

BACTÉRIOLOGIE. — *De la présence d'un glycopeptide dans la paroi de Bdellovibrio bacteriovorus.* Note (*) de M^{lle} Regina Tinelli, M. Moshe Shilo, M^{me} Maryvonne Laurent et M. Jean-Marie Ghuysen, présentée par M. André-Romain Prévot.

La présence dans la paroi de *Bdellovibrio bacteriovorus* d'un peptidoglycane à acide méso-diaminopimélique confirme le caractère procaryotique de ce micro-organisme.

Découvert par Stolp et coll. en 1962 [(¹), (²)] *Bdellovibrio bacteriovorus* est un micro-organisme parasite de certaines bactéries à Gram négatif dont il provoque la lyse [(³), (⁴)]. Son action lytique sur les bactéries ne peut pas être distinguée extérieurement des effets de la lyse induite par les bactériophages (⁵); sa taille (0,3 × 1 μ), voisine de celle des Rickettsies, le situe également entre les virus et les bactéries. Cependant, examiné au microscope électronique, *Bdellovibrio bacteriovorus* se présente comme une cellule flagellée typiquement procaryotique (⁶), entourée d'une paroi nettement différenciée. On sait que la paroi des Procaryotes contient un élément caractéristique, le glycopeptide (peptidoglycane, mucopeptide, muréine), hétéropolymère responsable de la forme et de la survie de la bactérie. Cet hétéropolymère [(⁷), (⁸)] est constitué de chaînes osidiques linéaires (-N-acétylglucosaminyl-acide N-acétylmuraminyl-) substituées par des unités tétrapeptidiques (L-alanyl-γ-D-glutaminyl-L-R₃-D-alanine) reliées entre elles, à des degrés divers, par des ponts interpeptidiques de nature variable selon les bactéries (⁷). Le résidu R₃ est le plus souvent de la L-lysine, ou de l'acide LL ou méso-diaminopimélique ou de la L-ornithine.

Afin de préciser la nature procaryotique de *B. bacteriovorus*, nous avons donc recherché, dans sa paroi, les composants caractéristiques d'un glycopeptide bactérien.

CONDITIONS DE CULTURE. — Les souches utilisées sont : *Bdellovibrio bacteriovorus* 109 et la souche sensible de *Escherichia coli* B 2262.

Le parasite est inoculé dans une culture de *E. coli* en fin de phase logarithmique de croissance; la lyse des cellules-hôtes est totale en 20 h environ. Les cellules de *B. bacteriovorus* sont alors recueillies par centrifugation, lavées et lyophilisées (¹⁰); un examen au microscope électronique a montré l'absence totale de cellules de *E. coli* et de débris cellulaires; les cellules de *B. bacteriovorus* ont perdu leur flagelle.

MÉTHODES ANALYTIQUES. — La composition en amino-acides a été déterminée à l'aide d'un autoanalyseur « Technicon », après hydrolyse par HCl 6 N pendant 20 h à 120°. Les isomères de l'acide diaminopimélique (DAP) ont été déterminés par chromatographie en utilisant la technique de Rhuland, Work et coll. (¹¹), puis celle de Jusic et coll. (¹²). La D- et la L-alanine ont été dosées par les méthodes enzymatiques spécifiques (¹³). L'acide D-glutamique a été caractérisé par différence après action de la L-glutamate-décarboxylase de *Clostridium perfringens* SR 12.

Les amino-sucres ont été dosés (après hydrolyse par HCl 6 N, 6 h à 100°) suivant la technique de Morgan-Elson ; la glucosamine est dosée spécifiquement par action enzymatique (14).

OBTENTION DE FRACTIONS GLYCOPEPTIDIQUES. — 3 préparations enrichies en glycopeptide ont été obtenues selon les procédés suivants :

1. *Par broyage mécanique des cellules lyophilisées au moyen de poudre d'aluminium « Alcoa »*, des parois ont été séparées ; après purification par centrifugations différentielles, délipidation et trypsination, elles ont été lyophilisées (rendement : 2 %) ; (l'utilisation de ballotini en verre selon la technique habituelle de préparation des parois bactériennes a donné un rendement très inférieur : 0,1 %).

2. *Par traitement direct de cellules lyophilisées (2,9 g) par les solvants suivants, à température ambiante* : alcool-éther (1-1) 20 h ; chloroforme-méthanol (2-1) 20 h ; puis, potasse alcoolique à 0,5 % (48 h à 37°) ; acide acétique N/10 (12 h à 60°). Le résidu a été ensuite soumis à l'action de la trypsine puis à celle de la pronase (4 h à 37° pH 8,5). La fraction obtenue pesait 84 mg (rendement : 3 %).

3. *Par autolyse* : la préparation précédente, mise en suspension dans du tampon véronal 0,01 M (pH 8,5) à 37° est encore susceptible de se lyser. Cette autolyse qui s'est vraisemblablement déjà manifestée lors des traitements précédents, provoque en 20 h une perte de 50 % (en poids). Le résidu insoluble a été récupéré et analysé.

RÉSULTATS. — Dans les 3 préparations nous avons caractérisé les composants spécifiques des glycopeptides pariétaux des bactéries : acide muramique, glucosamine, acide D-glutamique, acide méso-diaminopimélique, D-alanine, ainsi que de nombreux autres acides aminés : L-alanine, glycine, acide aspartique, sérine, thréonine, valine, leucine, isoleucine, phénylalanine, histidine, arginine, tyrosine, proline. Les dosages indiquent que les préparations 1 et 2 sont essentiellement des complexes glycopeptide (30 %)-protéines (70 %) encore liés à des lipides et à des polysides. Par contre, dans la préparation obtenue par autolyse de la préparation n° 2 ce rapport est totalement modifié : le complexe contient 70 % de glycopeptide et 30 % de protéines (tableau).

De plus, dans cette préparation, acide muramique, glucosamine, D-et L-alanine, acide méso-diaminopimélique et glycine existent dans des rapports molaires voisins de 1-1-2-1-1.

La faible teneur en lysine indique que cet acide aminé ne fait pas partie du glycopeptide pariétal.

TABLEAU

Composition en amino-sucres et amino-acides de la préparation n° 3 en μ moles/mg

Acide muramique .	194	Acide aspartique ..	85	Phénylalanine ..	90
Glucosamine	206	Sérine	120	Tyrosine	30
DAP	270	Thréonine	85	Lysine	50
Alanine totale	530	Valine	90		
Acide glutamique .	242	Leucine	160		
Glycine	207	Isoleucine	65		

En ce qui concerne l'autolyse, des résultats préliminaires ont montré que cette autolyse est due à une action protéolytique, bien que la souche de *B. bacteriovorus* utilisée n'excrète pas de protéase (9).

Des cellules entières de *B. bacteriovorus* mises dans les mêmes conditions d'incubation subissent également une autolyse de 50 % environ. Dans les surnageants des autolysats de glycopeptide et de cellules entières, nous avons décelé, après électrophorèse sur agarose et révélation spécifique des protéases (15), 2 enzymes migrant vers l'anode.

CONCLUSIONS. — *Bdellovibrio bacteriovorus* contient un glycopeptide pariétal analogue à celui des *Eubactéries* comprenant de l'acide méso-diaminopimélique et vraisemblablement de la glycine : la glycine pouvant, soit substituer la fonction α -carboxyle de l'acide D-glutamique, soit former des ponts interpeptidiques. S'il était prouvé ultérieurement que la glycine est réellement un composant du glycopeptide pariétal, *B. bacteriovorus* offrirait le premier exemple d'un peptidoglycane contenant simultanément ces 2 acides aminés ; il se distinguerait de la cellule-hôte de *E. coli* où le glycopeptide, à méso-DAP, ne contient pas de ponts glycine [(16), (17)].

Le peptidoglycane de *B. bacteriovorus* qui ne représente qu'une faible fraction de la cellule (environ 1 %), est intimement lié à d'autres polymères pariétaux : polysides, protéines et lipides, ce qui apparente la paroi de *B. bacteriovorus* à celle des bactéries à Gram négatif.

B. bacteriovorus souche 109 qui ne sécrète pas de protéase, possède cependant un puissant système protéolytique particulière, responsable de l'autolyse partielle de la paroi et dont l'action sur la fraction protéique pariétale a permis d'obtenir des préparations enrichies en glycopeptide.

(*) Séance du 11 mai 1970.

(1) H. STOLP et H. PETZOLD, *Phytopathol.*, Z., 45, 1962, p. 364.

(2) H. STOLP et M. P. STARR, *Antonie van Leeuwenhoek*, 29, 1963, p. 217.

(3) M. SHILO, *Science J.*, 2, 1966, p. 33 ; *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 50, 1969, p. 174.

(4) J. C. BURNHAM, T. HASHIMOTO et S. F. CONTI, *J. Bact.*, 96, 1968, p. 1366 ; 101, 1970, p. 997.

(5) H. STOLP, *Naturwissenschaften*, 2, 1968, p. 57.

(6) D. ELAR, in : *Organization and Control in Prokaryotic and Eukaryotic Cells*, Cambridge, Univ. Press, 1970.

(7) J. M. GHUYSEN, *Bact. Rev.*, 32 (2), 1968, p. 425.

(8) R. TINELLI, *Bull. I. P.*, 66, 1968, p. 2507.

(9) M. SHILO et B. BRUFF, *J. Gen. Microbiol.*, 40, 1965, p. 317.

(10) M. VARON et M. SHILO, *J. Bact.*, 99, 1969, p. 136.

(11) L. E. RHULAND, E. WORK, R. F. DENMAN et D. S. HOARE, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1955, p. 4844.

(12) D. JUSIC, C. ROY, A. J. SCHOCHER et R. W. WATSON, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41, 1963, p. 817.

(13) J. M. GHUYSEN, D. J. TIPPER et J. L. STROMINGER, *Meth. Enzymology*, 8, 1966, p. 685.

(14) O. LÜDERITZ, D. ALASTAIR, R. SIMMONS, O. WESTPHAL et J. L. STROMINGER, *Analyt. Biochem.*, 9, 1964, p. 263.

(15) J. URIEL, T. WEBB et C. LAPRESLE, *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 42, 1960, p. 1285.

(16) W. WEIDEL et H. PELZER, *Ad. in Enzymol.*, 1964, p. 193.

(17) J. VAN HEIJENOORT, L. ELBOZ, Ph. DEZELEE, J. F. PETIT, E. BRICAS et J. M. GHUYSEN, *Biochem.*, 8, 1969, p. 207.

Par une communication personnelle du Professeur H. Stolp, nous apprenons que le Professeur H. H. Martin (Darmstadt) a trouvé, dans la paroi de *B. bacteriovorus*, du DAP et de l'acide muramique.

(R. T., M. L., *Institut Pasteur*,
25, rue du Docteur-Roux, 75-Paris, 15^e ;
M. S., *The Hebrew University-Hadassah Medical School*,
Jérusalem, Israël ;
J.-M. G., *Faculté de Médecine, Liège, Belgique.*)

