

EVOLUTION DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE DE *NOCARDIA ASTEROIDES* AU COURS DE LA CROISSANCE *

C.BORDET, M.J.VACHERON et G.MICHEL

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences de Lyon,
Villeurbanne, France

Received 23 September 1969

By addition of 1-¹⁴C-sodium acedate to the growth medium of *Nocardia asteroides*, it can be shown that the lipid content increases during the exponential phase, but does not vary during the stationary phase of the growth. Nocardic acid biosynthesis from the medium molecular weight fatty acids occurs chiefly during the stationary phase. As these compounds are localised in the cell walls, it becomes evident that the lipid envelope of the walls is still increasing when the cell growth and division have stopped.

1. Introduction

Les lipides de *Nocardia asteroides* 9969 comprennent essentiellement des acides gras non hydroxylés, des acides nocardiques, des nocardols et des nocardones. L'acide gras le plus abondant est l'acide palmitique, on trouve également les acides myristique, stéarique, nonadécanoïque et tuberculostéarique [1]. Les acides nocardiques, les nocardols et les nocardones représentent un ensemble de composés à haut poids moléculaire mono, di et triéthyléniques, leur biogénèse s'effectue à partir des acides gras de poids moléculaire moyen en C₁₄, C₁₆ et C₁₈ [2,3]. Le rôle de ces composés à haut poids moléculaire dans la cellule bactérienne est encore mal connu. Il est possible que leur biosynthèse ne soit pas constante lors de la croissance bactérienne, nous avons donc étudié la variation de la composition lipidique après différents temps de culture de *Nocardia asteroides*. Le taux de chacun des composés lipidiques est déterminé par addition au milieu de culture d'acétate de sodium ¹⁴C-1 qui est incorporé dans les lipides bactériens.

2. Methods

2.1. Obtention des bactéries

La culture des *Nocardia* est effectuée dans un fermenteur New Brunswick à partir de 10 l de milieu

de Sauton auquel on ajoute 0,5 mCi d'acétate de sodium ¹⁴C-1, activé spécifique 10 mCi/mmmole. Le milieu de culture est aéré par un courant stérile et agité à 200 tours/min. Un prélèvement de 500 ml est effectué tous les quatre jours, les bactéries sont centrifugées et culot de centrifugation est lavé deux fois par une solution de K₂HPO₄, MgSO₄ à 0,5 g/l. Le dernier liquide de lavage ne renferme plus de radioactivité.

2.2. Fractionnement des lipides

Le résidu bactérien est extrait 2 fois par le mélange chloroforme-méthanol 2:1 sous agitation pendant 12 h, on utilise 50 ml de solvant par g de bactéries. La solution lipidique est lavée 3 fois selon Folch et al. (4) avec une solution aqueuse de NaCl à 0,58%, puis le solvant est évaporé sous vide et on obtient les lipides totaux. Les lipides sont saponifiés par une solution méthanolique de potasse à 5% et la fraction étherosoluble recueillie après acidification de la solution. Les produits de saponification sont séparés par chromatographie en couches minces sur plaques de gel de silice G avec le solvant hexane-éther 95:5. Les lipides sont révélés par pulvérisation d'une solution de rhodamine G puis de fluorescéine, l'emplacement des composés radioactifs est indiqué par autoradiographie. Les taches apparaissant à la rhodamine-fluorescéine co-

* 17^e Communication sur les constituants des *Nocardia*, 16^e Communication, voir réf. [3].

incident avec celles de l'autoradiogramme, trois groupes de composés sont ainsi obtenus correspondant aux nocardones, nocardols et acides gras. La fraction lipidique acide de $R_f < 0,5$ est reprise, élue du gel de silice par l'éther et estérifiée par le diazométhane. Une nouvelle chromatographie sur couches minces dans le solvant hexane-éther 75:25 permet de séparer les esters des acides gras non hydroxylés les esters nocardiques.

2.3. Mesure de la radioactivité

Chaque groupe de lipides est élué du gel de silice par l'éther. Après évaporation du solvant la radioactivité du résidu est mesurée avec un passeur automatique à très faible mouvement propre Biospan 4342 Nuclear Magnetic Chicago.

3. Resultats

Les *Nocardia* cultivés en fermenteur avec aération et agitation continue ont un aspect très différent des *Nocardia* provenant de cultures en surface, ils n'ont pas une structure filamenteuse et ils se présentent sous

la forme de petits grains sédimentant facilement. La courbe de croissance déterminée par pesée du mycélium de chaque prélèvement indique une phase exponentielle de 12 jours suivie d'une phase stationnaire (fig. 1, courbe A).

La quantité de lipides totaux augmente fortement au cours de la phase exponentielle et demeure constante pendant la phase stationnaire au voisinage de 20% du poids sec des bactéries (fig. 1, courbe B).

Il est intéressant de constater les variations des différents types de lipides (fig. 2). Le pourcentage d'acides gras de poids moléculaire moyen non hydroxylés diminue régulièrement et passe de 64% des lipides totaux après 4 jours de culture, à 44% au bout de 32 jours (fig. 2, courbe A). Le taux d'acides nocardiques qui augmente légèrement pendant la période de croissance exponentielle présente une augmentation plus importante au cours de la phase stationnaire, passant de 16% au bout de 12 jours à 34% après 32 jours de culture (fig. 2, courbe B); par contre, les nocardols (fig. 2, courbe C) et les nocardones (fig. 2, courbe D) restent sensiblement constants : 20% pour les nocardols, 5% pour les nocardones pendant toute la durée de la culture.

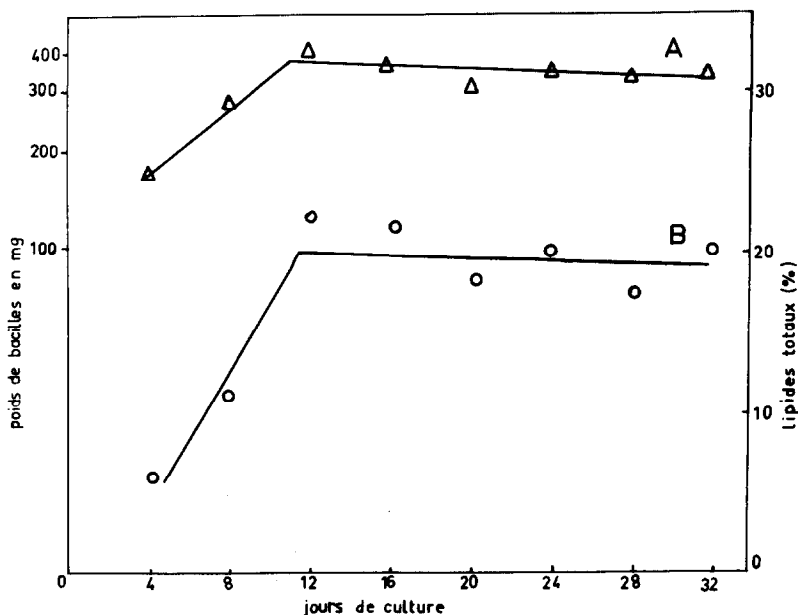


Fig. 1. A - Courbe de croissance de *Nocardia asteroides*.
B - Lipides totaux exprimés en % du poids de bacilles.

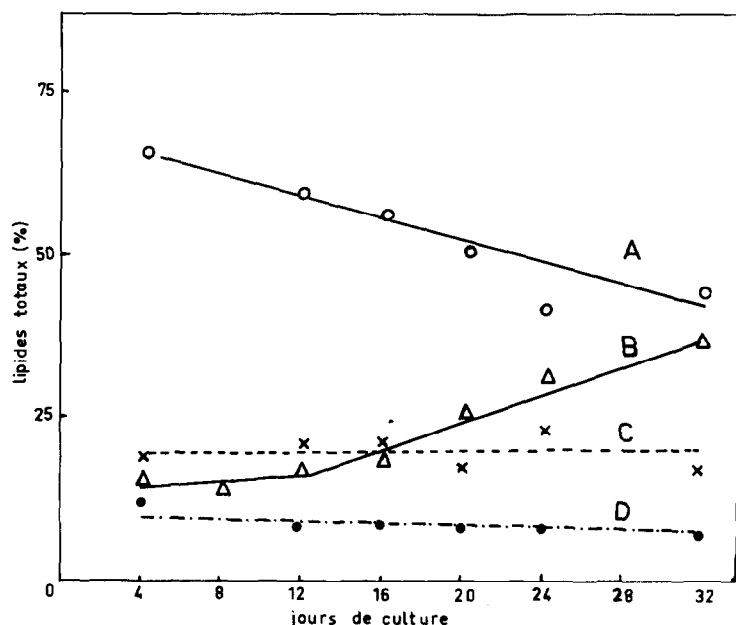


Fig. 2. Variation des différents lipides au cours de la culture, les quantités de chaque composé sont exprimées en % des lipides totaux. A - Acides gras non hydroxylés - B - Acides nocardiques C - Nocardols - D - Nocardones.

4. Discussion

L'incorporation de l'acétate d'effectue rapidement dès les premiers jours de la culture et ce sont essentiellement les acides gras de poids moléculaire moyen : C₄ à C₁₉ qui possèdent la majeure partie de la radioactivité. Le pourcentage des lipides totaux augmente au cours de la phase exponentielle, passant de 6% au quatrième jour à 22% au douzième jour, pour rester ensuite stationnaire. Les dosages de phosphore effectués sur les différents prélèvements indiquent un taux constant du phosphore lipidique. La proportion de phospholipides reste donc uniforme au cours de la culture, il est vraisemblable qu'il n'y a pas de modification dans la composition de la membrane cytoplasmique.

Les variations quantitatives et qualitatives des composés lipidiques affectent plutôt les lipides des parois cellulaires. On sait en effet qu'un pourcentage important de lipides constitués d'esters d'acides gras de poids moléculaire moyen et d'acides nocardiques se retrou-

vent dans les parois de Nocardia [5]. La présence des acides mycoliques a également été démontrée dans les parois des mycobactéries [6,7]. L'augmentation du taux d'acides nocardiques aux dépens des acides gras, plus importante encore lors de la phase stationnaire, montre que la biosynthèse des acides nocardiques continue, bien que la croissance et la division bactérienne soient arrêtées. Ainsi, la couche lipidique externe qui constitue une sorte de coque protectrice hydrophobe pour la bactérie s'enrichit encore en acides nocardiques lors de la période de repos de la bactérie correspondant à un ralentissement ou à un arrêt des activités métaboliques.

Références

- [1] C.Bordet et G.Michel, *Biochem. Biophys. Acta* 70 (1963) 613.
- [2] C.Bordet, Thèse Doctorat Université de Lyon (1967).
- [3] C.Bordet et G.Michel, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 51 (1969) 527.

- [4] J.Folch, M.Lees et G.H.S.Stanley, J. Biol. Chem. 226
(1957) 496.
[5] Résultats inédits.

- [6] F.Kanetsuna, Biochim. Biophys. Acta 158 (1968) 130.
[7] I.Azuma, Y.Yamamura et K.Fukushi, J.Bacteriol. 96
(1968) 1885.