

5 cm³ d'eau. Après 2 h., on coule dans de l'eau, on essore et on cristallise dans l'éthanol. On obtient des aiguilles incolores F. 384°.

$C_{16}H_{10}ON_2$ Calculé C 78,03 H 4,09 N 11,38%
Trouvé „, 78,03 „, 3,83 „, 11,53%

Remarque. Si l'on opère la réaction indiquée sous c) en présence de 100 cm³ d'alcool, on obtient un produit fondant mal entre 243—253°, qui semble être en majeure partie un dérivé non cyclisé.

$C_{16}H_{13}O_2N_3$ Calculé C 68,80 H 4,69 N 15,05%
Trouvé „, 69,74 „, 4,57 „, 15,12%

Ce produit se cyclise en fondant. Si on le traite par du nitrite pour obtenir un azide, il se forme en partie la lactone F. 248° et en partie le lactame de sorte qu'une dégradation par ce moyen n'a pas réussi.

RÉSUMÉ.

Il est décrit la synthèse de la lactone de l'(o-carboxy-phényl)-2-hydroxy-3-quinoléine (I) et de l'(o-carboxy-phényl)-3-hydroxy-2-quinoléine (II).

Sont décrits des essais infructueux pour préparer la lactone de l'(o-carboxy-phényl)-3-hydroxy-4-quinoléine (III).

Par des essais comparatifs du comportement de l'hydrazide dérivant du produit II et de l'hydrazide provenant d'une lactone de composition inconnue obtenue dans la dégradation du jaune Höchst R, les auteurs en arrivent à la conclusion que cette lactone inconnue doit avoir la constitution correspondant à la formule III.

Institut de chimie de l'Université de Fribourg (Suisse).

129. Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un bacille paratuberculeux IV¹).

A. Précisions sur la nature des composants de la pigmentation.

B. Action anticaroténogène du phénol

par Gilbert Turian.

(27 IV 51)

A. A l'instar d'autres bacilles acido-résistants (bacille *Lombardo Pellegrini* et bacille de *Grassberger*²), *Mycobacterium leprae*³), *Mycobacterium lacticola*⁴)), le bacille de la fléole (*Mycob. phlei*) élabore une riche gamme de caroténoïdes: α , β et γ -carotènes, léprotène, krypto-

¹⁾ IIIe communication, *Helv.* **33**, 1988 (1950).

²⁾ *E. Chargaff & E. Lederer*, *Ann. Inst. Pasteur* **54**, 383 (1935).

³⁾ *Y. Takeda & T. Ohta*, *Z. physiol. Ch.* **258**, 7 (1939).

⁴⁾ *H. F. Haas & L. D. Bushnell*, *J. Bact.* **48**, 219 (1944).

xanthine, xanthophylle libre ou estérifiée, zéaxanthine, azafrine libre ou estérifiée ont été identifiés chez ce germe¹⁾.

Nous avons récemment signalé l'abondante production (fonction de l'âge du bacille) d'un caroténoïde acide du type céto-énolique par le bacille de la fléole cultivé sur milieu synthétique d'*Ingraham & Steenbock*²⁾ glycérolé (1%) et contenant du fer (1 mg %). Nous rapportons ci-dessous les résultats d'une analyse plus complète des divers pigments élaborés par le bacille cultivé sur ce milieu standard.

Mycobacterium phlei (souche coll. *P. Hauduroy*) âgé de 9 jours est tué (autoclave 100°), filtré, puis desséché. La masse bactérienne est ensuite traitée 3 fois par de l'acétone pur; le résidu reste coloré en jaune par des pigments partiellement extractibles par l'alcool alcalin (KOH). Les extraits acétoniques sont réunis et dilués avec de l'eau pour transférer les pigments dans de l'éther de pétrole. La solution éthéropétrolique est ensuite saponifiée avec de la potasse alcoolique (une nuit à température ordinaire). L'addition d'eau, ad séparation de la solution en deux phases, permet de capturer les caroténoïdes hydrocarbures (épiphase) dans l'éther de pétrole. L'alcool alcalin, coloré en rouge orangé, est acidifié (ac. acétique 1/2) ad virage au jaune et dilué avec un volume égal d'eau; les pigments hypophasiques (caroténoïdes oxygénés neutres ou acides, corps quinoniques éventuels) passent alors aisément dans l'éther de pétrole.

Caroténoïdes épiphasiques. Leur solution éthéropétrolique filtrée sur colonne d'alumine (*Merck*) neutralisée se résout en 3 bandes: une zone rougeâtre au sommet de la colonne, une bande jaune pâle en son milieu; enfin une bande jaune vif rapidement entraînée dans le filtrat représente le pigment principal; son spectre d'absorption dans l'éther de pétrole, déterminé avec l'appareil de *Beckman*³⁾, correspond à celui du β -carotène ou du léprotène: 425—452—480 $\mu\mu$. Les deux autres pigments sont faiblement représentés; nous n'avons pu établir que le spectre du pigment dessinant la bande jaune pâle élue par l'éther de pétrole contenant 1% d'éthanol; les centres de ses bandes d'absorption dans l'éther de pétrole correspondent à ceux du pigment principal.

Caroténoïdes hypophasiques. Filtrée sur alumine neutralisée (*Merck*), leur solution éthéropétrolique forme tout d'abord une large zone au haut de la colonne. L'addition de quelques gouttes d'éthanol à l'éther de pétrole provoque le déplacement rapide d'une faible bande jaune; celle-ci est recueillie dans le filtrat (= H_1). Une importante bande jaune brunâtre (= H_2) peut ensuite être élueée sur colonne avec le mélange éther de pétrole-éthanol (2:1). Une zone jaune ocreâtre, non élueable par l'éthanol 95%, subsiste alors au sommet de la colonne; l'addition d'une goutte de $FeCl_3$ à l'alcool de lavage fait immédiatement virer cette bande au rouge brunâtre; il s'agit vraisemblablement là de composés quinoniques acides du type phtiocol⁴⁾, élueables par KOH alcoolique.

Spectres d'absorption dans l'éther de pétrole:

Fraction H_1 : max. 420—447—475 $\mu\mu$. Xanthophylle identique à la lutéine isolée par *Chargaff*¹⁾.

Fraction H_2 : maximum intense à 449 $\mu\mu$ et légère 2e bande⁵⁾ à ~ 475 $\mu\mu$. Caroténoïde oxygéné à net caractère acide (facilement capté par l'éthanol 50% alcalin (KOH))

¹⁾ *E. Chargaff*, Ann. Inst. Pasteur **52**, 415 (1934); *M. A. Ingraham & H. Steenbock*, Biochem. J. **29**, 2553 (1935); *Y. Takeda & T. Ohta*, Z. physiol. Ch. **262**, 168 (1939); **265**, 233 (1940).

²⁾ *M. A. Ingraham & H. Steenbock*, Biochem. J. **29**, 2553 (1935).

³⁾ Nous remercions M. le Dr *E. Fischer* d'avoir bien voulu mettre à notre disposition le spectro-photomètre de *Beckman* du Laboratoire de chimie organique, ainsi que pour ses conseils techniques.

⁴⁾ *R. J. Anderson & M. S. Newman*, J. biol. Chem. **101**, 773 (1933); **103**, 197 (1933).

⁵⁾ Que le spectro-photomètre de *Coleman* ne permet pas de déceler.

avec virage de coloration du jaune vif au rouge cuivré) en rapport avec une transposition céto-énolique; pigment décrit par nous sous le nom de chrysofléine¹).

Dans nos conditions de culture, *Mycobacterium phlei* synthétise donc deux types de pigments endocellulaires acéto-solubles, à savoir d'abondants caroténoïdes et des pigments acides de nature quinonique.

Les caroténoïdes comprennent: un composant neutre constitué essentiellement de β -carotène (ou de léprotène²) et d'un peu de xanthophylle; un important composant acide constitué par la chrysofléine. Selon nos déterminations quantitatives, l'accroissement du composant polyénique acide en fonction de l'âge des bactéries est corrélatif d'une baisse progressive de la teneur des germes en caroténoïdes neutres; il est donc logique d'admettre que la chrysofléine résulte d'une oxydation biogénétique des caroténoïdes neutres³).

Les propriétés des pigments quinoniques rappellent celles du phticol: coloration rouge foncé avec FeCl_3 , solubilité dans le NaHCO_3 (0,5%).

Le bacille de la fléole élabore en outre des pigments exocellulaires, diffusibles, jaunissant progressivement le milieu de culture. La biosynthèse de ce(s) pigment(s) de type flavinique (fluorescence vert jaunâtre) est très fortement stimulée en milieu synthétique (mineralia-lactate d' NH_4 et de Na-glycérol), s'alcalinisant au cours de la culture (pH après 7 jours: 9,0). Signalons que la biosynthèse de la riboflavine a été bien étudiée chez un autre bacille acido-résistant, *Mycobacterium smegmatis*⁴).

B. Nous avons récemment mis en évidence l'action anticaroténogène de la diphénylamine (Da)³ et avons montré comment la connaissance d'un tel inhibiteur et de son mode d'action peut contribuer à éclairer les étapes du processus biosynthétique. La recherche d'autres «interrupteurs» chimiques de la caroténogénèse s'imposait donc.

Parmi les nombreuses substances dont nous avons étudié l'action sur la pigmentation du bacille de la fléole, seul le phénol (1/2000—1/5000) a fait preuve d'une activité anticaroténogène d'intensité comparable à celle de la Da (1/25000). Parmi les diphénols, le résorcinol (1/1000—1/5000) est déjà 2—3 fois moins actif que le phénol; l'hydroquinone et le pyrocatechol sont trop facilement oxydables. L' α -naphtylamine (1/40000), la thiourée (1/1000—1/5000), le KCN (M/1000) et la salicylaldoxime (1/20000) n'ont manifesté qu'une action inhibitrice faible et inconstante.

Le phénol et la Da diffèrent quant aux modalités de leur action inhibitrice, ainsi qu'en témoigne le tableau ci-dessous:

¹) *G. Turian*, Helv. **33**, 1303 (1950).

²) *Ch. Grundmann & Y. Takeda*, Naturw. **25**, 27 (1937); *Y. Takeda & T. Ohta*, Z. physiol. Ch. **267**, 171 (1941).

³) *G. Turian*, loc. cit. 1, p. 1060.

⁴) *R. L. Mayer & M. Rodbart*, Arch. Biochem. **11**, 49 (1946).

Actions comparées du phénol et de la Da sur la pigmentation jaune du bacille de la fléole.
(Age: 7 jours; pH initial du milieu: 7,2)

Milieu standard ¹⁾ (glucosé 5%) +	Témoins			Phénol $1/_{5000}$			Da $1/_{25000}$		
	pH filtrat	mg	U.C.	pH	mg	% inhibition ²⁾	pH	mg	% inhibition ²⁾
Glucose 1% .	6,0	89	6	7,7	72	~95%	7,1	70	~95%
Glucose 1% + Fe M/6000	6,9	416	26	7,3	238	50%	7,1	364	0%
Glycérol 1% .	5,6	62	25	6,2	64	80%	6,5	53	90%
Glycérol 3% .	5,5	60	59	5,9	65	70%	6,4	55	95%
Glycérol 5% .	5,2	56	80	5,4	53	50%	6,3	62	95%

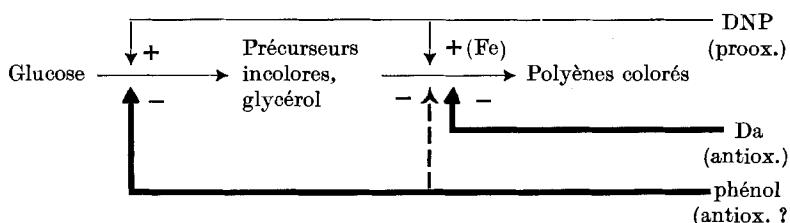
mg = poids sec récolté s/ 25 cm³.

U.C. = unités caroténoïdes, valeurs comparatives obtenues par mesures colorimétriques de l'extrait acétonique total.

Les valeurs exprimées dans ce tableau montrent que le phénol perturbe la caroténogénése spécialement au niveau de la glucose; l'addition de glycérol réduira donc cette inhibition. Par ailleurs, le pH élevé (7,7) du filtrat souligne le ralentissement des transformations de la glucose en présence de phénol. Ce comportement du phénol est l'inverse de celui que nous avons décrit pour la Da³⁾ qui perturbe la caroténogénése à un stade postérieur à celui de l'utilisation immédiate de la glucose. A noter aussi la différence de comportement des deux inhibiteurs en présence de fer (1 mg%).

Parmi les autres composés phénoliques, le m-dinitrophénol (DNP, 10^{-6}) s'est révélé un activateur intéressant de la caroténogénése à partir de glucose ou de glucose + glycérol. Des essais quantitatifs nous ont montré que l'action caroténogène du DNP peut être complètement (milieu glucosé) ou partiellement (mil. glucosé + glycérol) compensée par le pouvoir inhibiteur du phénol. L'action anticaroténogène de la Da n'est pas réduite par 10^{-6} de DNP.

Ces données nouvelles permettent de compléter le schéma que nous avions proposé³⁾ pour représenter les grandes étapes de la biosynthèse des caroténoïdes chez le bacille de la fléole:



+ = stimulation.

- = inhibition.

Nous remercions vivement M. le Prof. F. Chodat pour son précieux appui et ses conseils judicieux.

¹⁾ M. A. Ingraham & H. Steenbock, loc. cit. 6, p. 1.

²⁾ Evaluation colorimétrique de la pigmentation.

³⁾ G. Turian, loc. cit. 1, p. 1060.

RÉSUMÉ.

Les composants endocellulaires de la pigmentation du bacille de la fléole comprennent des caroténoïdes et des pigments quinoniques; nous avons identifié trois caroténoïdes, à savoir β -carotène (ou léprotène), xanthophylle et chrysofléine.

Nous avons mis en évidence l'action anticaroténogène du phénol et signalons le pouvoir chromogène du m-dinitrophénol.

Institut de Botanique générale de l'Université, Genève.

130. Die Wirkung von Carotinoiden auf die Keimung von Cyklamenpollen

von F. H. Schwarzenbach.

(28. III. 51.)

Carotinoide sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Besonders häufig sind sie in Blüten lokalisiert, was zur Vermutung geführt hat, dass diese Pigmente fortpflanzungsphysiologische Vorgänge steuern könnten. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde das folgende Teilproblem herausgegriffen: Sind Carotinoide Wirkstoffe für die Pollenkeimung?

Methodik.

Die versuchstechnische Schwierigkeit bei der Lösung dieser Frage liegt darin, dass Carotinoide extrem lipophile Stoffe sind, während der Pollen zur Keimung Wasser benötigt. Um die Wirkung von Carotinoiden auf die Pollenkeimung feststellen zu können, ist es daher notwendig, gleichzeitig Wasser und ein Fettlösungsmittel an den Pollen heranzubringen. Das lässt sich dadurch erreichen, dass der Blütenstaub in der feuchten Kammer nicht wie üblich in einer wässrigen Nährlösung zur Keimung gebracht, sondern auf Paraffin, das als Lösungsmittel für Carotinoide dient, kultiviert wird. Das für die Keimung benötigte Wasser wird dem Pollen in der feuchten Kammer in Form von Wasserdampf zur Verfügung gestellt.

Versuchsvorschrift. Man löst das zu prüfende Carotinoid in der gewünschten Konzentration in geschmolzenem Paraffin vom Smp. 55°—60°. Ein Tropfen dieser Lösung wird heiß auf ein Deckglas gebracht, wo man ihn erstarren lässt. Nach Abkühlung wird der Tropfen mit Pollen beimpft, indem man den Blütenstaub mit einer Präpariernadel in möglichst dünner Schicht aufstreicht. Das Deckglas wird auf eine mit Paraffinöl oder Vaseline abgedichtete feuchte Kammer aufgesetzt. (Die verwendeten feuchten Kammern bestanden aus einem Objektträger mit aufgekleistem Glasring von 10 mm Höhe und 15 mm lichter Weite.)

Die Versuchsbedingungen für die Pollenkeimung müssen für jede Pflanzenart besonders festgelegt werden. Für Blütenstaub von *Cyclamen persicum* Mill. betrug die Versuchsdauer bei der optimalen Keimungstemperatur von 24° vier bis fünf Stunden.