

The high activity in the  $\alpha$ -carbon of the two samples of 23 h:0 acid, in contrast to the distribution in the 22 h:0 and 24 h:0 acids, supports the hypothesis. Apparently the molecules of 23 h:0 formed shortly after injection are made from non-radioactive primary acid (17:0?) and 24 h:0 acid and highly radioactive acetate. The later molecules are formed from slightly active acetate, somewhat active primary acid, and 24 h:0 acid whose  $\alpha$ -carbons are only slightly labeled. The data do not rule out direct conversion of 24:0 to 23 h:0, or  $\alpha$ -degradation of the odd-numbered acids to form even-numbered acids. The data for the normal acid, 23:0, indicate that synthesis from propionate is the only important route.

Dr. MEAD has kindly told us of a similar degradation study with younger rats which supports the  $\alpha$ -degradation scheme for 23 h:0 synthesis.

*Mental Health Research Institute, University of Michigan,  
Ann Arbor, Mich. (U.S.A.)*

AMIYA K. HAJRA  
NORMAN S. RADIN

- <sup>1</sup> A. K. HAJRA AND N. S. RADIN, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 327.  
<sup>2</sup> N. S. RADIN AND Y. AKAHORI, *J. Lipid Res.*, 2 (1961) 335.  
<sup>3</sup> R. O. MARTIN AND P. K. STUMPF, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 2548.  
<sup>4</sup> A. J. FULCO AND J. F. MEAD, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2416.

Received September 17th, 1962

*Biochim. Biophys. Acta*, 70 (1963) 97-99

PN 1182

### **Sur la présence d'ornithine dans des lipides bactériens\***

Le principal constituant azoté présent dans la fraction phosphatidique des Mycobactéries a été identifié à la L-ornithine par GENDRE ET LEDERER<sup>1</sup>; ce résultat a été confirmé par la suite<sup>2</sup>. De petites quantités d'autres acides aminés peuvent exister à côté de l'ornithine<sup>2,3</sup>.

L'ornithine a été retrouvée, à côté d'éthanolamine, dans les produits d'hydrolyse de phospholipides de *Vibrio cholerae*<sup>4</sup> et de *Brucella melitensis*<sup>5</sup>, et à côté d'autres acides aminés, dans ceux de *Salmonella typhosa*<sup>6</sup>.

Tous ces travaux ont montré la présence d'ornithine, sans apporter de précision sur la forme sous laquelle elle existe dans les phospholipides considérés. Cependant, dans une note récente, PAUL ET VILKAS<sup>7</sup> ont décrit l'isolement, à partir des produits de saponification des phospholipides de *Mycobacterium phlei*, d'une petite quantité (3% du phospholipide de départ) d'une fraction insoluble dans l'eau et soluble dans le chloroforme, contenant tous les acides aminés présents dans le produit initial; aucune recherche de phosphore sur cette fraction n'est mentionnée.

Nous étudions actuellement les lipides d'une souche de Mycobactérie, No. 1217, reçue de Varsovie par l'intermédiaire du Professeur HAUDUROY (Lausanne), qui

\* 2ème communication sur la chimie des micro-organismes; 1ère comm., voir réf. 11.

semble être une souche "atypique" scotochromogène: Les bacilles que nous utilisons ont été cultivés pendant 4 semaines sur milieu de Sauton, et les lipides ont été extraits par le procédé d'ANDERSON<sup>8</sup>.

La fraction phosphatidique brute se présente sous forme d'un solide presque incolore,  $F 170-180^\circ$ ,  $[\alpha]_D + 24^\circ$  ( $CHCl_3$ ), contenant 1.0 % P et 1.0 % N. Par chromatographie sur acide silicique, elle peut être séparée en une fraction azotée pauvre en phosphore (éluée par du chloroforme contenant peu de méthanol), et des fractions phosphorées dépourvues d'azote (éluées par du chloroforme contenant 20 % de méthanol).

La fraction azotée ( $F 100-105^\circ$ , 1.3 % N et 0.7 % P) a été soumise à une hydrolyse acide, et la partie hydrosoluble a été analysée par chromatographie sur papier. La révélation par l'acide periodique et la benzidine fournit une seule tache correspondant au glycérol. Un seul constituant révélé par la ninhydrine a été observé: il a été identifié à l'ornithine par sa similitude de migration dans le phénol-ammoniacal ( $R_F 0.77$ ), le butanol-acide acétique ( $R_F 0.08$ ) et le phénol-acide acétique ( $R_F 0.50$ ). Cette identification a été complétée par la révélation spécifique par le réactif à la vanilline<sup>9</sup>.

Cette fraction a été rechromatographiée sur acide silicique: toutes les fractions obtenues contiennent de l'azote et du phosphore. Le rapport N/P varie de 3 pour les fractions les moins adsorbées à 1.5 pour les fractions les plus adsorbées; toutes ne renferment que de l'ornithine comme constituant azoté. La fraction la moins adsorbée (éluée par du chloroforme contenant 2 % de méthanol) présente les propriétés suivantes:  $F 50-70^\circ$ ,  $[\alpha]_D + 18^\circ$ , 1.5 % N et 0.5 % P.

La répétition de la chromatographie sur acide silicique entraîne un enrichissement en azote et un appauvrissement en phosphore de la fraction la moins adsorbée. Ceci montre qu'elle consiste en un mélange d'une substance azotée dépourvue de phosphore, et d'une substance phosphorée dépourvue d'azote, c'est à dire en un mélange d'un dérivé de l'ornithine et de composés du type acides phosphatidiques (les moins adsorbés sur acide silicique parmi les glycérophosphatides).

La séparation complète par chromatographie de ces deux types de constituants nécessitant trop de temps et de substance, nous avons eu recours à la désacylation alcaline<sup>10</sup> pour modifier la structure du constituant glycérophosphatidique. Le produit brut de désacylation a été séparé en fraction neutre (75 %) et fraction acide (11 %). La fraction neutre a été chromatographiée sur acide silicique. Environ 60 % du produit, consistant principalement en esters méthyliques d'acides gras (formés par transestérification au cours de la désacylation), sont rapidement élués de la colonne. 35 % du produit sont élués par du chloroforme contenant peu de méthanol: cette fraction se présente sous forme d'un solide cireux,  $F 85-90^\circ$ ,  $[\alpha]_D + 15^\circ$ , 3.6 % N, dépourvue de phosphore. Son hydrolyse libère, à côté d'acides gras éthersolubles, de l'ornithine, mise en évidence par chromatographie sur papier; aucun autre constituant hydrosoluble n'a été décelé. Le spectre infrarouge montre la présence de liaison amide (bandes à 6.15 et 6.45  $\mu$ ), de chaînes polyméthéniques (bande relativement forte à 13.9  $\mu$ ), et l'absence de carboxyle libre.

Cette fraction se comporte donc comme une combinaison d'acide(s) gras et d'ornithine. La teneur en azote, correspondant à environ 17 % d'ornithine, permet de calculer un poids moléculaire minimum de 775; à titre d'exemple, un *N,N'*-distéaroyl ornithine,  $C_{41}H_{80}O_4N_2$ , possède un poids moléculaire de 665 et une teneur

en ornithine de 19.8 %. La structure de la fraction que nous avons isolée est plus complexe, puisque, d'après son spectre infrarouge, elle ne possède pas de carboxyle libre et qu'elle donne avec la ninhydrine un test (faiblement) positif (une faible bande à  $2.9 \mu$  dans le spectre infrarouge peut correspondre à un groupe  $-\text{NH}_2$  libre). En outre, cette fraction a été isolée par chromatographie, mais son homogénéité n'a pas été démontrée.

Il reste encore à savoir si la désacylation alcaline a modifié la structure du dérivé de l'ornithine initialement présent dans la fraction phospholipidique. La similitude de comportement sur acide silicique entre le produit azoté obtenu après désacylation, et les fractions riches en azote isolées par chromatographie avant désacylation, rend peu probable cette éventualité, sans l'exclure complètement.

Ce travail montre que l'ornithine n'est pas un constituant des phospholipides de notre souche de Mycobactérie, mais se trouve sous forme d'une combinaison avec des acides gras, dépourvue de phosphore, dont les caractères de solubilité et d'adsorbabilité rendent difficile sa séparation des phospholipides.

Le type de combinaison entre acide(s) gras et acide aminé discuté ici se différencie nettement des peptido-lipides mis en évidence chez certaines espèces de Mycobactéries (*M. paratuberculosis*<sup>11</sup>, *M. fortuitum*<sup>12</sup>), et se rapproche davantage des lipo-amino acides caractérisés chez *Bacillus megaterium*<sup>13</sup> ou dans certains matériels d'origine animale (par ex, ref. 14). Dans ce dernier cas<sup>14</sup>, l'acide aminé semble être lié par des liaisons du type amide qui font intervenir à la fois le carboxyle et le groupe aminé. Le rôle particulier joué chez certaines espèces bactériennes par l'ornithine est encore complètement inexpliqué.

Nous remercions vivement Monsieur le Dr. J. BRETEY et Monsieur le Professeur J. TREFOUEL (Institut Pasteur, Paris) pour la culture de grosses quantités de bactéries. Ce travail a fait l'objet d'une subvention de la Fondation Waksman pour le Développement des Etudes microbiologiques en France.

*Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, MARIE-ANTOINETTE LANÉELLE  
Toulouse (France) G. LANÉELLE  
J. ASSELINÉAU*

<sup>1</sup> T. GENDRE ET E. LEDERER, *Ann. Acad. Sci. Fennicae, ser. A II*, 60 (1955) 313.

<sup>2</sup> E. VILKAS, *thèse Doct. Sci.*, Paris, 1960.

<sup>3</sup> E. VILKAS ET E. LEDERER, *Compt. Rend.*, 240 (1955) 1156.

<sup>4</sup> J. BLASS, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 38 (1956) 1305.

<sup>5</sup> J. ROUX ET J. ASSELINÉAU, résultats inédits.

<sup>6</sup> S. ČMELIK, *Z. Physiol. Chem.*, 299 (1955) 227.

<sup>7</sup> F. PAUL ET E. VILKAS, *Compt. Rend.*, 254 (1962) 3915.

<sup>8</sup> R. J. ANDERSON, *Forts. Chem. Org. Naturstoffe*, 3 (1939) 145.

<sup>9</sup> M. JUTISZ, in E. LEDERER, *La chromatographie en chimie organique et biologique*, Vol. 2, Masson, Paris, 1960, p. 374.

<sup>10</sup> R. M. C. DAWSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 374.

<sup>11</sup> G. LANÉELLE ET J. ASSELINÉAU, *Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 731.

<sup>12</sup> E. VILKAS ET E. LEDERER, communication personnelle.

<sup>13</sup> G. D. HUNTER ET R. A. GOODSALL, *Biochem. J.*, 78 (1961) 564.

<sup>14</sup> R. W. HENDLER, *Biochim. Biophys. Acta*, 60 (1962) 90.

Reçu le 28 Septembre, 1962