l'iode et d'hydrolyses enzymatiques spécifiques des liaisons α -glucosidiques. La longueur moyenne des chaînes est de 13 résidus de glucose. Sa localisation intracellulaire a été confirmée par l'étude de coupes en microscopie électronique, après coloration spécifique (THIERY, 1967).

L'étude de la synthèse du glucose 6-P a montré qu'elle suivait une voie similaire à celle des méthanogènes hydrogénophiles (JANSEN *et al.*, 1982), ce qui avait été suggéré par EKIEL *et al.* (1985).

Deux précurseurs nucléotidiques peuvent être utilisés pour la biosynthèse du glycogène : l'UDP-glucose chez les Eucaryotes et l'ADP-glucose chez les Eubactéries. KÖNIG *et al.* (1982) ont étudié la biosynthèse du glycogène chez une Archéobactérie : *Sulfolobus acidocaldarius*. La glycogène synthase reconnaît non préférentiellement l'ADP-glucose et l'UDP-glucose, les Km respectifs étant de 0,2 et 0,42 mM. Il était donc intéressant d'étudier la spécificité de cette enzyme chez *Methanothrix soehngeni* puisqu'aucune activité de ce type n'avait été décrite auparavant chez une méthanogène. Nous

avons montré que les deux précurseurs peuvent être utilisés comme donneurs de résidus glucosyls par la même enzyme, avec des spécificités très différentes : les K_m respectifs sont de 625 et 8 μM pour l'UDP et ADP-glucose. Cette différence d'affinité suggère que l'ADP-glucose est le donneur physiologique de glucose pour la biosynthèse du glycogène.

Le détail de ces résultats est donné dans la publication suivante réalisée avec la collaboration de B. GRUSON (I.N.R.A. LILLE) pour les travaux sur la néoglucogénèse et de G. PRENSIER (I.N.S.E.R.M. LILLE) pour les observations de microscopie électronique.

Glycogen in *Methanothrix*

P. Pellerin¹, B. Gruson¹, G. Prensier², G. Albagnac¹, and P. Debeire¹

¹ Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Technologie Alimentaire, B.P. 39, F-59651 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U 42, B. P. 39, F-59651 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Abstract. An intracellular glycogen was purified and characterized from the acetoclastic bacteria *Methanothrix* str. FE, its average chain length was about 13 glucose residues. Acetyl-CoA was shown to be synthesized by the action of acetate thiokinase; in addition pyruvate synthase, phosphoenolpyruvate synthetase and enzymes of gluconeogenesis were detected in cell extracts. For glycogen synthase activity, both adenosine diphosphate glucose and uridine diphosphate glucose were used as glycosyl donors, apparent K_m were, respectively, 8 μM for ADPGlc and 625 μM for UDPGlc, at the opposite the V_m were the same for both precursors. This was in accordance with competition experiments and strongly suggested that only one glucosyl transferase was involved and that ADPGlc was the physiological glycosyl donor in *Methanothrix* str. FE. In addition branching enzyme activity (α 1-4-glucan-6-glucosyl transferase) was detected in cell extracts.

Key words: *Methanothrix* – Archaeobacteria – Gluconeogenesis – Glycogen – Glycogen synthase

To date, the presence of glycogen in archaeobacteria has been rarely described. Its occurrence was reported in thermoacidophilic species (König et al. 1982) and in *Methanosarcina barkeri* (Murray and Zinder 1984), *Methanolobus* and *Methanococcus* (König et al. 1985).

Ultrastructural studies in our laboratory, using transmission electron microscopy, revealed cytoplasmic polysaccharidic inclusions in acetoclastic methanogens. Particular attention was paid to *Methanothrix* whose high affinity for acetate ensures its dominance in anaerobic fermentors treating waste waters. The glycogen of methanogenic bacteria could play a role in anaerobic digestors by helping bacteria to survive during starvation.

In this paper, we report the isolation of glycogen from *Methanothrix* strain FE. As little information is available about the metabolism of acetoclastic methanogens, studies on glucose metabolism and the requirement for sugar nucleotide for the synthesis of glycogen are described.

Offprint requests to: P. Pellerin

Abbreviations. ADPGlc, adenosine diphosphate glucose; UDPGlc, uridine diphosphate glucose

Materials and methods

Source of organism and culture conditions

Methanothrix soehngenii str. FE (DSM 3013) was isolated in our laboratory from the sludge of a bench-scale anaerobic digester treating vegetable canning waste waters at 35°C. A partial description has been given by Touzel and Albagnac (1984). The medium used for maintenance and cultivation was BCYT (basal carbonate, yeast extract, trypticase) described by Touzel and Albagnac (1983). Cells were mass-cultivated in a 20-l fermentor (Biolafitte France) at pH 7.4 at 35°C. Addition of 50% acetic acid solution was used both for substrate provision and for pH control.

Isolation and characterization of the polysaccharide

Cells were harvested after two months of cultivation to give 10 g of dry weight for a consumption of 450 g of acetic acid. Bacterial cells were disrupted in a French Pressure cell at 130,000 kPa. Cell fragments were eliminated by centrifugation at 50,000 $\times g$ for 20 min. After elimination of proteins using 5% final trichloroacetic acid, the polysaccharide was precipitated by addition of four volumes of cold ethanol, centrifuged, redissolved in water and chromatographed on a 1.5 \times 90 cm column of Ultrogel A4 (IBF, France).

Neutral and reducing sugars were, respectively, quantified according to Dubois et al. (1956), Kidby and Davidson (1973). Proteins in cell extracts were estimated according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard. Products of hydrolysis of the polysaccharide by 1 N trifluoroacetic acid (105°C, 1 h) were analysed by GLC of their alditol acetate derivatives (Sawardeker et al. 1965).

Iodine coloration was developed according to Zevenhuizen (1966). The infrared spectrum of isolated polysaccharide was recorded with a Perkin-Elmer IR 1310 spectrophotometer using the KBr-disc technique, and compared with that of glycogen (Merck, Darmstadt, FRG).

Amyloglucosidase, α -amylase and β -amylase were obtained from Boehringer, Mannheim (FRG). The average chain length of glycogen was estimated according to Manners (1962), using the α - and β -amylolysis performed as described by Linton and Cripps (1978).

Samples for electron microscopic investigations were prepared as described by Le Ruyet et al. (1985), specific staining of polysaccharides (Thiery 1967) was developed with 2 h of periodic acid oxydation.

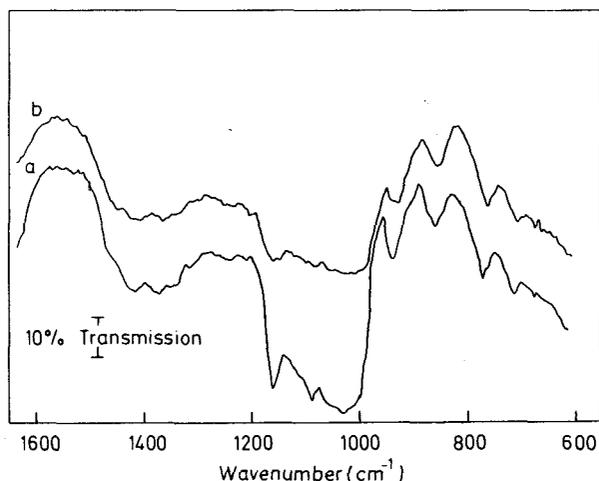


Fig. 1. The infrared spectrum of polysaccharide isolated from *Methanotherix* str. FE (a), compared with that of glycogen (b)

Preparation of cell extract

Cells were collected at the end of exponential growth. Anaerobic conditions were maintained throughout the procedure, all manipulations were performed in an anaerobic glove-box with $N_2:H_2:CO_2$ (75:15:10) as gas phase.

Fresh cells were washed two times in 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.1) containing 2 mM DTT. Cells were resuspended in the buffer and were disrupted as described above. After centrifugation at $20,000 \times g$ for 10 min, the supernatant was purged and stored under oxygen-free N_2 at $-80^\circ C$.

Enzymatic assays on glucose metabolism

Assays were performed under strictly anaerobic conditions at $35^\circ C$ in photometric anaerobic cuvettes sealed with rubber stoppers. Enzymatic activities were tested as previously described: Acetate thiokinase, acetate kinase and phosphotransacetylase (Oberlies et al. 1980), pyruvate synthase and glyceraldehydephosphate dehydrogenase (Zeikus et al. 1977), phosphoenolpyruvate synthetase (Eyzaguirre et al. 1982), enolase, phosphoglycerate mutase and phosphoglycerate kinase (Jansen et al. 1982), fructose-1,6-bisphosphate aldolase and triose phosphate isomerase (Fuchs et al. 1983), fructose-1,6-bisphosphate phosphatase was measured following NADPH formation (Fuchs et al. 1983) or by phosphate determination (Eibl and Lands 1969). Glucose-6-phosphate isomerase was assayed following NADP reduction, with glucose-6-phosphate dehydrogenase as coupling enzyme. All the enzymes were tested for lability to exposure to air.

Coenzyme F420 was purified from *Methanobacterium thermoautotrophicum* str. ΔH according to Schönheit et al. (1981).

Glycogen synthase assays

Incorporation of glucose from UDP- $[^{14}C]Glc$ and ADP- $[^{14}C]Glc$ was measured according to Greenberg and Preiss (1964). After incubation, the labelled glycogen was precipitated by adding 75% methanol solution containing 1% KCl. The precipitate was collected on a glass fiber filter

Table 1. Enzymatic hydrolyses of polysaccharide isolated from *Methanotherix* str. FE. Polyglucose was released as glucose under the action of amyloglucosidase and as maltose under the action of α - and β -amylase

Enzyme	% glucose released ^a	% maltose released ^b
Amyloglucosidase	100	—
α -Amylase	—	75
β -Amylase	—	35

^a Quantified with hexokinase and glucose-6-P dehydrogenase

^b Quantified as reducing equivalents

(Whatman GF-F), extensively washed with the methanol solution and subjected to radioactivity determination. For determination of apparent K_m values, initial velocities were measured at $35^\circ C$ with varying concentrations of labelled sugar nucleotides (0.586 Ci per mol). Activity was expressed in pkat (1 pkat of enzyme incorporated 1 pmol of glucose into glycogen per s). Sugar nucleotide degradation was monitored after each incubation by subjecting 10 μl of the incubation medium to paper chromatography (Whatman No. 3) developed in: Ethyl acetate:pyridine:acetic acid:water (5:5:1:3). After cutting up of sections corresponding to the different products of degradation (glucose and glucose 1-P) their respective rates were determined by liquid scintillation.

Branching enzyme assay

The incorporation of glucose from $[^{14}C]$ glucose 1-P into a α -glucan synthesized by phosphorylase a (Boehringer, FRG) was measured. The basis of the assay is the activation of this synthesis by increasing quantities of cell extract containing branching enzyme. The assay was carried out according to Hawker et al. (1974), the radioactivity incorporated was measured as described above.

Results

Structure of the intracellular polysaccharide

The extraction procedure led to the isolation of a polysaccharide, homogenous under chromatography on Ultrogel A4, which represented 2% of the total dry weight of the bacteria and gave opalescent solutions in water. After hydrolysis with trifluoroacetic acid, glucose was the only product detected by GLC. The infrared spectrum of the polysaccharide was identical to that of glycogen (Fig. 1), with absorptions characteristics for derivatives of D-glucopyranose in the region $700-960\text{ cm}^{-1}$ (Barker et al. 1956). The absorption at 860 cm^{-1} is characteristic of α -glucosidic linkages. Moreover absorptions at 760 cm^{-1} and 930 cm^{-1} are found in glycogen-like glucans. No peak was detected at 830 cm^{-1} , indicating the absence of β -configuration. The spectrum of the polysaccharide-iodine complex had a reddishbrown colour and presented a maximum absorption at 490 nm, characteristic of an highly branched polyglucose (Archibald et al. 1961).

The results of enzymatic hydrolyses are summarized in Table 1; in contrast to both amylases, amyloglucosidase

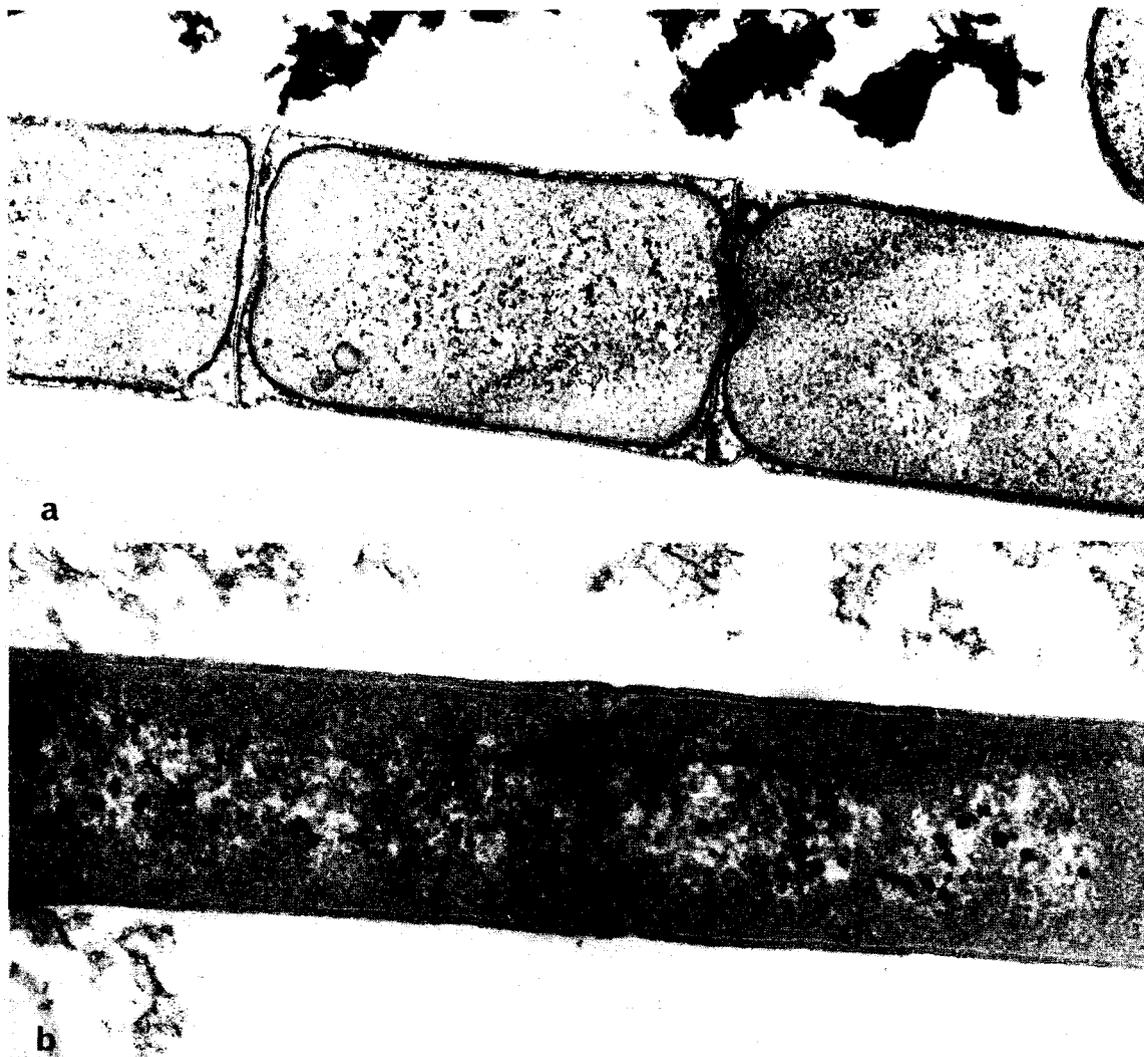


Fig. 2a, b. Electron micrographs of ultrathin sections of *Methanotherix* str. FE showing cytoplasmic inclusions (a), which became electron dense after specific staining for polysaccharides (b)

allowed a quantitative liberation of glucose, proving thus that both linkages are involved in the polysaccharide. From the results obtained with α - and β -amylase, an estimation of average chain length of 13 glucose residues could be made, indicating that it is a glycogen rather than an amylopectin.

The intracellular presence of glycogen in *Methanotherix* str. FE was confirmed by transmission electron microscopy on ultrathin sections. Cells showed cytoplasmic inclusions (Fig. 2) which became electron dense after specific coloration of polysaccharide and presented a rosette-like structure.

Pathway to glucose 6-P

The known enzymes of gluconeogenesis were detected in the cell extract (Table 2). Acetate was first activated to acetyl-CoA by acetate thiokinase, neither acetate kinase nor phosphotransacetylase activities were detected. Pyruvate synthase activity was measured in the direction of acetyl-CoA synthesis with methylviologen as electron acceptor, its activity was dramatically depressed by exposure to air,

coenzyme F420 could be reduced by the enzyme. The formation of phosphoenolpyruvate was catalysed by phosphoenolpyruvate synthetase, pyruvatephosphate dikinase was not detected.

Glycogen synthase: kinetic studies

For glycogen synthase activity, both UDPGlc and ADPGlc (at 0.7 mM) were utilized as glycosyl donors. The rates of incorporation of glucose were linear with time up to 90 min and the respective velocities were of 10.8 and 33 pkat per mg of protein. Omission of glycogen in the reaction mixture led to residual activities of less than 5%.

Concomitant study of the sugar nucleotide degradation showed that UDPGlc diminution corresponded closely to glucosyl transfer into glycogen. In contrast, ADPGlc was degraded through a pyrophosphatase activity, yielding glucose 1-P, at a velocity of 40 pkat per mg of protein. Incorporation into glycogen from labelled glucose 1-P, measured under the same conditions, gave less than 0.5% of glucosyl transfer compared to that obtained with ADPGlc. Thus the

Table 2. Activities of enzymes which catalyse the reactions of glucose 6-P synthesis from acetate in *Methanothrix* str. FE. All the enzymes were assayed in anaerobic cell extract

Enzyme	EC number	Measured in the direction of	Specific activity nkat per mg of protein
Acetate thiokinase	6.2.1.1	Acetyl-CoA	50
Pyruvate synthase	1.2. —. —	Acetyl-CoA	3.50
Phosphoenolpyruvate synthetase	2.7.9.2	Phosphoenolpyruvate	0.33
Enolase	4.2.1.11	Phosphoenolpyruvate	0.75
Phosphoglycerate mutase	2.7.5.3	2-Phosphoglycerate	0.15
Phosphoglycerate kinase	2.7.2.3	1,3-Diphosphoglycerate	0.27
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.2.1. —	Glyceraldehyde-3-phosphate	1.03
Triosephosphate isomerase	5.3.1.1	Dihydroxyacetonephosphate	2.50
Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	4.1.2.13	Fructose-1,6-bisphosphate	0.03
Fructose-1,6-bisphosphate phosphatase	3.1.3.11	Fructose-6-phosphate	0.15
Phosphoglucose isomerase	5.3.1.9	Glucose-6-phosphate	0.17

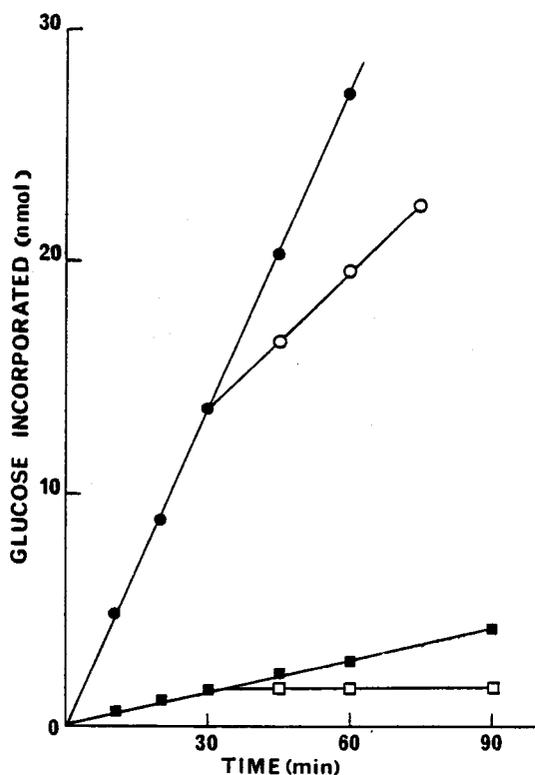


Fig. 3. Kinetics of competition between both sugar nucleotides, for the synthesis of glycogen, catalysed by cell extract of *Methanothrix* str. FE containing 0.2 mg of protein. Incorporation of glucose into glycogen: (●) using ADP-[¹⁴C]Glc at 0.35 mM as substrate, (○) after addition of 100-fold excess of UDPGlc at 30 min. (■) Using UDP-[¹⁴C]Glc at 0.35 mM as substrate, (□) after addition of 10-fold excess of ADPGlc at 30 min

degradation of ADPGlc into glucose 1-P could not explain the difference of activity between both sugar nucleotides.

Glycogen synthase: specificity

Apparent V_m values were about 33 pkat per mg of protein for both glycosyl donors, but the affinities were much different: apparent K_m values were, respectively, 625 μ M for UDPGlc and 8 μ M for ADPGlc.

Kinetics of competition between both precursors were performed (Fig. 3). Addition of 10-fold excess of ADPGlc

to a reaction mixture containing 0.35 mM of UDP-[¹⁴C]Glc gave a total inhibition of radioactive incorporation into glycogen. However, 10-fold excess of UDPGlc had no detectable effect on glucose incorporation from ADP-[¹⁴C]Glc at 0.35 mM, 100-fold excess was necessary to give 55% of inhibition of glucosyl transfer. Thus only one glycogen synthase seemed to occur in the cell extract, which recognized ADPGlc with a high affinity and allowed glucosyl transfer from UDPGlc into glycogen.

Presence of α 1-4-glucan-6-glycosyl transferase

The rate of α -glucan synthesis by phosphorylase a was increased by increasing quantities of cell extract and reached a maximal value of 530 pkat in the presence of 0.5 mg of cell extract proteins. Reactions mixtures without phosphorylase a showed no incorporation of [¹⁴C]glucose into the precipitate. Those results clearly indicate the presence of branching enzyme activity.

Discussion

Methanothrix str. FE stores a glycogen which represents 2% of the total dry weight of bacteria in our culture conditions. Glycogen is widespread in bacteria (Preiss and Walsh 1981). It is a storage compound of carbon and energy, which helps bacteria to survive during starvation (Strange 1968). König et al. (1985) reported a consumption of glycogen in *Methanobolus tindarius* to produce methane.

For the biosynthesis of glucose in *Methanothrix* str. FE, the first step is the activation of acetate to acetyl-CoA which involves acetate thiokinase rather than acetate kinase and phosphotransacetylase, according to Kohler and Zehnder (1984). Coenzyme F420 can be utilized in vitro as electron acceptor by pyruvate synthase. Phosphoenolpyruvate synthetase and the known enzymes of gluconeogenesis then ensure the formation of glucose 6-P. The biosynthetic pathway of glucose 6-P seems to be closely related to that of *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Jansen et al. 1982). In addition our results are in good agreement with the postulated pathway of *Methanothrix concilii* (Ekiel et al. 1985).

ADPGlc is the physiological donor in eubacteria for the synthesis of glycogen, instead of UDPGlc which is utilized in mammalian systems (Preiss and Walsh 1981). For

eubacteria, less than 5% of activity is obtained with UDPGlc and any other sugar nucleotide. The situation of archaeobacteria as a third kingdom of organisms suggests that biosynthesis of glycogen may be different.

Cell extracts of *Methanotherix* str. FE exhibits a glucosyl transferase activity with both ADPGlc and UDPGlc, however, the apparent K_m values show a great difference of affinity. Different experiments suggest that only one enzyme is involved:

Both sugar nucleotides are recognized with different affinities but give almost the same maximal velocity.

Transfer of glucose from UDPGlc is inhibited by 10-fold excess of ADPGlc, whereas only 55% of inhibition of ADPGlc transfer is obtained with 100-fold excess of UDPGlc.

The physiological significance of the UDP-glucosyl transferase activity remains uncertain, however, the specificity of the glycogen synthase for ADPGlc is comparable with that of eubacteria, in contrast to the archaeobacterium *Sulfolobus* which utilizes UDPGlc as well as ADPGlc with respective K_m values of 0.42 and 0.2 mM (König et al. 1982).

Cell extracts also contain branching enzyme activity which may play a role in the biosynthesis of glycogen (Hawker et al. 1974).

The enzymatic activities for synthesis of glucose and glycogen are present in cell extract of *Methanotherix* str. FE. However, in the absence of labelling studies using [14 C]-acetate, we can not postulate that this pathway, leading from acetyl-CoA to glycogen, occurs within the bacteria.

Methane bacteria in granular sludges of anaerobic digestors contain cytoplasmic polysaccharidic inclusions (Dubourguier et al. 1985). Our results confirm the presence of glycogen in the dominant acetoclastic bacteria *Methanotherix* str. FE, this compound could play a role in the survival of bacteria, which have a low turnover rate.

Acknowledgements. This work was partly supported by a grant from the „Agence Française pour la Maitrise de l'Energie“.

We thank Dr. J. P. Touzel for providing the strain and for helpful discussion.

References

- Archibald AR, Fleming ID, Liddle MA, Manners DJ, Mercer GA, Wright A (1961) The absorption spectra of glycogen and amylopectin-iodine complexes. *J Chem Soc* 1:1183–1190
- Barker SA, Bourne EJ, Whiffen DH (1956) Use of infrared analysis in the determination of carbohydrate structure. *Meth Biochem Anal* 3:213
- Bradford MA (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356
- Dubourguier HC, Prensier G, Samain E, Albagnac G (1985) Granular methanogenic sludge: microbial and structural analysis. In: Palz W, Coombs J, Hall DO (eds) *Energy from biomass*, 3. E.C. conference. Elsevier, London New York, pp 542–546
- Eibl H, Lands WE (1969) A new sensitive determination of phosphate. *Anal Biochem* 30:51–57
- Ekiel I, Sprott GD, Patel GB (1985) Acetate and CO₂ assimilation in *Methanotherix concilii*. *J Bacteriol* 162:905–908
- Eyzaguirre J, Jansen K, Fuchs G (1982) Phosphoenolpyruvate synthetase in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* 132:67–74
- Fuchs G, Winter H, Steiner I, Stupperich E (1983) Enzymes of gluconeogenesis in the autotroph *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* 136:160–162
- Greenberg E, Preiss J (1964) The occurrence of adenosine diphosphate glucose: glycogen transglucosylase in bacteria. *J Biol Chem* 239:4314–4315
- Hawker JS, Ozburn JL, Ozaki H, Greenberg E, Preiss J (1974) Interaction of spinach leaf adenosine diphosphate glucose, α 1,4-glucan α -4-glucosyl transferase and α -1,4-glucan, α 1,4-glucan-6-glucosyl transferase in synthesis of branched α -glucan. *Arch Biochem Biophys* 160:530–551
- Jansen K, Stupperich E, Fuchs G (1982) Carbohydrate synthesis from acetyl-CoA in the autotroph *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* 132:355–364
- Kidby DK, Davidson DJ (1973) A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. *Anal Biochem* 55:321–325
- König H, Skorbo R, Zillig W, Reiter WD (1982) Glycogen in thermoacidophilic archaeobacteria of the genera *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Desulfurococcus* and *Thermococcus*. *Arch Microbiol* 132:297–303
- König H, Nusser E, Stetter KO (1985) Glycogen in *Methanobacterium* and *Methanococcus*. *FEMS Microbiol Lett* 28:265–269
- Kohler HPE, Zehnder AJB (1984) Carbon monoxide dehydrogenase and acetate thiokinase in *Methanotherix soehngenii*. *FEMS Microbiol Lett* 21:287–292
- Le Ruyet P, Dubourguier HC, Albagnac G, Prensier G (1985) Characterization of *Clostridium thermolacticum* sp. nov., a hydrolytic thermophilic anaerobe producing high amounts of lactate. *System Appl Microbiol* 6:196–202
- Linton JD, Cripps RE (1978) The occurrence and identification of intracellular polyglucose storage granules in *Methylococcus* NCIB 11083 grown in chemostat culture on methane. *Arch Microbiol* 117:41–48
- Manners DJ (1962) Enzymic synthesis and degradation of starch and glycogen. *Advan Carb Chem* 17:371–430
- Murray PA, Zinder SH (1984) Nitrogen fixation by a methanogenic archaeobacterium. *Nature* 312:284–286
- Oberlies G, Fuchs G, Thauer RK (1980) Acetate thiokinase and the assimilation of acetate in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* 128:248–252
- Preiss J, Walsh DA (1981) The comparative biochemistry of glycogen and starch. In: Ginsburg V, Robbins P (eds) *Biology of carbohydrates*, vol 1. John Wiley, New York, pp 199–314
- Sawardeker JS, Sloneker JH, Jeanes A (1965) Quantitative determination of monosaccharides and their acetates by gas liquid chromatography. *Anal Chem* 37:1602–1604
- Schönheit P, Keweloh H, Thauer RK (1981) Factor F420 degradation in *Methanobacterium thermoautotrophicum* during exposure to oxygen. *FEMS Microbiol Lett* 12:347–349
- Strange RE (1968) Bacterial glycogen and survival. *Nature* 220:606–607
- Thiery JP (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupe fine en microscopie électronique. *J Microscop* 67:987–1018
- Touzel JP, Albagnac G (1983) Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiol Lett* 16:241–265
- Touzel JP, Albagnac G (1984) Acetoclastic methanogens in anaerobic digesters. In: Antonopoulos AA (ed) *Biotechnological advances in processing municipal wastes for fuels and chemicals*. 1. Symposium Minneapolis, National Technical Information Service. US Dept Commerce, Springfield, pp 35–39
- Zeikus JG, Fuchs G, Kenealy W, Thauer RK (1977) Oxydo-reductases involved in cell carbon synthesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Bacteriol* 132:604–613
- Zevenhuizen LPTM (1966) Function, structure and metabolism of the intracellular polysaccharide of *Arthrobacter*. Doctoral Thesis, Agricultural University of Wageningen

La description de glycogène chez *Methanothrix soehngeni* permet de confirmer les observations microscopiques réalisées sur les biofilms méthanogènes. Il pourrait maintenir les populations bactériennes en vie pendant les périodes où les digesteurs ne sont pas alimentés.

D'autres travaux restent à réaliser car des questions restent en suspens :

- La bactérie accumule-t-elle du glycogène dans des conditions de croissance carencée à l'azote ? Le taux en est resté égal à 2% du poids sec cellulaire au cours de la culture en fermenteur 200 l.
- Dans quelles conditions la bactérie utilise-t-elle son glycogène et par quelle voie métabolique ?
- Quels sont les mécanismes de régulation de la synthèse du glycogène chez les Archéobactéries ?

Ces travaux sont actuellement poursuivis au laboratoire par B. GRUSON.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les références incluses dans l'article de Archives of Microbiology ne sont pas classées ci-dessous.

- ALDRICH H.C., ROBINSON R.W., WILLIAMS D.S. (1986). 38
System. Appl. Microbiol. 7:314-319.
- BALCH W.E., FOX G.E., MAGRUM L.J., WOESE R.S. (1979). 31
Microbiol. Rev. 43:260-296.
- BAYARD B., KERCKAERT J.P., ROUX D., STRECKER G. (1979). 78
In : PEETERS H. (ed.) Protides of biological fluids,
Pergamon Press p. 153-156.
- BAYARD B., MONTREUIL J. (1974). In : MONTREUIL J. (ed.) 75
Méthodologie de la structure et du métabolisme des
glycoconjugués. Coll. Intern. C.N.R.S. n° 221. C.N.R.S.
PARIS, p. 209-218.
- BEVERIDGE T.J., HARRIS B.J., PATEL G.B., SPROTT G.D. 47
(1986b). Can. J. Microbiol. 32:779-786.
- BEVERIDGE T.J., PATEL G.B., HARRIS B.J., SPROTT G.D. 47
(1986a). Can. J. Microbiol. 32:703-710.
- BEVERIDGE T.J., STEWART M., DOYLE R.J., SPROTT G.D. 48, 50, 106, 118
(1985). J.Bacteriol. 162:728-737.
- BIGELOW C.C. (1967). J. Theoret. Biol. 16:187-211. 95
- BLIGH E.G., DYER W.J. (1959). Can. J. Biochem. Physiol. 70
37:911-917.
- BLUMENKRANTZ N., ASBOE-HANSEN G. (1973). Anal. Biochem. 71
54:484-489.
- BOCHEM H.P., SCHOBERTH S.M., SPREY B., WENGLER P. (1982). 20
Can.J. Microbiol. 28:500-510.
- BRADFORD M.A. (1976). Anal. Biochem. 72:248-254. 71
- CALVIN M., BASSHAM J.A. (1962). The photosynthesis of 25
carbon compounds. NEW YORK : Benjamin.
- CARLSON D.M. (1968). J. Biol. Chem. 243:616-626. 74
- CHRISTIAN R., SCHULZ G., UNGER F.M., MESSNER P., KUPCÚ 61
Z., SLEYTR U.B. (1986). Carbohydr. Res. 150:265-272.
- COSTERTON J.W., GEESEY G.G., CHENG K.J. (1978). Pour la 23, 125
Science 5:100-110.
- COSTERTON J.W., IRVIN R.T., CHENG K.J. (1981). Ann. Rev. 23, 125
Microbiol. 35:299-324.
- DANIELS L., ZEIKUS J.G. (1978). J. Bacteriol. 136:75-84. 25

- DEBEIRE P., MONTREUIL J., MOCZAR E., VAN HALBEEK H., Vliegenthart J.F.G. (1985) *Eur. J. Biochem.* 151:607-611. 114, 115, 117
- DOLFING J., GRIFFIOEN A., VAN NEERVEN A.R., ZEVENHUIZEN L.P.T.M. (1985). *Can. J. Microbiol.* 31:744-750. 20, 22
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. (1956). *Anal. Chem.* 28:350-356. 71
- DUBOURGUIER H.C., PRENSIER G., SAMAIN E., ALBAGNAC G. (1985). In : PALZ W., COOMBS J., HALL D.O. (eds.) *Energy from biomass, 3rd EC Conference*, Elsevier Applied Science Publishers, LONDON p. 542-546. 15, 20, 89, 125
- EKIEL I., SMITH I.C., SPROTT G.D. (1983). *J. Bacteriol.* 156:316-326. 27
- EKIEL I., SPROTT G.D., PATEL G.B. (1985). *J. Bacteriol.* 162:905-908. 28, 129
- EVANS M.C.W., BUCHANAN B.B., ARNON D.I. (1966). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 55:928-934. 25
- EVANS J.N.S., TOLMAN C.J., KANODIA S., ROBERTS M.F. (1985). *Biochemistry* 24:5693-5698. 28
- EYZAGUIRRE J., JANSEN K., FUCHS G. (1982) *Arch. Microbiol.* 132:67-74. 27
- FEWSON C.A. (1986). *Biochem. Educ.* 14:103-115. 18
- FINNE J., KRUSIUS T., RAUVALA H. (1980). *Carbohydr. Res.* 80:336-339. 81
- FOURNET B., STRECKER G., LEROY Y., MONTREUIL J. (1981). *Anal. Biochem.* 116:489-502. 81
- FUCHS G., STUPPERICH E. (1980). *Arch. Microbiol.* 127:267-272. 25
- FUCHS G., STUPPERICH E. (1984). In : CRAWFORD R.L., HANSON R.S. (eds.) *Microbial growth on C1 compounds*. American Society for Microbiology WASHINGTON p. 199-202. 27
- FUCHS G., STUPPERICH E. (1986). *System. Appl. Microbiol.* 7:364-369. 25
- GEHR R., HENRY J.G. (1983). *Water Res.* 17:1743-1748. 85
- HAAS E.S., HOOK L.A., REEVE J.N. (1986). *FEMS Microbiol. Letters* 33:185-188. 43
- HAMMES W.P., WINTER J., KANDLER O. (1979). *Arch. Microbiol.* 123:275-279. 36
- HECHT K., WIELAND F., JAENICKE R. (1986). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367:33-38. 57

- HUSER B.A., WUHRMANN K., ZEHNDER A.J.B. (1982). Arch. Microbiol. 132:1-9. 14
- JANSEN K., STUPPERICH E., FUCHS G. (1982). Arch. Microbiol. 132:355-364. 27, 129
- JONES J.B., BOWERS B., STADTMAN T.C. (1977). J. Bacteriol. 130:1357-1363. 43, 44
- KANDLER O. (1979). Naturwissenschaften 66:95-105. 35
- KANDLER O. (1982). Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C3:149-160. 31, 34, 35, 42, 61
- KANDLER O., HIPPE H. (1977). Arch. Microbiol. 113:57-60. 40, 41
- KANDLER O., KÖNIG H. (1978). Arch. Microbiol. 118:141-152. 33, 36, 43
- KANDLER O., KÖNIG H. (1985). In : WOESE C.R., WOLFE R.S. (eds.) The bacteria VIII, Academic Press : 413-458. 19, 29, 36, 42, 46, 47, 48, 58, 127
- KANODIA S., ROBERTS M.F. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:5217-5221. 28
- KERCKAERT J.P. (1978). Anal. Biochem. 84:354-360. 79
- KIDBY D.K., DAVIDSON D.J. (1973). Anal. Biochem. 55:321-325. 71
- KIENER A., KÖNIG H., WINTER J., LEISINGER T. (1987). J. Bacteriol. 169:1010-1016. 34, 36
- KOHLER H.P., ZEHNDER A.J.B. (1984). FEMS Microbiol. Lett. 21:287-292. 27
- KÖNIG H. (1984). Can. J. Microbiol. 30:1477-1481. 23
- KÖNIG H., KANDLER O. (1979a). Arch. Microbiol. 121:271-275. 35
- KÖNIG H., KANDLER O. (1979b). Arch. Microbiol. 123:295-299. 35
- KÖNIG H., KANDLER O. (1980). Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 361:981-983. 35
- KÖNIG H., KRALIK R., KANDLER O. (1982). Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C3 : 179-191. 33, 34, 129
- KÖNIG H., NUSSER E., STETTER K.O. (1985a). FEMS Microbiol. Lett. 28:265-269. 18, 24, 58, 125, 129
- KÖNIG H., SEMMLER R., LERP C., WINTER I. (1985b). Arch. Microbiol. 141:177-180. 36

- KÖNIG H., STETTER K.O. (1982). Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C3 : 478-490. 23, 44
- KÖNIG H., STETTER K.O. (1986). System. Appl. Microbiol. 7:300-309. 43, 48, 58, 59
89, 93, 94, 98
126
- KOVAL S.F., JARRELL K.F. (1987). J. Bacteriol. 169:1298-1306. 39, 44
- KREISL P., KANDLER O. (1986). System. Appl. Microbiol. 7:293-299. 40, 41
- KÜPCÜ Z., MARZ L., MESSNER P., SLEYTR U.B. (1984). FEBS Letters 173:185-190. 61
- LECHNER J., WIELAND F., SUMPER M. (1985a). J. Biol. Chem. 260:860-866. 57
- LECHNER J., WIELAND F., SUMPER M. (1985b). J. Biol. Chem. 260:8984-8989. 57
- LECHNER J., WIELAND F., SUMPER M. (1986). System. Appl. Microbiol. 7:286-292. 57
- LEE Y.C., SCOCCA J.R. (1972). J. Biol. Chem. 247:5753. 74
- LEPS B., LABISCHINSKI H., BARNICKEL G., BRADACZEK H., GIESBRECHT P. (1984). Eur. J. Biochem. 144:279-286. 35
- LEQUERICA J.L., TOLDRÁ F. (1986). Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 26:90-100. 20
- LIU Y., BOONE D.R., SLEAT R., MAH R.A. (1985). Appl. Environ. Microbiol. 49:608-613. 40
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951). J. Biol. Chem. 193:265-275. 71
- MAEBA P.Y. (1986). J. Bacteriol. 166:644-650. 61
- MESCHER M.F. (1981). Trends Biochem. Sci. 6:97-99. 56, 61
- MESCHER M.F., HANSEN U., STROMINGER J.L. (1976). J. Biol. Chem. 251:7289-7294. 55
- MESCHER M.F., STROMINGER J.L. (1976a). J. Biol. Chem. 251:2005-2014. 19, 53, 54, 127
- MESCHER M.F., STROMINGER J.L. (1976b). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:2687-2691. 19
- MESCHER M.F., STROMINGER J.L. (1978). FEBS Letters 89:37-41. 55
- MESSNER P., PUM O., SÁRA M., STETTER K.O., SLEYTR U.B. (1986). J. Bacteriol. 166:1046-1054. 50

- MICHALSKI J.C., PETER-KATALINIC J., EGGE M., PAZ-PARENTE J., MONTREUIL J., STRECKER G. (1984). *Carbohydr. Res.* 134: 177-189. 115, 117
- MILLER T.L., WOLIN M.J. (1985). *Arch. Microbiol.* 141:116-122. 24
- MONTREUIL J. (1982). In : NEUBERGER A., VAN DEENEN L.L.M. (eds.) *Comprehensive biochemistry* Vol. 19, Elsevier Science Publishers, AMSTERDAM p. 1-188. 52
- MOORE S., STEIN W.H. (1954). *J. Biol. Chem.* 211:893-907. 71
- MOYE C.J. (1972). In : TIPSON R.S., HORTON D. (eds.). *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 27, Academic Press NEW YORK, LONDON p.85-127. 76, 101
- MULDER E.G., DEINEMA M.H. (1981). In : STARR M.P., STOLP H., TRÜPER H.G., BALOWS A., SCHLEGEL H.G. (eds.) *The prokaryotes*. Springer Verlag, BERLIN, HEIDELBERG p. 425-440. 45
- MURRAY P.A., ZINDER S.H. (1984). *Nature* 312:284-286. 24
- NOZAKI Y., TANFORD C. (1971). *J. Biol. Chem.* 246:2211-2217. 95
- NOZHEVNIKOVA A.N., CHUDINA V.I. (1984). *Mikrobiologiya* 53:756-760. 74
- OBERLIES G., FUCHS G., THAUER R. (1980). *Arch. Microbiol.* 128:248-252. 67
- OLLIVIER B.M., MAH R.A., GARCIA J.L., ROBINSON R. (1985). *Int.J. System. Bacteriol.* 35:127-130. 23
- PALO J., SAVOLAINEN H. (1972). *J. Chromatogr.* 65:447-450. 72, 78
- PATEL G.B. (1984). *Can. J. Microbiol.* 30:1383-1395. 14, 23, 47
- PATEL G.B., SPROTT G.D., HUMPHREY R.W., BEVERIDGE T.J. (1986). *Can. J. Microbiol.* 32:623-631. 48, 49, 89, 90, 92, 93, 94, 98, 99, 106, 125
- PAUL G., LOTTISPEICH F., WIELAND F. (1986). *J. Biol. Chem.* 261:1020-1024. 54, 55, 57, 58
- PAZ-PARENTE J., CARDON P., LEROY Y., MONTREUIL J., FOURNET B., RICARD G. (1985). *Carbohydr. Res.* 141:41-47. 81
- PETERSON G.L. (1977). *Anal. Biochem.* 83:346-356. 71
- PREISS J., WALSH D.A. (1981). In : GINSBURG V., ROBBINS P. (eds.) *Biology of carbohydrates*, 1. John WILEY NEW YORK p. 199-314. 24, 129
- RIDEAU J.P., MORFAUX J.N. (1976). *Water Res.* 10:999-1003. 67

- ROBINSON R.W. (1986). *Appl. Environ. Microbiol.* 52:17-27. 23, 39
- ROBINSON R.W., ALDRICH H.C., HURST S.F., BLEIWEIS A.S. (1985). *Appl. Environ. Microbiol.* 49:321-327. 38
- ROGERS H.J., PERKINS H.R., WARD I.B. (1986). In : ROGERS H.J., PERKINS H.R., WARD J.B. (eds.) *Microbial cell walls and membranes*, Chapman and Hall, LONDON, NEW YORK, p. 239-297. 36
- ROMESSER J.A., WOLFE R.S., MAYER F., SPIESS E., WALTHER-MAURUSCHAT A. (1979). *Arch. Microbiol.* 121:147-153. 44
- ROUSTAN J.L., TOUZEL J.P., PRENSIER G., DUBOURGUIER H.C., ALBAGNAC G. (1986). In : *Biology of anaerobic bacteria* : DUBOURGUIER H.C., ALBAGNAC G., MONTREUIL J., ROMOND C., SAUTIERE P., GUILLAUME J. (eds.) Elsevier Science Publishers, AMSTERDAM p. 200-205. 47, 50
- SAWARDEKER J.S., SLONEKER J.H., JEANES A. (1965). *Anal. Chem.* 37:1602-1604. 73
- SCHERER P.A., BOCHEM H.P. (1983). *Can. J. Microbiol.* 29: 1190-1199. 24
- SCHÖNHEIT P., THAUER R.K. (1980). *FEMS Microbiol. Letters* 9:77-80. 36
- SEELY R.J., FAHRNEY D.E. (1983). *J. Biol. Chem.* 258: 10835-10838. 28
- SHAW P.J., HILLS G.J., HENWOOD J.A., HARRIS J.E., ARCHER D.B. (1985). *J. Bacteriol.* 161:750-757. 45, 46
- SIEGEL L.M. (1965). *Anal. Biochem.* 11:126-132. 66
- SLEYTR U.B. (1975). *Nature* 257:400-402. 42
- SLEYTR U.B., MESSNER P. (1983). *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 311-339. 42
- SLEYTR U.B., SÁRA M., KÜPCÜ Z., MESSNER P. (1986). *Arch. Microbiol.* 146:19-24. 43, 59, 61
- SLEYTR U.B., THORNE K.J.I. (1976). *J. Bacteriol.* 126:377-383. 61
- SOWERS K.R., BARON S.F., FERRY J.G. (1984). *Appl. Environ. Microbiol.* 47:971-978. 38
- SOWERS K.R., FERRY J.G. (1983). *Appl. Environ. Microbiol.* 45:684-690. 44
- SPACKMAN D.H., STEIN W.H., MOORE S. (1958). *Anal. Chem.* 30:1190-2006. 79

- SPROTT G.D., BEVERIDGE T.J., PATEL G.B., FERRANTE G. (1986). *Can. J. Microbiol.* 32:847-854. 50, 90
- SPROTT G.D., COLVIN J.R., Mc KELLAR R.C. (1979). *Can. J. Microbiol.* 25:730-738. 48, 50
- SPROTT G.D., Mc KELLAR R.C. (1980). *Can. J. Microbiol.* 26:115-120. 48, 69, 90, 92
- STETTER K.O., THOMM M., WINTER J., WILDGRUBER G., HUBER H., ZILLIG W., JANEKOVIC D., KÖNIG H., PALM P., WUNDER S. (1981). *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C2* : 166-178. 33
- STEWART M., BEVERIDGE T.J., SPROTT G.D. (1985). *J. Mol. Biol.* 183:509-515. 45, 50, 118, 123
127
- STRANGE R.E. (1968). *Nature* 220:606-607. 24
- STROBEL G.A., TALMADGE K.W., ALBERSHEIM P. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 261:365-374. 61
- SUTHERLAND I.W. (1977). In : SUTHERLAND I.W. (ed.) *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell.* Academic Press LONDON, NEW YORK, SAN FRANCISCO p. 17-96. 61
- TAKASAKI S., MIZUOCHI T., KOBATA A. (1982). *Methods in Enzymology*, Vol. 83. p. 263-268. 126
- THAUER R., FUCHS G. (1980). In : DALTON H. (ed.) *Microbial growth on C1 compounds.* 3rd International Symposium p. 143-145. 25
- THIERY J.P. (1967). *J. Microscop.* 67:987-1018. 129
- TOUZEL J.P., ALBAGNAC G. (1983). *FEMS Microbiol. Letters* 16:241-265. 64
- TOUZEL J.P., PETROFF D., ALBAGNAC G. (1985). *System. Appl. Microbiol.* 6:66-71. 24, 38
- VAN BRUGGEN J.J.A., ZWART K.B., HERMANS J.G.F., VANHOVE E.M., STUMM C.K., VOGELS G.D. (1986). *Arch. Microbiol.* 144: 367-374. 24, 44
- VERRIER D. (1984). *Thèse de Docteur-Ingénieur E.N.S.I.A.* 14, 15, 20
- VERRIER D., ALBAGNAC G. (1985). In : PALZ W., COOMBS J., HALL D.O. (eds.) *Energy from biomass 3rd EC Conference*, Elsevier Applied Science Publishers LONDON p. 537-541. 15
- WEIMER P.J., ZEIKUS J.G. (1979). *J. Bacteriol.* 137:332-339. 25, 28, 29
- WESTPHAL O., JANN K. (1965). In : WHISTLER R.L. (ed.) *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. V. Academic Press, NEW YORK, SAN FRANCISCO, LONDON p. 83-91. 76

- WHITMAN W.B. (1985). In : WOESE C.R., WOLFE R.S. (eds.) 18, 31, 32
The Bacteria VIII, Academic Press p. 3-84.
- WIELAND F., DOMPERT W., BERNHARDT G., SUMPER M. (1980). 53, 55, 56
FEBS Letters 120:110-114.
- WIELAND F., LECHNER J., BERNHARDT G., SUMPER M. (1981). 53
FEBS Letters 132:319-323.
- WIELAND F., LECHNER J., SUMPER J. (1982). Zbl. Bakt. Hyg. 55
I. Abt. Orig. C3 : 161-170.
- WIELAND F., PAUL G., SUMPER M. (1985). J. Biol. Chem. 55
260:15180-15185.
- WILDGRUBER G., THOMM M. KÖNIG H., OBER K., RICCHIUTO T., 24, 44
STETTER K.O. (1982). Arch. Microbiol. 132:31-36.
- WOESE C.R., FOX G.E. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 18
74:5088-5090.
- YANG L.L., HAUG A. (1979). Biochim. Biophys. Acta 556: 59
265-277.
- ZABEL H.P., KÖNIG H., WINTER J. (1984). Arch. Microbiol. 24, 44
137:308-315.
- ZANETTA J.P., BRECKENBRIDGE W.C., VINCENDON G. (1972). J. 72
Chromato. 69:291-304.
- ZEHNDER A.J.B., HUSER B.A., BROCK T.D., WUHRMANN K. 47
(1980). Arch. Microbiol. 124:1-11.
- ZEIKUS J.G., BOWEN V.G. (1975a). Can. J. Microbiol. 21: 33, 38
121-129.
- ZEIKUS J.G., BOWEN V.G. (1975b). J. Bacteriol. 1975:373- 45
380.
- ZHILINA T.N. (1976). Microbiology 45:414-421. 23, 38
- ZHILINA T.N., ZAVARZIN G.A. (1979). Microbiology 48:223- 38
228.
- ZINDER S.H., ANGUISH T., LOBO A.L. (1987). Arch. 14
Microbiol. 146:315-322.
- ZINDER S.H., CARDWELL S.C., ANGUISH T., LEE M., KOCH M. 15
(1984). Appl. Environ. Microbiol. 47:796-807.

