

SUR LA CONSTITUTION CHIMIQUE DES ACIDES MYCOLIQUES  
DE DEUX SOUCHES HUMAINES VIRULENTES DE  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*\*

par

JEAN ASSELINEAU ET EDGAR LEDERER

*Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris (France)*

Les cires du Bacille tuberculeux contiennent un acide hydroxylé à haut poids moléculaire, découvert par ANDERSON<sup>27</sup> et appelé *acide mycolique*.

L'intérêt que nous portons à l'acide mycolique est justifié par plusieurs considérations: 1. Du point de vue pondéral, l'acide mycolique est un des constituants les plus importants du Bacille tuberculeux; la souche virulente Test en contient p.ex. 8.3% (poids sec). 2. L'acide mycolique fait partie, dans le Bacille, de complexes lipo-polysaccharidiques et autres, dont des propriétés biologiques intéressantes viennent d'être rapportées par plusieurs auteurs<sup>13, 15, 22</sup>. 3. C'est la seule substance chimique bien définie, isolée du Bacille tuberculeux, qui présente la propriété d'être acido-résistante<sup>10, 17</sup>. 4. L'acide mycolique est un acide gras naturel à très haut poids moléculaire et de constitution encore inconnue.

L'*acide mycolique* isolé par ANDERSON et col.<sup>27</sup> de la souche humaine H37 se présente sous forme d'une poudre incolore, amorphe, F 57–58°,  $[\alpha]_D = +1.8^\circ$ . La formule brute de l'acide mycolique serait  $C_{88}H_{172}O_4$  ou  $C_{88}H_{176}O_4$ , cette dernière formule étant finalement préférée par ANDERSON<sup>4</sup>. L'acide mycolique contient *un carboxyle, un hydroxyle et un méthoxyle*; la nature des quatre atomes d'oxygène est ainsi connue. A la *pyrolyse* (à 300° sous 0.5 mm), l'acide mycolique subit un cracking et donne une partie volatile que ANDERSON et col.<sup>27</sup> ont identifiée comme étant l'*acide n-hexacosanoïque*. A l'oxydation chromique, l'acide mycolique donne un mélange très complexe d'acides gras, dans lequel ANDERSON et col.<sup>20</sup> ont identifié les acides stéarique, *n*-hexacosanoïque et *n*-hexadécane-1.16-dicarboxylique. Ils en concluent que l'acide mycolique doit contenir deux chaînes en  $C_{26}$ , l'une mise en évidence par pyrolyse, l'autre par oxydation.

Une étude de l'acide mycolique d'ANDERSON aux rayons X et en couche monomoléculaire, effectuée par STÄLLBERG-STENHAGEN ET STENHAGEN<sup>28</sup> a montré inhomogénéité de cette substance et son état micro-cristallin. La largeur de la molécule ne dépasserait nulle part celle de trois chaînes parallèles d'hydrocarbures et il semblerait que l'hydroxyle soit placé près du carboxyle.

\* 9ème communication sur la chimie du Bacille tuberculeux; 8ème comm.: J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Nature* 166 (1950) 782: le présent travail fait partie de la thèse de Doctorat ès-Sciences de J. ASSELINEAU. Pour des revues générales sur la chimie du Bacille tuberculeux, voir ANDERSON<sup>2-5</sup>, et ROULET ET BRENNER<sup>23</sup>.

Différentes souches de Mycobactéries contiennent des acides mycoliques de composition différente. C'est ainsi qu'ANDERSON et col. ont isolé des acides mycoliques de souches bovines<sup>14</sup>, aviaires<sup>6</sup>, du Bacille de la phléole<sup>21</sup> et d'un Bacille de la lèpre<sup>7</sup>.

*Isolement chromatographique de deux acides mycoliques des souches virulentes Aeschbacher et Test*

Dans notre rère communication<sup>10</sup> nous avons décrit l'isolement chromatographique de l'acide mycolique par filtration de sa solution éthéropétrolique sur une colonne d'alumine. L'acide mycolique est fortement retenu et élué seulement avec de l'éther contenant un faible pourcentage d'acide acétique. La chromatographie permet ainsi d'éliminer d'emblée des substances neutres\* et même des acides gras inférieurs, car les acides gras de C<sub>16</sub> à C<sub>26</sub> qui pourraient accompagner l'acide mycolique sont élués déjà par l'éther seul (avec une alumine d'activité II).

En essayant de fractionner l'acide mycolique par des éluations successives contenant des quantités croissantes d'acide acétique, nous avons obtenu une séparation très nette en deux acides mycoliques que nous appelons acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -mycoliques<sup>11</sup>.

L'acide  $\alpha$ -mycolique représente la majeure partie de l'acide mycolique brut et fond à 55-56°; il s'élué le premier, à l'éther contenant 0.1% d'acide acétique.

L'acide  $\beta$ -mycolique ne représente qu'environ 10% de l'acide mycolique brut et fond à 71-73°; il s'élué à l'éther contenant 0.5 à 1% d'acide acétique.

Les deux acides mycoliques se présentent sous forme de poudres blanches, d'aspect amorphe, apparaissant au microscope comme constituées de petites sphérules. Les spectres de diffraction de rayons X montrent cependant que ces acides sont cristallisés\*\*. Les acides mycoliques sont facilement solubles dans l'éther, le chloroforme et le benzène, un peu moins solubles dans l'éther de pétrole; ils sont insolubles dans l'eau, le méthanol, l'éthanol et l'acétone, à froid; un peu solubles dans le méthanol, l'éthanol et l'acétone, à chaud. De façon générale, l'acide  $\alpha$ -mycolique présente une plus grande solubilité que l'acide  $\beta$ . Les sels de Na et de K de ces acides sont solubles dans l'éther de pétrole et le benzène, d'où la difficulté de séparer les acides mycoliques des substances neutres qui les accompagnent. Le sel de K de l'acide  $\alpha$  est soluble dans l'éther, tandis que celui de l'acide  $\beta$  est insoluble<sup>11</sup>.

Les deux acides mycoliques diffèrent également par le point de fusion de leurs acétates, de leurs esters méthyliques, des acétates de leurs esters méthyliques et des alcools mycoliques (obtenus par réduction du carboxyle par LiAlH<sub>4</sub>), comme le montre le Tableau I.

Les deux acides mycoliques sont acido-résistants et libèrent, tous les deux, de l'acide *n*-hexacosanoïque par pyrolyse\*\*\*.

Les analyses élémentaires des deux acides et des deux séries de leurs dérivés donnent des résultats pratiquement identiques; d'ailleurs, la *déshydratation* semble donner le même acide *anhydro-mycolique* (Tableau I); il paraît donc s'agir d'*isomères*.

Les deux souches virulentes humaines, Aeschbacher et Test, ont donné chacune des acides  $\alpha$  et  $\beta$  mycoliques qui semblent respectivement identiques. Une identification

\* Les sels de Na et K de l'acide mycolique sont solubles dans l'éther et l'éther de pétrole; on les trouve dans l'"insaponifiable" et la séparation de l'acide mycolique des substances neutres est ainsi rendue très difficile par les moyens chimiques habituels.

\*\* Étude cristallographique de A. TRILLAT ET S. BARBEZAT.

\*\*\* Cet acide a été identifié de façon indiscutable par A. TRILLAT ET S. BARBEZAT par la mesure de la diffraction des rayons X.

par point de fusion de mélange n'est pas possible avec ces substances, car des mélanges d'acides mycoliques nettement différents ne donnent pas de dépression de point de fusion. L'identification la plus précise qui soit possible à l'heure actuelle, semble être la comparaison des spectres infrarouges\*.

TABLEAU I  
PROPRIÉTÉS DES ACIDES  $\alpha$  ET  $\beta$ -MYCOLIQUES, ET DE LEURS DÉRIVÉS

	acide $\alpha$ -mycolique	acide $\beta$ -mycolique
Point de fusion	55-56°	71-73°
Sel de potassium	soluble dans l'éther	presqu'insoluble dans l'éther
$[\alpha]_D$ (CHCl <sub>3</sub> )	+ 1.8° $\pm$ 0,5	+ 2.3° $\pm$ 0,5
Poids moléculaire (titrage)	1280, 1290 $\pm$ 50	1290, 1300 $\pm$ 50
Ester méthylique	F 43-46°	F 52-55°
Acétate de l'acide	40-42°	44-48°
Acétate de l'ester	33-35°	42-44°
Alcool mycolique	50-52°	60-63°
Acide anhydro-mycolique	36-38°	36-38°
Anhydro-mycolate de méthyle	34-36°	34-36°

Nous ne saurions affirmer que nos acides  $\alpha$  et  $\beta$  mycoliques sont des substances pures. Des chromatographies répétées de ces substances et de divers dérivés n'ont pas décelé d'inhomogénéité. Il semble d'ailleurs, qu'ANDERSON ait isolé des fractions analogues, puisque GERSTL, TENNANT ET PELZMAN<sup>18</sup> mentionnent des essais biologiques sur deux préparations d'acide mycolique fournies par ANDERSON et fondant respectivement à 55-56° et à 73-75°.

Nous n'avons jamais observé de substance pouvant correspondre à un acide C<sub>104</sub>H<sub>208</sub>O<sub>8</sub>, F 74-76° tel qu'ANDERSON et col.<sup>20</sup> l'ont obtenu après traitement de l'acide mycolique par l'acide iodhydrique; nous pensons qu'il s'agit là d'un artéfact.

#### Structure chimique des acides mycoliques des souches virulentes Aeschbacher et Test

1. *Formule brute.* Les résultats des analyses de carbone, hydrogène et de méthoxyle, ainsi que ceux des titrations de l'acidité effectuées sur les acides  $\alpha$  et  $\beta$ -mycoliques et sur un grand nombre de leurs dérivés, indiqués dans le Tableau II, sont en accord avec la formule C<sub>88</sub>H<sub>176</sub>O<sub>4</sub> proposée par ANDERSON en 1938<sup>27</sup>. Il faut cependant considérer cette formule non comme certaine, mais comme une des plus probables; en effet, les déterminations analytiques du carbone introduisent une marge d'erreur de  $\pm 0.2$  à 0.3%, ce qui correspond à une incertitude dans le nombre d'atomes de carbone de  $\pm 5$ , comme le montrent les chiffres suivants:

+ 5C:	C <sub>93</sub> H <sub>188</sub> O <sub>4</sub>	P.M. 1368.4,	C 81.62%	H 13.70%
	C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>4</sub>	1298.3	81.40	13.66
- 5C	C <sub>83</sub> H <sub>166</sub> O <sub>4</sub>	1228.3	81.16	13.62

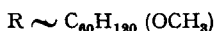
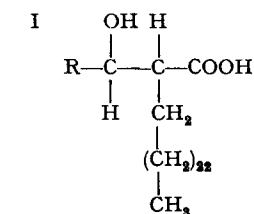
Les déterminations de poids moléculaire, effectuées par titrage fournissent, d'autre part, des résultats à  $\pm 4\%$  près, ce qui entraîne une incertitude de  $\pm 50$  unités pour le poids moléculaire. La formule en C<sub>88</sub> peut donc subir des variations qui ne dépasseront probablement pas  $\pm 5$  carbones.

\* Étude en cours, avec A. CHEUTIN.

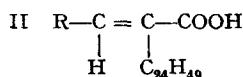
TABLEAU II

COMPOSITION ÉLÉMENTAIRE DES ACIDES  $\alpha$ - ET  $\beta$ -MYCOLIQUES ET DE LEURS DÉRIVÉS

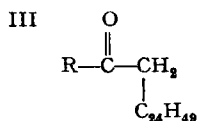
	Analyses	
	Trouvé %	Calculé %
<i>Dérivés <math>\alpha</math>:</i>		
Acide mycolique (I)	C 81.47 H 13.28 OCH <sub>3</sub> 2.36 81.53 13.42	C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>4</sub> : C 81.40 H 13.66 OCH <sub>3</sub> 2.39
Ester méthylique	C 81.48 H 13.17	C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>4</sub> : C 81.52 H 13.58
Acétate mycolique	80.89 13.32	C <sub>90</sub> H <sub>178</sub> O <sub>5</sub> : 80.64 13.38
Acétate de mycolate de méthyle	81.03 13.04	C <sub>91</sub> H <sub>180</sub> O <sub>5</sub> : 80.70 13.40
Alcool mycolique	82.66 13.66	C <sub>88</sub> H <sub>178</sub> O <sub>3</sub> : 82.29 13.97
Diacétate d'alcool	80.79 13.11	C <sub>92</sub> H <sub>182</sub> O <sub>5</sub> : 80.81 13.32
Acide anhydro-mycolique (II)	C 82.68 H 13.46 OCH <sub>3</sub> 2.56 82.58 13.55	C <sub>88</sub> H <sub>174</sub> O <sub>3</sub> : C 82.55 H 13.69 OCH <sub>3</sub> 2.42
Anhydro-mycolate de méthyle	82.52 13.52	C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>3</sub> : C 82.66 H 13.62
Alcool anhydro-mycolique	83.40 13.96	C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>2</sub> : 83.46 14.01
Mycolane	85.69 14.25	C <sub>87</sub> H <sub>176</sub> : 85.51 14.50
Méthoxy-nor-mycolanone(III)	83.65 14.01	C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>2</sub> : 83.44 14.01
Méthoxy-oxo-mycolanoate de méthyle (IV)	81.37 13.53	C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>4</sub> : 81.58 13.54
Résidu non-volatile de pyrolyse	84.19 13.78	C <sub>61</sub> H <sub>120</sub> O: 84.25 13.91
<i>Dérivés <math>\beta</math>:</i>		
Acide mycolique (I)	C 81.27 H 13.52 OCH <sub>3</sub> 2.16 81.70 13.01	C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>4</sub> : C 81.40 H 13.66 OCH <sub>3</sub> 2.39
Ester méthylique	81.80 13.28	C <sub>88</sub> H <sub>178</sub> O <sub>4</sub> : C 81.52 H 13.58
Acétate mycolique	C 80.82 13.12	C <sub>90</sub> H <sub>178</sub> O <sub>5</sub> : C 80.64 H 13.38
Acide anhydro-mycolique (II)	82.89 13.59	C <sub>88</sub> H <sub>174</sub> O <sub>3</sub> : 82.55 13.69



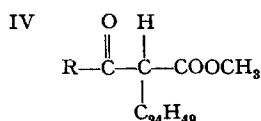
Acide mycolique



Acide anhydro-mycolique



Méthoxy-nor-mycolanone



Méthoxy-oxo-3-mycolanoate de méthyle

Quant au nombre d'atomes d'hydrogène présent dans la molécule d'acide mycolique, il est également très difficile de le fixer. Les deux formules  $C_{88}H_{172}O_4$  et  $C_{88}H_{176}O_4$  successivement adoptées par ANDERSON renferment, respectivement 13.39 et 13.66 % d'hydrogène, valeurs assez difficilement discernables par microanalyse élémentaire. Si l'acide mycolique est saturé et purement aliphatique, il doit évidemment avoir deux fois plus d'atomes d'hydrogène que de carbone. L'absence de doubles liaisons semble assez certaine (pas d'absorption de brome, pas de coloration avec le tétranitrométhane pas de réaction avec l'ozone, pas de bande correspondante dans le spectre infrarouge\*). L'absence de noyaux cyclaniques ne peut pas encore être affirmée. Cette éventualité doit être examinée d'autant plus sérieusement que HOFFMAN ET LUCAS<sup>19</sup> viennent d'isoler de *Lactobacillus arabinosus* un acide  $C_{19}H_{36}O_2$  contenant un noyau cyclopropanique. Il est un fait que les chiffres obtenus pour la teneur en hydrogène des acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -mycoliques et quelques uns de leurs dérivés sont souvent faibles et pourraient ainsi correspondre à des formules avec 2 ou 4 H de moins qu'une formule purement aliphatique.

Un poids moléculaire multiple semble être exclu, car les déterminations cryoscopiques d'après RAST fournissent des chiffres autour de 1100 (calc. 1298).

En conclusion, nous tenons à souligner que ce n'est que comme *hypothèse de travail* que nous adoptons la formule  $C_{88}H_{176}O_4$ , qui est de caractère purement aliphatique.

Quant au méthoxyle de l'acide mycolique, remarquons que nos analyses sont les premières concordant avec les chiffres théoriques (Tableau II). L'acide mycolique d'ANDERSON n'a jamais donné plus de 1.4 % de méthoxyle (au lieu de 2.39 % correspondant à un méthoxyle). Ceci est probablement dû au fait qu'ANDERSON avait en main un mélange d'acides méthoxylés et non-méthoxylés, tels que nous en avons récemment isolés de diverses souches\*\*. Les chiffres justes pour la teneur en méthoxyle sont une nouvelle preuve à l'appui de la formule brute envisagée ci-dessus.

Parmi les dérivés mentionnés dans le Tableau II, la plupart ont déjà été décrits<sup>10,11,8</sup>. L'hydrocarbure saturé correspondant à l'acide mycolique a été préparé à partir de l'alcool mycolique. Nous proposons de l'appeler *mycolane*. L'acide mycolique est ainsi un *acide hydroxy-méthoxy-mycolanoïque* et l'acide anhydro-mycolique un *acide méthoxymycoléoïque*.

2. *Position de l'hydroxyle*. Les acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -mycoliques sont déshydratés par ébullition dans l'anhydride acétique contenant  $KHSO_4$  fondu. L'*acide anhydro-mycolique* (méthoxy-

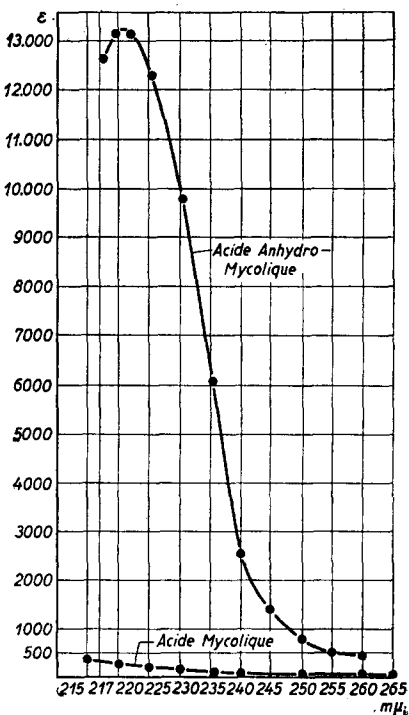


Fig. 1. Spectres d'absorption des acides  $\alpha$ -mycolique (I) et anhydro-mycolique (II) (dans l'hexane)

\* Travail spectrographique en cours avec A. CHEUTIN; il est vrai qu'une double liaison tertiaire n'est pas facilement décelable par le spectre infrarouge.

\*\* Travail en cours avec H. DEMARTEAU.

mycolénoïque),  $C_{88}H_{174}O_8$ , F 39–41°, ainsi obtenu possède un spectre d'absorption indiquant la conjugaison de la double liaison avec le carboxyle ( $\log \epsilon = 4.13$  à 220 m $\mu$ , Fig. 1)\*. La présence d'une double liaison du type  $C-C=C-C$  a été également mise en évidence



par le spectre d'absorption infrarouge (bande à 1645  $cm^{-1}$ , qui manque dans l'acide mycolique même)\*\*.

Le fait que la double liaison de l'acide anhydro-mycolique soit située en  $\alpha$ ,  $\beta$  par rapport au carboxyle, permet d'envisager deux possibilités pour l'emplacement de l'hydroxyle des acides mycoliques en question: soit en  $\alpha$ , soit en  $\beta$ .

Les essais suivants prouvent que l'hydroxyle n'est pas en  $\alpha$ .

1. Le tétracétate de plomb décarboxyle les acides  $\alpha$ -hydroxylés en les oxydant en aldéhyde inférieur<sup>16</sup>; or les acides mycoliques ne sont pas attaqués par ce réactif.

2. Si les acides mycoliques étaient hydroxylés en  $\alpha$ , leur transformation en alcools mycoliques (par réduction du carboxyle avec  $LiAlH_4$ ) donnerait des 1,2-glycols qui seraient oxydés par l'acide periodique. Or, les alcools mycoliques résistent à l'oxydation periodique.

Les essais suivants prouvent, d'autre part, que l'hydroxyle des acides mycoliques est en  $\beta$ <sup>8</sup>.

1. Par oxydation chromique ménagée, avec la quantité calculée de  $CrO_3$ , l'acide  $\alpha$ -mycolique (I) donne, en très bon rendement, une substance neutre, F 64–67°, insaponifiable et non-acétylable. L'analyse élémentaire et le spectre d'absorption  $\epsilon$  (bande à 280 m $\mu$   $\log \epsilon = 1.6$ ; Fig. 2) indiquent qu'il s'agit d'une cétone (méthoxy-normycolanone III) formée par oxydation de l'hydroxyle de l'acide mycolique et décarboxylation consécutive de l'acide  $\beta$ -cétonique ainsi formé.

2. L' $\alpha$ -mycolate de méthyle donne par contre, par oxydation chromique sous les mêmes conditions, une substance neutre, F 40–42°, qui n'est plus acétylable et dont l'analyse élémentaire et le spectre d'absorption (bande à 260 m $\mu$   $\log \epsilon = 2.7$ ; Fig. 2)\*\*\* correspondent à un  $\beta$ -céto-ester. Nous l'appelons méthoxy-oxo-3-mycolanoate de méthyle (IV). Par saponification, ce corps se décarboxyle et conduit à la méthoxy-nor-mycolanone (III) décrite ci-dessus.

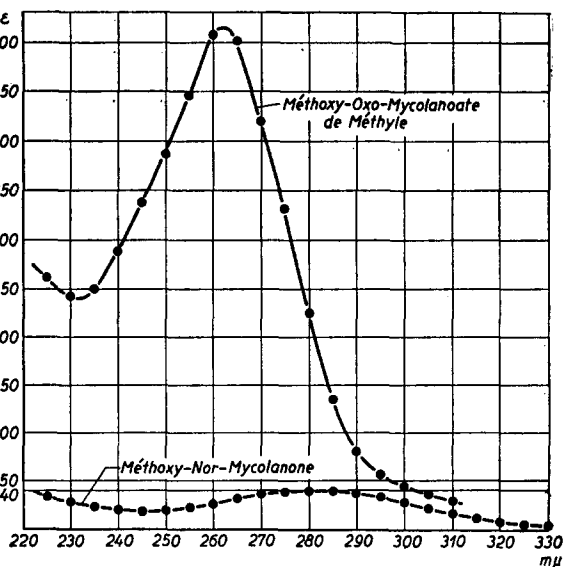


Fig. 2. Spectres d'absorption de la méthoxy-nor-mycolanone (III) et du méthoxy-oxo-3-mycolanoate de méthyle (IV) (dans l'hexane)

\* Nous mentionnons, dans la partie expérimentale, quelques produits secondaires obtenus au cours de cette réaction.

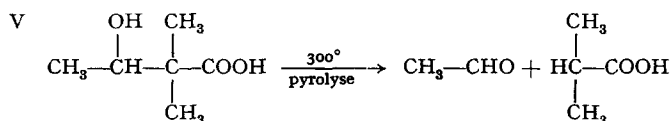
\*\* Etude spectrographique en cours, avec A. CHEUTIN.

\*\*\* Des  $\beta$ -céto-esters ramifiés en  $\alpha$ , synthétiques, présentent un spectre d'absorption analogue (E. LEDERER ET K. SERCK-HANSEN) essais inédits.

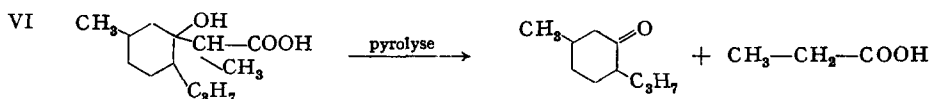
Pour ces cétones à haut poids moléculaire, nous avons pu constater la présence du groupe carbonyle seulement par le spectre d'absorption caractéristique et l'impossibilité d'acétyler la substance dans les conditions qui acétylent l'acide mycolique. La formation de dérivés de la fonction cétonique est, en effet, gênée dans les longues chaînes paraffiniques et par la ramification en  $\alpha$  dont l'existence sera prouvée ci-dessous.

La formation de substances cétoniques par oxydation chromique de l'acide mycolique et de son ester méthylique prouve aussi que l'hydroxyle de l'acide mycolique est *secondaire*.

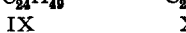
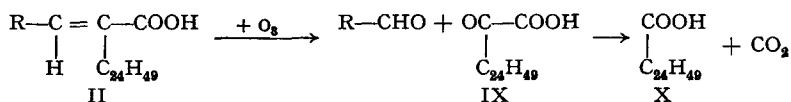
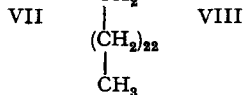
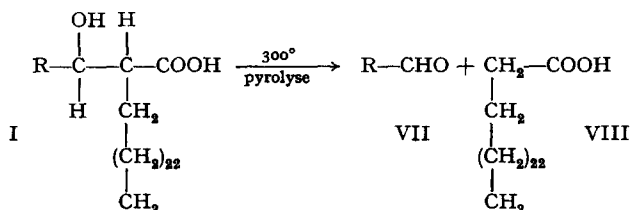
3. *Position et structure d'une ramification.* L'existence de l'hydroxyle en  $\beta$  et la libération d'acide *n*-hexacosanoïque (VIII) par pyrolyse, ne peuvent se concilier qu'en admettant en  $\alpha$  une chaîne latérale non ramifiée à 24 atomes de carbone (voir formule I). Or, il est connu depuis longtemps que les  $\alpha, \alpha$ -dialcoyl- $\beta$ -hydroxy-acides se coupent par pyrolyse: ainsi, l'acide  $\alpha, \alpha$ -diméthyl- $\beta$ -hydroxy-butyrique (V) donne naissance à de l'acétaldéhyde et de l'acide *iso*-butyrique<sup>25</sup>. La présence de deux ramifications en  $\alpha$  n'est d'ailleurs pas nécessaire, puisque l'acide  $\alpha$  (hydroxy-1, méthyl-3, *iso*-propyl-5-cyclohexyl)-propionique (VI) subit la même scission pyrolytique en menthone et acide propionique<sup>28</sup>.



Acide  $\alpha, \alpha$  diméthyl- $\beta$ -hydroxy-butyrique.



Acide  $\alpha$ (hydroxy-1-méthyl-3-*iso*-propyl-5-cyclohexyl)-propionique



C'est un mécanisme analogue qui donne naissance à l'acide *n*-hexacosanoïque (VIII) par pyrolyse de l'acide  $\alpha$ -mycolique (I). D'ailleurs nous avons pu prouver la formule I de la manière suivante: L'acide anhydro-mycolique (méthoxy-mycolénoïque, II) a été ozonisé; de la partie acide des produits d'ozonolyse nous avons isolé un acide cristallisé, qui, après purification, fond à 82-83° et dont l'analyse et le poids moléculaire correspondent à l'acide *n*-pentacosanoïque (X). En raison des difficultés d'identification d'acides aliphatiques supérieurs, la structure de l'acide *n*-pentacosanoïque a été vérifiée

par la comparaison de son spectre de rayons X avec celui d'un échantillon d'acide *n*-pentacosanoïque synthétique aimablement fourni par le Dr E. STENHAGEN (Uppsala)\*.

L'ozonisation de la substance II aurait normalement dû donner l'acide  $\alpha$ -oxo-*n*-hexacosanoïque (IX). Or, il a déjà été observé<sup>24</sup> que l'ozonisation d'acides  $\alpha,\beta$ -insaturés et ramifiés en  $\alpha$  donne l'acide en  $C_{n-1}$  au lieu de l' $\alpha$ -oxo-acide en  $C_n$  attendu. Dans le cas présent, l'identification précise de l'acide *n*-pentacosanoïque, obtenu par ozonolyse prouve d'une façon certaine la présence d'une chaîne latérale en  $C_{24}$  sur le carbone  $\alpha$  de l'acide mycolique.

En conclusion, l'acide  $\alpha$ -mycolique de souche Test est un  $\alpha$ -*n*-tétra cosyl- $\beta$ -hydroxy-acide<sup>12</sup>. L'acide  $\beta$ -mycolique de la même souche qui donne également de l'acide *n*-hexacosanoïque par pyrolyse doit aussi avoir son -OH en  $\beta$  et la chaîne latérale *n*-tétra-cosyle en  $\alpha$ .

L'explication du mécanisme de la pyrolyse donné ci-dessus est en accord avec le fait que l'hydroxyle est nécessaire pour la formation de l'acide *n*-hexacosanoïque; ni l'acide nor-mycolique d'ANDERSON, ni l'acide anhydro-mycolique ni l'acétate de l'acide mycolique ne se laissent pyrolyser. Il semble que cette pyrolyse soit *une réaction caractéristique des acides  $\beta$  hydroxylés, ramifiés en  $\alpha$ .*

La présence dans les acides  $\alpha$  et  $\beta$  mycoliques d'au moins deux carbones asymétriques (carbones  $\alpha$  et  $\beta$ ) entraîne l'existence d'au moins quatre isomères, qui disparaissent par déshydratation (formation d'acide anhydro-mycolique II). Cette structure rend donc possible l'isomérisie des acides  $\alpha$  et  $\beta$  mycoliques, possédant un produit de déshydratation commun; étant tous les deux dextrogyres, ils sont donc des diastéromères. Quant à l'acide anhydro-mycolique, il peut évidemment exister sous deux formes: *cis* et *trans*. Nous avons toujours obtenu un acide apparemment homogène et à point de fusion constant; sa configuration reste à étudier; d'ailleurs, un tel édifice moléculaire doit présenter une structure préférentielle.

Nous avons donc pu caractériser la nature et la structure de 27 atomes de carbone de l'acide mycolique et déterminer l'emplacement et la nature secondaire de l'hydroxyle. En ce qui concerne le reste de la molécule, avec ses 61 atomes de carbone et son méthoxyle, nous ne savons à l'heure actuelle que le fait, qu'il doit y avoir encore *au moins deux ramifications*, car des dosages de C-méthyle effectués sur l'acide mycolique, d'après KUHN ET ROTH indiquent la présence de *quatre chaînes*\*\*.

La structure I de l'acide mycolique concorde bien avec les conclusions tirées par STÄLLBERG-STENHAGEN ET STENHAGEN<sup>26</sup> d'une étude de l'acide mycolique aux rayons X et en couches monomoléculaires.

ANDERSON et col.<sup>20</sup> ont pensé que l'acide mycolique renferme deux chaînes en  $C_{26}$ , dont l'une porte le carboxyle. Or, contrairement à ce que pensaient ces auteurs, l'acide hexacosanoïque obtenu par oxydation chromique peut provenir de la même chaîne latérale en  $\alpha$  que celui obtenu par pyrolyse. En effet, l'oxydation chromique de l'acide mycolique (I) peut passer intermédiairement par la méthoxy-normycolanone (III) qui, par oxydation ultérieure doit se couper avec formation d'acide *n*-hexacosanoïque. Il n'est donc pas prouvé que l'acide mycolique renferme une deuxième chaîne en  $C_{26}$ .

\* Analyse aux rayons X effectuée par A. TRILLAT et S. BARBEZAT.

\*\* Nous décrivons, dans la partie expérimentale, une étude sommaire de la partie non volatile obtenue après pyrolyse. La nature de ces produits semble indiquer que la substance VII subit des réactions secondaires, ce qui n'est pas étonnant, étant donné les conditions de la réaction.



### Structure générale des acides mycoliques

Tous les acides mycoliques décrits par ANDERSON<sup>6,7,14,21,26</sup> et les nouveaux acides mycoliques isolés récemment dans notre laboratoire<sup>9,11,\*</sup> sont caractérisés par la présence d'un hydroxyle au moins et par la réaction de pyrolyse conduisant à la formation d'un acide gras à haut poids moléculaire (le plus souvent en C<sub>26</sub>).

Nous venons de montrer que cette réaction de pyrolyse est due à la présence d'un -OH en  $\beta$  et d'une longue chaîne latérale en  $\alpha$ . Nous proposons donc de *définir les acides mycoliques comme acides  $\beta$  hydroxylés à haut poids moléculaire ayant une longue chaîne aliphatique en  $\alpha$* .

C'est là une structure tout à fait nouvelle dans la série des acides gras naturels.

### Répartition des acides mycoliques dans les diverses fractions lipidiques

Une partie de l'acide mycolique est présente dans les *souches virulentes* (Aeschbacher, Test, H37-Rv) à l'état libre et peut en être isolé par chromatographie<sup>10</sup>. (Voir Tableau III: cires solubles dans l'acétone). La présence d'acide libre n'est pas causée par une saponification sur la colonne d'alumine, car l'acidité initiale de ces cires correspond à la quantité d'acide isolée. Elle n'est pas non plus causée par une lipolyse puisque nous n'avons pas obtenu d'acide mycolique libre dans le cas de souches avirulentes (H37-Ra, R<sub>1</sub>), traitées de la même manière.

La plus grande partie de l'acide mycolique (mélange de  $\alpha$  et  $\beta$ ) se trouve dans le Bacille à l'état *estérifié*; dans le cas de la souche Test, 6% environ du poids sec des Bacilles se trouvent sous cette forme et sont extraits par les solvants organiques neutres, principalement par le chloroforme (voir Tableau III).

Dans les *lipides liés* de bacilles de souche Test, nous avons encore isolé, après saponification, 2,3% du poids sec des bacilles d'un mélange d'acides  $\alpha$  et  $\beta$  mycoliques. Aucune différence n'a été observée entre ces acides et les acides correspondants isolés des lipides libres.

TABLEAU III

TENEUR EN ACIDE MYCOLIQUE ( $\alpha + \beta$ ) DES DIFFÉRENTES FRACTIONS LIPIDIQUES DE BACILLES DE SOUCHE TEST (EN % DE POIDS SEC DES BACILLES)

Fractions lipidiques	Libre	Acide mycolique estérifié	Total
Cires A *	1.2	traces	1.2
Cires extraites au chloroforme			
Cires molles	0	0.2	0.2
Cires solubles acétone	1.4	0.3	1.7
Lipopolysaccharide	0	2.9	2.9
Lipides liés	0	2.3	2.3
Total	2.6	5.7	8.3

\* Cires isolées de l'extrait alcool-éther; dans cette fraction, l'acide mycolique consiste presque entièrement en acide  $\alpha$ .

\* Travaux en cours avec H. DEMARTEAU et A. GINSBURG.

## DESCRIPTION DES EXPÉRIENCES

Les bacilles utilisés dans le présent travail ont été cultivés pendant six semaines, sur milieu de Sauton dans le cas de la souche Test (collection de l'Institut Pasteur) et sur milieu de Long dans le cas de la souche Aeschbacher (Prof. Roulet, Bâle). L'extraction des différentes fractions lipidiques a été effectuée selon ANDERSON<sup>1</sup>.

*Préparation d'acide mycolique brut*

5 g de cires purifiées préparées selon ANDERSON<sup>1</sup> sont dissous dans 20 ml de benzène et additionnés de 20 ml de potasse méthanolique à 5%. Après 72 heures de chauffage à reflux, au bain d'air, la solution est décantée de la masse brunâtre collée au fond du ballon (polysaccharide). Cet insoluble est lavé plusieurs fois au benzène bouillant, et toutes les solutions, réunies et concentrées sous vide, sont additionnées d'eau, acidifiées et extraites à l'éther.

L'éthéro-soluble brut pèse 3.5 g; il est repris par 10 ml d'éther et précipité par addition de 20 ml de méthanol. Le précipité, séparé par centrifugation, est lavé au méthanol, puis soumis à une deuxième précipitation et lavage, pour éliminer le plus possible les acides gras inférieurs. Le produit obtenu se présente, après séchage, sous forme d'un solide blanc, amorphe, F 55-57°, pesant 2.3 g.

Mis en solution dans 30 ml d'éther de pétrole, l'acide mycolique a été chromatographié sur 50 g d'alumine (activité II):

I.	Poids des fractions	Point de fusion	P.M. (titrage)
a. 300 ml éther de pétrole	2 mg		
b. 300 ml éther de pétrole-benzène 10%	5		
c. 300 ml benzène	1		
d. 300 ml éther	4		
e. 300 ml éther	0		
f. 300 ml éther-acide acétique 10%	1230	56-59°*	1250
g. 300 ml éther-acide acétique 10%	943	57-59°	1275
h. 300 ml éther-acide acétique 10%	46		

Total: 2219 mg soit 96.5%

Au cours de toutes les chromatographies d'acide mycolique et de ses dérivés, les points de fusion des fractions isolées ont été déterminés sur les produits précipités de leur solution étherée par le méthanol; la même observation est valable en ce qui concerne les titrages.

Une chromatographie témoin a été effectuée sur un mélange d'acides gras:

100 mg d'acide palmitique (P.M. 256.3) et 20 mg d'acide hexacosanoïque (P.M. 396.6) ont été chromatographiés sur 2.5 g d'alumine (act. II):

II.	Poids des fractions	P.M. (titrage)
a. 30 ml éther de pétrole	0 mg	
b. 30 ml éther de pétrole-benzène 10%	0	
c. 30 ml éther de pétrole-benzène 30%	0	
d. 30 ml benzène	0	
e. 30 ml benzène-éther 10%	1	
f. 30 ml éther	71	270
g. 30 ml éther	32	285
h. 30 ml éther	10	

Total: 114 mg soit 95%

\* Tous les points de fusion de ce travail sont corrigés.

*Isolement des acides  $\alpha$  et  $\beta$ -mycoliques*

1585 mg d'acide mycolique ont été chromatographiés sur 32 g d'alumine:

III.	Poids des fractions	F	P.M. (titrage)
a. 150 ml benzène	14.5 mg		
b. 150 ml éther (séché sur $\text{CaCl}_2$ )	} 4.0		
c. 150 ml éther (séché sur $\text{CaCl}_2$ )			
d. 150 ml éther ordinaire	8		
e. 150 ml éther-ac. acétique 0.1%	322.5	55-56°	1250
f. 200 ml éther-ac. acétique 0.1%	571	55-56°	1240
g. 200 ml éther-ac. acétique 0.1%	268	55-56°	1265
h. 200 ml éther-ac. acétique 0.3%	198	57-58.5°	1270
i. 200 ml éther-ac. acétique 0.5%	74	} 62-64°	1260
j. 200 ml éther-ac. acétique 1.0%	63		
Total: 1523 mg soit 96%			

*Acide  $\alpha$ -mycolique*

La fraction (III)-f (490 mg) a été rechromatographiée sur 15 g d'alumine:

IV.	Poids des fractions	F	P.M. (titrage)
a. 100 ml benzène	0 mg		
b. 200 ml éther	0		
c. 200 ml éther-ac. acétique 0.05%	3.5		
d. 150 ml éther-ac. acétique 0.1%	162	54.5-56°	1260
e. 150 ml éther-ac. acétique 0.1%	101	54.5-56°	1250
f. 200 ml éther-ac. acétique 0.1%	180	55-56°	1270
g. 150 ml éther-ac. acétique 0.2%	34	55-56°	—
Total: 480 mg, soit 97.9%			

Toutes les fractions ont pratiquement les mêmes caractéristiques.

*Acide  $\alpha$ -mycolique (souche Aeschbacher)*: solide blanc, F 55-56°

Analyse: trouvé\* C 81.53% H 13.42%  $\text{OCH}_3$  2.20%  
calculé pour  $\text{C}_{88}\text{H}_{176}\text{O}_4$  81.40 13.66 2.39%

*Acide  $\alpha$ -mycolique (souche Test)*: solide blanc, F 55-56°

Analyse: trouvé C 81.47% H 13.28%  $\text{OCH}_3$  2.36%

*Acide  $\beta$ -mycolique*

112 mg de fractions (III)-i et (III)-j ont été rechromatographiés sur 2 g d'alumine:

V.	Poids des fractions	F	P.M. (titrage)
a. 20 ml benzène	0 mg		
b. 20 ml éther	0		
c. 50 ml éther	0		
d. 30 ml éther-ac. acétique 0.1%	22	58-61°	
e. 30 ml éther-ac. acétique 0.1%	7		
f. 30 ml éther-ac. acétique 0.2%	10		
g. 30 ml éther-ac. acétique 1.0%	21	70-73°	1290
h. 50 ml éther-ac. acétique 5.0%	23	71-73°	1300
i. 50 ml éther-ac. acétique 5.0%	18	70-73°	
j. 50 ml éther-ac. acétique 5.0%	5		
Total: 106 mg, soit 94.6%			

\* Les micro-analyses de ce travail ont été effectuées dans le laboratoire, microanalytique du Prof. L. RUZICKA (École Polytechnique, Zürich).

L'élution de l'acide  $\beta$ -mycolique demande l'emploi de solutions plus concentrées en acide acétique: il est nettement plus adsorbé sur alumine que l'acide  $\alpha$ -mycolique.

*Acide  $\beta$ -mycolique (souche Aeschbacher):* solide blanc, F 71–73°

Analyse: trouvé C 81.70% H 13.01%  
calculé pour  $C_{88}H_{176}O_4$  81.40 13.66  $OCH_3$  2.39%

*Acide  $\beta$ -mycolique (souche Test):* solide blanc, F 71–73°

Analyse: trouvé C 81.27% H 13.52%  $OCH_3$  2.16%

Dans le but d'éprouver l'homogénéité de l'acide  $\alpha$ -mycolique, une chromatographie de l'ester méthylique préparé à partir de la fraction *d* de la chromatographie (IV) a été effectuée:

150 mg d' $\alpha$ -mycolate de méthyle (préparé à partir de (IV)-d) ont été chromatographiés sur 4.5 g d'alumine:

VI.	Poids	F	Acide obtenu par saponification	
			F	P.M.
a. 30 ml éther de pétrole purifié	0 mg			
b. 30 ml éther de pétrole purifié	0			
c. 30 ml éther de pétrole ordinaire	0			
d. 30 ml éther de pétrole-benzène 10%	4			
e. 30 ml éther de pétrole-benzène 20%	79	43–46°	55–56°	1300
f. 30 ml éther de pétrole-benzène 30%	45	43–46°	55–56°	1280
g. 50 ml éther de pétrole-benzène 50%	13	43–46°		

Aucune différence n'a pu être observée entre les divers éluats. Une autre chromatographie effectuée sur (IV)-e a fourni des résultats analogues.

#### *Préparation de dérivés des acides mycoliques*

Rappelons que, avec les restrictions mentionnées ci-dessus, nous adoptons pour l'acide mycolique, la formule  $C_{88}H_{176}O_4$  d'Anderson.

#### *Esters méthyliques*

Une solution étherée de chaque acide est additionnée d'un excès de solution étherée de diazométhane. Après plusieurs heures de contact, les solutions sont amenées à sec, dissoutes dans l'éther et précipitées par le méthanol. Chaque ester est ensuite chromatographié sur alumine (voir par ex. la chromatographie VI).

*$\alpha$ -mycolate de méthyle:* solide blanc, neutre, F 43–46°

Analyse: trouvé C 81.48 H 13.17%  
calculé pour  $C_{89}H_{178}O_4$  C 81.52 H 13.58%

*$\beta$ -mycolate de méthyle:* solide blanc, neutre, F 52–55°

Analyse: trouvé C 81.80 H 13.28

#### *Acétates mycoliques*

160 mg d'acide mycolique sont dissous dans 1 ml de benzène anhydre, additionnés de 1 ml de pyridine anhydre, puis, avec précaution, de 0.2 ml de chlorure d'acétyle dans 0.5 ml de pyridine. Le mélange est abandonné trois heures, en réchauffant le tube de temps à autre, dans un bain-marie à 60°. Après le traitement habituel, le produit

de la réaction est isolé puis chromatographié sur alumine (activité II); l'acétate est élué par l'éther (obtenu environ 50% de produit pur).

*Acétate d'acide  $\alpha$ -mycolique*: solide blanc, F 40–42°, saponifiable en régénérant l'acide  $\alpha$ -mycolique (F 54–56°).

Analyse: trouvé	C 80.89	H 13.32%	P.M. 1275 (titrage)
calculé pour $C_{90}H_{178}O_5$	80.64	13.38	1340

*Acétate d'acide  $\beta$ -mycolique*: solide blanc, F 44–48°, saponifiable en régénérant l'acide  $\beta$  mycolique (F 66–70°)

Analyse: trouvé	C 80.82%	H 13.12%	P.M. 1300 (titrage)
-----------------	----------	----------	---------------------

#### *Acétates de mycolate de méthyle*:

Préparés par méthylation par le diazométhane de chaque acétate d'acide mycolique; le produit obtenu a été purifié par précipitation de sa solution étherée par le méthanol:

*Acétate d' $\alpha$ -mycolate de méthyle*: solide blanc, neutre, F 33–35°

Analyse: trouvé	C 81.03%	H 13.04%
calculé pour $C_{91}H_{180}O_5$	80.70	H 13.40%

*Acétate de  $\beta$ -mycolate de méthyle*: solide blanc, neutre, F 42–44°.

#### *Alcools mycoliques*

Chaque acide, dissous dans l'éther anhydre, a été additionné d'un excès de solution étherée d'hydruure double de lithium et d'aluminium. Après une nuit de contact à température ordinaire, le mélange réactionnel est décomposé en le versant sur de la glace, puis, acidifié et extrait à l'éther. Le produit brut est purifié par chromatographie sur alumine (élué par un mélange benzène-50% éther). Rendement: environ 80% en produit pur.

*Alcool  $\alpha$ -mycolique*: solide blanc, neutre, F 50–52°,  $[\alpha]_D^{25} = +4.5^\circ$  ( $CHCl_3$ ,  $c = 1.06$ ).

Analyse: trouvé	C 82.66%	H 13.66%
	82.41	13.63
calculé pour $C_{88}H_{178}O_3$	82.29	13.97

*Alcool  $\beta$ -mycolique*: solide blanc, neutre F 60–63°.

#### *Diacétate de l'alcool $\alpha$ -mycolique*

110 mg d'alcool  $\alpha$ -mycolique ont été chauffés à reflux dans 5 ml d'anhydride acétique bouillant pendant trois heures. Après hydrolyse de l'excès d'anhydride acétique, extraction à l'éther et lavages de la solution étherée, le produit isolé est chromatographié sur alumine: le diacétate sort de la colonne dans le filtrat à l'éther de pétrole. Solide blanc, neutre, F 32–36°.

Analyse: trouvé	C 80.79%	H 13.11%
calculé pour $C_{92}H_{182}O_5$	80.81	13.32

*Remarque.* Dans le cas des dérivés acétylés, nous n'avons pas pu vérifier la teneur en acétyle par indice de saponification; en effet, la saponification complète de ces substances nécessite l'emploi d'un excès de potasse trop fort pour que les résultats des titrages puissent avoir une signification.

*Bibliographie p. 145.*

*Acides anhydro-mycoliques*

L'acide mycolique est chauffé à reflux dans 50 parties d'anhydride acétique, en présence de 5 parties de bisulfate de potassium fraîchement fondu et pulvérisé, pendant environ deux heures. Après isolement du produit de la réaction, une saponification est effectuée pour hydrolyser l'acétate mycolique présent (1.2 g de substance sont chauffés à reflux dans 10 ml de benzène avec 10 ml de potasse méthanolique à 5 %, pendant 5 heures). Le produit isolé de la saponification, est chromatographié sur alumine: l'acide mycolique (régénéré de l'acétate) n'est élué que par un mélange éther-acide acétique.

Exemple: chromatographie de 1.225 mg de substance sur une colonne de 25 g d'alumine (activité II):

a. 150 ml éther de pétrole	45 mg	
b. 150 ml éther de pétrole-benzène 30 %	21	
c. 150 ml benzène	4	
d. 150 ml éther	256	} soit 39 %
e. 150 ml éther	131	
f. 150 ml éther	63	
g. 150 ml éther	7	
h. 150 ml éther-acide acétique 0.5 %	387	
i. 200 ml éther-acide acétique 0.5 %	230	
j. 200 ml éther-acide acétique 1.0 %	31	

Total: 1.175 mg (soit 95.9 %)

L'acide anhydro-mycolique (éluate *d*, *e*, *f* et *g*) forme une poudre blanche, F 36–38°.

*Acide anhydro-mycolique:*

Préparé à partir d'acide  $\alpha$ -mycolique (souche Test):

Analyse: trouvé C 82.68 % H 13.46 % OCH<sub>3</sub> 2.56 %  
calculé pour C<sub>88</sub>H<sub>174</sub>O<sub>8</sub> 82.55 13.69 2.42

Préparé à partir d'acide  $\beta$ -mycolique (souche Test):

Analyse: trouvé C 82.89 % H 13.59 %

Le rendement en produit pur, présentant le maximum d'absorption à 220 m $\mu$ , est en moyenne de 35 %. La possibilité d'une migration de la double liaison au cours de la saponification et de la chromatographie nécessaires pour la préparation des acides anhydro-mycoliques purs est exclue par le fait suivant: l'intensité d'absorption du produit obtenu directement après traitement par l'anhydride acétique est sensiblement égale à celle qui peut être calculée à partir de l'intensité d'absorption du produit pur, compte tenu de son pourcentage dans le mélange initial (déterminé par isolement).

Dans les déshydratations d'acides  $\beta$ -hydroxylés, le produit déshydraté peut être un mélange d'acide  $\alpha$ - $\beta$  éthylénique et  $\beta$ - $\gamma$  éthylénique. La présence de ce dernier isomère peut être montrée par la formation d'époxyde, sous l'action de l'acide perbenzoïque. BÖSEKEN<sup>13bis</sup> a en effet montré que les acides  $\alpha$ - $\beta$  éthyléniques ne réagissent pas avec l'acide perbenzoïque; seul l'isomère  $\beta$ - $\gamma$  insaturé donne un dérivé:

Utilisant l'acide anhydro-mycolique, préparé comme il vient d'être dit, nous l'avons laissé en contact pendant une semaine vers 19° et à l'obscurité, avec une solution chloroformique d'acide perbenzoïque renfermant un large excès de produit actif (déterminé par titrage iodométrique). La chromatographie du produit de la réaction a permis d'isoler une fraction éluable seulement par l'éther-acide acétique à 0.1 %, correspondant à environ 20 % de l'acide anhydro-mycolique utilisé. Cet époxyde se présente sous forme d'un solide blanc, F 49–51°.

Analyse: trouvé C 81.03 % H 13.14 %  
calculé pour C<sub>88</sub>H<sub>174</sub>O<sub>4</sub> (époxyde) 81.53 13.53  
calculé pour C<sub>88</sub>H<sub>176</sub>O<sub>5</sub> (glycol) 80.41 % H 13.50 %

La faiblesse des % de C obtenus par analyse peut être due au moins en partie à la présence de glycol, qui peut se former à côté de l'époxyde. Il se peut donc que notre acide anhydro-mycolique contienne 20% d'un isomère ayant la double liaison en  $\beta$ .

### Anhydro-mycolate de méthyle

Ce dérivé peut être facilement préparé par méthylation au diazométhane de l'acide anhydro-mycolique: solide blanc, neutre, F 34-36°.

Analyse: trouvé	C 82.52%	H 13.52%
calculé pour $C_{89}H_{176}O_3$	82.66	13.62

### Alcool anhydro-mycolique

Par réduction d'acide anhydro-mycolique par  $LiAlH_4$ , dans les mêmes conditions que celles qui ont été décrites à propos de l'alcool mycolique, un alcool est obtenu qui, après purification par chromatographie (élué par des mélanges éther de pétrole-benzène), se présente sous forme d'un solide blanc, F 44-48°, neutre.

Analyse: trouvé	C 83.40%	H 13.96%
calculé pour $C_{88}H_{176}O_2$	83.46	14.01

La présence d'une double liaison est montrée par le spectre d'absorption ultra-violet (220 m $\mu$ , log  $\epsilon$  = 3.22).

### Fractions neutres obtenues au cours de la préparation de l'acide anhydro-mycolique

Lorsqu'on effectue la chromatographie sur alumine du produit brut provenant de l'ébullition de l'acide mycolique avec l'anhydride acétique, en présence de  $SO_4HK$ , environ 5 à 10% de produits neutres sont isolés dans les éluats éther de pétrole et éther de pétrole-benzène, *lorsqu'aucune saponification n'a été faite* avant de chromatographier (sinon, la proportion de neutre baisse environ de moitié):

Par rechromatographie de ces fractions neutres réunies, sur une alumine d'activité I, *neutralisée*, les résultats suivants sont obtenus:

310 mg de substance, 7 g d'alumine		
a	25 ml éther de pétrole purifié	23 mg
b	30 ml éther de pétrole purifié	17
c	30 ml éther de pétrole ordinaire	10
d	60 ml éther de pétrole-benzène 10%	30
e	60 ml éther de pétrole-benzène 15%	2
f	60 ml éther de pétrole-benzène 50%	4.5
g	60 ml benzène	1
h	100 ml éther	13
i	100 ml éther	3
j	100 ml éther-méthanol 20%	2
k	100 ml éther-acide acétique 0.5%	151
l	50 ml éther-acide acétique 1.0%	33
Total		289.5 mg (soit 93.5%)

Deux fractions neutres ont été isolées:

*éluat a*: solide blanc, peu soluble dans l'éther, F 61-65°

Analyses: trouvé C 85.70% H 13.84% (O = 0.39% !)

85.84 13.77

*éluat d*: solide blanc, neutre, F 58-62°

Analyse: trouvé C 84.94% H 14.11%  $OCH_3$  0%

84.96 13.99

Ces deux fractions ne renferment presque plus d'oxygène: elles correspondent à des produits décarboxylés et déméthoxylés; notons que la fraction *d* présente un spectre de rayons X de produit cristallisé\*.

\* Mesures de A. TRILLAT et S. BARBEZAT.





### Réaction de pyrolyse

Par chauffage d'acide mycolique vers 250–300° sous 0.3 mm de mercure, dans un tube à boules, un distillat cristallisé est recueilli, correspondant à environ 28% du poids d'acide traité (théorie: 30.5%). Après deux recristallisations dans le benzène, ce distillat se présente sous forme de lamelles incolores, F 87–88°, dont le poids moléculaire déterminé par titrage est de 397 et 402. Ces propriétés correspondent à celles de l'*acide n-hexacosanoïque* (F 88°, P.M. 396.6).

L'identité avec l'acide *n*-hexacosanoïque a en outre été vérifiée par diffraction aux rayons X\*.

La fraction volatile de pyrolyse a été étudiée plus soigneusement dans le cas de l'acide  $\alpha$ -mycolique: trois fractions ont pu être séparées:

- a) tête: (3%), après cristallisation dans le benzène, F 85–87°;
- b) cœur: (20%), recristallisé, F 87–88°;
- c) queue: (5%), trop soluble dans le benzène pour y être recristallisée, elle est précipitée par le méthanol: solide d'aspect cireux, F 40–42°; en raison des trop faibles quantités obtenues, il n'a pas été étudié davantage.

Le résidu non-volatile a été particulièrement examiné dans le cas de l'acide  $\alpha$ -mycolique (pyrolysé le plus rapidement possible: moins de 10 minutes): 340 mg de résidu ont été chromatographiés sur 10 g d'alumine (act. I).

a	100 ml d'éther de pétrole purifié	80 mg
b	100 ml éther de pétrole ordinaire	11
c	100 ml éther de pétrole-benzène 5%	26
d	100 ml éther de pétrole-benzène 12%	43
e	100 ml benzène	48
f	100 ml éther	40
g	100 ml éther-méthanol 10%	6
h	100 ml éther-acide acétique 1.0%	57
i	100 ml éther-acide acétique 3.0%	18
Total		329 mg (soit 96.7%)

La fraction *a* est peu soluble dans l'éther; solide blanc, neutre, F 54–58°.

Analyse: trouvé	C 85.62%	H 13.71%	OCH <sub>3</sub> 0
	85.51	13.92	
calculé pour C <sub>122</sub> H <sub>238</sub> O	85.13%	13.93%	

La fraction *d* se présente sous forme d'un solide blanc, neutre, F 36–38°.

Analyse: trouvé	C 84.19%	H 13.78%	OCH <sub>3</sub> 0
calculé pour C <sub>61</sub> H <sub>120</sub> O	84.25%	13.91%	

fraction *e*: F 37–50°;

fraction *f*: F 38–41°.

La pyrolyse d'*acide anhydro-mycolique* a fourni un distillat correspondant à 5.6% de l'acide utilisé; après purification, par précipitation de sa solution étherée par le méthanol, ce distillat se présente sous forme d'une poudre blanche, neutre, F 41–43°, rappelant la fraction de queue du distillat obtenu au cours de la pyrolyse d'acide  $\alpha$ -mycolique.

L'*acétate d'acides  $\alpha$  ou  $\beta$ -mycoliques* ne fournit aucun distillat au cours d'essais de pyrolyse.

### Position de l'hydroxyle dans les acides mycoliques

#### a. Traitement des acides mycoliques par le tétracétate de plomb

Chaque acide mycolique ( $\alpha$  et  $\beta$ ) est chauffé avec 0.4 parties de tétracétate de plomb

\* Analyse aux rayons X de A. TRILLAT et S. BARBEZAT.

dans un mélange à parties égales de benzène et d'acide acétique, dans un bain d'huile maintenu vers 90°, pendant une heure. Le produit de la réaction est repris par l'eau, acidifié et extrait à l'éther; après saponification et chromatographie sur alumine du produit obtenu, 85% de l'acide mycolique mis en œuvre sont retrouvés inchangés.

b. *Essai d'oxydation periodique des alcools mycoliques*

100 mg d'alcool, dissous dans 40 ml de dioxane, sont additionnés de 20 ml d'acide periodique  $M/10$ ; après deux heures de contact, 5 ml d'une solution  $M/10$  d'acide arsénieux sont ajoutés; après un quart d'heure d'attente, l'excès d'anhydride arsénieux est titré par l'iode  $N/10$ : aucune différence n'est trouvée entre les essais et les témoins.

c. *Oxydation chromique ménagée*

*Acide  $\alpha$ -mycolique.* 280 mg d'acide  $\alpha$ -mycolique, dissous dans 15 ml de benzène anhydre, sont additionnés d'une solution de 48 mg de  $CrO_3$  dans 12 ml d'acide acétique (préalablement distillé sur  $CrO_3$ ); après une semaine de contact à température ordinaire, à l'obscurité, aucune réduction n'a eu lieu, à en juger par la couleur. Le mélange est alors laissé 24 heures à 37°; la solution ayant viré au vert, un peu d'alcool est ajouté pour détruire le reste d'oxydant éventuellement présent, et après plusieurs heures de contact, le mélange est repris par l'eau et l'éther. Le produit isolé est chromatographié sur alumine; en raison de sa mauvaise solubilité dans l'éther de pétrole, la chromatographie est commencée en utilisant du tétrachlorure de carbone. 72% de substance sont retrouvés dans le filtrat au  $CCl_4$ : ce produit est peu soluble dans l'éther à froid, d'aspect amorphe, F 64–67°, neutre, et non-acétylable dans les conditions décrites pour la préparation des acétates d'acide mycolique.

Analyse: trouvé	C 83.65%	H 14.01%
calculé pour $C_{87}H_{174}O_2$	83.44	14.01
(méthoxy-nor-mycolanone, III)		

*$\alpha$ -mycolate de méthyle.* 236 mg d'ester sont dissous dans 15 ml de benzène et additionnés d'une solution de 41 mg de  $CrO_3$  dans 12 ml d'acide acétique. Après 24 heures de contact à 37°, le produit de la réaction est isolé comme dans le cas précédent, et chromatographié: 61.2% de substance sont retrouvés dans le filtrat à l'éther de pétrole purifié, formant un solide blanc, neutre, F 40–43°.

Analyse: trouvé	C 81.37%	H 13.53%
calculé pour $C_{89}H_{176}O_4$	81.58	13.54
(méthoxy-oxo-3-mycolanoate de méthyle, IV)		

Cette substance n'est plus acétylable par le chlorure d'acétyle; après deux heures de saponification par la potasse méthanolique, et traitement habituel, le produit isolé se présente sous forme d'un solide F 65–68°, peu soluble dans l'éther, comme la cétone précédente.

*Identification de la ramification en  $\alpha$ , par ozonisation*

268 mg d'acide anhydro-mycolique sont dissous dans 8 ml de  $CCl_4$  sec; la solution, refroidie dans un bain de glace, est soumise à l'action d'un courant d'oxygène ozonisé pendant 2 heures. Le bain de glace étant enlevé, on laisse passer l'ozone encore 30 minutes. La solution est alors amenée à sec avec précaution, puis additionnée de 3 ml

d'éther et 5 ml d'eau. Après trois heures de chauffage à reflux, le produit de la réaction est extrait à l'éther, et lavé par une solution de potasse à 2%.

La solution alcaline est lavée à l'éther, puis acidifiée et extraite à l'éther: cette solution, amenée à sec, fournit un résidu de 85 mg. Ce résidu est distillé sous vide dans un tube à boules, et le distillat est purifié par plusieurs recristallisations dans le méthanol. 17 mg d'un acide pur, F 82–83°, sont obtenus, sous forme de lamelles incolores.

Analyse: trouvé	C 78.49%	H 13.26%	P.M. (titrage) 378
calculé pour $C_{25}H_{50}O_2$	78.47	13.17	382

Cet acide a été identifié avec l'acide *n*-pentacosanoïque (échantillon du Dr STENHAGEN), par spectrographie de rayons X\*.

Nous remercions la ELLA SACHS PLOTZ FOUNDATION, Boston, pour un crédit de laboratoire qui a facilité ce travail, Mr J. TRÉFOUËL et le Dr J. BRETEY (Institut Pasteur, Paris) pour nous avoir fourni les bacilles de souche Test, le Professeur F. ROULET (Bâle) pour les bacilles de souche Aeschbacher, le Professeur J. TRILLAT et Mme S. BARBEZAT (Laboratoire de rayons X du C.N.R.S., Bellevue) pour les études aux rayons X des acides *n*-hexacosanoïque et *n*-pentacosanoïque.

#### RÉSUMÉ

1. L'acide mycolique, qui fait 8.3% du poids sec des Bacilles tuberculeux de la souche virulente, humaine, Test, peut être séparé par chromatographie en deux acides ( $\alpha$  et  $\beta$ ) qui sont probablement des isomères.

2. L'analyse élémentaire de ces deux acides mycoliques et d'un certain nombre de leurs dérivés permet de confirmer la formule brute  $C_{88}H_{176}O_4$  proposée par R. J. ANDERSON en 1938. Etant donné les difficultés analytiques inhérentes à l'étude de substances à haut poids moléculaire, cette formule ne doit être considérée que comme la plus probable.

3. Des réactions spécifiques prouvent que l'hydroxyle des acides mycoliques est en  $\beta$  par rapport au carboxyle.

4. Les acides mycoliques des deux souches virulentes étudiées ici portent en  $\alpha$  une chaîne latérale normale de 24 atomes de carbone. La réaction de pyrolyse de l'acide mycolique découverte par R. J. ANDERSON et conduisant à l'acide *n*-hexacosanoïque trouve ainsi son explication. C'est une réaction caractéristique des acides  $\beta$ -hydroxylés, ramifiés en  $\alpha$ .

5. Nous définissons les acides mycoliques, dont au moins un membre est présent dans toutes les souches de Mycobactéries examinées jusqu'ici comme acides  $\beta$ -hydroxylés à haut poids moléculaire portant une longue chaîne aliphatique en  $\alpha$ . C'est là un aspect tout à fait nouveau dans la chimie des acides gras naturels.

#### SUMMARY

1. Mycolic acid, which makes up 8.3% of the dry weight of the human tubercle bacillus Test, can be separated by chromatography into two acids ( $\alpha$  and  $\beta$ ) which are probably isomers.

2. The elementary analysis of these two mycolic acids and a number of their derivatives confirms the molecular formula  $C_{88}H_{176}O_4$  proposed by R. J. ANDERSON in 1938. Taking into account the difficulties inherent in the analysis of compounds of high molecular weight, this formula can be considered only as being the most probable.

3. Specific reactions show that the hydroxyl group present in the mycolic acids is in the  $\beta$ -position with respect to the carboxyl group.

4. The mycolic acids of the two virulent tubercle bacilli studied here have in the  $\alpha$ -position an unbranched side chain containing 24 carbon atoms. The pyrolysis of mycolic acid, investigated by R. J. ANDERSON, which leads to *n*-hexacosanoic acid is thus explained. It is a reaction characteristic of  $\beta$ -hydroxy-acids having a side chain in the  $\alpha$ -position.

5. Mycolic acids, at least one of which is present in all the strains of Mycobacteria examined up to now, may be defined as  $\beta$ -hydroxy-acids of high molecular weight which contain a long aliphatic side chain in the  $\alpha$ -position. This is a completely new aspect in the chemistry of the natural fatty acids.

\* Travail de A. TRILLAT et S. BARBEZAT.

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Mykolsäure, welche 8,3% des Trockengewichtes der menschlichen Tuberkelbazillen vom virulenten Stamm Test ausmacht, kann chromatographisch in zwei, wahrscheinlich isomere Säuren ( $\alpha$  und  $\beta$ ) gespalten werden.

2. Die Ergebnisse der Elementaranalyse dieser beiden Mykolsäuren sowie einiger ihrer Derivate bestätigen die von R. J. ANDERSON im Jahre 1938 vorgeschlagene Bruttoformel  $C_{88}H_{176}O_4$ . Im Hinblick auf die analytischen Schwierigkeiten, die mit der Untersuchung hochmolekularer Stoffe verbunden sind, soll diese Formel nur als die wahrscheinlichste angesehen werden.

3. Spezifische Reaktionen beweisen, dass sich die Hydroxylgruppe der Mykolsäuren in  $\beta$ -Stellung zur Carboxylgruppe befindet.

4. Die Mykolsäuren der beiden untersuchten virulenten Stämme haben in  $\alpha$ -Stellung eine normale Seitenkette von 24 C-Atomen. So erklärt sich die von R. J. ANDERSON entdeckte Pyrolyse-Reaktion der Mykolsäure, die zur  $n$ -Hexakosansäure führt. Dies ist eine charakteristische Reaktion der in  $\alpha$  verzweigten  $\beta$ -Hydroxysäuren.

5. Wir definieren die Mykolsäuren, von denen mindestens eine in allen bisher untersuchten Stämmen von Mykobakterien vorkommt, als hochmolekulare  $\beta$ -Hydroxysäuren, die eine lange aliphatische Seitenkette in  $\alpha$ -Stellung enthalten. Dies ist ein ganz neuer Aspekt der Chemie der natürlichen Fettsäuren.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 74 (1927) 525.
- <sup>2</sup> R. J. ANDERSON, *Fortschr. Chem. organ. Natur.*, 3 (1939) 145.
- <sup>3</sup> R. J. ANDERSON, *Harvey Lectures*, 1939-40, 271.
- <sup>4</sup> R. J. ANDERSON, *Chem. Rev.*, 29 (1941) 225.
- <sup>5</sup> R. J. ANDERSON, *Yale J. Biol. Med.*, 15 (1943) 311.
- <sup>6</sup> R. J. ANDERSON ET M. M. CREIGHTON, *J. Biol. Chem.*, 129 (1939) 57.
- <sup>7</sup> R. J. ANDERSON, J. A. CROWDER, M. S. NEWMAN ET F. H. STODOLA, *J. Biol. Chem.*, 113 (1936) 637.
- <sup>8</sup> J. ASSELINEAU, *Compt. rend.*, 230 (1950) 1620.
- <sup>9</sup> J. ASSELINEAU, H. DEMARTEAU ET E. LEDERER, *Compt. rend.*, 230 (1950) 877.
- <sup>10</sup> J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 492.
- <sup>11</sup> J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Compt. rend.*, 228 (1949) 1892.
- <sup>12</sup> J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Nature*, 166 (1950) 782.
- <sup>13</sup> H. BLOCH, *Am. Rev. Tuberc.*, 61 (1950) 270; *J. Exptl. Med.*, 91 (1950) 197.
- <sup>13bis</sup> J. BÖESEKEN, *Rec. trav. chim.*, 45 (1926) 838.
- <sup>14</sup> J. CASON ET R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 126 (1938) 527.
- <sup>15</sup> N. CHOUCRON, *Am. Rev. Tuberc.*, 56 (1947) 203; *Compt. rend.*, 226 (1948) 1477.
- <sup>16</sup> A. H. COOK, S. F. COX ET T. H. FARMER, *J. Chem. Soc.*, (1949) 1022.
- <sup>17</sup> N. FETHKE ET R. J. ANDERSON, *Am. Rev. Tuberc.*, 57 (1948) 294.
- <sup>18</sup> B. GERSTL, R. TENNANT ET O. PELZMAN, *Am. J. Path.*, 21 (1945) 1007.
- <sup>19</sup> K. HOFFMAN ET R. A. LUCAS, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 4328.
- <sup>20</sup> A. LESUK ET R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 136 (1940) 603.
- <sup>21</sup> R. L. PECK ET R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) 89.
- <sup>22</sup> S. RAFFEL, *J. Inf. Diseases*, 82 (1948) 267.
- <sup>23</sup> F. ROULET ET M. BRENNER, *Zentralbl. f. gesamt. Tuberk. Forsch.*, 56 (1941) 193.
- <sup>24</sup> H. SCHMID, A. EBNÖTHER ET M. BURGER, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 609.
- <sup>25</sup> H. SCHNAPP, *Ann.*, 201 (1880) 62.
- <sup>26</sup> S. STÄLLBERG-STENHAGEN ET E. STENHAGEN, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945) 255.
- <sup>27</sup> F. H. STODOLA, A. LESUK ET R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 126 (1938) 505.
- <sup>28</sup> O. WALLACH, *Ann.*, 365 (1909) 255.

Reçu le 3 novembre 1950