

162. Vitamines et microorganismes

par W. H. Schopfer.

Paraîtra ailleurs.

163. Fermentation β -hydroxybutyrique

par M. Lemoigne.

(12 VI 46)

Formation d'acide β -hydroxybutyrique par autolyse¹⁾²⁾.

Le *B. megatherium* est un aérobie strict qui, dans de bonnes conditions de milieu, donne une culture abondante. Si l'on recueille les corps microbiens, on constate qu'ils s'acidifient rapidement. Cette acidification se fait par production d'acides solubles dont le principal est l'acide β -hydroxybutyrique. Elle se produit sans intervention d'oxygène par lyse de substances intracellulaires. Deux de ces substances ont été surtout étudiées.

Lipides β -hydroxybutyriques³⁾.

La première est insoluble dans l'eau, l'éther, l'éther de pétrole, le benzène, le toluène, l'alcool froid, mais soluble dans l'alcool bouillant et le chloroforme. Sa solution alcoolique chaude se trouble par refroidissement et laisse déposer un précipité blanc, floconneux. Ce produit est constitué de fines aiguilles cristallisées groupées en étoiles, p. de f. 120°. Avec les microbes frais, on n'en obtient que des traces tandis que, dans les microbes autolysés, on en trouve 9 à 10 pour cent du poids sec des bactéries.

L'autre substance se distingue facilement de la première par son insolubilité dans l'alcool bouillant. Sa solution chloroformique, qui a l'aspect du collodion, laisse, par évaporation, une pellicule extrêmement mince, cohérente, transparente, incolore, ayant l'aspect de la cellophane et se détachant facilement des parois des vases. Pure, cette substance forme une poudre parfaitement blanche fondant à 156—157°.

Par extraction directe des microbes secs par le chloroforme bouillant, on n'en obtient guère que 7 à 9 pour cent des bacilles secs. Mais si les corps microbiens sont hydrolysés par HCl à 20 pour cent, à l'ébullition pendant 3 minutes, le rendement atteint 20 à 25 pour cent de la matière sèche, dans le cas de cultures sur gélose.

¹⁾ M. Lemoigne, Ann. Inst. Past. **39**, 144 (1925).

²⁾ M. Lemoigne, Ann. Inst. Past. **41**, 148 (1927).

³⁾ M. Lemoigne, Bl. Soc. Chim. biol. **8**, 770 (1926).

Ces deux produits ont la même formule brute $(C_4H_6O_2)^n$, n est égal à 6 dans le cas du produit fondant à $+120^\circ$ et est plus grand que 6 pour le produit fondant à $+156^\circ$. Tous deux sont solubles dans des solutions alcalines bouillantes, le premier rapidement, le second difficilement. Dans les deux cas, on obtient le même indice de saponification correspondant à la formule $C_4H_6O_2$.

Les produits de cette hydrolyse par la soude sont l' α -crotonate et le β -hydroxybutyrate de sodium. Le rapport de ces deux acides est variable. On obtient d'autant moins d'acide α -crotonique que l'on chauffe moins longtemps, mais on obtient toujours cet acide éthylénique.

Quand on fait fondre ces deux produits, ils donnent de l'acide α -crotonique. Ces deux substances ne présentent ni fonction acide, ni fonction alcool, ni double liaison. On doit donc les considérer comme des esters de l'acide β -hydroxybutyrique à ranger dans le groupe des étholides, et qui se distinguent par leur degré de polymérisation différent. Le produit fondant à $+120^\circ$ provient de la dépolymérisation autolytique du produit fondant à $+156^\circ$.

De ces deux lipides, le plus important quantitativement est le produit insoluble dans l'alcool bouillant.

Origine du lipide β -hydroxybutyrique.

Ce lipide peut se former aux dépens des résidus carbonés des acides aminés, mais il provient surtout des oses.

Pour déterminer le rendement maximum obtenu aux dépens du glucose, nous avons été amenés à cultiver *B. megatherium*, en milieu minéral glucosé liquide, le nitrate de potassium étant le seul aliment azoté. Ne poussant pas en surface et étant aérobic strict, on ne peut obtenir de belles cultures qu'en milieux agités. Dans ces conditions, la teneur des microbes secs en lipide β -hydroxybutyrique peut atteindre 50 pour cent et même parfois dépasser ce chiffre.

Dans les meilleures conditions de rendement, nous avons constaté que sur 100 molécules de glucose métabolisées, 42 servent à cette synthèse du lipide β -hydroxybutyrique¹⁾. A côté il se forme également de l'acétylméthylcarbinol.

Evolution du lipide β -hydroxybutyrique.

En milieu solide, au début la teneur du microbe en lipide β -hydroxybutyrique est faible, puis elle augmente peu à peu et atteint, vers le 2^e jour, un maximum (25 à 30 pour cent de la matière sèche). Quand les spores se forment, elle décroît brusquement.

En milieu liquide, l'évolution en fonction du temps est analogue, mais elle est beaucoup plus rapide et le maximum est beaucoup plus élevé²⁾. Pour cent de la matière sèche des microbes, il atteint 46, 52, 54 et même 58.

¹⁾ M. Lemoigne et N. Roukhelman, Ann. Ferm. 5, 527 (1940).

²⁾ M. Lemoigne, N. Grelet, M. Croson et M. Le Treis, Bl. Soc. Chim. biol. 27, 93 (1945).

Ces différences tiennent sûrement aux vitesses de diffusion des métabolites et de l'oxygène beaucoup plus grandes en milieu liquide agité qu'en milieu solidifié par la gélose.

Ces faits montrent que le produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide β -hydroxybutyrique n'est pas une substance de déchet qui s'accumule dans la cellule, mais est une substance de réserve qui est utilisée au moment de la sporulation.

La disparition de ce lipide β -hydroxybutyrique n'est pas un simple phénomène d'autolyse *post-mortem*, mais bien une transformation liée à la vie même du microbe.

Bactéries productrices de lipide β -hydroxybutyrique.

Toutes les souches de *B. megatherium* sont productrices de ce lipide. Nous avons essayé d'autres bacilles (193 souches)¹⁾. Beaucoup d'entre elles contiennent des lipides apparents sous forme de globules très réfringents. Or, chaque fois que ces globules sont nombreux, on trouve des quantités importantes de lipide β -hydroxybutyrique.

Tels sont les cas des souches de *B. megatherium*, de *B. mycoïdes*, *B. cereus*, *B. anthracis*.

B. subtilis qui ne contient pas de globules lipidiques apparents ne donne pas de lipide β -hydroxybutyrique quand on applique la méthode ordinaire. Toutefois la réaction devient positive, si l'on part d'une prise plus grande. Ainsi 101 g de microbes contenant 24 g de matière sèche, ont permis d'obtenir un produit qui, purifié par traitement à l'éther, donne une pellicule très mince qui présente l'aspect tout à fait caractéristique du lipide β -hydroxybutyrique. Le rendement est de 0,029 pour cent de la matière sèche. Le *B. subtilis* est donc aussi producteur du lipide β -hydroxybutyrique.

Azotobacter chroococcum contient également des lipides qui s'accumulent pour disparaître en partie quand l'enkystement se produit, alors qu'ils subsistent quand il n'a pas lieu.

Avec *H. Girard*²⁾, nous avons constaté qu'*Azotobacter chroococcum* contient des quantités importantes de lipides β -hydroxybutyriques. Peu abondants dans les cultures jeunes, ils forment près de 20 pour cent de la matière sèche avant l'enkystement et diminuent brusquement quand celui-ci se produit.

Dans ce cas on retrouve donc le même lipide jouant le même rôle de matière de réserve.

Conclusions. Les résultats que nous venons d'exposer montrent tout d'abord que la formation de l'acide β -hydroxybutyrique aux dépens des glucides n'est pas une curiosité biologique due à un organisme exceptionnel, mais au contraire un phénomène normal chez de nombreuses espèces microbiennes très répandues dans la nature.

Cet acide ne s'accumule jamais dans le milieu comme le fait l'acide lactique, mais déshydraté et polymérisé, il forme un produit s'apparentant aux étholides. Ce lipide intracellulaire ne se trouve qu'à l'état de traces chez certaines espèces alors que chez d'autres, il constitue une réserve pouvant atteindre 25 à 50 pour cent de la ma-

¹⁾ *M. Lemoigne, B. Delaporte et M. Croson, Ann. Inst. Past. 70, 224 (1944).*

²⁾ *M. Lemoigne et H. Girard, C. r. 217, 557 (1943).*

tière sèche du microbe. Ces réserves, au moment de la sporulation, se dépolymérisent en donnant un produit à point de fusion plus faible, puis s'hydratent en fournissant de l'acide β -hydroxybutyrique qui, lui-même, est alors utilisé.

Chez beaucoup de ces organismes, il y a très peu d'acides gras à poids moléculaire élevé. Le métabolisme des réserves lipidiques est alors très simplifié et réduit presque exclusivement à ce cycle β -hydroxybutyrique.

Nous continuons nos recherches pour préciser le mécanisme de la formation et de la disparition de ce lipide.

Paris, Institut Pasteur.

164. Sur l'action du periodate de sodium sur les protéines

par P. Desnuelle et S. Antonin.

(7 VI 46)

Il est maintenant bien connu que l'acide periodique et ses sels alcalins coupent à froid la chaîne hydrocarbonée des α -glycols¹⁾ et des α -oxyamines²⁾ entre leurs fonctions, pourvu que celles-ci ne soient pas substituées. Rapide et quantitative dans certaines conditions de p_H , cette réaction donne naissance à deux aldéhydes et de nombreuses applications en ont été faites en chimie préparative comme en chimie analytique.

Remarquons tout de suite, dans ce dernier domaine, que les fonctions primaires sont oxydées en formol. Réglée par deux conditions restrictives, l'apparition de cet aldéhyde est donc susceptible soit de conduire, pour la substance oxydée, à des dosages hautement spécifiques, soit de donner de précieux renseignements concernant sa structure.

Pour nous limiter ici plus spécialement aux substances biologiquement intéressantes, signalons que d'importants résultats ont été obtenus, grâce à l'emploi des periodates, dans l'étude des sucres et de leurs dérivés ainsi que dans celle des acides aminés β -hydroxylés.

De très nombreux travaux ont montré en effet que les periodates coupent les chaînes sucrées partout où elles portent 2 fonctions —OH libres en α mais qu'ils respectent les ponts d'oxygène et les liaisons glycosidiques. Les hexoses, en particulier, produisent du formol par oxydation periodique car leurs —OH 5 et 6 sont libres. Mais le blocage

¹⁾ Malaprade, L., Bl. [4] 43, 685 (1928); [5] 1, 832 (1934).

²⁾ Nicolet, B. H. et Shinn, L. A., Am. Soc. 61, 1615 (1939).