

## ÉTUDE DES ACIDES GRAS ISOLÉS DE PLUSIEURS ESPÈCES DE NOCARDIA\*

CLAUDETTE BORDET ET GEORGES MICHEL

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté Catholique des Sciences, Lyon (France)*

(Reçu le 25 juillet, 1963)

### SUMMARY

#### *Studies on the fatty acids of several Nocardia species*

The free and combined fatty acids from acetone-soluble lipids of *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. lurida* and *N. rugosa* have been studied.

Straight-chain saturated acids from  $C_{14}$  to  $C_{19}$  have been found; palmitic acid is the major compound in this series.

The branched-chain saturated acids  $C_{15}$ ,  $C_{16}$  and  $C_{17}$  belong to the iso and anteiso series; iso  $C_{18}$  and 10-methyloctadecanoic acids have been identified.

Several unsaturated acids: 9-hexadecenoic, 10-hexadecenoic, 9-heptadecenoic and oleic acids have also been identified.

### INTRODUCTION

Nous avons décrit précédemment la préparation de plusieurs composés lipidiques à partir d'une souche de *Nocardia asteroides* ATCC 9969. Des peptidolipides représentant 5.5 % du poids sec de mycélium ont été obtenus à partir des extraits éthéro-alcooliques<sup>1</sup>. L'un d'eux, la peptidolipine NA, a été purifié et sa structure partiellement déterminée<sup>2</sup>. Cette souche renferme également des acides mycoliques, les acides nocardiques ayant environ 50 atomes de carbone<sup>3</sup> et des alcools à haut poids moléculaire, les nocardols<sup>4</sup>.

La majeure partie des lipides est représentée par la fraction acétono-soluble des extraits éthéro-alcooliques. Nous avons étudié les acides gras présents dans cette partie lipidique pour différentes espèces de *Nocardia*. A côté des acides saturés à chaîne droite ayant de 14 à 19 atomes de carbone, nous avons mis en évidence plusieurs acides éthyléniques et ramifiés dont nous avons précisé la structure. Ces acides sont présents soit à l'état libre, soit sous forme d'esters, en particulier de glycérides.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### *Préparation des graisses acétono-solubles*

Nous avons étudié 7 souches de *Nocardia*:

I, *Nocardia asteroides* ATCC 9969; II, *Nocardia asteroides* ATCC 443-2; III, *Nocardia*

\* 5ème communication sur les constituants des *Nocardia*. 4ème communication, voir *Compt. Rend.*, 256 (1963) 1621.

*asteroides* ATCC 535; IV, *Nocardia brasiliensis* ATCC 733; V, *Nocardia brasiliensis* ATCC 426; VI, *Nocardia lurida*; VII, *Nocardia rugosa*.

Les Souches I-V ont été cultivées sur milieu de Sauton pendant 4 semaines à l'Institut Pasteur, Paris. *N. lurida* nous a été fourni par Abbott Laboratories, North Chicago, Ill. (U.S.A.) et *N. rugosa* provient de Farmitalia, Milan (Italie).

Les bacilles sont extraits plusieurs fois par un mélange alcool-éther (1:1) puis par le chloroforme selon la méthode d'ANDERSON<sup>5</sup>. La solution éthérée, lavée à l'eau puis séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , fournit après évaporation du solvant l'extrait éthéro-alcoolique total. Celui-ci est repris plusieurs fois par l'acétone et donne en quantité prépondérante une fraction lipide soluble dans l'acétone à froid.

#### *Fractionnement des acides gras*

Nous avons utilisé la méthode classique de TWITCHELL<sup>6</sup>. Les acides (9 g) sont dissous dans l'alcool bouillant (75 ml). On ajoute une solution de 9 g d'acétate neutre de plomb dans 75 ml d'alcool et 1 ml d'acide acétique. La fraction insoluble dans l'alcool chaud est séparée par décantation et la solution est abandonnée une nuit à 0°. Les sels de plomb insolubles dans l'alcool froid sont séparés par filtration ou centrifugation. Le filtrat contient les sels de plomb solubles à froid. Les opérations sont répétées plusieurs fois sur chaque fraction.

#### *Séparation des esters méthyliques saturés et insaturés*

La formation de complexes entre les composés éthyléniques et l'acétate mercurique a été appliquée à la séparation des acides gras insaturés<sup>7,8</sup>. Nous avons utilisé cette méthode pour obtenir de petites quantités d'esters méthyliques éthyléniques. A 10 mg d'esters on ajoute 50 mg d'acétate mercurique préalablement séché sur  $\text{P}_2\text{O}_5$  et 1 ml de méthanol anhydre. On chauffe pendant 2 h à 66° puis on extrait par 50 ml d'éther. La solution est lavée par l'acide acétique 0.5 N puis par l'eau jusqu'à neutralité, elle est ensuite séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et le solvant est évaporé. Le résidu, repris par 3 ml d'hexane, est chromatographié à l'obscurité sur une colonne de 2 g de trisilicate de magnésium. L'ester saturé est élut par 100 ml d'hexane. L'élution est ensuite effectuée par le mélange acide: éthanol-chloroforme-acide chlorhydrique concentré (10:8:1). Le complexe est détruit et l'ester insaturé est recueilli dans un mélange eau-éther (70:50). La phase éthérée est lavée à l'eau, séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et l'ester insaturé récupéré après évaporation du solvant.

#### *Fractionnement des esters méthyliques par chromatographie gaz-liquide*

Les acides gras en solution dans l'éther contenant 10 % de méthanol sont estérifiés par le diazométhane gazeux préparé extemporanément à partir de nitrosométhylurée<sup>9</sup>. On évite ainsi la formation de produits secondaires qui pourraient interférer lors de la chromatographie gaz-liquide<sup>10</sup>.

Les esters méthyliques sont analysés par chromatographie gaz-liquide sur Aerograph A 90 P équipé d'une cellule de détection à résistances. La séparation est effectuée avec une colonne d'Apiezon M, 20 % sur Fire brick (60-80 mesh), longueur 1.60 m, diamètre intérieur 6.25 mm. Une colonne polaire de diéthylène glycol succinate 20 % sur Fire brick (60-80 mesh), longueur 3.20 m, diamètre intérieur 6.25 mm a été utilisée pour certaines séparations. Le gaz porteur est l'hélium, débit 50-60 ml/min.

Les chromatographies préparatives ont été réalisées avec le même appareil en

utilisant la colonne d'Apiezon M à une température de 200°. Lorsque les quantités disponibles étaient plus importantes, nous avons effectué la préparation avec un Aerograph Autoprep A 700, colonne d'Apiezon L, 20 % sur Fire brick (60-80 mesh) longueur 3.20 m, diamètre intérieur 9.5 mm à une température de 200°.

#### *Oxydation des esters éthyléniques par le mélange permanganate-periodate*

La technique employée est celle de VON RUDLOFF<sup>11</sup> adaptée par CHANG ET SWEELY<sup>12</sup> à l'échelle microanalytique.

2 mg d'esters sont agités pendant 6 h à température ordinaire avec 3 ml de butanol tertiaire, 2 ml d'une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 1 % et 4 ml d'une solution d'oxydant contenant 3.85 g de  $\text{NaIO}_4$  et 0.395 g de  $\text{KMnO}_4$ /l. La réaction est arrêtée par addition de bisulfite de sodium et le milieu est alcalinisé par addition d'une pastille de KOH. Le butanol tertiaire et l'eau sont évaporés sous vide à 50°. Le résidu, repris par 3 ml d'eau, est acidifié par  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 15 % et les acides sont extraits avec 4 fois 2 ml d'éther. La solution éthérée est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et l'éther évaporé à 10° sous courant d'azote. Les acides sont estérifiés par le diazométhane gazeux<sup>9</sup> et analysés par chromatographie gaz-liquide.

#### *Oxydation des esters ramifiés iso et anteiso*

La ramification iso ou anteiso est mise en évidence par oxydation chromique<sup>13, 14</sup>.

2-3 mg d'esters ramifiés sont ajoutés à une solution de 50 mg de  $\text{CrO}_3$  dans 0.2 ml d'acide acétique et 0.1 ml d'anhydride acétique. Le mélange est placé pendant une nuit à 0° sous agitation puis on ajoute 12 ml d'eau et on détruit l'excès de  $\text{CrO}_3$  par le bisulfite de sodium. L'ensemble est chauffé et 12 ml de distillat sont recueillis dans une solution chlorhydrique de 2,4-dinitrophénylhydrazine. Les hydra zones sont extraites par l'hexane et identifiées par chromatographie en couches minces avec le solvant hexane-alcool-éther (96:2:2) en présence d'hydra zones témoins<sup>15</sup>.

#### *Oxydation des esters ramifiés à l'intérieur de la chaîne*

Nous avons utilisé la méthode de CASON *et al.*<sup>16</sup>. 10 mg d'esters sont oxydés pendant 3 h à 67° par 20 mg de  $\text{CrO}_3$  dans 1 ml d'acide acétique. Après refroidissement, la solution est alcalinisée par 20 ml de KOH à 7 % puis extraite en continu pendant 16 h par 40 ml d'éther. La phase éthérée contient les produits neutres qui sont analysés par chromatographie gaz-liquide.

La solution aqueuse est évaporée à sec, sous vide, à 50°. On acidifie par 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dans 10 ml de méthanol anhydre. Les acides sont méthylés par 1 ml de 2,2-diméthoxypropane ajouté en trois fois au mélange chauffé sous reflux à 50° (voir réf. 17). Après neutralisation par KOH, la solution est évaporée sous vide. Le résidu, repris par l'eau, est acidifié et extrait à l'éther. Les esters méthyliques présents dans la solution éthérée sont analysés par chromatographie gaz-liquide.

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### *Obtention et fractionnement des acides gras*

Les lipides solubles dans l'acétone, dissous dans l'éther, sont repris à froid par une solution aqueuse de potasse qui permet de séparer les acides libres et les graisses neutres. Le Tableau I donne les pourcentages de lipides acétono-solubles et d'acides

libres pour chacune des souches de *Nocardia*. Les graisses sont saponifiées par la potasse méthanolique et après les traitements habituels on identifie le glycérol dans la phase aqueuse. Un insaponifiable a été trouvé dans certaines souches: *N. asteroides* 9969 renferme des alcools à haut poids moléculaire, les nocardols<sup>4</sup>. D'autres alcools de poids moléculaire élevé ont été trouvés dans *N. brasiliensis* 733.

TABLEAU I

Pourcentage de graisses solubles dans l'acétone par rapport aux lipides totaux et pourcentage d'acides libres par rapport aux graisses acétone-solubles.

	<i>N. asteroides</i>			<i>N. brasiliensis</i>		<i>N. rugosa</i>	<i>N. lurida</i>
	9969	535	443-2	733	426		
Graisses solubles dans l'acétone	82	87	61	72.5	67.5	85	95
Acides libres	22.8	38	40	0	36	32	19

Le traitement des acides par les sels de plomb donne 3 fractions: acides à sels de plomb insolubles à chaud dans l'alcool, insolubles à froid, solubles à froid. La première fraction est constituée essentiellement d'acides mycoliques identifiés après purification. Les acides nocardiques ont déjà été isolés de *N. asteroides* 9969 (voir réf. 3), les autres souches de *Nocardia* étudiées renferment également des acides mycoliques, leur étude est en cours.

La fraction des sels de plomb insolubles à froid comprend en majeure partie les acides normaux saturés avec, en quantité plus faible, des acides ramifiés. Le reste des acides ramifiés se trouve avec les acides éthyléniques dans la fraction des sels de plomb solubles dans l'alcool froid. Malgré le manque de spécificité de cette méthode, nous l'avons utilisée pour préparer les acides mycoliques et pour séparer la majeure partie des acides saturés à chaîne droite constitués essentiellement, comme nous le verrons plus loin, d'acide palmitique. Après récupération des acides à partir des sels de plomb et estérisation, les esters méthyliques ont été purifiés par passage sur colonne d'alumine d'activité II, la fraction principale, élue par l'hexane, a été étudiée.

Dans un premier temps, nous avons analysé par chromatographie gaz-liquide les différentes fractions, c'est-à-dire pour chaque souche: Fraction I, acides libres à sels de plomb solubles à froid; Fraction II, acides libres à sels de plomb insolubles à froid; Fraction III, acides des lipides neutres à sels de plomb solubles à froid; Fraction IV, acides des lipides neutres à sels de plomb insolubles à froid.

Nous avons représenté (Figs. 1a, b) deux chromatogrammes typiques renfermant tous les constituants trouvés dans les sept souches de *Nocardia* étudiées, le nombre et le pourcentage de chacun d'eux étant variable avec la souche.

Les esters d'acides saturés à chaîne droite ont été facilement identifiés par chromatographie en mélange avec des esters témoins.

Pour déterminer l'emplacement des esters éthyléniques, nous avons fait appel à plusieurs méthodes: bromuration ou hydrogénéation du mélange puis comparaison des chromatogrammes avec la courbe initiale, analyse sur colonne polaire (diéthylène glycol succinate 20 %) qui modifie la position des esters éthyléniques par rapport à celle des esters saturés correspondants. Cependant, dans certains cas, l'interprétation

était assez délicate en raison du grand nombre de pics présents dans le chromatogramme initial et il était parfois difficile de préciser sans ambiguïté la nature insaturée ou ramifiée de certains constituants.

La méthode la plus efficace a été la formation de complexes avec l'acétate mercurique<sup>7,8</sup> qui a permis une séparation complète des esters saturés et insaturés.

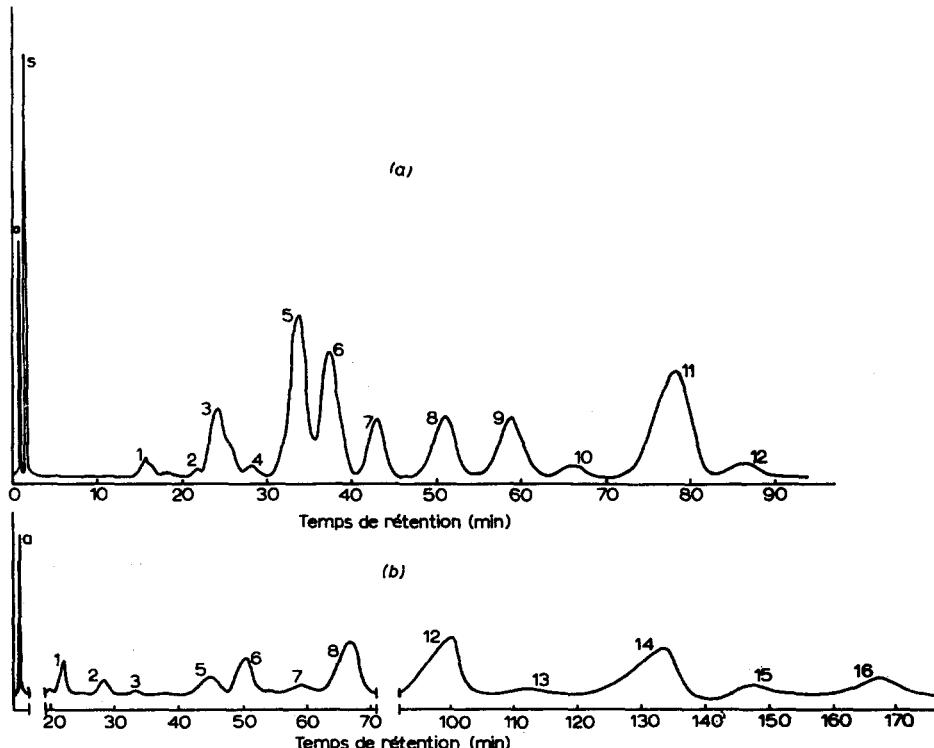


Fig. 1. Chromatogrammes gaz-liquide des esters méthyliques. a, Air; s, solvant; 1,  $C_{14}$  n; 2,  $C_{15}$  ram.; 3,  $C_{15}$  n, 4,  $C_{16}$  ram.; 5,  $C_{16}A$ ; 6,  $C_{16}$  n; 7, non identifié; 8,  $C_{17}$  ram.; 9,  $C_{17}A$ ; 10,  $C_{17}$  n; 11,  $C_{18}$  ram.; 12,  $C_{18}A$ ; 13,  $C_{18}$  n; 14, 10-méthyl  $C_{18}$ ; 15, non identifié; 16,  $C_{19}$  n. (a), *Nocardia rugosa*, Fraction I sur colonne Apiezon M; à 210°; (b), *Nocardia asteroides* 9969, Fraction I sur colonne Apiezon M à 200°.

La structure des acides éthyléniques et ramifiés a été précisée par dégradation après isolement de chaque composé par chromatographie gaz-liquide préparative. Suivant les cas, des quantités de 2 à 20 mg ont été obtenues en vue de l'analyse structurale. Lorsque la matière première disponible était insuffisante, nous avons indiqué seulement la nature ramifiée ou éthylénique sans préciser davantage la structure. Le Tableau II schématise les résultats obtenus. Les pourcentages ont été calculés d'après l'aire du pic correspondant à chaque composé, selon la méthode décrite par DIJKSTRA<sup>18</sup>.

#### Étude des acides saturés à chaîne droite

Par chromatographie en mélange avec des esters saturés normaux authentiques, nous avons montré la présence des acides  $C_{14}$  (Fig. 1, Pic No. 1),  $C_{15}$  (Fig. 1, Pic No. 3),  $C_{16}$  (Fig. 1, Pic No. 6),  $C_{17}$  (Fig. 1a, Pic No. 10),  $C_{18}$  (Fig. 1, Pic No. 13),  $C_{19}$  (Fig. 1b,

TABLEAU II

## NATURE DES ACIDES GRAS ISOLÉS DES GRAISSES ACÉTONO-SOLUBLES DES NOCARDIA

Les quantités sont exprimées en % des acides totaux de chaque groupe. AGN, acides des graisses neutres; AL, acides libres; i, acides ramifiés iso; a, acides ramifiés anteiso; 10-Me-18, acide 10-méthyoctadécanoïque;  $\Delta_9$ ,  $\Delta_{10}$ , position de la double liaison sur la chaîne carbonée.

	<i>N. asteroides</i>				<i>N. brasiliensis</i>				<i>N. rugosa</i>		<i>N. lurida</i>			
	9969		535		443-2		733		426		AGN	AL	AGN	AL
	AGN	AL	AGN	AL	AGN	AL	AGN	AL	AGN	AL	AGN	AL	AGN	AL
14 n	4.3	4.9	2.2	1.9	3.3	2.4	5.3	1.1	1.2	1.0	0.6	1.0	1.2	
	a	a									i	i		
15 ram.	3.0	1.0	0.8	1.3	0.3			0.8	0.5	0.4	0.6	11.4	11.7	
15 n	2.1		0.7	0.4			0.5			6.4	4.8	0.6	0.4	
										a + i	a + i	i	i	
16 ram.										3.9	3.3	17.5	18.1	
16 A	$\Delta_9$ 0.4	$\Delta_9$ 1.7	$\Delta_{10}$ 5.6	$\Delta_{10}$ 3.9	4.6	5.5	1.2	2.5	1.0	$\Delta_9$ 6.2	$\Delta_9$ 12.4			
16 n	36.7	42.6	38.9	35.6	46.5	32.3	43.3	17.6	43.0	23.7	21.1	11.9	19.1	
?	0.7	0.7	0.6	0.9	1.4	1.4	1.7	1.6	0.8	7.9	8.7		1.0	
	a + i	a + i					i	i	i			i	i	
17 ram.	4.5	6.9	1.7	8.6	1.2	4.6	1.1	21.5	14.0	3.8	5.8	12.9	10.1	
17 A										$\Delta_9$ 13.1	$\Delta_9$ 11.0			
17 n	1.8		0.7	0.8		0.4		0.8	0.3	13.5	12.6	2.6	2.5	
										i	i			
18 ram.										10.8	16.9			
18 A	$\Delta_9$ 1.1	$\Delta_9$ 13.7	$\Delta_9$ 21.3	$\Delta_9$ 9.8	$\Delta_9$ 18.4	$\Delta_9$ 17.0	$\Delta_9$ 6.6	$\Delta_9$ 11.8	$\Delta_9$ 6.2	$\Delta_9$ 7.9	$\Delta_9$ 1.5	$\Delta_9$ 38.5	$\Delta_9$ 27.2	
18 n	6.4	6.3	6.2	4.3	3.3	2.0	9.7	1.2		1.0	0.7	3.6	8.7	
10-Me-18	11.0	18.0	19.9	25.4	21.0	26.2	27.4	30.2	22.1					
?		1.1	1.0	2.2		6.5		0.7	2.2					
19 n	28.0	3.1	0.3	5.1		1.7	3.2	10.2	8.7					

Pic No. 16). Aucun acide supérieur n'a été décelé. L'acide palmitique est le constituant principal dans la plupart des souches étudiées.

## Étude des acides ramifiés

Les esters méthyliques ont été soumis à une oxydation chromique selon SONNEVELD *et al.*<sup>14</sup> (voir partie expérimentale) et les hydrazones obtenues identifiées par chromatographie en couches minces sur silica gel G dans le solvant hexane-éther-alcool (96:2:2)<sup>15</sup>. On observe, suivant les composés étudiés, une tache correspondant au dérivé de l'acétone,  $R_F = 0.35$ , provenant de la coupure des acides iso ou une tache correspondant au dérivé de la méthyléthylcétone,  $R_F = 0.44$ , provenant des acides anteiso. Les dérivés des autres méthylcétones volatiles: méthylpropylcétone etc. ont un  $R_F$  plus élevé. Nous n'avons observé aucune tache de  $R_F$  supérieur à 0.44. Un seul acide ramifié ne donne pas d'acétone ni de méthyléthylcétone, nous avons montré qu'il s'agissait de l'acide tuberculostéarique.

1. Acides 13-méthyltétradécanoïque et 12-méthyltétradécanoïque (Fig. 1, Pic No. 2). A partir de la Fraction I de *N. lurida* (360 mg), 18.6 mg d'esters ont été isolés. Les méthodes explicitées précédemment ont montré que cet ester était ramifié. La spectrographie de masse indique qu'il s'agit d'un pentadécanoate de méthyle avec une ramifications éventuelle iso ou anteiso\*. Plusieurs arguments sont en faveur de la structure iso: la présence d'un petit pic à  $m/e = M-65 = 191$  et le rapport des hauteurs des pics  $M-29/M-31 = 0.86$ . Le pic à  $M-65$  serait en effet caractéristique des acides iso<sup>19</sup>. D'autre part, les acides anteiso ont un pic à  $m/e = M-29$  plus important que celui dû à l'ion acylium à  $M-31$  en raison de la facilité avec laquelle se forme l'ion résultant de la perte du radical éthyl porté par le carbone tertiaire de la chaîne carbonée.

L'oxydation chromique de 2 mg de produit suivie de la chromatographie en couches minces permet d'identifier la dinitrophénylhydrazone de l'acétone ( $R_F = 0.35$ ).

L'ester étudié est donc celui de l'acide 13-méthyltétradécanoïque (iso C<sub>15</sub>). Il faut noter que l'acide iso C<sub>15</sub> est assez rare dans les lipides bactériens. Il a été signalé par SAITO<sup>20</sup> dans *Bacillus subtilis* (natto) et par ALLISON *et al.*<sup>21</sup> dans les bactéries des ruminants: *Ruminococcus albus* 7 et *Ruminococcus flavigraciens* C94. ETEMADI<sup>22</sup> l'a identifié récemment dans *Corynebacterium parvum*.

A partir de *N. asteroides* 9969 nous avons isolé 2.5 mg d'ester correspondant au Pic No. 2 (Fig. 1). L'hydrazone obtenue après oxydation chromique a été identifiée à celle de la méthyléthylcétone. L'acide correspondant est donc l'acide 12-méthyltétradécanoïque (anteiso C<sub>15</sub>). L'acide anteiso C<sub>15</sub> ou acide sarinique est plus répandu que l'isomère iso. Il a été trouvé dans un *Sarcina*<sup>23</sup> et dans d'autres microorganismes, par exemple *Micrococcus lysodeikticus*<sup>24</sup>, différentes souches de *B. subtilis*<sup>25</sup> et de *Ruminococcus*<sup>21</sup>.

2. Acides 14-méthylpentadécanoïque et 13-méthylpentadécanoïque (Fig. 1a, Pic No. 4). 26.2 mg ont été isolés par chromatographie préparative des esters de *N. lurida* (Fraction I) et 6 mg à partir de *N. rugosa* (Fraction II). La spectrographie de masse des esters de *N. lurida* montre qu'il s'agit d'un hexadécanoate de méthyle. On observe la présence d'un pic à  $m/e = M-65$  et un pic à  $m/e = M-31$  plus intense que le pic à  $m/e = M-29$ ,  $M-29/M-31 = 0.86$ . Ces constatations sont en faveur de la structure iso.

L'oxydation chromique et l'identification des hydrazones ont donné les résultats suivants: à partir des esters de *N. lurida*, on trouve en quantité prépondérante l'hydrazone de l'acétone ( $R_F = 0.35$ ) et, en plus faible proportion, celle de la méthyléthylcétone ( $R_F = 0.44$ ). Il y a donc un mélange de deux acides, l'acide isopalmitique et, en proportion moindre, l'acide anteisopalmitique. Dans le cas de *N. rugosa*, une seule tache est obtenue correspondant à l'hydrazone de l'acétone. L'acide initial est l'acide isopalmitique.

La présence d'acide isopalmitique dans les lipides bactériens a déjà été signalée, en particulier par KANEDA<sup>26</sup> dans *B. subtilis* ATGC 7059 mais il ne semble pas que l'acide anteisopalmitique ait été trouvé dans les bactéries.

3. Acides 15-méthylhexadécanoïque et 14-méthylhexadécanoïque (Fig. 1, Pic No. 8). Les esters correspondant au pic No. 8 ont été isolés à partir de plusieurs souches de *Nocardia*. Le Tableau III indique les fractions utilisées et les résultats de

\* Nous remercions M. W. WETTER, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif sur Yvette, Seine et Oise (France) qui a effectué les spectres de masse.

TABLEAU III

NATURE DES DINITROPHÉNYLHYDRAZONES OBTENUES À PARTIR DES ACIDES  $C_{17}$  RAMIFIÉS

Souche	Fraction	Acétone dinitrophénylhydrazone	Méthyléthylcétone dinitrophénylhydrazone
<i>N. asteroides</i> 9969	I	+	+
<i>N. brasiliensis</i> 733	III	+	-
<i>N. brasiliensis</i> 426	IV	+	-
<i>N. lurida</i>	II	+	-

l'oxydation chromique après chromatographie en couches minces des hydrazones. Toutes les souches étudiées renferment l'acide 15-méthylhexadécanoïque. Le composé anteiso: acide 14-méthylhexadécanoïque se trouve en mélange avec l'acide iso dans *N. asteroides* 9969.

L'acide iso  $C_{17}$  a déjà été trouvé en faibles quantités dans plusieurs souches de *B. subtilis*<sup>20,25</sup> et dans *Corynebacterium parvum*<sup>22</sup>. L'acide anteiso  $C_{17}$  a été signalé dans *M. lysodeikticus*<sup>24</sup> et dans différentes souches de *B. subtilis*<sup>25</sup>. Un acide ramifié en  $C_{17}$  a également été trouvé dans *Ruminococcus flavifaciens* sans que la position de la ramifications ait été précisée<sup>21</sup>.

4. Acide 16-méthylheptadecanoïque (Fig. 1a, Pic No 11). Nous l'avons isolé

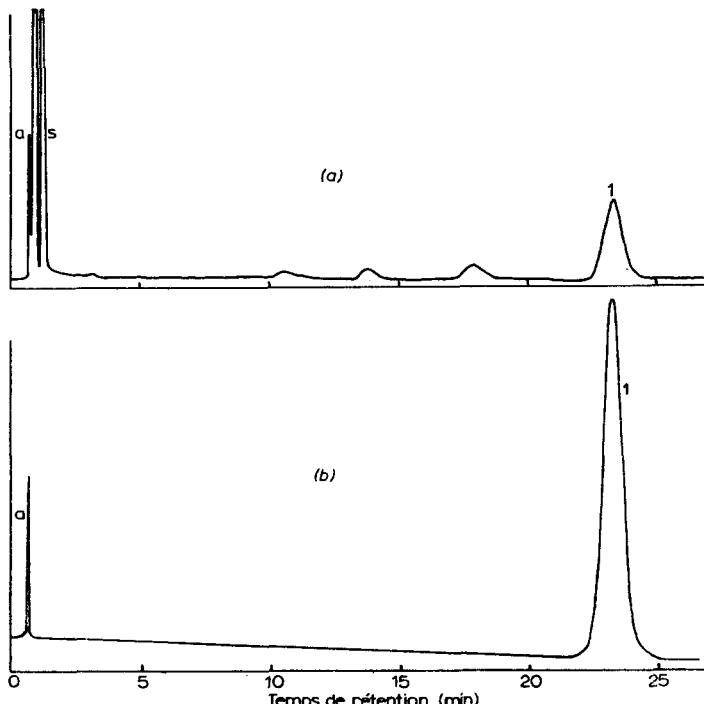


Fig. 2. Chromatogramme gaz-liquide de la fraction acide après coupure oxydative du 10-méthyl-octadécanoate de méthyle (Fig. 1b, Pic No. 14). Colonne, diéthylène glycol succinate, à 180°. (a), Ester inconnu; (b), ester témoin. a, Air; s, solvant; 1, di  $C_9$ .

des acides libres de *N. rugosa*, où il est présent en quantité relativement importante: 16.9 % des acides totaux. Après oxydation chromique, la chromatographie en couches minces des dinitrophénylhydrazones n'a donné qu'une tache de  $R_F = 0.35$  identique à celle du dérivé de l'acétone. Il s'agit donc de l'acide isostéarique.

5. Acide 10-méthyoctadécanoïque (Fig. 1b, Pic No. 12). Cet acide existe en quantité importante dans les souches de *N. asteroides* et de *N. brasiliensis* mais il est absent de *N. lurida* et de *N. rugosa* (voir Tableau II). Il a été identifié par spectrographie de masse et par oxydation chromique.

Le spectre de masse est identique à celui du tuberculostéarate de méthyle authentique: pics très intenses à  $m/e = 171$ , 172 et 173, à  $m/e = 199$  et à  $m/e = 167$  (199-32) (voir réfs. 19, 26).

L'oxydation chromique est effectuée d'après CASON *et al.*<sup>16</sup>. Après séparation des fractions neutre et acide, nous avons identifié par chromatographie gaz-liquide la 2-décanone dans la partie neutre et l'acide azélaïque dans la fraction acide, ce qui confirme la structure de l'acide 10-méthyoctadécanoïque. Les chromatogrammes

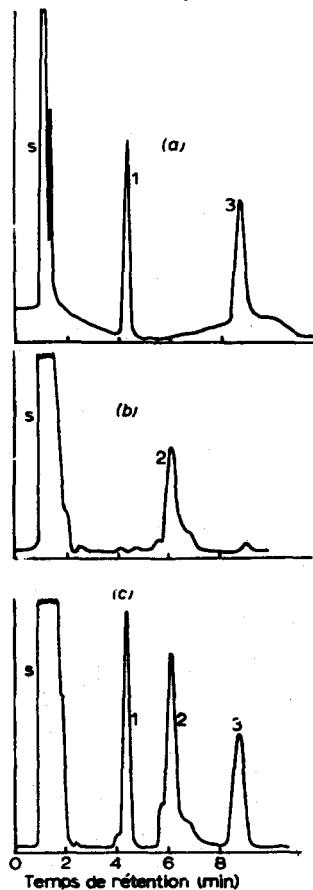


Fig. 3. Chromatogrammes gaz-liquide de la fraction neutre après coupure oxydative du 10-méthyl-octadécanoate de méthyle (Fig. 1b, Pic No. 14). Colonne diéthylène glycol succinate à 150°. (a), Cétones témoins; (b), cétone inconnue; (c), cétones témoins + cétone inconnue. s, Solvant; 1, 2-nonanone; 2, 2-décanone; 3, 2-undécanone. En l'absence de 2-décanone authentique, la cétone inconnue est identifiée par sa position par rapport aux cétones homologues.

obtenus sont représentés dans les Figs. 2 et 3 avec ceux des cétones et des esters de diacides authentiques. La quantité disponible n'a pas permis une mesure du pouvoir rotatoire. On peut vraisemblablement supposer qu'il s'agit de l'acide tuberculostéarique.

L'acide tuberculostéarique isolé des lipides du bacille tuberculeux par ANDERSON<sup>27</sup> a été trouvé dans plusieurs souches de *Mycobacterium tuberculosis*<sup>28, 29</sup>, dans *Mycobacterium phlei*<sup>30</sup> et dans *Mycobacterium smegmatis*<sup>22</sup>. Cependant il n'a jamais été signalé jusqu'à présent en dehors des mycobactéries. Il est intéressant de constater pour la première fois sa présence dans plusieurs espèces de *Nocardia*.

Ce résultat établit un nouveau point commun entre les *Nocardia* et les mycobactéries. Une parenté avait déjà été mise en évidence tant par la similitude de leur action adjuvante signalée par FREUND<sup>31</sup> que par une analogie de constitution chimique de la paroi cellulaire. CUMMINS ET HARRIS<sup>32</sup> ont trouvé dans les parois cellulaires des mycobactéries et des *Nocardia* les mêmes sucres: arabinose et galactose et les mêmes acides aminés: alanine, acide glutamique et acide  $\alpha, \alpha'$ -diaminopimélique. Nous avons montré que les acides mycoliques, largement répandus chez les mycobactéries, étaient aussi des constituants des *Nocardia*<sup>3</sup>. Il faut encore ajouter la présence dans les deux genres bactériens d'acide tuberculostéarique.

#### Étude des acides éthyléniques

Leur présence est décelée sur les chromatogrammes par comparaison des courbes

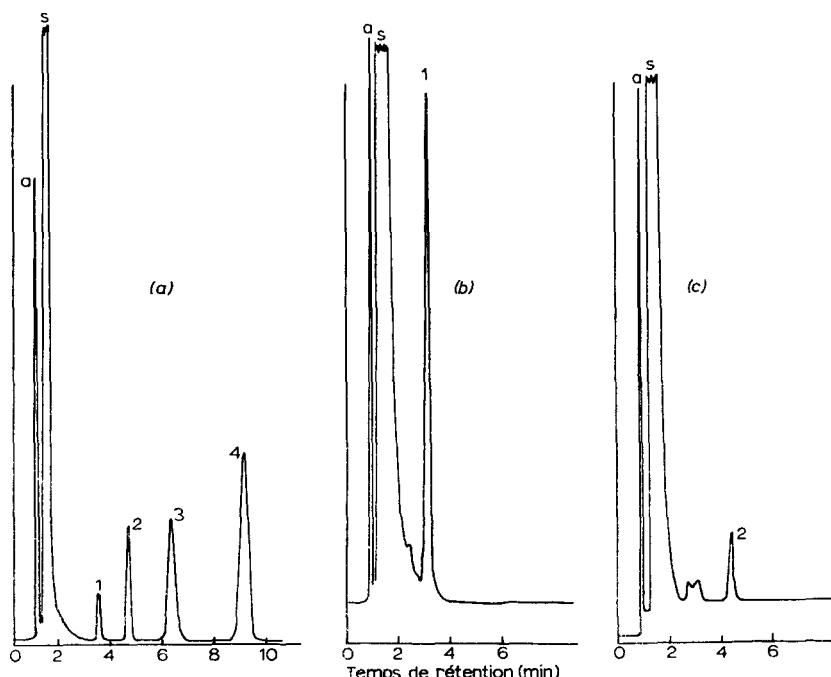


Fig. 4. Chromatogrammes gaz-liquide des monoesters méthyliques obtenus par coupure oxydative des esters éthyléniques. Colonne diéthylène glycol succinate à 155°. (a), Mélange d'esters témoins; (b), monoester provenant de l'hexadécenoate de méthyle (Fig. 1, Pic No. 5); (c), monoester provenant de l'heptadécenoate de méthyle (Fig. 1a, Pic No. 9). a, Air; s, solvant; 1, C<sub>7</sub> n; 2, C<sub>8</sub> n; 3, C<sub>9</sub> n; 4, C<sub>10</sub> n.

initiales avec les courbes obtenues après hydrogénéation et après bromuration. Ils ont été préparés par chromatographie gaz-liquide après séparation des acides saturés avec l'acétate mercurique. L'oxydation par le mélange permanganate-periodate<sup>12</sup> a été effectuée sur 1 à 3 mg d'ester; les produits d'oxydation, analysés par chromatographie gaz-liquide, ont permis de préciser l'emplacement de la double liaison.

1. Acide 9-hexadécénoïque (Fig. 1, Pic. No. 5). Nous avons isolé des Fractions I et II de *N. asteroides* 9969 et de *N. rugosa* un acide hexadécénoïque. Après coupure oxydative de la double liaison, estérification des produits obtenus, la chromatographie gaz-liquide permet d'identifier les esters de l'acide heptanoïque (Fig. 4b) et de l'acide azélaïque (Fig. 5b). Le spectre infrarouge montre l'absence de bande à  $970\text{ cm}^{-1}$  caractéristique de  $>\text{C}=\text{C}<\text{trans}$ . Il s'agit donc d'acide palmitoléique. Cet acide est assez commun dans les lipides bactériens<sup>33</sup>.

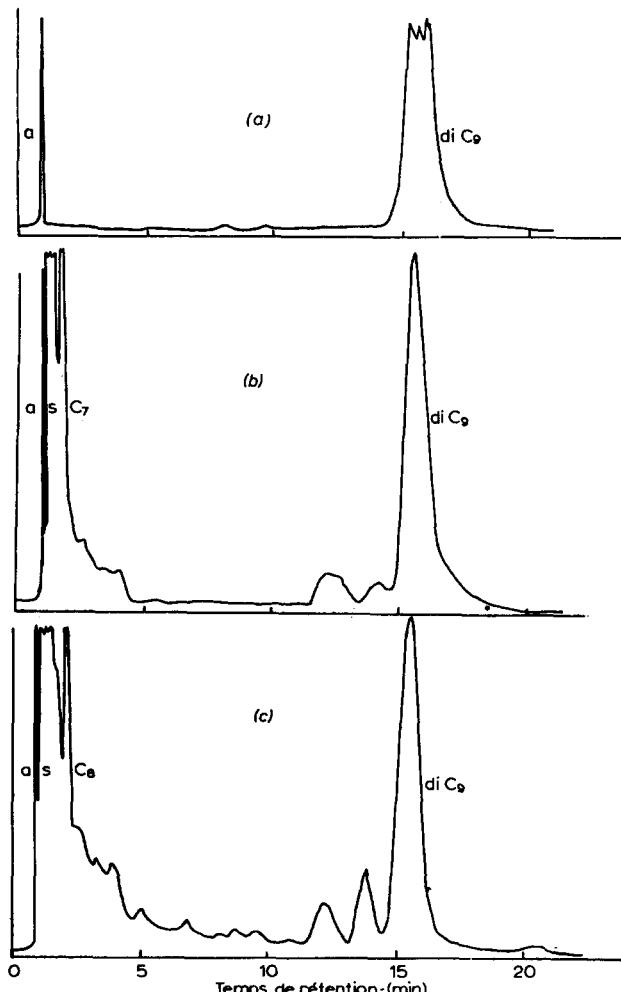


Fig. 5. Chromatogrammes gaz-liquide des diesters méthyliques obtenus par coupure oxydative des esters éthyléniques. Colonne diéthylène glycol succinate, à  $200^\circ$ . (a), Diester témoignage; (b), diester provenant de l'hexadécénoate de méthyle (Fig. 1, Pic No. 5); (c), diester provenant de l'heptadécénoate de méthyle (Fig. 1a, Pic No. 9). a, Air; s, solvant.

2. Acide 10-hexadécénique (Fig. 1, Pic No. 5). 7.8 mg d'acide hexadécénique ont été isolés de la Fraction III de *N. asteroides* 535. L'analyse des produits obtenus après oxydation et estérisation indique la présence de sébacate de méthyle et d'hexanoate de méthyle (Fig. 6). L'acide initial est donc l'acide 10-hexadécénique.

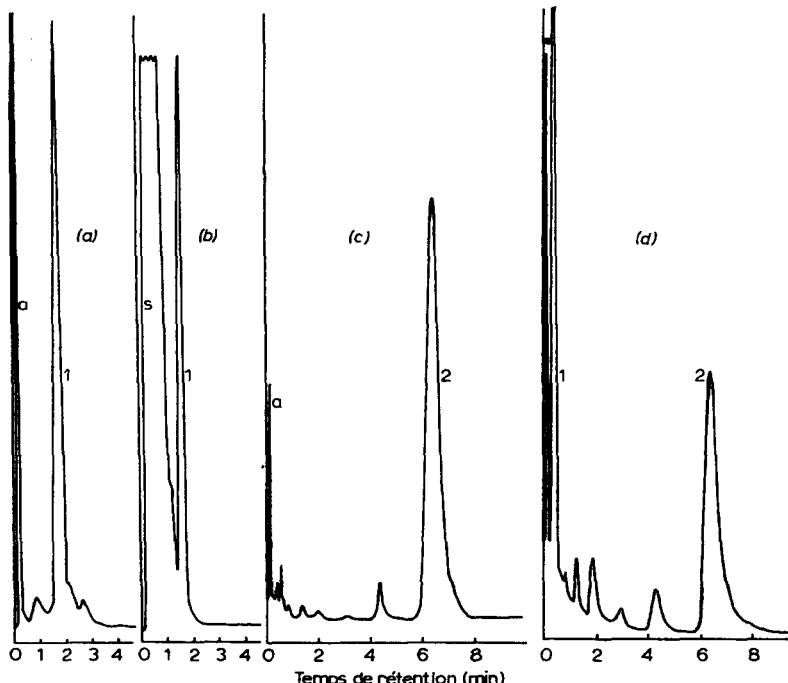


Fig. 6. Chromatogrammes gaz-liquide des esters obtenus par coupure oxydative du 10-hexadécénate de méthyle. Colonne Apiezon M; température *a* et *b*, 137°; *c* et *d*, 230°. (*a*), Monoester témoin; (*b*), monoester inconnu; (*c*), diester témoin; (*d*), diester inconnu. *a*, Air; *s*, solvant; *1*, C<sub>6</sub> n; *2*, di C<sub>10</sub>.

Cet acide n'avait jamais été trouvé dans les lipides bactériens. Récemment, il a été signalé par BLOCH *et al.*<sup>30,33</sup> dans *M. phlei* et par CASON *et al.*<sup>34</sup> dans *M. tuberculosis* H 37. On constate ainsi une nouvelle parenté biochimique entre Nocardia et mycobactéries. Cependant il est nécessaire de rechercher systématiquement cet acide dans d'autres genres bactériens avant de tirer une conclusion de ces premiers résultats.

3. Acide 9-heptadécénique (Fig. 1a, Pic No. 9). L'étude de la Fraction I de *N. rugosa* nous a permis d'isoler en faible quantité un ester éthylénique en C<sub>17</sub>. Après coupure oxydative de la double liaison, on identifie par chromatographie gaz-liquide l'octanoate de méthyle (Fig. 4c) et le diester de l'acide azélaïque (Fig. 5c).

L'acide initial est donc l'acide 9-heptadécénique. Cet acide a été isolé par SHORLAND ET JESSOP<sup>35</sup> des acides gras de la laine et par CHISHOLM ET HOPKINS<sup>36</sup> des graisses de dépôt d'*Ovibos moschatus*. Il n'a jamais été signalé jusqu'à présent dans les lipides bactériens.

4. Acide 9-octadécénique (Fig. 1, Pic No. 12). Cet acide a été isolé par chromatographie gaz-liquide. Les composés obtenus après coupure oxydative ont été identifiés aux esters méthyliques de l'acide pélargonique et de l'acide azélaïque

(Fig. 7). Le spectre infrarouge ne présente aucune bande  $>\text{C}=\text{C}<$  *trans* à  $970 \text{ cm}^{-1}$ . Il s'agit donc de l'acide oléique. Il a déjà été trouvé dans plusieurs bactéries, en particulier dans différentes souches du bacille tuberculeux<sup>37</sup> et dans *M. marianum*<sup>38</sup>.

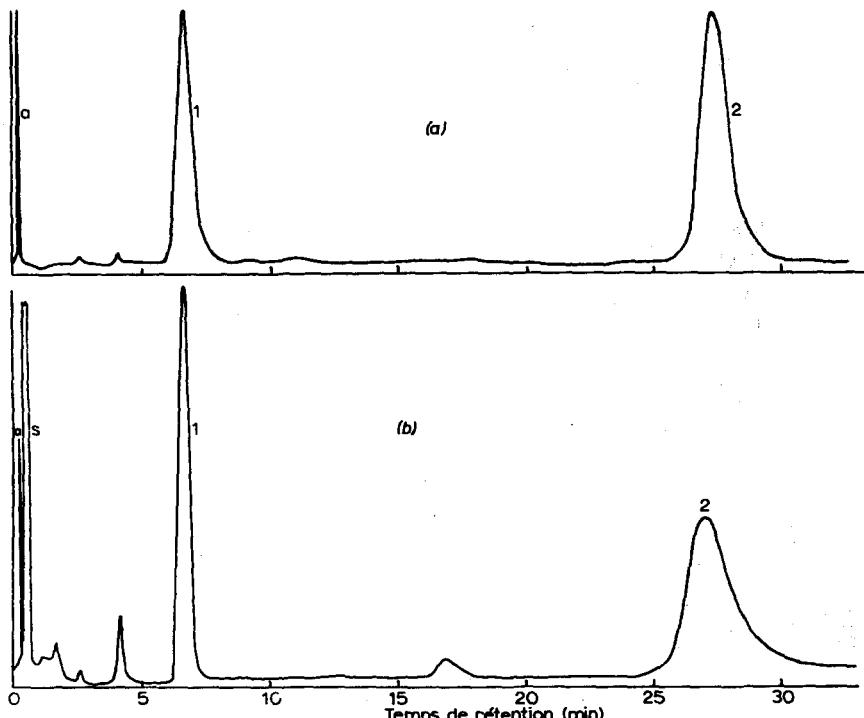


Fig. 7. Chromatogramme gaz-liquide des esters obtenus par coupure oxydative de l'octadécénoate de méthyle (Fig. 1, Pic No. 12). Colonne Apiezon M, à  $170^\circ$ . (a), Esters témoins; (b), esters inconnus. a, Air; s, solvant; 1,  $\text{C}_8\text{n}$ ; 2, di  $\text{C}_8$ .

#### CONCLUSIONS

La composition en acides gras des graisses solubles dans l'acétone, isolées de plusieurs souches de *Nocardia*, s'est révélée très complexe. Tous les acides sont compris entre  $\text{C}_{14}$  et  $\text{C}_{19}$ , aucun homologue supérieur n'a été décelé. Le constituant le plus abondant est, dans la majorité des souches, l'acide palmitique (voir Tableau II).

Les lipides des *Nocardia* sont riches en acides éthyléniques et ramifiés. Parmi ces derniers il faut souligner la présence d'acide tuberculostéarique dans les souches de *N. asteroides* et *N. brasiliensis* (10-30 % des acides totaux).

Les acides insaturés sont constitués en majeure partie d'acide oléique, plus de 30 % des acides gras totaux de *N. lurida*. Il faut noter aussi la présence d'un acide assez inhabituel, inconnu chez les bactéries, l'acide 9-heptadécénique en proportion relativement importante chez *N. rugosa* (12 % des acides gras totaux).

D'autre part, deux acides hexadécéniques ont été identifiés. A côté de l'acide palmitoléique on trouve chez *N. asteroides* un pourcentage assez fort d'acide 10-hexadécénique. Celui-ci vient d'être découvert par ailleurs chez *M. tuberculosis* et *M. phlei*.

Ces résultats établissent de nouvelles similitudes de composition entre les lipides des mycobactéries et des *Nocardia*.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions M. le Professeur E. LEDERER de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à nos recherches.

Ce travail a bénéficié de subventions de la "Fondation Waksman pour le Développement des Études microbiologiques en France" et du National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Grant E 28-38), United States Public Health Service.

## RÉSUMÉ

Nous avons étudié la nature des acides gras libres et estérifiés isolés des graisses acétono-solubles de *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia lurida* et *Nocardiarugosa*.

Dans les acides non hydroxylés nous avons trouvé des acides saturés à chaîne droite de  $C_{14}$  à  $C_{19}$ , l'acide palmitique étant le constituant principal.

Les acides saturés à chaîne ramifiée comprennent les acides iso et anteiso  $C_{15}$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{17}$ , iso  $C_{18}$  et l'acide 10-méthyloctadécanoïque.

Plusieurs acides éthyléniques ont été identifiés: acides 9-hexadécénoïque, 10-hexadécénoïque, 9-heptadécénoïque et acide oléique.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> M. GUINAND, G. MICHEL ET E. LEDERER, *Compt. Rend.*, 246 (1958) 848.
- <sup>2</sup> M. GUINAND ET G. MICHEL, *Compt. Rend.*, 256 (1963) 1621.
- <sup>3</sup> G. MICHEL, C. BORDET ET E. LEDERER, *Compt. Rend.*, 250 (1960) 3518.
- <sup>4</sup> G. MICHEL ET E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. France*, (1962) 651.
- <sup>5</sup> R. J. ANDERSON, *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe*, 3 (1939) 145.
- <sup>6</sup> E. TWITCHELL, *Ind. Eng. Chem.*, 13 (1921) 807.
- <sup>7</sup> J. CHATT, *Chem. Rev.*, 48 (1951) 7.
- <sup>8</sup> Y. KISHIMOTO ET N. S. RADIN, *J. Lipid Res.*, 1 (1959) 73.
- <sup>9</sup> H. SCHLENK ET J. L. GELLERMAN, *Anal. Chem.*, 32 (1960) 1412.
- <sup>10</sup> W. R. MORRISON, T. D. V. LAWRIE ET J. BLADES, *Chem. Ind. London*, (1961) 1534.
- <sup>11</sup> E. VON RUDLOFF, *Can. J. Chem.*, 34 (1956) 1413.
- <sup>12</sup> T. CHANG ET C. C. SWEENEY, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 170.
- <sup>13</sup> D. P. ARCHER ET W. J. HICKINBOTTOM, *J. Chem. Soc.*, (1954) 4197.
- <sup>14</sup> W. SONNEVELD, P. H. BEGEMANN, G. J. VAN VEERS, R. KEUNING ET J. C. M. SCHOGT, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 351.
- <sup>15</sup> C. BORDET ET G. MICHEL, *Compt. Rend.*, 256 (1963) 3482.
- <sup>16</sup> J. CASON, J. S. FESSENDEN ET C. L. AGRE, *Tetrahedron*, 7 (1959) 289.
- <sup>17</sup> N. S. RADIN, A. K. HAJRA ET Y. AKAHORI, *J. Lipid Res.*, 1 (1960) 250.
- <sup>18</sup> G. DIJKSTRA, *Nature*, 192 (1961) 965.
- <sup>19</sup> R. RYHAGE ET E. STENHAGEN, *J. Lipid Res.*, 1 (1960) 361.
- <sup>20</sup> K. SAITO, *J. Biochem. Tokyo*, 47 (1960) 710.
- <sup>21</sup> M. J. ALLISON, M. P. BRYANT, I. KATZ ET M. KEENEY, *J. Bacteriol.*, 83 (1962) 1084.
- <sup>22</sup> A. H. ETEMADI, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, sous presse.
- <sup>23</sup> S. AKASHI ET K. SAITO, *J. Biochem. Tokyo*, 47 (1960) 222.
- <sup>24</sup> M. G. MAC FARLANE, *Biochem. J.*, 79 (1961) 4P.
- <sup>25</sup> T. KANEDA, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 1222.
- <sup>26</sup> R. RYHAGE, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 670.
- <sup>27</sup> R. J. ANDERSON ET E. CHARGAFF, *J. Biol. Chem.*, 85 (1929) 77.
- <sup>28</sup> J. CASON, G. SUMRELL, C. F. ALLEN, G. A. GILLIES ET S. ELBERG, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 435.
- <sup>29</sup> J. CASON, C. F. ALLEN, W. DE ACETIS ET G. J. FONKEN, *J. Biol. Chem.*, 220 (1956) 893.
- <sup>30</sup> W. J. LENNARZ, G. SCHEUERBRANDT ET K. BLOCH, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 664.
- <sup>31</sup> J. FREUND, *Advan. Tuberc. Res.*, Vol. 7, S. Karger, Basel-New York, 1956, p. 130.
- <sup>32</sup> C. S. CUMMINS ET H. HARRIS, *J. Gen. Microbiol.*, 18 (1958) 173.
- <sup>33</sup> G. SCHEUERBRANDT ET K. BLOCH, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 2064.
- <sup>34</sup> J. CASON ET W. T. MILLER, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 883.
- <sup>35</sup> F. B. SHORLAND ET A. S. JESSOP, *Nature*, 176 (1955) 737.
- <sup>36</sup> M. J. CHISHOLM ET C. Y. HOPKINS, *Can. J. Chem.*, 35 (1957) 1434.
- <sup>37</sup> J. CASON ET P. TAVS, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1401.
- <sup>38</sup> G. MICHEL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41 (1959) 1649.