

COMPOSITION DES LIPOPOLYSACCHARIDES DE LA SOUCHE SAUVAGE P678 ET DE LA SOUCHE MUTANTE PM61 DE *ESCHERICHIA COLI* K12

Denis BLACHE, Maud BRUNETEAU and Georges MICHEL

Laboratoire de Biochimie Microbienne, Université de Lyon I, 43, Boulevard du 11 Novembre 1918 F-69621, Villeurbanne, France

Received 13 September 1977

SUMMARY

The composition of the lipopolysaccharides from *E. coli* K12 P678 and from a mutant strain PM61 was investigated. No difference was found between the lipopolysaccharides of both strains. These bacteria belong to the CR34 serologic type in the group of *E. coli* K12.

1. Introduction

Plusieurs types de lipopolysaccharides ont été caractérisés chez *Escherichia coli*. Le groupe de *E. coli* K12 a été étudié avec les souches CR34, D21, W300 et avec des mutants obtenus à partir de ces souches [1–6]. On distingue plusieurs types sérologiques à l'intérieur du groupe K12. Le lipopolysaccharide de la souche CR34 renferme le glucopyranose, le galactose et le L-glycero-D-mannoheptose, ces deux oses sont sous les deux formes pyranique et furanique; la glucosamine n'est présente que dans le lipide A. Les souches D21 et W300 renferment les mêmes sucres, sous forme pyranique seulement, avec en plus le rhamnose [5,6]; d'autre part la glucosamine est présente dans le polysaccharide du noyau.

Starka et al. ont isolé à partir de la souche sauvage P678 de *Escherichia coli* K12 un mutant PM61 présentant des anomalies dans la morphologie et la division cellulaire [7,8]. La composition en phospholipides est différente pour les deux souches, la souche mutante est caractérisée par un pourcentage très élevé en diphosphatidylglycérol [7,9]. Par ailleurs ce mutant présente une sensibilité à la pénicilline, à la D-cyclosérine et à la rifampicine supérieure à celle de la souche parente [7].

Nous avons étudié la composition des lipopolysaccharides des deux souches P678 et PM61, d'une

part pour rechercher une relation éventuelle entre la sensibilité aux antibiotiques et une modification de la structure de l'enveloppe lipopolysaccharidique, d'autre part pour préciser le type sérologique de ces souches dans le groupe de *E. coli* K12.

2. Matériel et méthodes

2.1. Isolement du lipopolysaccharide et obtention du polysaccharide

Les conditions de culture ont été décrites précédemment [10]. Les bactéries sont recueillies en fin de phase exponentielle, lavées à l'eau distillée puis lyophilisées. Le lipopolysaccharide est extrait par le mélange phénol/chloroforme/éther de pétrole (2/5/8, en vol.) selon [11], il est purifié par centrifugation à 100 000 $\times g$ pendant 4 h.

Le polysaccharide est obtenu par traitement du lipopolysaccharide avec une solution à 1% d'acide acétique pendant 45 min à 110°C. Il est purifié sur colonne de Sephadex G-15 avec élution par le solvant: pyridine/acide acétique/eau (125/18/1500, en vol.).

2.2. Analyse des acides gras

L'hydrolyse acide du lipide A est effectuée par HCl 4 N pendant 5 h à 100°C [12], les acides gras sont extraits à l'éther. Ils sont étudiés par chromatographie

en phase gazeuse après méthylation par le diazo-méthane, les pourcentages de chaque ester sont calculés par mesure de l'aire des pics. Les chromatographies sont réalisées à 160°C sur une colonne (200 × 0,3 cm) de diéthylène glycol succinate 10% sur chromosorb W 80–100 mesh.

2.3. Analyse des sucres

Les méthodes analytiques ont été décrites précédemment [2]. L'analyse quantitative des sucres a été réalisée soit par colorimétrie, soit par chromatographie gazeuse des acétates d'alditols à 170°C sur une colonne contenant 3% de ECNSS-M sur chromosorb G 80–100 mesh [13]. La recherche des esters phosphoriques d'oses a été effectuée par électrophorèse sur papier à pH 5,4 dans le solvant: pyridine/eau/acide acétique (2,5/1000/9, en vol.).

2.4. Analyse des sucres méthylés

Les lipopolysaccharides et les polysaccharides sont méthylés selon la méthode de Hakomori [14] et Hellerqvist et al [15]. Ils sont ensuite purifiés par passage sur colonne de Sephadex LH-20 dans le solvant éthanol/chloroforme (2/1, en vol.) puis hydrolysés. Les sucres méthylés sont réduits en alditols par le borodeutériure de sodium en présence de $^2\text{H}_2\text{O}$ puis acétylés. Les acétates d'alditols partiellement méthylés sont analysés par chromatographie gazeuse.

2.5. Méthodes sérologiques

Les tests d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination sont réalisés selon la méthode décrite par Beckmann et al. [16] et modifiée selon Ruschmann et al. [17].

3. Résultats

Le lipopolysaccharide représente 2,6% du poids sec de *E. coli* P678 et 1,7% de *E. coli* PM61.

3.1. Propriétés immunologiques des lipopolysaccharides

L'hémagglutination de l'antisérum *E. coli* K12 CR34 avec le lipopolysaccharide homologue est inhibée par les lipopolysaccharides des souches P678 et PM61 à la concentration de 40 µg/ml. La structure de ces lipopolysaccharides est donc voisine de celle du lipopolysaccharide de la souche CR34.

3.2. Composition des lipopolysaccharides et des polysaccharides

L'analyse quantitative des sucres du lipopolysaccharide et du polysaccharide des souches P678 et PM61 a été réalisée soit par chromatographie gazeuse des acétates d'alditols [13], soit par dosage colorimétrique, les résultats sont indiqués dans le tableau 1. Les lipopolysaccharides des deux souches sauvage et mutante, fermentent le galactose, le glucose, la glucosamine, le L-glycero-D-mannoheptose et l'acide 3-désoxyoctulosonique. La glucosamine est absente du noyau polysaccharidique, elle se trouve dans le lipide A. Le glucose et le galactose possèdent la configuration D, ils sont oxydés respectivement par la D-glucose-oxydase et la D-galactose-oxydase. Le L-glycero-D-mannoheptose est identifié par chromatographie gazeuse de l'acétate d'alditol.

3.3. Analyse des acides gras du lipide A

Le lipide A est hydrolysé et les acides gras sont étudiés après méthylation par chromatographie en phase gazeuse. La composition en acides gras de

Tableau 1
Composition du lipopolysaccharide et du polysaccharide des souches P678 et PM61 de *E. coli* K12

Composé	Composition (%) du			
	lipopolysaccharide P678	polysaccharide P678	lipopolysaccharide PM61	polysaccharide PM61
Galactose	2,8	7,4	3,2	6,9
Glucose	9,6	21,8	10,3	18,6
Heptose	19,7	28,6	16,8	31,7
Acide 3-désoxy- octulosonique	9,8	5,0	8,7	7,8
Phosphore	3,5	3,4	3,0	3,0
Glucosamine	6,8	0,4	7,7	0,4

Tableau 2
Composition en acides gras des lipopolysaccharides de *E. coli* K12 P678 et PM61

Constituant	Composition (%) de	
	<i>E. coli</i> P678	<i>E. coli</i> PM61
Acide laurique	6,8	30,8
Acide myristique	30,5	18,7
Acide palmitique	29,3	2,8
Acide stéarique	9,0	—
Acide oléique	5,5	—
Acide β -hydroxymyristique	18,7	47,7

chaque lipopolysaccharide est indiquée dans le tableau 2. Les acides laurique, myristique, β -hydroxymyristique et palmitique existent dans des proportions différentes dans les deux souches, les acides oléique et stéarique sont absents dans le mutant.

3.4. Analyse des lipopolysaccharides et polysaccharides méthylés

Les acétates d'alditols partiellement méthylés provenant des lipopolysaccharides et polysaccharides méthylés sont analysés par chromatographie gazeuse [18,19]. Les composés ont été identifiés d'après leur temps de rétention par rapport au 2,3,4,6-tétra-*O*-méthylglucitol. Les lipopolysaccharide méthylés des deux souches renferment 1e 2,3,4,6-tétra-*O*-méthylgalactose correspondant au galactofuranose et des traces de 2,3,5,6-tétra-*O*-méthylgalactose correspondant au galactofuranose. Le galactose n'est pas substitué dans les lipopolysaccharides. Le glucose se retrouve sous la forme de 2,3,4,6-tétra-*O*-méthylglucose, de 3,4,6- et de 2,3,4-tri-*O*-méthylglucose. Dans la région des heptoses, deux penta-*O*-méthylheptoses, l'un furanique et l'autre pyranique, sont caractérisés; chez le mutant, la forme furanique est prédominante. Les polysaccharides méthylés contiennent les mêmes sucres que les lipopolysaccharides méthylés mais on observe une diminution du taux des formes furaniques partiellement éliminées par l'hydrolyse acétique.

3.5. Identification des oses-phosphates

Les polysaccharides sont hydrolysés par HCl N, 2 h à 100°C et les hydrolysats sont soumis à l'électrophorèse sur papier. Après révélation par le nitrate d'argent en milieu alcalin, on observe la présence de

composés anioniques dont la mobilité électrophorétique est voisine de celle du glucose-6-phosphate témoin. Ces composés sont élués et soumis à l'action de la phosphatase alcaline; la chromatographie gazeuse effectuée sur les acétates d'alditols permet l'identification de l'heptose et du glucose.

Il existe donc, à côté des heptoses phosphates, du glucose-phosphate dans la chaîne polysaccharidique du noyau des deux souches sauvage et mutante. Un résultat identique avait été obtenu avec le lipopolysaccharide de la souche CR34 de *E. coli* K12 [2].

4. Conclusion

Aucune différence n'est observée dans les propriétés immunologiques des souches P678 et PM61. Les différences d'ordre structural ne portent pas sur la composition du noyau mais seulement sur la répartition des acides gras du lipide A. Ce résultat pourrait être en relation avec une modification du métabolisme lipidique déjà observée chez le mutant PM61 au niveau des phospholipides [9]. Les acides gras ayant 12 et 14 atomes de carbone représentent 56% des acides gras totaux du lipide A de la souche P678 et 97% de ceux de la souche PM61. Si des différences analogues se retrouvent au niveau des phospholipides membranaires elles peuvent éventuellement expliquer les changements de morphologie et de sensibilité aux antibiotiques observés chez le mutant.

Par ailleurs il existe une grande similitude de composition entre les lipopolysaccharides des souches P678 et PM61 et celui de la souche CR34 étudié précédemment. Ces trois souches peuvent donc être classées dans le même type sérologique.

Remerciements

Nous remercions le Dr J. Starka, Laboratoire de Physiologie Microbienne, Marseille, qui nous a fourni les souches bactériennes P678 et PM61.

Bibliographie

- [1] Rooney, S. A. et Goldfine, H. (1972) *J. Bacteriol.* 111, 531–540.
- [2] Benedetto, J. P., Bruneteau, M. et Michel, G. (1976) *Eur. J. Biochem.* 63, 313–320.
- [3] Bruneteau, M. et Michel, G. (1977) *Eur. J. Biochem.* sous presse.
- [4] Prehm, P., Stirn, S., Jann, B. et Jann, K. (1976) *Eur. J. Biochem.* 66, 369–377.
- [5] Boman, H. G. et Monner, D. A. (1975) *J. Bacteriol.* 121, 455–464.
- [6] Mayer, H., Rapin, A. H. C. et Schmidt, G. (1976) *Eur. J. Biochem.* 66, 357–368.
- [7] Rodolakis, A. et Starka, J. (1973) *CR Acad. Sci. Paris t.276*, 663–665.
- [8] Rodolakis, A., Thomas, P. et Starka, J. (1973) *J. Gen. Microbiol.* 75, 409–416.
- [9] Michel, G., Disavino, D. et Starka, J. (1977) *J. Bacteriol.* 129, 145–150.
- [10] Rodolakis, A., Casse, F. et Starka, J. (1974) *Mol. Gen. Genet.* 130, 177–181.
- [11] Galanos, C., Lüderitz, O. et Westphal, O. (1969) *Eur. J. Biochem.* 9, 245–249.
- [12] Reitschel, E. Th., Gottert, H., Lüderitz, O. et Westphal, O. (1972) *Eur. J. Biochem.* 28, 166–173.
- [13] Sawardeker, J. J., Sloneker, J. H. et Jeanes, A. R. (1967) *Anal. Chem.* 37, 1602–1604.
- [14] Hakomori, S. (1964) *J. Biochem.* 55, 205–208.
- [15] Hellerqvist, C. G., Lindberg, B., Svensson, S., Holme, T. et Lindberg, A. A. (1968) *Carbohydr. Res.* 8, 43–55.
- [16] Beckmann, I., Lüderitz, O. et Westphal, O. (1964) *Biochem. Z.* 339, 401–415.
- [17] Ruschmann, E. et Niebuhr, C. (1972) *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A.* 222, 326–341.
- [18] Björndal, H., Lindberg, B. et Svensson, S. (1967) *Acta Chem. Scand.* 21, 1801–1804.
- [19] Björndal, H., Lindberg, B. et Svensson, S. (1967) *Carbohydr. Res.* 5, 433–440.