

always exceeded the amount calculated from the acetoin formation, but the surplus decreased upon adding TPP. Hence I believe that the TPP-catalyzed CO<sub>2</sub>-fixation also occurs in pigeon heart muscle, though it was obscured in my experiments by other reactions producing CO<sub>2</sub>. No evidence was obtained for the occurrence of the reaction in pigeon leg muscle.

Full details and discussions will be published. This work forms part of the investigations by H. G. K. WESTENBRINK and collaborators on the metabolism and function of thiamine.

TABLE I

ANAEROBIC FORMATION OF CO<sub>2</sub> AND ACETOIN IN PIGEON BREAST MUSCLE HOMOGENATES

200 mg tissue in 2.3 ml 0.1 M K Na phosphate, containing Mn-ions (concentration 0.001 M); 22.7 μM Na pyruvate added. CO<sub>2</sub> and acetoin formation in 3 hrs at 38° C. 8 normal pigeons and 10 twelve days' B<sub>1</sub>-deficient pigeons investigated. TPP contents of breast muscle: normal, 7.2 ± 0.33 γ per g; 12 days deficient 3.3 ± 0.08 γ per g. All standard deviations mentioned are standard deviations of the means. P calculated according to STUDENT's method.

	Addition of 6 γ TPP	Normal pigeons		B <sub>1</sub> -deficient pigeons	
		μM	P	μM	P
CO <sub>2</sub> formation	—	6.3 ± 0.15	< 0.001	4.5 ± 0.20	≤ 0.001
	+	7.0 ± 0.16		7.4 ± 0.39	
Acetoin formation	—	4.3 ± 0.15	< 0.001	1.9 ± 0.23	≤ 0.001
	+	5.2 ± 0.23		5.0 ± 0.16	
CO <sub>2</sub> deficit	—	2.3 ± 0.14	< 0.001	—0.5 ± 0.32	≤ 0.001
	+	3.4 ± 0.10		2.6 ± 0.34	

## REFERENCES

- 1 M. GRUBER AND F. G. D. MEIJER, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1951) 445.
- 2 M. GRUBER, *Nature*, 166 (1950) 78.
- 3 S. OCHOA, *Physiol. Rev.*, 31 (1951) 56.

Received March 25th, 1952

SUR UN ACIDE AMINÉ DU PHOSPHATIDE DE *MYCOBACTERIUM PHLEI*\*

par

M. BARBIER ET E. LEDERER  
*Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris (France)*

CHARGAFF, PANGBORN ET ANDERSON<sup>2</sup> ont décrit en 1931 un phosphatide isolé du Bacille de la phléole (*Mycobacterium phlei*); après l'avoir purifié par plusieurs précipitations de sa solution étherée par un volume égal d'acétone, ils l'ont obtenu sous forme d'une poudre jaune se ramollissant à 180°, fondant à 190° et contenant 2.80 % de phosphore et 0.22 % d'azote. La nature de cet azote n'a pas été précisée. Rappelons qu'il n'y a pas de choline, ni de colamine dans les phosphatides des Mycobactéries et que la nature des faibles quantités d'azote qu'ils contiennent est restée fort controversée<sup>3</sup>.

Dans la présente note nous rapportons la présence d'*hydroxylysine* dans le phosphatide de *M. phlei*. Les phosphatides de souches humaines et bovines de *M. tuberculosis* contiennent d'autres acides aminés<sup>4</sup>.

Nous avons isolé le phosphatide d'une souche de *M. phlei* cultivée à l'Institut Pasteur, sur milieu de Sauton. Après cinq précipitations par l'acétone, il se présente sous forme d'une poudre jaunâtre, F. 180-190°, contenant 1.1 % de P et 0.62 % de N (Kjeldahl). Ce phosphatide est insoluble dans

\* 15ème communication sur les constituants du bacille tuberculeux. 14ème communication<sup>1</sup>.

l'acétone bouillante, dans le méthanol et l'éthanol, soluble dans le benzène, le chloroforme, l'éther et l'éther de pétrole.

Plus de la moitié de l'azote du phosphatide est sous forme ammoniacale. La chromatographie sur papier d'un hydrolysat chlorhydrique du phosphatide préparé sous les conditions habituelles, révèle une seule tache réagissant à la ninhydrine. La chromatographie dans les six solvants suivants: phénol-NH<sub>3</sub>, phénol sur papier tamponné à pH 4, *m*-crésol, butanol-acide formique, butanol-N-éthylmorpholine, et propanol-acide acétique\* montre que les *R<sub>F</sub>* de cet acide aminé sont identiques à ceux de l'hydroxylysine\*\*.

A l'électrophorèse sur papier, en présence d'un tampon de véronal, à pH 8.6, l'acide aminé du phosphatide de *M. phlei* se déplace de la même distance que l'hydroxylysine\*\*\*.

Quand on oxyde par l'acide périodique dans deux essais parallèles, l'acide aminé du phosphatide de *M. phlei* et l'hydroxylysine, on obtient, dans les deux cas, une nouvelle substance ayant le même *R<sub>F</sub>* (dans butanol-acide formique et phénol-NH<sub>3</sub>).

L'addition d'acide picrique à un hydrolysat du phosphatide de *M. phlei* provoque la précipitation d'un picrate cristallisé qui se comporte comme le di-picrate de l'hydroxylysine (deux formes: F 110-115° et F 195°, la première pouvant être transformée par broyage en la seconde\*). La décomposition du picrate en milieu chlorhydrique nous a donné un *chlorhydrate* que nous avons purifié par dissolution dans l'eau et précipitation par l'alcool. Un échantillon de chlorhydrate d'hydroxylysine\*\* avait un point de fusion de 205-214°\$, le chlorhydrate isolé du phosphatide de *M. phlei* avait F 210-218°; le mélange des deux préparations fondait à 205-217°. Il n'y a pas de dépression du point de fusion. Le reste du chlorhydrate (2.6 mg) fut soumis à un dosage d'azote d'après DUMAS. Calculé pour C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>HCl: 14.10%; trouvé: 13.95% N.

Il ne semble plus y avoir de doute que l'acide aminé du phosphatide de *M. phlei* soit de l'hydroxylysine. Il semble que c'est la première fois que cet acide aminé soit trouvé dans un phosphatide et qu'il soit signalé dans une Mycobactéries. WORK<sup>6</sup> l'a trouvé dans un hydrolysat total du Bacille diphtérique.

La chromatographie sur papier du phosphatide intact et la révélation à la ninhydrine donne une seule tache (*R<sub>F</sub>* = 0.98, dans butanol-acide formique). Des dosages de phosphore effectués sur des éluats d'une telle tache indiquent qu'elle renferme pratiquement tout le phosphore du phosphatide. Ceci montre que l'hydroxylysine est liée au phosphatide et se déplace avec lui. La réaction du phosphatide intact avec la ninhydrine prouve qu'au moins un groupe aminé de l'hydroxylysine y est libre.

Antant traité le phosphatide intact par l'acide périodique, nous avons récupéré l'hydroxylysine après hydrolyse. Il s'en suit que dans le phosphatide l'un des groupes OH et NH<sub>2</sub> (en δ et ε) de l'hydroxylysine est lié. Nous pensons, par analogie avec la phosphatidyl-sérine de FOLCH<sup>7</sup> que c'est l'hydroxyle de l'hydroxylysine qui est lié à l'acide phosphorique. Rappelons que GORDON<sup>8</sup> a trouvé le phosphatide d'hydroxylysine dans des extraits d'embryon de veau.

Le phosphatide de *M. phlei* contient environ 1% d'hydroxylysine; en admettant que ce phosphatide soit une substance homogène, on peut calculer que son poids moléculaire minimal serait d'environ 16,000. Nous comptions revenir sur cette question.

Nous remercions la "Fondation Waksman pour le Développement des Etudes Microbiologiques en France" pour des subventions ayant facilité ce travail.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. ASSELINEAU, *Bull. soc. chim. France* (1952), sous presse.
- 2 E. CHARGAFF, M. C. PANGBORN, ET R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 90 (1931) 45.
- 3 R. J. ANDERSON, *Chem. Rev.*, 29 (1941) 225; *Yale J. Biol. & Med.*, 15 (1943) 311;
- 4 J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Experientia*, 7 (1951) 281;
- 5 E. LEDERER, in *Colloquium on the Chemotherapy of Tuberculosis*, Trinity College Dublin (1952) p. 1.
- 6 T. GENDRE ET E. LEDERER, essais inédits.
- 7 J. C. SHEEHAN ET W. A. BOLHOFER, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 2466.
- 8 E. WORK, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 400.
- 9 J. FOLCH, *J. Biol. Chem.*, 174 (1948) 439.
- 10 A. H. GORDON, *Biochem. J.*, 45 (1949) 99.

Reçu le 24 mars 1952

\* Chromatographies descendantes, avec écoulement du solvant en bas de la feuille.

\*\* Nous remercions le Professeur J. C. SHEEHAN, Cambridge, Mass., pour des échantillons d'hydroxylysine.

\*\*\* Nous remercions Mr M. JUTISZ pour son aide dans cette expérience.

\$ Points de fusion corrigés, pris sous le microscope avec l'appareil de KOFLER.