

SUR LA CONSTITUTION CHIMIQUE
D'UN LIPO-POLYSACCHARIDE ANTIGÉNIQUE EXTRAIT DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS VAR. *HOMINIS**

par

J. ASSELINEAU, N. CHOUCROUN ET E. LEDERER

Institut de Biologie Physico-chimique, Paris (France)

L'objet de cette communication** est de décrire quelques propriétés chimiques d'une fraction lipo-polysaccharidique dite "PMKo", extraite par l'un de nous du bacille tuberculeux¹ (souche PB15) et dont les propriétés antigéniques ont été décrites antérieurement³.

L'analyse chimique de cette fraction lipo-polysaccharidique² (très soluble dans l'éther, le chloroforme, l'éther de pétrole) ayant montré la présence d'azote, on pouvait se demander si l'antigénicité de ce complexe n'était pas due à la présence de protéines. Ce travail a été entrepris afin de *déterminer la nature des substances azotées* contenues dans cette fraction antigénique.

Purification du lipo-polysaccharide PMKo

Par centrifugation à basse température (-5°) et à grande vitesse (16 000 tours par minute) de la solution éthéro-pétrolique du lipo-polysaccharide préparé selon², trois fractions distinctes sont obtenues:

1. une solution éthéro-pétrolique surnageante, presque incolore, qui, amenée à sec, fournit une substance brun-jaune, amorphe, F: $194-202^{\circ}\text{C}^{***}$.

$N_{(\text{Kjeldahl})}$: 0.72%; P: 0.22%; acidité: 1.9 mm³ de potasse N/10 par milligramme.

2. une couche liquide, dense, brun-jaune, qui fournit par évaporation un solide qui n'a pas encore été étudié.

3. une fraction insoluble, F: $220-228^{\circ}\text{C}$.

$N_{(\text{Kjeldahl})}$: 1.02%; P: 0.38%; acidité: 2.2 mm³ de potasse N/10 par milligramme.

Nous nous occupons dans la présente communication uniquement de la partie la plus soluble (fraction I). 90% de celle-ci passent dans le premier filtrat à l'éther de pétrole après chromatographie sur alumine. Le produit ainsi obtenu a conservé l'acidité de la fraction I.

Nous n'avons encore aucune donnée précise quant au poids moléculaire de cette fraction lipo-polysaccharidique. Des déterminations par cryoscopie dans le camphre d'après RAST, ont fourni des chiffres erratiques (entre 1 000 et 3 000). D'après la teneur en phosphore, on peut calculer un poids moléculaire minimum d'environ 14 000. Si,

* Ce travail a été facilité par une subvention provenant des crédits accordés par la "JOSIAH MACY JR FOUNDATION" aux recherches de Mlle N. CHOUCROUN.

** 4^e communication sur les constituants chimiques du bacille tuberculeux. (3^e communication: J. ASSELINEAU, *Compt. rend.*, 229 (1949) 791.

*** Les points de fusion de ce travail sont corrigés.

comme nos essais semblent le prouver (voir ci-dessous), il y a une molécule d'ammoniac et trois d'acides aminés, on peut calculer un poids moléculaire minimum de 7700. D'autre part, le poids moléculaire calculé d'après l'acidité serait d'environ 5250. Il est possible que nous soyons en présence d'un mélange d'espèces moléculaires très voisines, inséparables par les méthodes mises en œuvre.

Saponification du lipo-polysaccharide

Par saponification rapide³, nous avons obtenu une *fraction lipidique* et une *fraction hydrosoluble*. La *fraction lipidique* (55.5% du complexe initial) est constituée par un solide blanc, F: 40–50°, consistant essentiellement en mycolate de méthyle (résultant d'une trans-estérification³ et en acides gras (10.9% du complexe initial) de poids moléculaire moyen 346. La *fraction hydrosoluble* (47% du complexe initial) est constituée par un polysaccharide (analogue à celui que viennent d'étudier en détail HAWORTH, KENT ET STACEY⁴), et contient tout le phosphore et tout l'azote du lipo-polysaccharide initial.

Nature des substances azotées du lipo-polysaccharide

Une partie de l'azote présent dans la fraction I existe sous forme ammoniacale (0.18% N ammoniacal). Tout l'azote restant (soit les trois quarts) appartient à des *acides aminés** : le dosage de l'azote α -aminé par la méthode de VAN SLYKE, MCFAYDEN ET HAMILTON⁵ (titrage du CO₂ libéré par l'action de la ninhydrine) appliqué à un hydrolysate acide de PMKo conduit à la valeur de 0.55%. Nous rappelons qu'il a été trouvé pour la fraction I de PMKo la valeur de 0.72% pour l'azote total (KJELDAHL).

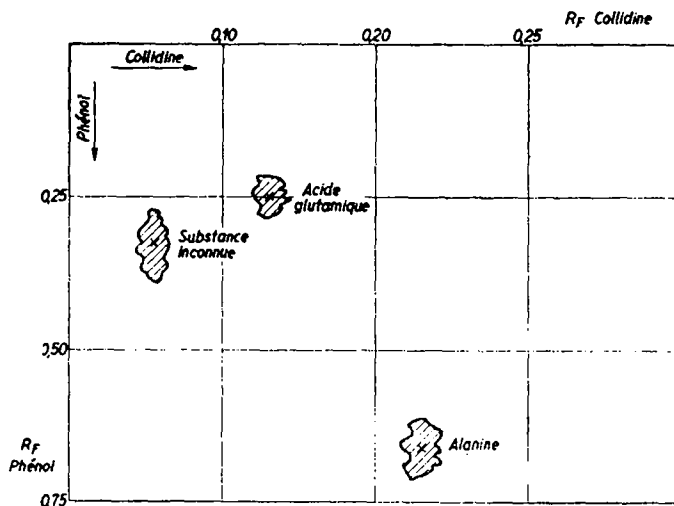


Fig. 1. Chromatographie à deux dimensions d'un hydrolysate de lipo-polysaccharide (fraction soluble dans l'éther de pétrole)

Par chromatographie de partage sur papier, selon CONSDEN, GORDON ET MARTIN⁶ d'un hydrolysate acide de la fraction I de PMKo, trois acides aminés sont mis en évidence (Fig. 1). Deux d'entre eux ont été identifiés à l'*acide glutamique* et à l'*alanine* par déter-

* La réaction de DISCHE (*Mikrochemie*, 8 (1930) 4) est faiblement positive et correspond à une teneur en acide désoxyribo-nucléique d'environ 0.6%.

mination de leur R_F (dans le phénol et dans la collidine) et du R_F du mélange avec l'acide aminé supposé (Fig. 1 et 2). La troisième substance n'a été identifiée avec aucun acide aminé connu :

	phénol	R_F déterminé dans butanol-20 % acide acétique	collidine*
acide glutamique.	0.25	0.13
substance inconnue.	0.33	0.04	0.055
alanine	0.66	0.23

(sur papier Whatman No. 4; dans le cas du phénol, en présence de CNK et ammoniacque).

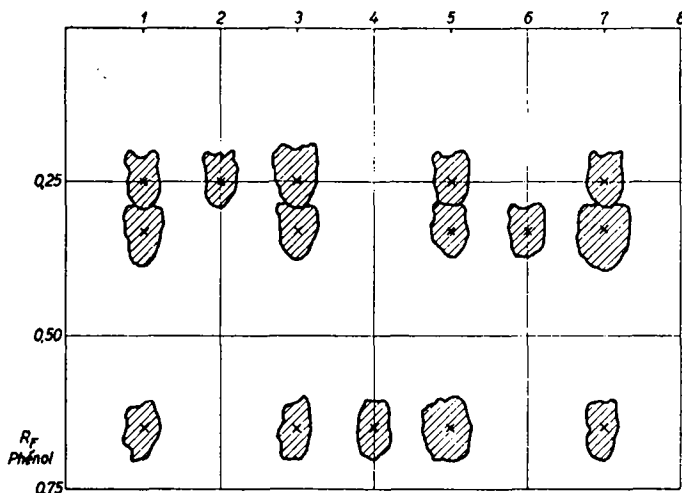


Fig. 2. Chromatographie à une dimension (phénol): 1. Hydrolysât du lipo-polysaccharide seul; 2. Acide glutamique; 3. Hydrolysât + acide glutamique; 4. Alanine; 5. Hydrolysât + alanine; 6. Substance No. 17 de Mrs WORK; 7. Hydrolysât + substance No. 17

Les trois acides aminés sont présents en quantités à peu près équi-moléculaires, à en juger par l'intensité de coloration des taches sur papier, comparée avec celles de quantités connues de témoins. Dans le cas de la fraction 3 de PMKo (fraction insoluble dans l'éther de pétrole à froid), il a été trouvé en outre, de l'acide aspartique, de la valine et des leucines, en quantité plus faible. Des traces de ces derniers acides aminés sont décelées sur les chromatogrammes de la fraction I, provenant sans doute de sa contamination par la fraction 3.

La substance inconnue possède les mêmes propriétés chromatographiques qu'un composé non identifié, isolé par E. WORK du *Bacille diphtérique* (tache B⁷; tache No. 17⁸): une comparaison chromatographique de la substance isolée par E. WORK avec la nôtre montre leur complète identité (Fig. 2). Les R_F indiqués par E. WORK¹⁷ diffèrent légèrement des nôtres, cependant, l'identité chromatographique de sa substance inconnue avec la nôtre a été vérifiée à Londres et à Paris, avec plusieurs solvants (Fig. 2).

Cette nouvelle substance ne semble pas exister dans les protéines du bacille tuberculeux (résidus bacillaires totalement délipidés, d'après ANDERSON⁹), ni dans la tuber-

* Schweizerische Teerindustrie A.G., Pratteln, Suisse.

culine, et nous ne l'avons trouvée jusqu'à présent que dans le lipo-polysaccharide PMKo (ou dans la fraction analogue isolée d'après la technique d'ANDERSON¹⁰ dont nous avons mentionné antérieurement la similitude de composition avec le PMKo¹¹). D'après nos essais sur son comportement chimique, il s'agit d'une substance *neutre*: elle n'est adsorbée, en effet, ni sur gel de silice, ni sur alumine "acide"¹², et *aliphatique*: elle n'est pas adsorbée sur charbon (Activit 50 XP^{12, 13}). Étant donné sa réactivité vis-à-vis de la ninhydrine, cette substance inconnue doit posséder une fonction amine; le fait de ne pas être adsorbée sur gel de silice montre la présence simultanée d'un groupe acide; la présence d'un peptide semble exclue puisque notre substance reste inchangée, même après 3 jours de contact avec HCl 6 N à 105°. Il semble donc bien s'agir d'un acide aminé. Cette substance est exempte de soufre et de phosphore, ce qui exclut la présence de cystine, lanthionine et d'acide colamine-phosphorique, qui ont des R_F voisins.

Le dosage des groupes aminés libres fait dans la partie hydrosoluble, d'après la technique de VAN SLYKE¹⁴ par l'acide nitreux, a donné les résultats suivants: trouvé 0.33 et 0.35% d'azote aminé, rapporté au lipo-polysaccharide initial; calculé pour $1 \text{ NH}_3 + 1 \text{ NH}_2$ (provenant d'un des trois acides aminés): 0.36%. Par ailleurs, le titrage du CO_2 libéré par action de la ninhydrine⁵ sur le polysaccharide donne une valeur très faible (correspondant à 0.03% d'azote aminé du lipo-polysaccharide). Ceci semble indiquer que les trois acides aminés sont engagés dans des liaisons peptidiques, un seul groupe aminé sur trois étant libre.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Purification du lipo-polysaccharide

800 mg de lipo-polysaccharide en solution dans 60 ml d'éther de pétrole (Eb: 40-50°), répartis dans quatre tubes en matière plastique, sont centrifugés à environ -5°, pendant 4 heures, à 16000 tours par minute. La solution éthéropétrolique surnageante, jaune très pâle et complètement limpide (fraction 1: voir page 197), est siphonnée avec un tube très effilé; puis, la couche dense, jaune foncé, (fraction 2) mise en suspension dans un peu d'éther de pétrole est siphonnée à son tour. Il reste alors dans le tube la fraction insoluble à froid (fraction 3). Chaque fraction est purifiée par une nouvelle centrifugation dans des conditions identiques.

La fraction 1 ainsi obtenue se comporte vis-à-vis de la chromatographie sur alumine comme une fraction à peu près homogène.

Chromatographie de 126 mg de fraction 1 sur une colonne de 2.5 g d'alumine Prolabo neutralisée (activité II):

a. 30 ml d'éther de pétrole	114 mg (90.4%)
b. 30 ml d'éther de pétrole + 30% benzène	2 mg
c. 30 ml de benzène	traces
d. 50 ml d'éther	5 mg
Total	121 mg, soit 96%

L'emploi d'une plus forte proportion d'alumine, même neutralisée, provoque la saponification d'une certaine quantité de lipo-polysaccharide sur la colonne. Cette saponification est prouvée par l'isolement d'acide mycolique à partir des derniers éluats (obtenus avec de l'éther renfermant 5% d'acide acétique).

Saponification du lipo-polysaccharide

Une solution bouillante de 101 mg de la fraction 1 dans 3 ml de benzène est additionnée de 3 ml

de solution bouillante de potasse méthanolique à 5% un précipité se forme immédiatement⁸. Le mélange est trituré à 80° environ, pendant une minute, puis essoré. Le polysaccharide ainsi isolé est lavé au benzène, puis au méthanol bouillants; (poids brut: 47% du complexe initial). La solution alcoolo-benzénique obtenue est additionnée d'eau, acidifiée et extraite à l'éther. L'extrait étheré fournit la fraction lipidique, sous forme d'une substance d'aspect cireux (56 mg, soit 55.4% du complexe).

Par dissolution dans l'éther de la fraction lipidique brute, et précipitation par le méthanol, un solide blanc est obtenu qui, après lavage au méthanol et séchage, se présente sous forme d'une poudre blanche, F: 40-50°, acidité: 2.7 μ l de potasse N/10 par mg (poids: 45.5 mg, soit 45% du complexe). La solution éthéro-méthanolique fournit par évaporation à sec 11 mg d'acides gras (soit 10.9% du complexe), de poids moléculaire moyen 346 (déterminé par titrage). Des résultats analogues ont été obtenus dans plusieurs essais portant sur des centaines de mg de lipopolysaccharide.

Par chromatographie sur alumine du précipité F:40-50°, on obtient une fraction neutre (75%) éluee par un mélange éther de pétrole-benzène, et une fraction acide (12.5%) éluee par une solution étherée d'acide acétique à 5%. La fraction neutre est constituée essentiellement par du mycolate de méthyle (F:45-47°) qui provient, comme il a été montré³, d'une trans-estérification; la fraction acide (F:57-60°) est constituée d'acide mycolique.

Nature des substances azotées

50 mg de lipo-polysaccharide sont hydrolysés, par chauffage avec 1 ml d'acide chlorhydrique 6N, en tube scellé sous atmosphère de gaz carbonique, pendant 24 heures à 105°.

La chromatographie de partage de ces hydrolysats, a été réalisée dans les conditions décrites par CONSDEN, GORDON ET MARTIN⁶, sur du papier Whatman No. 4. Dans les essais à une dimension, effectués avec le phénol en milieu ammoniacal, la substance inconnue forme une tache située juste en dessous de celle de l'acide glutamique, bleu violacé comme elle lorsque la coloration est récente, mais devenant grisâtre ensuite.

1. Nous avons vérifié que cette tache non identifiée n'était pas causée par un peptide difficilement hydrolysable, en soumettant un hydrolysats obtenu dans les conditions mentionnées ci-dessus, à une nouvelle hydrolyse poursuivie pendant trois jours, par l'acide chlorhydrique 6N, en tube scellé, à 105° (SYNGE ayant montré que certains peptides de la valine demandent une hydrolyse acide de 72 heures pour être scindés¹⁵).

2. L'acide aminé inconnu a été différencié de la cystine et de la lanthionine par addition, à la goutte d'hydrolysats déposée sur le papier, d'une goutte d'eau oxygénée. Tandis que la cystine et la lanthionine sont détruites par ce traitement, la substance inconnue reste inchangée. Quant à l'acide colamine-phosphorique, il présente une différence de R_F dans le phénol qui le différencie également de l'acide aminé inconnu:

	phénol	collidine
acide aminé inconnu	0.33	0.055
acide colamine-phosphorique . . .	0.40	0.06
cystine	0.41	

3. Il nous a été impossible de mettre en évidence la présence de soufre ou de phosphore dans la substance inconnue. Ces essais ont été réalisés sur la substance inconnue isolée, soit par élution à l'eau de bandes découpées dans des chromatogrammes sur papier, d'après DENT¹⁶, soit par séparation sur colonne d'alumine acide, en triplant la quantité ordinairement utilisée d'alumine acide, conformément à l'observation de E. WORK¹⁷.

* Nous remercions le Dr E. WORK qui a eu l'amabilité de nous communiquer le manuscrit de son mémoire (17).

Lorsque l'on utilise la méthode d'extraction du bacille tuberculeux employée par ANDERSON⁹, l'extrait chloroformique permet d'obtenir ce que cet auteur appelle les "cires purifiées"; celles-ci, après épuisement par l'acétone bouillante, laissent un résidu insoluble, constitué par un lipo-polysaccharide dont nous avons déjà mentionné la similitude avec le PMKo¹¹. Ce lipo-polysaccharide, isolé à partir de bacilles tuberculeux humains soit de souche "Test" (Institut PASTEUR, Paris), soit de souche "Aeschbacher" (Pr. F. ROULET, Bâle) renferme également cet acide aminé inconnu. Par contre, ce dernier ne semble pas être présent dans des hydrolysats acides de résidus bacillaires obtenus après enlèvement des "lipides fortement liés" selon ANDERSON, ni dans des hydrolysats acides de tuberculine (Institut PASTEUR). En effet, les chromatogrammes sur papier ne laissent voir, à la place correspondant à l'acide aminé inconnu, que de vagues traînées bleuâtres, à côté des taches fortement colorées des autres acides aminés. Il en est de même d'hydrolysats acides de la substance "sensibilisante" isolée par N. CHOUCROUN² du complexe protéolipido-polysaccharidique, trouvé dans l'extrait huileux de bacilles morts.

RÉSUMÉ

1. Nous décrivons la purification du complexe lipo-polysaccharidique extrait du Bacille Tuberculeux par N. CHOUCROUN et dont les propriétés antigéniques ont été décrites antérieurement².

2. Par saponification, une des fractions principales obtenues, facilement soluble dans l'éther de pétrole même à froid, donne 45% d'acide mycolique, 11% d'acides gras et 47% d'une partie hydrosoluble constituée essentiellement par un polysaccharide et contenant tout le phosphore et tout l'azote du lipo-polysaccharide.

3. Un quart environ de l'azote est présent sous forme d'ammoniac; il y a en outre trois acides aminés, dont deux ont été identifiés par chromatographie sur papier; ce sont l'acide glutamique et l'alanine. Le troisième acide aminé est identique à la substance No. 17 que E. WORK a récemment isolée des protéines du Bacille Diphtérique. Cette substance est neutre, aliphatique et exempte de phosphore et de soufre. Elle ne semble pas se trouver dans les protéines du Bacille Tuberculeux, ni dans la tuberculine.

4. Les trois acides aminés semblent engagés dans des liaisons peptidiques, un seul groupe $-NH_2$ sur trois étant libre.

SUMMARY

1. The purification is described of the lipid-polysaccharide complex extracted from the tubercle bacillus by N. CHOUCROUN, the antigenic properties of which have already been described previously².

2. After saponification one of the principal fractions obtained, which is readily soluble in petroleum ether, even in the cold, gives 45% mycolic acid, 11% fatty acids and 47% of a portion soluble in water, essentially consisting of a polysaccharide and containing all the phosphorus and the nitrogen of the lipid-polysaccharide.

3. About one fourth of the nitrogen is present as ammonia; furthermore there are three amino acids, two of which have been identified by paper partition chromatography; glutamic acid and alanine. The third amino acid is identical with compound no. 17 which E. WORK has recently isolated from the proteins of the diphtheria bacillus. This substance is neutral, aliphatic and does not contain phosphorus or sulphur. It does not seem to be present in the proteins of the tubercle bacillus, nor in tuberculin.

4. The three amino acids seem to be combined in peptide linkages, one of three amino groups being free.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Verfasser beschreiben die Reinigung des Lipopolysaccharidkomplexes welcher aus Tuberkelbazillen von N. CHOUCROUN isoliert wurde und dessen antigene Eigenschaften früher beschrieben worden sind.

2. Durch Verseifung entsteht aus einer der Hauptfraktionen, welche in Petroläther auch in der Bibliographie p. 203.

Kälte leicht löslich ist, 45% Mycolsäure, 11% Fettsäuren und 47% einer wasserlöslichen Fraktion, welche hauptsächlich aus Polysaccharid besteht und den gesamten Phosphor und Stickstoff des Lipopolysaccharides enthält.

3. Ungefähr ein Viertel des Stickstoffes findet sich in Form von Ammoniak. Weiter sind 3 Aminosäuren vorhanden, von denen 2 durch Chromatographie auf Papier identifiziert worden sind, nämlich Glutaminsäure und Alanin. Die dritte Aminosäure ist identisch mit der Substanz Nr. 17 welche E. WORK kürzlich aus den Proteinen des Diphterie-Bazillus isolierte. Diese Substanz ist neutral, aliphatisch und frei von Phosphor und Schwefel. Sie scheint weder in den Eiweisstoffen des Tuberkelbazillus noch im Tuberkulin vorzukommen.

4. Die 3 Aminosäuren scheinen durch Peptidbindungen verbunden zu sein, wobei von je drei NH_2 -Gruppen eine frei ist.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ N. CHOUCROUN, *Compt. rend.*, 210 (1940) 511.
- ² N. CHOUCROUN, *Compt. rend.*, 223 (1946) 104; *Am. Rev. Tuberc.*, 56 (1947) 203.
- ³ J. ASSELINEAU, *Compt. rend.*, 229 (1949) 791.
- ⁴ W. N. HAWORTH, P. W. KENT ET M. STACEY, *J. Chem. Soc.*, (1948) 1220.
- ⁵ D. D. VAN SLYKE, D. A. MCFAYDEN ET P. HAMILTON, *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 671.
- ⁶ R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- ⁷ E. WORK, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 138.
- ⁸ E. WORK, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 400.
- ⁹ R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 74 (1927) 525.
- ¹⁰ R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 83 (1929) 505.
- ¹¹ J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 492.
- ¹² C. FROMAGEOT, H. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- ¹³ H. JUTISZ ET E. LEDERER, *Nature*, 159 (1947) 445.
- ¹⁴ D. D. VAN SLYKE, *J. Biol. Chem.*, 9 (1911) 185; 23 (1915) 407.
- ¹⁵ R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 44 (1949) 240.
- ¹⁶ C. E. DENT, *Biochem. J.*, 41 (1947) 240.
- ¹⁷ E. WORK, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 204.

Reçu le 6 octobre 1949

Note ajoutée à la correction des épreuves (30/1/1950)

E. WORK vient d'identifier la "substance No. 17" à l'acide α , ϵ -diamino-pimélique (*Nature*, 165 (1950) 71; Biochemical Society, London, séance du 16/XII/1949). Dans une note récente (*Compt. rend.*, 230 (1950) 142) J. ASSELINEAU ET E. LEDERER ont rapporté la présence des mêmes trois acides aminés (alanine, acide glutamique et acide α , ϵ -diamino-pimélique) dans un lipopolysaccharide isolé des souches humaines Aeschbacher, Test, H37-Rv et Rj. Il n'y a pas d'acide α , ϵ -diamino-pimélique dans le lipopolysaccharide correspondant isolé des souches H37-Ra et B.C.G. (avirulentes) et de la souche bovine Vallée.