

4'hydroxy, 4-chlorobutyrophenone (method C).

1) Preparation of the phenylester of 4-chlorobutyric acid by the method of Soine and Digangi (ref. 9).

A mixture of 94 g (1 mole) phenol and 141 g (1 mole) 4-chlorobutyrylchloride is refluxed for 3 hours. The mixture is then fractionated in vacuo to yield 179 g (91 %) of phenyl-4-chlorobutyrate,

n_D^{20} : 1.5148;
b. p. 140 - 143° C at 10 mm;
d₄²⁰ : 1.165; Cl % : calculated 17.94, found 17.73.

2) Fries rearrangement of the phenylester.

77 g (0.58 mole) anhydrous aluminum chloride is dissolved in 400 ml nitrobenzene. To this solution is added slowly under stirring 99 g (0.5 mole) of phenyl-4-chlorobutyrate. After the addition is complete stirring is continued for 18 hours at room temperature. Then the reaction mixture is poured into a mixture of 200 ml conc. hydrochloric acid and 400 g ice. After the decomposition is complete, the whole is filtered. The solid is dissolved in 200 ml ether, the residual water is separated and the solution is diluted carefully with 50 ml petroleumether. On scratching and cooling a precipitate is obtained; this is filtered and dried to yield 20 g

The preparation and properties of twenty-eight 4-chlorobutyrophenones and of 4-chlorobutyro 2'-thienone are given. Only one of these compounds has been described in the literature.

4'hydroxy, 4-chlorobutyrophenone, m. p. 114-115° C.

From the first filtrate the nitrobenzene layer is separated. On cooling and seeding a second fraction of 14 g somewhat less pure product is obtained, m. p. 112-115° C. Total yield : 34 g (34 %).

Acknowledgement.

The authors wish to thank the analytical department (Mr. P. Demoen and co-workers) for the analysis of the compounds.

REFERENCES

- (1) CONANT J. B., SEGUR J. B. and KIRNER W. R.: J. Am. Chem. Soc. 46, 1882 (1924).
- (2) CLOKE J. B.: J. Am. Chem. Soc. 51, 1174 (1929).
- (3) CHELINTZEV G. V. and OSETROVA E. D.: Compt. rend. acad. sci. U.R.S.S. 2, 251 (1935) - C. A. 29, 6223 (1935).
- (4) KHITRIK S. N.: J. Gen. Chem. (U.R.S.S.) 10, 2095 (1940). - C. A. 35, 4001 (1941).
- (5) CLOSE W. J.: J. Am. Chem. Soc. 79, 1455 (1957).
- (6) BUU-HOI Ng Ph. and CAGNIANT P.: Rec. trav. chim. 64, 214 (1945).
- (7) Org. Synth. Coll., Vol. II, 8 (1947).
- (8) Organic Reactions, Vol. I, 342 (1954).
- (9) SOINE T. O. and DIGANGI F. E.: J. Am. Pharm. Ass. 41, 236 (1952).

Man beschreibt die Vorbereitung und physikalischen Eigenschaften von acht und zwanzig 4-chlorobutyrophenonen und 4-chlorobutyro 2'-thienone. Nur ein dieser ist in die Literatur bekannt.

576.851.4 : 576.314.1

Chimie de la structure des parois cellulaires bactériennes

par J.-M. GHUYSEN

La composition chimique des parois cellulaires microbiennes est très variable. Toutes renferment cependant un complexe constitué de deux N-acetylhexosamines et de trois ou quatre acides aminés.

Ce complexe constitue la presque totalité des parois de Micrococcus lysodeikticus dont la structure est étudiée en détail. Dans d'autres cas, il ne présente qu'un pourcentage parfois minime de la composition globale de la paroi, mais serait toujours, en ordre principal du moins, responsable de la rigidité de celle-ci.

Cette propriété lui a valu d'être désigné par le terme de « mucopeptide de base ».

A la fin du XIX^e siècle, les expériences de plasmolyse de Fischer (1, 2) avaient montré que les bactéries vivantes étaient entourées de deux enveloppes. Lors de la rétraction du protoplasme, l'une de ces enveloppes conservait la forme initiale de la cellule, tandis que l'autre, fine et flexible, épousait la forme rétractée du protoplasme. Ces deux enveloppes sont respectivement appelées paroi cellulaire et membrane cytoplasmique.

L'étude moderne de la structure chimique de la paroi cellulaire bactérienne a débuté aux environs de 1950, grâce aux techniques de microscopie électronique, de désintégration cellulaire et de séparation de particules de tailles différentes par centrifugation différentielle.

I. - Isolement des parois cellulaires bactériennes.

Il n'existe pas de procédé absolument standard de préparation des parois bactériennes. Cependant, la méthode proposée en 1951 par Salton et Horne (3) a été très généralement adoptée. Une suspension lavée des cellules bactériennes vivantes est désintégrée au moyen d'appareils divers (4, 5, 6) par agitation avec un abrasif fin ou encore, quoique plus rarement, par application d'ultrasons (7). Les

De chemische samenstelling van de celwanden van microben is zeer veranderlijk. Ze bevatten nochtans een complex bestaande uit twee N-acetylhexosamines en 2 of 3 aminozuren.

Dit complex vormt het hoofdbestanddeel van de wanden van Micrococcus lysodeikticus dat grondig werd bestudeerd. In andere gevallen vormt het vaak slechts een gering percentage van de totale samenstelling van de wand, nochtans zou het steeds de voornaamste oorzaak zijn van de rigiditeit van de wand.

Deze eigenschap vormt de grondslag van zijn benaming « basismucopeptide ».

parois sont ensuite isolées et purifiées par une série de centrifugations différentielles, en eau distillée ou en solution saline (8).

Habituellement, ce procédé permet d'obtenir une préparation homogène, dépourvue de cellules intactes et de contaminations d'origine cytoplasmique. Il arrive, cependant, qu'un traitement enzymatique (9) au moyen de trypsine ou de ribonucléase facilite l'élimination de tout résidu intracellulaire. Protéases et nucléases sont, en effet, très généralement inactives sur les parois bactériennes. Il arrive, cependant, que ces enzymes détruisent certains constituants. C'est le cas de l'antigène M des streptocoques hémolytiques (10) qui constitue environ 40 %, en poids, des parois natives (11). La protéine M en est cependant éliminée par la trypsine sans que leur forme et leur rigidité ne soient altérées.

L'estimation de la pureté d'une préparation de parois bactériennes est difficile. Elle repose sur plusieurs procédés dont aucun n'est exempt de critiques. Un examen au microscope à contraste de phase donne une idée générale de la propreté de la préparation (présence de cellules intactes et de débris divers). Le microscope électronique révèle la présence éventuelle de particules denses d'origine

cytoplasmique. Un maximum d'absorption à 268 m μ indique une contamination par des acides nucléiques. Enfin, les parois bactériennes sont dépourvues d'activité enzymatique dont un test judicieusement choisi peut également être une épreuve de pureté.

II. - Propriétés physiques des parois cellulaires bactériennes.

Les parois représentent, en poids, environ 20 à 30 % des bactéries. Elles forment, dans la grande généralité des cas, des suspensions opalescentes blanches. Elles sont complètement dépourvues de pigments, hormis les cas exceptionnels de *Rhodospirillum rubrum* (12) et de *Myxococcus xanthus* (13).

Examinées au microscope électronique, dans des conditions de freeze-drying qui ne détruisent pas leur organisation (14), les parois bactériennes montrent une structure manifestement rigide, une taille (1 à 5 μ) et une forme, sphérique ou cylindrique, égales à celles de la cellule originale. Leur épaisseur est variable mais généralement comprise entre 10 et 25 m μ . La structure macromoléculaire, telle qu'elle apparaît sur les micrographies de section fine, peut être de complexité variable. Certaines parois semblent constituées d'une seule couche homogène. D'autres comprennent deux ou même plusieurs couches superposées (15, 16, 17, 18) de quelques m μ chacune d'épaisseur. Dans certains cas, une de ces couches peut montrer une structure fine particulière, due à un arrangement selon une trame parfois hexagonale, parfois rectangulaire, de macromolécules d'un diamètre compris entre 50 et 150 Å.

III. - Rôles biologiques des parois cellulaires.

Le protoplasme d'une cellule bactérienne vivante est le siège d'une pression osmotique, variant de 3 à 30 atmosphères, due à une forte concentration de substances solubles (19). Cet effet est attribuable au rôle sélectif joué par la membrane cytoplasmique qui, grâce à une combinaison de transporteurs spécifiques, règle les échanges entre le milieu extérieur et le cytoplasme lui-même. Mais cette membrane est fragile et ne peut résister à la forte pression interne. C'est à la paroi cellulaire qu'est dévolu ce rôle de protection.

Lorsque, par une technique appropriée, la cellule bactérienne est privée de sa paroi, mais maintenue dans un milieu de pression osmotique convenable, elle se transforme en éléments parfaitement sphériques appelés protoplastes. Capables de synthétiser protéines et acides nucléiques, de croître et peut-être de se diviser, les protoplastes semblent avoir retenu presque intégralement les propriétés biochimiques des cellules qui leur ont donné nais-

sance (20). Ils manifestent cependant une grande fragilité et si la pression osmotique du milieu extérieur est réduite, ils éclatent, le contenu cytoplasmique se répand et la membrane apparaît comme un sac vide qui, en se désintégrant, donne naissance à de petits granules.

Dans le cas où la paroi présente une structure particulièrement complexe, une partie seulement de celle-ci peut être éliminée. On observe encore la transformation des cellules en éléments sphériques mais qui se distinguent des protoplastes vrais par une plus grande résistance mécanique et osmotique. Ces cellules partiellement dénudées sont appelées sphéroplastes.

Le seul rôle actif que l'on attribue à la paroi bactérienne est celui qu'elle joue dans l'infection virale de la cellule. La première étape de cette infection est une interaction spécifique entre des récepteurs chimiques localisés sur la paroi bactérienne et l'extrémité de la queue du bactériophage. Celle-ci est constituée, d'après les études de Kozloff, Dukes et Lute (21, 22) sur la queue des bactériophages T₂, T₄, T₅ d'*Escherichia coli*, d'une protéine dont les propriétés contractiles et enzymatiques sont similaires, à beaucoup de points de vue, à celles de l'actomyosine. Lors de l'interaction avec la paroi bactérienne, la queue du phage se contracte jusqu'à diminuer de 50 % en longueur et augmenter de 30 % en largeur (23) rendant ainsi possible l'introduction de l'acide désoxyribonucléique viral dans le cytoplasme de la cellule hôte.

La rôle primordial joué par la paroi bactérienne dans ce premier stade de l'infection virale est amplement démontré.

Les parois bactériennes isolées mises en contact avec le phage spécifique inactivent ce dernier en l'adsorbant à leur surface (24, 25). Dans certains cas, les récepteurs ont été isolés à partir des parois bactériennes purifiées (26, 27, 28, 29). Les phages sont doués d'activité lytique spécifique à l'égard de la paroi bactérienne qui les adsorbe (30, 31). Citons enfin la formation de protoplastes par adsorption massive de bactériophages non infectieux (32).

Par ailleurs, les protoplastes sont parfaitement aptes à assurer la multiplication du bactériophage. Une fois l'acide désoxyribonucléique introduit dans le cytoplasme cellulaire, la paroi ne joue plus aucun rôle et peut être éliminée, pour autant que le procédé utilisé permette d'obtenir des protoplastes stables. De même, la paroi semble ne jouer aucun rôle dans l'induction phagique d'une culture bactérienne lysogène. En effet, contrairement aux résultats antérieurs de Salton et Mc Quillen (33), Borek et Ryan (34) ont réussi à induire, par irradiation aux ultraviolets, la formation de phages dans une suspension de protoplastes dérivés de *Bacillus megaterium* lysogène.

IV. - Substances communes à toute paroi cellulaire bactérienne.

L'analyse des hydrolysats acides des parois bactériennes a révélé la présence d'hydrates de carbone (sucres, hexosamines, polyols), d'acides aminés, de lipides, de phosphore.

Parmi ces divers constituants, un certain nombre d'entre eux ont systématiquement été retrouvés dans les différentes parois microbiennes examinées jusqu'à présent. Ce sont deux hexosamines, la glucosamine et l'acide muramique, et trois ou quatre acides aminés, l'alanine, l'acide glutamique, la lysine et/ou l'acide diaminopimélique.

L'acide muramique fut d'abord découvert dans les hydrolysats de spores par Strange et Powell (35), puis ensuite dans de nombreuses parois bactériennes (36, 37, 38, 39, 40). La structure 3-O- α carboxéthyl-D-glucosamine lui a été attribuée par Strange et Kent en 1959 (41) (fig. 1). Glucosamine et acide muramique semblent être présents dans les parois bactériennes examinées jusqu'à présent, exclusivement sous forme N-acétylée.

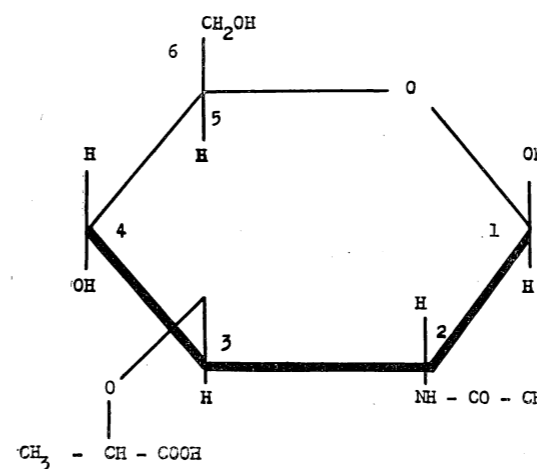


Fig. 1

Acide N-acétylmuramique

L'acide α, ϵ diaminopimélique (fig. 2) fut découvert en 1951 par Elisabeth Work (42) dans *Corynebacterium diphtheriae* et *Mycobacterium tuberculosis*. Isolé l'année suivante des parois de *Corynebacterium diphtheriae* par Holsworth (43, 44), sa présence dans de nombreuses autres parois bactériennes fut bientôt confirmée (45, 56, 47, 48). Les isomères optiques DL, DD, LL purent être séparées par chromatographie (49), ce qui permit l'étude de leur distribution dans la nature (50).

Acide muramique et acide diaminopimélique sont des substances exclusivement décelées, jusqu'à pré-

composants différents à l'électrophorèse et d'un sent, dans les parois microbiennes. Ces parois ont également infirmé l'idée que les seuls acides aminés

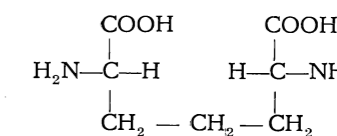


Fig. 2

Acide α, ϵ diaminopimélique

naturels étaient les stéréoisomères L. En effet, une proportion considérable de lysine, d'alanine et d'acides glutamique ont, dans les parois bactériennes, la configuration D (51, 52, 53, 54). Enfin, le mésoisomère de l'acide diaminopimélique, avec une configuration D à un bout et une configuration L à l'autre bout, est fréquemment rencontré et est susceptible de relier deux chaînes peptidiques identiques en leur donnant des configurations différentes.

Certaines parois bactériennes sont presque exclusivement constituées des quelques 5 à 6 substances citées plus haut. Ce sont des mucopolysaccharides, dont le type probablement le plus parfait est représenté par les parois de *Micrococcus lysodeikticus*. En effet, l'analyse chimique révèle que 95 % de ces parois sont constituées de: acide N-acétylmuramique 1 p., N-acétylglucosamine 1 p., alanine 2 à 3 p., acide glutamique 1 p., lysine 1 p. et glycine 1 p.

V. - Etude chimique des parois de « *Micrococcus lysodeikticus* ».

Les progrès les plus considérables réalisés dans l'étude de la structure des parois microbiennes ont été obtenus par l'isolement et la caractérisation des fragments libérés lors de leur digestion enzymatique.

L'enzyme le plus utilisé jusqu'à présent a été le lysozyme du blanc d'œuf, découvert par Fleming en 1922 (55), Meyer et alii (56) établirent en 1936 sa nature polysaccharidique et, en 1952, Salton (57) démontra son action directe sur les parois bactériennes isolées. Cette dernière technique se répandit bientôt dans tous les laboratoires intéressés par les problèmes de structure bactérienne.

Le produit de la digestion des parois de *Micrococcus lysodeikticus* par le lysozyme est un mélange hétérogène dont 45 % environ sont constitués de fragments relativement petits. C'est surtout cette fraction dialysable qui a été particulièrement étudiée jusqu'à présent. La fraction non dialysable est mal connue. Elle serait constituée d'au moins trois

poinds moléculaire moyen compris entre 10.000 et 20.000.

A. Fragments polysaccharidiques.

Les hydrolysats des parois de *Micrococcus lysodeikticus* obtenus par action du lysozyme, sont réducteurs et donnent la réaction des hexosamines (réaction d'Elson et Morgan) et des N-acétylhexosamines (réaction de Morgan et Elson).

La réaction positive d'Elson et Morgan resta longtemps mystérieuse, puisque glucosamine et acide muramique sont, dans la paroi, sous forme N-acétylée. Tout récemment, Perkins (58) donna une explication de cette apparente anomalie. On sait, en effet (59), qu'un mélange de glucose et de glycine ou de lysine est la cause d'un des artefacts les plus connus de la réaction d'Elson et Morgan. L'existence dans les parois bactériennes d'un certain nombre de groupements aminés libres (alanine terminal en très faible quantité et groupes ϵ aminés de la lysine) avait été démontrée par Ingram et Salton (60). En masquant ces groupes aminés libres par réaction avec le fluorodinitrobenzène, Perkins montra qu'ils étaient responsables, en ordre principal et par suite de leur interaction avec des complexes réducteurs d'acétylhexosamines, de la réaction d'Elson et Morgan apparemment positive des hydrolysats de parois bactériennes.

La réaction de Morgan et Elson n'est pas due à la présence de N-acétylhexosamines libres mais, partiellement en tout cas, à celle d'un complexe constitué à parties égales d'acétylglucosamine et d'acide acétylmuramique (61).

L'isolement et la structure de ce complexe fut entreprise simultanément, quoique indépendamment et par des méthodes différentes, par Perkins (62) et Salton et Ghuysen (63) qui lui attribuèrent la structure :

$\beta(1 \rightarrow 6)$ N-acétylglucosamine-acide N-acétylmuramique (fig. 3)

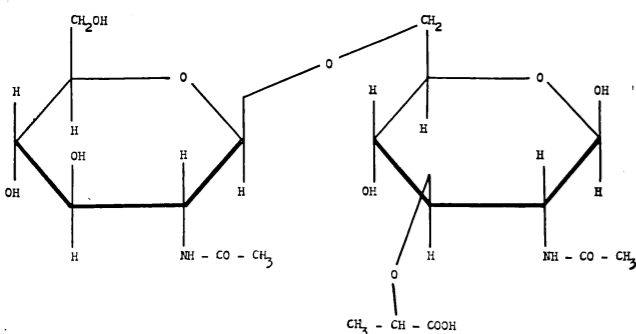


Fig. 3

Disaccharide $\beta(1 \rightarrow 6)$ N-acétylglucosamine-acide N-acétylmuramique

En effet, 1) après oxydation à l'iode (Perkins) ou après réduction au NaBH_4 (Salton et Ghuysen) de l'oligosaccharide, suivies d'une hydrolyse acide, la glucosamine fut retrouvée intacte, tandis que l'acide muramique avait été transformé en acide hexonique (après oxydation) ou en hexitol correspondant (après réduction). Le groupe réducteur terminal de l'oligosaccharide appartenait donc à l'acide acétylmuramique.

2) l'acide muramique étant complètement transformé en acide hexonique et le rapport glucosamine/hexitol, déterminé après transformation en dérivés dinitrophénoliques, étant proche de l'unité, cet oligosaccharide devait être effectivement un disaccharide.

3) l'absence de production de formol lors de l'oxydation du disaccharide par NaIO_4 (Salton et Ghuysen) et l'étude des chromogènes formés lors du chauffage du disaccharide en milieu alcalin, dans les conditions de la réaction de Morgan et Elson, (Perkins) montrèrent que la liaison entre les deux monomères était en $1 \rightarrow 6$.

4) Enfin, la nature β de la liaison fut prouvée par l'hydrolyse du dimère en N-acétylglucosamine et acide N-acétylmuramique sous l'action de la β -glucosidase (Salton et Ghuysen).

Ce disaccharide est en réalité le produit final de la digestion des parois de *Micrococcus lysodeikticus* par le lysozyme. Il est complètement résistant à une action ultérieure de cet enzyme.

Les hydrolysats enzymatiques des parois de *Micrococcus lysodeikticus* contiennent un second oligosaccharide, également constitué d'acétylglucosamine et d'acide acétylmuramique en parties égales. Mis en évidence sur les chromatogrammes (64) par une technique améliorée de révélation des N-acétylhexosamines (65), il se différencie du disaccharide par un R_F plus petit. Après isolement, sa structure fut établie par Salton et Ghuysen (63) comme étant un dimère de deux disaccharides $\beta(1 \rightarrow 6)$ N-acétylglucosamine-acide N-acétylmuramique réunis entre eux par une liaison $\beta(1 \rightarrow 4)$ (fig. 4).

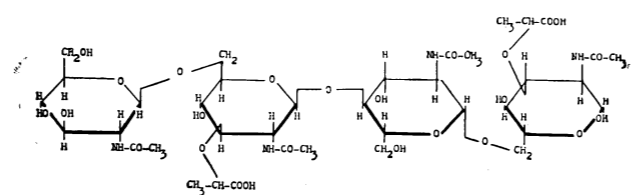


Fig. 4

Dimère $\beta(1 \rightarrow 4)$ de deux disaccharides $\beta(1 \rightarrow 6)$ N-acétylglucosamine - acide N-acétylmuramique

En effet, après réduction au NaBH_4 et hydrolyse acide ultérieure, glucosamine, acide muramique et son hexitol correspondant ont été retrouvés dans la

proportion 2/1/1; l'oxydation au NaIO_4 ne libère pas de formol; la β glucosidase en libère la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique; il présente une constante de sédimentation égale à 0,3 S (64). Enfin, il renferme encore une liaison sensible au lysozyme dont l'hydrolyse provoque la libération d'un produit unique, le disaccharide $\beta(1 \rightarrow 6)$ N-acétylglucosamine-acide N-acétylmuramique (66).

L'isolement du tétrasaccharide, l'établissement de sa structure et son hydrolyse par le lysozyme, caractérisent cet enzyme comme une $\beta(1 \rightarrow 4)$ glucosaminidase, confirmant ainsi la suggestion qu'avait émise Berger et Weisser (67) sur la base d'une attaque, cependant controversée, de la chitine par le lysozyme.

Des enzymes bactériolytiques autres que le lysozyme ont été utilisés dans l'étude des parois bactériennes. Ils sont le plus souvent sécrétés par des bactéries : *Sarcina* spp., *Bacillus* spp. (68, 69, 70) et *Streptomyces* spp. (71, 72, 73, 74). Leur spectre bactériolytique les apparente au lysozyme quoique dans la plupart des cas, aucune étude des liaisons qui leur sont spécifiquement sensibles n'ait été entreprise.

Une hexosaminidase du type lysozyme a été isolée par Ghuysen (75) à partir de filtrats de cultures de streptomycètes, connus depuis les travaux de Welsch (76) sous le nom d'actinomycétine. Le complexe bactériolytique de l'actinomycétine a été fractionné et une hexosaminidase purifiée a été concentrée dans une fraction dite F1. Toute comme le lysozyme, l'hexosaminidase F1 libère des parois de *Micrococcus lysodeikticus* les mêmes di- et tétrasaccharides. La proportion disaccharide/tétrasaccharide est cependant considérablement plus élevée après digestion par le lysozyme qu'elle ne l'est après action de l'hexosaminidase F1. En effet, l'action de l'hexosaminidase F1 sur le tétrasaccharide est décelable, mais faible (66). En terme de pourcentage de tétrasaccharide hydrolysé, l'hexosaminidase F1 est environ 10 fois moins active que le lysozyme. Le disaccharide présent dans les hydrolysats de parois de *Micrococcus lysodeikticus* obtenus par action de l'hexosaminidase F1 ne serait pas dû à l'hydrolyse d'un tétrasaccharide préalablement libéré de la paroi. Il serait, au contraire, directement libéré, en tant que tel, à partir d'un complexe polysaccharidique de la paroi même.

Que lysozyme et hexosaminidase F1 soient deux $\beta(1 \rightarrow 4)$ glucosaminidases de spécificité identique mais d'affinité différente, semble être confirmé par l'acétylation des parois de *Micrococcus lysodeikticus* (66). L'introduction d'un pourcentage convenable de groupes O-acétyles (et peut-être N-acétyles) dans les parois de *Micrococcus lysodeikticus* peut, soit les rendre complètement résistantes au lysozyme (77, 78) et à l'hexosaminidase F1, soit,

au contraire, pratiquement résistantes à l'hexosaminidase F1 uniquement. Enfin, lysozyme et hexosaminidase F1 sont deux protéines distinctes, ainsi qu'en témoigne leur comportement très différent vis-à-vis de la dénaturation thermique (66).

Des polysaccharides plus complexes que le tétrasaccharide n'ont pas été décelés à l'état libre dans les hydrolysats enzymatiques des parois de *Micrococcus lysodeikticus*. Il est possible qu'il n'y en ait pas. Il est aussi possible que le procédé de révélation soit incapable de les mettre en évidence. On constate, en effet, que la N-acétylglucosamine, le disaccharide et le tétrasaccharide sont progressivement moins sensibles à la réaction de Morgan et Elson. Cet effet est probablement dû à la dilution progressive du groupement réducteur et au blocage de l'hydroxyle en position 4 (79).

Lors de recherches effectuées en 1957 (80), nous avons cru, en comparant notre fraction F1 au lysozyme, qu'elle était dépourvue d'enzyme de nature polysaccharidasique. Cette erreur est attribuable : 1) au peu de sensibilité du procédé de révélation des N-acétylhexosamines utilisé à cette époque ; 2) au fait que di- et tétrasaccharides ne sont libérés des parois qu'assez tardivement ; si l'incubation est arrêtée dès clarification de la suspension des parois, aucun oligosaccharide dialysable ne peut être décelé ; 3) au fait que les produits finaux de la digestion par l'hexosaminidase F1 et le lysozyme sont principalement et respectivement le tétrasaccharide et le disaccharide. Or, le tétrasaccharide est relativement beaucoup moins sensible au procédé de révélation utilisé.

B. Fragments mucopeptidiques.

Parmi les fragments de parois de *Micrococcus lysodeikticus*, également dialysables et obtenus après digestion par le lysozyme et l'hexosaminidase F1, deux types de complexes mucopeptidiques ont été isolés et purifiés (64).

Les mucopeptides du premier type ont une composition chimique globale : N-acétylglucosamine₁-acide N-acétylmuramique₁-alanine₂₃₃-glycine₁-lysine₁-acide glutamique₁. Peu de choses sont connues sur leur structure et la séquence de leurs constituants, excepté que l'acétylglucosamine et l'acide acétylmuramique forment une unité $\beta(1 \rightarrow 6)$ disaccharidique, en position terminale à la chaîne peptidique.

Le second type de mucopeptide est représenté par un complexe du type précédent contenant, en plus, un résidu polysaccharidique constitué de 10 unités d'acétylglucosamine et d'acide acétylmuramique. Incubé en présence de lysozyme, ce mucopeptide libère, aux dépens de son résidu décasaccharidique, une certaine quantité du $\beta(1 \rightarrow 6)$ disaccharide.

Quel est le type de liaison qui réunit entre eux les résidus saccharidiques et peptidiques ? Dès la découverte de l'acide N-acétylmuramique, on avait émis l'hypothèse qu'il était le chaînon réunissant entre eux les résidus saccharidiques et peptidiques, grâce à une liaison amidique entre sa fonction COOH et un NH₂ de la chaîne peptidique. Cette hypothèse avait été renforcée par la découverte par Park (81, 82), dans les cellules staphylococciques, de nucléotides, considérés comme les précurseurs des parois et dans lesquels une chaîne peptidique similaire à celles décrites plus haut était unie à un résidu uridine-diphosphate-acide N-acétylmuramique (fig. 5). L'existence de cette liaison amidique a

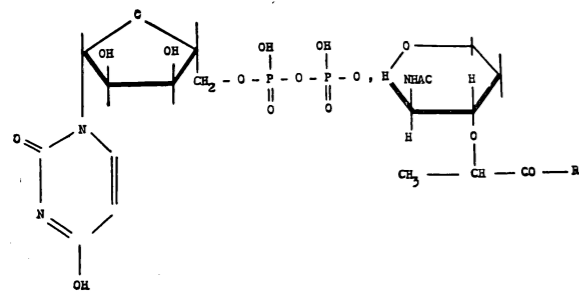


Fig. 5

Nucléotide uridine-diphosphate-acide N-acétylmuramique
R = peptide

été récemment confirmée grâce à l'isolement d'un second enzyme, appartenant également au complexe de l'actinomycétine et concentré dans une fraction F2 B différente de celle qui contient l'hexosaminidase F1. Incubés en présence de cette fraction F2B (66), les complexes mucopeptidiques décrits plus haut, se scindent en leurs deux constituants (fig. 6): d'une part le disaccharide chargé négativement (à pH supérieur à 2,5) et, d'autre part, le peptide dont les charges positives, ainsi que la sensibilité vis-à-vis de la ninhydrine, montrent une augmentation des groupes aminés libres par rapport aux mucopeptides originaux.

VI. - Structure des parois de « *Micrococcus lysodeikticus* ».

L'action consécutive du lysozyme, de l'hexosaminidase F1 et de l'amidase F2 B sur les parois de *Micrococcus lysodeikticus* a apporté quelques précisions sur la structure macromoléculaire de celles-ci.

L'unité structurale la plus simple qui explique les observations accumulées à ce jour, est représentée par une chaîne polysaccharidique portant trois chaînes peptidiques (fig. 7). Une de celles-ci est terminale, tandis que les deux autres sont elles-mêmes

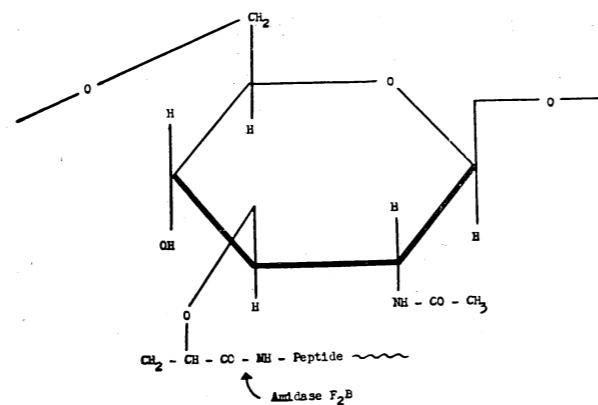


Fig. 6

Site de l'action de l'amidase F2 B

unies à d'autres résidus polysaccharidiques. Des unités structurales de ce type peuvent se combiner

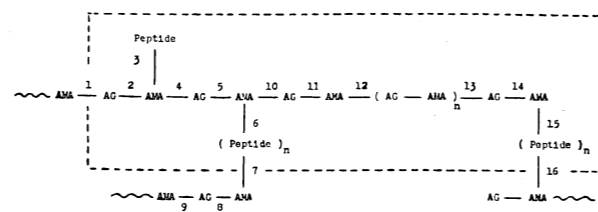


Fig. 7

Unité structurale type de la paroi de « *Micrococcus lysodeikticus* »

entre elles par des liaisons amidiques en 7 et 16 et glycosidique en 1. Il est cependant possible que la liaison 1 ne soit que facultative. Dans ce cas, le résidu peptide-disaccharide serait terminal. Enfin, des ramifications par liaisons peptidiques, grâce aux groupements ε de la lysine, sont théoriquement possibles.

L'unité structurale proposée repose sur les observations suivantes.

1) Il existerait de petits résidus peptidiques en position terminale à des chaînes polysaccharidiques. En effet, l'amidase libère des parois, des peptides dialysables (rupture de la liaison 3). De même, l'hexosaminidase F1 et le lysozyme libèrent des peptides contenant encore une unité disaccharidique (rupture de la liaison 4 et, éventuellement, de la liaison 1).

2) Il est difficile de savoir si des résidus polysaccharidiques existent en position terminale à une chaîne peptidique. En effet, la fraction dialysable obtenue après action de l'amidase F2 B sur les parois de *Micrococcus lysodeikticus* ne contient ni di- ni tétrasaccharide et n'en libère pas sous l'ac-

tion ultérieure de l'hexosaminidase F1 ou du lysozyme. Mais l'amidase F2 B pourrait n'être active que sur les liaisons amidiques réunissant des chaînes saccharidiques et peptidiques dont, au moins en partie, les structures présenteraient des caractéristiques données.

3) Des chaînes polysaccharidiques sont réunies par des ponts peptidiques dont certains sont de petite taille. En effet, après action de l'hexosaminidase F1, il a été possible d'isoler un peptide dialysable, portant deux résidus saccharidiques séparés, respectivement un disaccharide et un décaccharide (rupture des liaisons 4, 9 et 13).

4) Les résidus saccharidiques, ou au moins la plupart d'entre eux, seraient de grande taille. En effet, si l'amidase F2 B ne libère aucun di- ou tétrasaccharide par action directe sur les parois, elle en libère une certaine quantité par action sur la fraction non dialysable obtenue après une première digestion des parois par l'hexosaminidase F1. Ces réactions successives pourraient être schématisées de la façon suivante. Par rupture sous l'action de l'hexosaminidase F1 des liaisons 4, 10, 12 et 13, il y a libération d'un mélange de di- et de tétrasaccharides. L'amidase F2 B, agissant en second lieu et par rupture des liaisons 6 et 15 libérerait à son tour deux disaccharides. Si l'on imagine que la liaison 10 a échappé à l'action de l'hexosaminidase F1, l'amidase F2 B peut alors libérer un mélange de di- et de tétrasaccharides.

Il est évident que le schéma structurel proposé est répété dans les parois de *Micrococcus lysodeikticus*, avec des modifications très variables. En effet,

1) les hydrolysats enzymatiques des parois de *Micrococcus lysodeikticus* contiennent des fragments de masses très variables qu'une simple dialyse permet de séparer en deux fractions.

2) tous les résidus polysaccharidiques ne sont certainement pas une simple répétition d'un certain nombre d'unités tétrasaccharidiques. En effet, lysozyme et hexosaminidase F1 sont tous deux puissamment actifs sur les parois de *Micrococcus lysodeikticus* dont ils libèrent les mêmes oligosaccharides, quoique étant deux enzymes d'affinités différentes. On peut imaginer des liaisons β (1 → 4) glycosidiques différemment sensibles à l'un et à l'autre enzyme par des variations de structure, même minimales, dans le voisinage de la liaison. Les affinités respectives des deux enzymes pourraient, par exemple, être sous le contrôle de groupes O-acétyles, mis en évidence dans les parois de *Micrococcus lysodeikticus* (77, 78), ainsi que dans d'autres parois bactériennes (83).

3) les résidus peptidiques présentent probablement eux aussi des structures variables, ainsi qu'en

témoignent les propriétés chromatographiques et électrophorétiques différentes des complexes disaccharide-peptide (64).

4) l'hétérogénéité des résidus peptidiques et polysaccharidiques avait déjà été postulée par Perkins et Rogers (84). Par hydrolyse sulfurique des parois de *Micrococcus lysodeikticus*, ils avaient obtenu trois fractions dans lesquelles les proportions d'acétylglucosamine, d'acide acétylmuramique et d'acides aminés étaient très différentes.

5) Une autre confirmation nous a été donnée lors d'un travail réalisé en collaboration avec Salton, sur des parois de *Micrococcus lysodeikticus* dont seuls l'acétylglucosamine et l'acide acétylmuramique avaient été marqués au ¹⁴C par culture du micro-organisme en présence de ¹⁴C fructose. Après digestion des parois par le lysozyme, la polysaccharidase F1 et l'amidase F2B, l'autoradiographie des chromatogrammes a permis de déceler un certain nombre de taches dans lesquelles l'hydrolyse acide ultérieure a révélé une proportion glucosamine/acide muramique variable et égale à 1/2, 1/1,5 ou 1/1.

VII. - Composition chimique des parois cellulaires bactériennes autres que celles de « *Micrococcus lysodeikticus* ».

Les substances du complexe mucopeptidique qui constituent pratiquement à elles seules les parois de *Micrococcus lysodeikticus*, ont été systématiquement retrouvées dans les nombreuses parois étudiées jusqu'à présent. Cependant, dans la plupart d'entre elles, d'autres constituants interviennent, de façon même parfois prépondérante. Nous les passerons rapidement en revue.

A. Acides aminés et lipides.

Un certain nombre de parois provenant toutes d'organismes gram-positifs contiennent à côté de l'alanine, l'acide glutamique, la lysine et/ou l'acide diaminopimélique, d'autres acides aminés dont les plus fréquemment rencontrés sont la glycine, l'acide aspartique et la lysine. Les acides aminés soufrés et aromatiques n'ont jamais été rencontrés dans ce type de paroi. Dans la plupart des cas (excepté la glycine pour les parois de *Micrococcus lysodeikticus*) ces acides aminés sont en quantités très minimes et peuvent probablement être considérés comme une des causes d'hétérogénéité des chaînes peptidiques du complexe mucopeptide.

Les parois d'organismes gram-positifs contiennent parfois aussi une certaine quantité de lipide (de 0 à 3%).

Les parois des organismes gram-négatifs se distinguent radicalement des précédentes. Leur teneur en lipide est élevée (20% extractibles directement et plus encore lorsque l'extraction est réalisée après

hydrolyse acide) et leur composition en acides aminés est comparable à celle que l'on trouve communément dans les protéines. Lipides et protéines sont associés, du moins en partie, pour former un complexe lipoprotéinique.

B. Sucres.

Outre la glucosamine et l'acide muramique, les sucres les plus fréquemment rencontrés sont le glucose, le mannose, le galactose et la galactosamine, plus rarement le rhamnose, l'arabinose, le fucose, le tyvelose et divers heptoses. D'autres substances non encore identifiées, mais détectées par l'aniline-phthalate sur les chromatogrammes des hydrolysats des parois bactériennes, ont été signalées. A nouveau, dans les parois d'organismes gram-positifs, ces divers hydrates de carbone seraient essentiellement une autre cause de l'hétérogénéité du complexe mucopeptide. Dans les parois d'organismes gram-négatifs, ils forment des complexes lipopolysaccharides et lipo-protéine-polysaccharides. Cette partie « lipide-protéine-polysaccharide » des parois gram-négatives est, en poids, un de leurs constituants essentiels qui interviendrait pour 80 à 90 % de leur composition totale. Cette structure chimique complexe se traduit par des différenciations de structure physique. C'est, en effet, dans ces types de parois que les micrographies de section fine révèlent des structures en couches multiples.

C. Polyol-phosphates.

Des composés polyol-phosphates ont été découverts dans les parois bactériennes par Mitchell et Moyle en 1950 (85, 86, 87, 88, 89, 90). Leur intérêt a pris un nouvel essor, tout récemment, par les travaux de Baddiley et ses collaborateurs (91, 92, 93, 94, 95, 96, 97). Intéressés par la phosphorylation enzymatique de l'acide pantothénique chez *Lactobacillus arabinosus*, ils décelèrent dans leurs extraits, un certain nombre de nucléotides parmi lesquelles ils en isolèrent deux. Ils établirent leur structure comme étant respectivement le cytidine

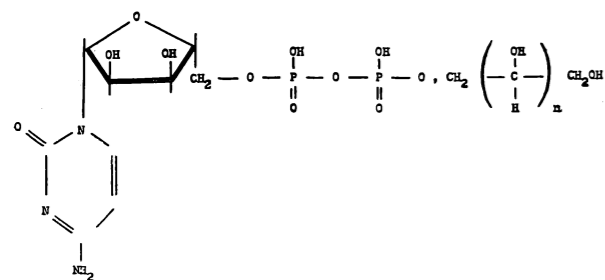


Fig. 8

Nucléotide cytidine-diphosphate-polyol
n = 1 : glycérol ; n = 3 : ribitol

diphosphate ribitol et le citidine diphosphate glycérol (fig. 8).

Simultanément à ces recherches, le rôle joué par d'autres nucléotides dans la biosynthèse de macromolécules était suspecté ou démontré. Une telle fonction était attribuée, par exemple, aux nucléotides de Park dans la synthèse des complexes mucopeptidiques des parois bactériennes, à l'uridine diphosphate glucose dans la synthèse de la cellulose (98) et à l'uridine diphosphate acétylglucosamine dans la synthèse de la chitine (99). Il était par conséquent logique d'imaginer que les polyol-nucléotides intervenaient également dans la biosynthèse d'autres macromolécules. Baddiley et ses collaborateurs confirmèrent cette hypothèse en isolant et caractérisant dans les extraits trichloracétiques de diverses parois bactériennes, des polymères de phosphate de ribitol auxquels ils donnèrent le nom d'acides téichoïques et assignèrent la structure générale montrée dans la figure 9.

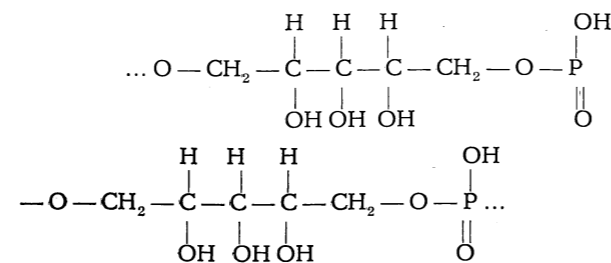


Fig. 9

Squelette du polymère de phosphate de ribitol

Ces acides téichoïques renferment en plus, par unité de phosphate de ribitol, un et parfois deux substituants : D-alanyle-glucose (dans les parois de *Lactobacillus arabinosus* et de *Bacillus subtilis*) ou D-alanyle-acétylglucosamine (dans les parois de *Staphylococcus aureus* H). Le mode de liaison de ses substituants a été établi, toujours par le même groupe de chercheurs. Alanine et glucose ou alanine et acétylglucosamine sont réunis par une liaison ester (ce qui constituerait probablement le premier exemple d'une liaison α -amino-ester dans la nature) et au squelette de phosphate de ribitol par une liaison glycosidique.

De leur côté, les nucléotides cytidiniques de glycérol seraient également attachés à un mécanisme biochimique aboutissant à la formation de polymères de glycérophosphates qui, au contraire des acides téichoïques, interviendraient surtout dans la structure de la membrane cytoplasmique (100). Cependant, il n'est pas exclu qu'ils puissent également faire partie de certaines parois bactériennes et ils auraient été effectivement détectés dans celles de *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus albus* et *Staphylococcus citreus* (cité par Baddiley, 97).

Après hydrolyse acide des parois bactériennes, les seuls phosphates organiques détectés sont ceux que donne l'hydrolyse des acides téichoïques isolés. De plus, il y a correspondance entre les phosphates inorganiques libérés et le 1:4 anhydroribitol formé. Il semble donc plausible de pouvoir déterminer le contenu en acide téichoïque des parois bactériennes en se basant sur leur teneur en phosphore. D'après ce procédé et selon Baddiley et collaborateurs, les acides téichoïques représenteraient, en poids, 40 à 60 % des quelques parois bactériennes examinées jusqu'à présent. Il ne faut cependant pas perdre de vue que les travaux de Baddiley et collaborateurs ont été réalisés à partir de l'acide téichoïque extractible par l'acide trichloracétique, que celui-ci représente seulement quelques % en poids de la paroi bactérienne (10 % pour *Lactobacillus arabinosus* ; 4,4 % pour *Staphylococcus aureus* H) (87) et que ce procédé d'extraction ne paraît altérer en rien l'insolubilité et la rigidité de la paroi. Il restait donc à découvrir comment la fraction non extractible des acides téichoïques s'intègre dans la structure rigide de la paroi et par quelles liaisons ils sont associés aux complexes mucopeptidiques.

A nouveau, l'utilisation d'un enzyme bactériolytique spécifique semble apporter la solution au problème. Après traitement au lysozyme des parois de *Bacillus megaterium* KM, d'où l'acide trichloracétique n'extrait pas d'acide téichoïque — il nous a été possible de séparer et de purifier par électrophorèse deux fractions non dialysables. L'une d'entre elles renferme l'acide téichoïque associé à un certain nombre de résidus mucopeptidiques et sa composition chimique correspond à : phosphate de ribitol₁-glucose_{1,50}-acétylglucosamine_{1,90} (alanine_{2,75}-acide glutamique_{1,54}-acide diaminopimélique_{1,54}) - (acétylglucosamine-acide acétylmuramique)_{0,47}-acide acétylmuramique_{1,10}. En faisant agir sur ce complexe un troisième enzyme, également contenu dans l'actinomycétine et distinct de l'hexosaminidase F₁ et de l'amidase F2 B, les résidus mucopeptidiques sont séparés du squelette [phosphate de ribitol-glucose-acétylglucosamine]. En effet, la composition chimique de la fraction téichoïque repurifiée après l'incubation enzymatique, montre des rapports P/glucose et P/acétylglucosamine inchangés, tandis que les rapports P/peptide, P/disaccharide et P/acide acétylmuramique ont simultanément augmenté d'une valeur égale et comprise entre 75 et 97 %, suivant les conditions expérimentales.

Ceci nous autorise donc à concevoir provisoirement l'association acide téichoïque-mucopeptide de la façon suivante.

Pour deux phosphates de ribitol, trois OH seraient engagés dans une liaison glycosidique avec un disaccharide (N-acétylglucosamine-glucose). Chacun des disaccharides serait uni à une chaîne peptidique, terminée à son tour soit par une molécule d'acide acétylmuramique, soit par le disaccha-

ride $\beta(1 \rightarrow 6)$ N-acétylglucosamine-acideN-acétylmuramique. Ces résidus saccharidiques terminaux seraient ce qui reste des sites qui, dans la paroi native, ont été attaqués par le lysozyme. La position terminale des résidus disaccharidiques et leur association aux chaînes peptidiques par l'intermédiaire d'une liaison amidique a été démontrée en isolant par électrophorèse et en dosant les disaccharides libérés par l'action de l'amidase F2 B sur le complexe original. Les séquences du saccharide (N-acétylglucosamine-glucose) et des chaînes peptidiques ne sont pas connues ni, d'ailleurs, la nature de la liaison mucopeptide-(glucose-N-acétylglucosamine).

VIII. - La notion de la structure de base des parois bactériennes.

Malgré leur composition chimique très différente, les parois bactériennes contiendraient toutes une structure de base semblable de nature mucopeptidique. Celle-ci représente 95 % des parois de *Micrococcus lysodeikticus*, 40 à 50 % des parois des germes gram-positifs contenant de l'acide téichoïque ou seulement 10 à 20 % des parois de la plupart des germes gram-négatifs. Dans tous les cas, cependant, elle serait, en ordre principal, responsable de l'intégrité et de la rigidité de la paroi bactérienne.

Cette notion de structure de base, introduite par Elisabeth Work en 1957 (101), repose sur un ensemble assez cohérent d'observations.

Lorsque les parois bactériennes isolées sont sensibles au lysozyme ou à l'hexosaminidase F1, et que des complexes d'acétylhexosamines sont décelés dans leur hydrolysat enzymatique, il est clair que la destruction de leur structure organisée est bien due à la digestion plus ou moins complète du complexe mucopeptidique. Si cette digestion est réalisée sur la cellule bactérienne vivante, celle-ci peut se transformer en protoplastes. La formation de protoplastes bactériens par l'emploi de lysozyme fut démontrée par Tomcsik et Guex-Holzer en 1952 (102), puis par Weibull en 1953 (103). Celui-ci précisa les conditions de stabilisation des protoplastes de *Bacillus megaterium* par le sucrose ou le polyéthylène glycol. De façon semblable, le lysozyme a permis d'obtenir des protoplastes de *Bacillus subtilis* (104, 105), de *Micrococcus lysodeikticus* et de *Sarcina lutea* (106). De même, en utilisant les enzymes bactériolytiques de l'actinomycétine, Welsch (107) obtint des protoplastes de *Bacillus subtilis* et nous-même de *Bacillus megaterium* KM (cité par Welsch, 108).

Lorsque les parois bactériennes isolées sont insensibles au lysozyme ou à l'hexosaminidase F1, on peut encore démontrer que leur rigidité est toujours due à un même type de structure basale, mucopeptidique. Dans ces conditions, la résistance des parois aux hexosaminidases peut être attribuée soit à

une protection des liaisons sensibles sous un revêtement de lipoprotéine, comme c'est vraisemblablement le cas des parois de bactéries gram-négatives, soit à des modifications de structure du mucopeptide qui annihilent l'affinité des enzymes.

La pénicilline ajoutée à une culture en phase de croissance d'*Escherichia coli*, provoque la lyse de la culture, que précède cependant une apparition éphémère de « corps larges » émergeant du centre et des extrémités des bacilles. Si le milieu est hypertonique, la pénicilline ne provoque pas de lyse mais, ainsi que l'a démontré Lederberg (109), la formation de protoplastes stables, sphériques, entièrement viables, mais osmotiquement fragiles. Si, par la suite, la pénicilline est diluée par addition de milieu frais et de pression osmotique convenable, les protoplastes retournent à la forme cellulaire normale. Le rôle de la pénicilline est donc d'induire la fragilité osmotique. Comme seules les cellules en phase de multiplication sont sensibles à la pénicilline, celle-ci n'agirait pas sur la paroi cellulaire existante mais bloquerait un processus métabolique lié à la biosynthèse de la paroi et qui, pour cette raison, ne serait vital que dans des conditions de multiplication cellulaire.

A l'heure actuelle, on ne connaît malheureusement pas la nature exacte de ce processus qui, chez *Escherichia coli*, est bloqué par la pénicilline. Mais, grâce aux remarquables travaux de Park, de Strominger et collaborateurs (110, 111, 112, 113, 114, 115, 116), il a été établi que dans le cas de *Staphylococcus aureus*, l'action de la pénicilline — qui, comme chez *Escherichia coli*, lyse les cultures en phase de croissance par inhibition de la biosynthèse de parois nouvelles — provoque l'accumulation de complexes nucléotide-acide N-acétylmuramique-peptide, lorsque les cellules staphylococciques sont maintenues en « resting culture » (cultures où ni multiplication ni mort cellulaire ne surviennent). Cette accumulation, obtenue en pratique par addition de pénicilline à un milieu qui ne contient que trois acides aminés (lysine, acide glutamique et alanine), est réalisée en un temps relativement très court (1 à 2 heures) et n'est donc pas un effet secondaire. D'ailleurs, lorsque les cellules inhibées sont lavées et remises en incubation en milieu normal, les nucléotides disparaissent.

D'autres procédés permettent d'inhiber la synthèse de la paroi de *Staphylococcus aureus*. La cyclosérine, la bacitracine, la chlortétracycline (citée par 117) ainsi que le violet de gentiane (116) et l'élimination de la lysine du milieu de culture (cette fois en l'absence de pénicilline) (115) provoquent également l'accumulation de nucléotides. Les deux procédés cités en dernier lieu sont particulièrement intéressants car à chacun d'eux correspond l'accumulation d'un nucléotide particulier. De cette façon, les différents nucléotides apparaissent comme les membres d'une suite métabolique dont l'aboutis-

sant est (fig. 5) l'uridine-diphosphate-acétylmuramyle-L alanine-D acide glutamique-L lysine-D alanine-D alanine. Le rôle de ce dernier nucléotide résiderait enfin dans le transfert du résidu acide muramique-peptide, c'est-à-dire de l'unité mucopeptidique la plus simple, à un accepteur de la paroi cellulaire. Ce transfert serait bloqué par la pénicilline avec, pour conséquence, soit la lyse de la culture si elle est en phase de multiplication, soit l'accumulation intracellulaire de nucléotides si les cellules sont au repos.

Il est malheureusement trop tôt pour savoir si réellement l'accumulation des nucléotides est un phénomène susceptible d'être retrouvé dans toute cellule bactérienne dont la synthèse de la paroi serait inhibée par un procédé adéquat. Certaines observations militent cependant en faveur de cette hypothèse. 1) La lyse de *Streptococcus faecalis* par élimination de la lysine du milieu de culture (118) serait due à une inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (119). 2) La lyse et, dans des conditions appropriées, la formation de sphéroplastes d'*Escherichia coli* par la glycine (120) agent qui, par ailleurs et selon Park (121), produirait également l'accumulation de nucléotides uridiniques chez *Staphylococcus aureus*. 3) La lyse de mutants d'*Escherichia coli* exigeant l'acide diaminopimélique, lorsqu'ils sont cultivés en présence de quantités limitées de cet acide aminé (122, 123). L'analogie avec *Staphylococcus aureus* serait complète si, comme Strominger et collaborateurs (124) l'ont annoncé, une accumulation intracellulaire d'esters d'acétylhexosamine est confirmée.

Les expériences accumulées à ce jour sont forcément disparates et limitées. La pénicilline qui, chez *Staphylococcus aureus* bloque le transfert dans la paroi en formation, du complexe mucopeptide, provoque chez des bactéries très diverses la lyse de la cellule ou sa transformation en protoplaste. Inversement, des agents variés provoquant les mêmes phénomènes de lyse ou de transformation en protoplaste, semble agir par un mécanisme qui, en fin de compte, aurait un effet identique à celui de la pénicilline. Le mucopeptide serait donc l'élément essentiel qui assure la rigidité des parois bactériennes quelles qu'elles soient.

Il ne faut cependant pas perdre de vue que, lors de l'inhibition de la synthèse de la paroi par un agent quelconque, des processus métaboliques autres que le transfert du mucopeptide pourraient également être bloqués, comme par exemple la biosynthèse des acides téichoïques. Armstrong et collaborateurs (93) ont signalé l'accumulation de cytidine-diphosphate-ribitol chez *Staphylococcus aureus* inhibé par le chloramphénicol ou le Crystal Violet. Mais il est douteux que les acides téichoïques soient responsables de la rigidité des parois qui en contiennent. En effet, la lyse par le lysozyme des parois de *Bacillus megaterium* KM est

due à la rupture de certaines liaisons glycosidiques de la fraction polysaccharidique. L'acide téichoïque se retrouve apparemment intact dans la fraction non dialysable, associé à de petits résidus mucopeptidiques.

Par ailleurs, le rôle essentiel joué par le mucopeptide dans les parois de bactéries gram-négatives est bien confirmé par leur dissolution sous l'action du lysozyme, dans des conditions particulières de pH ou en présence de versène (125, 126), ou sous l'action de l'actinomycétine lorsque les suspensions d'*Escherichia coli*, par exemple, ont été lyophilisées puis réhydratées (127). Lors de la digestion par le lysozyme, acétylglucosamine, acide muramique, acide diaminopimélique, alanine et acide glutamique sont libérés de la paroi (128). Ajoutons aussi que ces mêmes substances ont été obtenues par hydrolyse acide du complexe, libéré des parois d'*Escherichia coli* lors de leur dissolution sous l'action lytique des phages T (31).

Ainsi que l'a suggéré Salton, les parois des organismes gram-négatifs seraient constituées d'un réseau mucopeptidique fin mais rigide, recouvert d'un film plastique de lipoprotéines. Lorsque ce réseau est détruit, ou que sa synthèse est inhibée, la paroi ne peut plus résister à la pression cellulaire interne et, selon les conditions osmotiques du milieu, la bactérie se lyse ou se transforme en sphéroplastes.

IX. - Conclusion.

Les parois cellulaires bactériennes forment un groupe chimique très diversifié mais qu'une structure de base commune distingue complètement de celles, constituées de cellulose, chitine, glucane ou mannane, des plantes, des champignons et des levures. Cette structure de base est constituée de cinq à six substances seulement, deux N-acétylhexosamines et trois à quatre acides aminés, et est en fait l'élément rigide essentiel de la paroi.

Laboratoire de Microbiologie
de l'Université de Liège
et C. N. P. E. M. à Liège

BIBLIOGRAPHIE

- (1) A. FISCHER : Jahrb. wiss. Botan., 1895, 27, 1.
- (2) A. FISCHER : Vorlesungen über Bakterien, 20 (Verlag von Gustav Fischer, Jena, Germany, 1903, 374).
- (3) M.R.J. SALTON et R.W. HORNE : Biochim. Biophys. Acta, 1951, 7, 177.
- (4) H. MICKLE : J.R. Microsc. Soc., 1948, 68, 10.
- (5) J.C. CARVER et R.L. EPSTEIN : Appl. Microbiol., 1959, 7, 318.
- (6) C. LAMANA, M.A. CHATIGNY et E.H. COLLEDGE : J. Bact., 1959, 77, 104.
- (7) B. ROTMAN : J. Bact., 1956, 72, 827.
- (8) M.R.J. SALTON : Bioch. Biophys. Acta, 1952, 8, 510 et 1953, 10, 512.

- (9) M. McCARTY : J. exp. Med., 1952, 96, 569.
- (10) R.C. LANCEFIELD : J. exp. Med. 1949, 78, 465.
- (11) S.S. BARKULIS et M.F. JONES : J. Bact., 1957, 74, 207.
- (12) M.R.J. SALTON et R.C. WILLIAMS : Bioch. Biophys. Acta, 1954, 14, 455.
- (13) D.T. MASON et D. POWELSON : Bioch. Biophys. Acta, 1958, 29, 1.
- (14) R.C. WILLIAMS : Exp. Cell. Res., 1953, 4, 188.
- (15) E. KELLENBERGER et A. RYTER : J. Biophys. Biochem. Cytol., 1958, 4, 323.
- (16) G. PUKARSKI et P. GRIESBRECHT : Naturwissenschaften, 1956, 43, 89.
- (17) A.L. HOUWINK : Bioch. Biophys. Acta, 1953, 10, 360.
- (18) W. LABAW et V.M. MOSLEY : Bioch. Biophys. Acta, 1954, 15, 325.
- (19) P. MITCHELL et J. MOYLE : Bacterial Anatomy. The 6th Symp. Soc. Gen. Microbiol., 1956, p. 150.
- (20) K. McQUILLEN : The 6th Symp. Soc. Gen. Microbiol. 1956, p. 127.
- (21) L.M. KOZLOFF et M. LUTE : J. Biol. Chem., 1959, 234, 539.
- (22) P.P. DUKES et L.M. KOZLOFF : J. Biol. Chem., 1959, 234, 534.
- (23) E. KELLENBERGER et W.E. ARBER : Z. Naturforsch., 1955, 10b, 698.
- (24) J.E. HOTCHIN, I.M. DAWSON et W.J. ELFORD : Brit. J. exp. Pathol., 1952, 33, 177.
- (25) M.R.J. SALTON : The Nature of Virus. Ciba Found. Symp., 1956, p. 263.
- (26) W. WEIDEL : Z. Naturforsch., 1951, 6b, 251.
- (27) W. WEIDEL, J. KOCH et F. LOKSS : Z. Naturforsch., 1954, 9b, 398.
- (28) W. WEIDEL : Hoppe-seyl. Z., 1955, 299, 253.
- (29) W. WEIDEL et E. KELLENBERGER : Bioch. Biophys. Acta, 1955, 17, 1.
- (30) J.S. MURPHY : Virology, 1957, 4, 563.
- (31) W. WEIDEL et J. PRIMOSIGH : J. Gen. Microbiol., 1958, 18, 513.
- (32) W.F. CAREY, W. SPELMAN et L.S. BARON : J. Bact., 1957, 74, 543.
- (33) M.R.J. SALTON et K. McQUILLEN : Bioch. Biophys. Acta, 1955, 17, 465.
- (34) E. BOREK et A. RYAN : Bioch. Biophys. Acta, 1959, 36, 386.
- (35) R.E. STRANGE et J.F. POWELL : Bioch. J., 1954, 58, 80.
- (36) R.E. STRANGE et F.A. DARK : Nature, 1956, 177, 286.
- (37) C.S. CUMMINS et H. HARRIS : Bioch. J., 1954, 58, 57.
- (38) C.S. CUMMINS et H. HARRIS : J. Gen. Microbiol., 1956, 14, 583.
- (39) W. WEIDEL et J. PRIMOSIGH : Z. Naturforsch., 1957, 12, 441.
- (40) H.R. PERKINS et H.J. ROGERS : Bioch. J., 1958, 69, 15 P.
- (41) R.S. STRANGE et L.H. KENT : Bioch. J., 1959, 71, 333.
- (42) E. WORK : Bioch. J., 1951, 49, 17.
- (43) E.S. HOLDSWORTH : Bioch. Biophys. Acta, 1952, 8, 110.
- (44) E.S. HOLDSWORTH : Bioch. Biophys. Acta, 1952, 9, 19.

- (45) M.R.J. SALTON : Bioch. Biophys. Acta, 1953, 10, 512.
 (46) C.S. CUMMINS et H. HARRIS : J. Gen. Microbiol., 1955, 13, iii.
 (47) H. SMITH, R.E. STRANGE et H.J. ZWARTROUW : Nature, 1956, 173, 865.
 (48) E. WORK et D. DEWEY : J. Gen. Microbiol., 1953, 9, 394.
 (49) L.E. RHULAND, E. WORK, R.F. DENMAN et D.S. HOARE : J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 4844.
 (50) D.S. HOARE et E. WORK : Bioch. J., 1955, 61, 562.
 (51) E.E. SNELL, N.S. RADIN et M. IKAWA : J. Biol. Chem., 1955, 217, 803.
 (52) M. IKAWA et E.E. SNELL : Bioch. Biophys. Acta, 1956, 19, 576.
 (53) R.E. STRANGE et C.B. THORNE : Bioch. Biophys. Acta, 1957, 24, 199.
 (54) M.R.J. SALTON et J.M. GHUYSEN : Bioch. Biophys. Acta, 1957, 24, 160.
 (55) A. FLEMING : Proc. Roy. Soc. London : Ser. B., 1922, 93, 306.
 (56) K. MEYER, J.W. PALMER, R. THOMPSON et D. KHORAZO : J. Biol. Chem. 1936, 113, 479.
 (57) M.R.J. SALTON : Nature, London, 1952, 170, 746.
 (58) H.R. PERKINS : Bioch. J., 1960, 74, 186.
 (59) J. IMMERS et E. VASSEUR : Nature, 1950, 165, 898.
 (60) V. INGRAM et M.R.J. SALTON : Bioch. Biophys. Acta, 1957, 24, 9.
 (61) M.R.J. SALTON : Bioch. Biophys. Acta, 1956, 22, 495.
 (62) H.R. PERKINS : Bioch. J., 1960, 74, 182.
 (63) M.R.J. SALTON et J.M. GHUYSEN : Bioch. Biophys. Acta, 1959, 36, 532.
 (64) J.M. GHUYSEN et M.R.J. SALTON : Bioch. Biophys. Acta 1960, 40, 462.
 (65) M.R.J. SALTON : Bioch. Biophys. Acta, 1959, 34, 308.
 (66) J.M. GHUYSEN : Biochim. Biophys. Acta 1960, 40, 473.
 (67) Acta, 1957, 26, 517.
 (68) M.H. RICHMOND : Bioch. Biophys. Acta, 1959, 33, 78.
 (69) W. KAUFMANN et K. BAUER : Naturwissenschaften, 1956, 43, 403.
 (70) M.H. RICHMOND, Bioch. Biophys. Acta, 1959, 33, 92.
 (71) M. I. NAKHIMSOVSKAIA : Microbiologiya, 1937, 6, 131.
 (72) A.E. KRIS : Microbiologiya, 1940, 9, 32.
 (73) S.A. WAKSMAN : Bact. Rev., 1941, 5, 231.
 (74) M.R.J. SALTON : J. Gen. Microbiol., 1955, 12, 25.
 (75) J.-M. GHUYSEN : Arch. intern. Physiol. Bioch., 1957, 65, 173.
 (76) M. WELSCH : Rev. Belge Pathol. Méd. expérim., 1947, 28, 1.
 (77) W. BRUMFITT, A.C. WARDLAW et J.T. PARK : Nature, 1958, 181, 1783.
 (78) W. BRUMFITT : Brit. J. exp. Pathol., 1950, 40, 441.
 (79) R.W. JEANLOZ et M. TREMEGE : Fed. Proc., 1956, 15, 282.
 (80) J. T. PARK : J. biol. Chem., 1952, 194, 877.
 (81) J. T. PARK : J. biol. Chem., 1952, 194, 885 et 897.
 (82) J. T. PARK : Fed. Proc., 1954, 13, 271.
 (83) A. ABRAMS : J. biol. Chem., 1958, 230, 949.
 (84) H.R. PERKINS et H.J. ROGERS : Bioch. J., 1958, 69, 15 P.
 (85) P. MITCHELL et J. MOYLE : Nature, 1950, 166, 218.
 (86) P. MITCHELL et J. MOYLE : J. gen. Microbiol., 1951, 5, 421.
 (87) P. MITCHELL et J. MOYLE : J. gen. Microbiol., 1951, 5, 981.
 (88) P. MITCHELL et J. MOYLE : J. gen. Microbiol., 1954, 10, 533.
 (89) P. MITCHELL et J. MOYLE : Proc. Roy. Phys. Soc. (Edinburgh) 1958, 27, 79.
 (90) P. MITCHELL : Giorn. Microbiol., 1956, 2, 440.
 (91) J.J. ARMSTRONG, J. BADDILEY, J.G. BUCHANAN, B. CARSS et G.R. GREENBERG : J. chem. Soc., 1958, 882, 4344.
 (92) J. BADDILEY, J.G. BUCHANAN et B. CARSS : Bioch. Biophys. Acta, 1958, 27, 220.
 (93) J.J. ARMSTRONG, J. BADDILEY, J.G. BUCHANAN et B. CARSS : Nature, 1958, 181, 1692.
 (94) J.G. BUCHANAN, G.R. GREENBERG, B. CARSS, J.J. ARMSTRONG et J. BADDILEY : 4th. Intern. Cong. Bioch., Vienne, 1958, 7.
 (95) J.J. ARMSTRONG, J. BADDILEY, J.G. BUCHANAN, A.L. DAVISON, M.V. KELEMEN et F.C. NEUHAUS : Nature, 1959, 184, 247.
 (96) J.J. ARMSTRONG, J. BADDILEY et J.G. BUCHANAN : Nature, 1959, 184, 250.
 (97) J. BADDILEY : Proc. Chem. Soc., 1959, 177.
 (98) L. GLASER : J. biol. Chem., 1958, 232, 627.
 (99) L. GLASER et D.H. BROWN : J. biol. Chem., 1957, 228, 729.
 (100) K. McQUILLEN : Bioch. Bioph. Acta, 1955, 17, 382.
 (101) E. WORK : Nature, 1957, 179, 841.
 (102) J. TOMCSIK et S. GUEX-HOLZER : Schweiz. Z. allg. Path. Bakt., 1952, 15, 517.
 (103) C. WEIBULL : J. Bact., 1953, 66, 688.
 (104) W. MUTSAARS : Ann. Inst. Pasteur, 1955, 89, 166.
 (105) J.M. WIAME, R. STORCK et E. VANDERWINKEL : Bioch. Bioph. Acta, 1955, 18, 353.
 (106) P. MITCHELL et J. MOYLE : J. gen. Microbiol., 1956, 15, 512.
 (107) M. WELSCH : C. R. Soc. Biol., 1959, 153, 352.
 (108) M. WELSCH : Bull. Acad. Roy. Méd. Belg., 1960 (sous presse).
 (109) J. LEDERBERG : J. Bact., 1957, 73, 144.
 (110) J.T. PARK et J.L. STROMINGER : Science, 1957, 125, 99.
 (111) J.L. STROMINGER : J. bioch. Chem., 1957, 224, 509.
 (112) J.L. STROMINGER et H. SMITH : Fed. Proc., 1957, 1, 16.
 (113) J.L. STROMINGER et R.E. THOMPSON : J. Pharmacol. exp. Ther., 1957, 2, 119.
 (114) J. L. STROMINGER, R. H. THRENN et S. NATHANSON : J. Pharmacol. exp. Ther., 1958, 1, 122.
 (115) J.L. STROMINGER et R.H. THRENN : Bioch. Biophys. Acta, 1959, 36, 83.
 (116) J.L. STROMINGER : J. biol. Chem., 1959, 234, 1520. Ann. Rev. Microbiol., 1959, 13, 1.
 (117) R.B. ROBERTS, K. McQUILLEN et J.Z. ROBERTS :
 (118) G. TOENNIÉS et D.L. GALLANT : J. Biol. Chem., 1949, 177, 851.
 (119) G.D. SCHOCKMAN, J.J. KOLB et G. THENNIES : J. biol. Chem., 1958, 230, 961.

- (120) M. WELSCH : Schweiz. Allg. Pathol. Bakt. 1958, 21, 741.
 (121) J. T. PARK : Bioch. J., 1958, 70, 2 P.
 (122) P. MEADOW, D.S. HOARE et E. WORK : Bioch. J., 1957, 66, 270.
 (123) L. E. RHULAND : J. Bact., 1957, 73, 778.
 (124) J.L. STROMINGER, S.S. SCOTT et R.H. THRENN : Fed. Proc., 1959, 18, 334.
 (125) N.D. ZINDER et W.F. ARNDT : Proc. U. S. Nat. Acad. Sci., 1956, 42, 586.
 (126) R. REPASKE : Bioch. Bioph. Acta, 1956, 22, 189.
 (127) M. WELSCH : C. R. Soc. Biol., 1959, 153, 370.
 (128) M.R.J. SALTON : J. gen. Microbiol., 1958, 18, 481.

The chemical composition of the microbial cell-walls is most variable. However, all of them contain a complex constituted of two N-acetylhexosamines and three or four aminated acids.

This complex constitutes almost the whole of the cellwalls of the « Micrococcus lysodeikticus » ; the structure of which is thoroughly examined. In other cases it only represents a sometimes tiny percentage of the global composition of the cellwall ; however, for the principal part at least, it would always be responsible for the wall's rigidity.

Owing to this property this complex has received the name of « basic mucopeptide ».

Die chemische Zusammensetzung der Zellwände von Bakterien ist sehr verschieden. Alle enthalten jedoch einen Komplex von zwei N-Acetylhexosaminen und drei oder vier Aminosäuren.

Die Zellwand von Micrococcus lysodeikticus besteht beinahe völlig aus diesem Komplex und ihre Struktur wird eingehend untersucht. In anderen Fällen stellt er des öfteren lediglich einen sehr geringen Anteil der globalen Zusammensetzung der Wand dar. Prinzipiell scheint dieser Komplex jedoch für die Steifheit der Zellwand verantwortlich zu sein.

Infolge dieser Eigenschaft wurde ihm die Bezeichnung « Basis-Mucopeptid » gegeben.

CLASSIFICATION DECIMALE.

Nos lecteurs auront constaté qu'en vue de faciliter le classement de nos articles, nous mentionnons, en tête de chaque article, le numéro de la classification décimale universelle (C. D. U.).

Ces numéros ayant toutefois été omis dans notre numéro 8 (1960), nous les indiquons ci-dessous, en regard des titres des articles qui y étaient publiés :

DECIMAL CLASSIFICATION:

Our readers will have noticed that in order to facilitate the classification of our articles, we mention at the heading of each paper the General Decimal Classification number (C. D. U.).

Since these numbers have been omitted in our issue Nr. 8 (1960) you will find them underneath facing the title of each published article :

Un grand savant étranger en Belgique : August Kekulé, par J. Gillis.

92 (Kekulé)

Les méthodes non aqueuses, voies de l'avenir dans le retraitement des combustibles nucléaires, par J. Fuger.

66.022.97 : 539.162.

L'électrochimie organique et ses tendances, par I. Gillet.

541.13 : 547.

DECIMALE CLASSIFICATIE.

Onze lezers bemerkten hebben dat wij, om het classificeren van onze artikels te vergemakkelijken, bovenaan elke mededeling het nummer van de Algemene Decimale Classificatie (C. D. U.) aanduiden.

Daar deze nummers echter in onze uitgave Nr. 8 (1960) weggelaten werden, duiden wij ze hieronder aan tegenover de titels der gepubliceerde mededelingen :

DEZIMALKLASSIFIKATION.

Unsere Leser haben feststellen können, dass wir um die Klassifikation der Referate zu erleichtern, oben an jeder Mitteilung die Nummer der Universalen Dezimalklassifikation erwähnen (C. D. U.).

Da diese Nummern jedoch in unseren 8. Heft (1960) unterlassen wurden, geben wir sie hierunter gegenüber dem Titel eines jeden publizierten Artikels bekannt :