

Short Communications and Preliminary Notes

SUR UN ACIDE MYCOLIQUE DU BACILLE CALMETTE-GUÉRIN (BCG)*

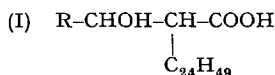
par

A. GINSBURG ET E. LEDERER

Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris (France)

CHARGAFF¹ a isolé en 1933 un acide mycolique du BCG sous forme d'un produit amorphe fondant à 63–65°, qui semblait avoir la formule $C_{52}H_{104}O_3$. Ce travail date d'une époque où la purification des acides mycoliques présentait encore de grosses difficultés. ASSELINEAU ET LEDERER² ont montré récemment que la chromatographie sur alumine permet une bonne séparation des acides mycoliques et conduit généralement à l'isolement d'au moins deux acides mycoliques, α et β , d'une même souche de Mycobactérie.

Les acides mycoliques de souches humaines et bovines isolés par chromatographie dans notre laboratoire ont tous à peu près la même taille moléculaire (P.M. 1250 ± 50); nous y distinguons les types suivants: 1. acides de formule approximative $C_{88}H_{176}O_4$ proposée par STODOLA, LESUK ET ANDERSON³, portant un hydroxyle et un méthoxyle; 2. acides $C_{87}H_{174}O_4$ ** contenant deux hydroxyles⁴; 3. acides $C_{87}H_{174}O_3$ contenant un hydroxyle⁵; et 4. acides $C_{88}H_{176}O_3$ contenant un méthoxyle⁵. Les acides des types 1 à 3 donnent par pyrolyse l'acide *n*-hexacosanoïque, et correspondent à la formule générale (I), ou R



est un reste saturé, ramifié, d'environ 60 atomes de carbone.

DEMARTEAU ET LEDERER⁶ viennent de décrire un nouveau type d'acides mycoliques: les acides β -mycolique de la souche bovine Marmorek (p.f. 58–60°), et γ -mycolique de la souche bovine Vallée (p.f. 62–64°). Ces acides de formule approximative $C_{87}H_{172}O_4$ ont un hydroxyle et un groupement cétonique; ils donnent une oxime et un monoacétate. DEMARTEAU ET LEDERER ont proposé d'appeler ces substances *acides mycoloniques*.

Dans la présente note nous décrivons un des acides mycoliques du BCG (cultivé pendant deux semaines sur milieu de Sauton) obtenu à partir des lipides liés, extraits d'après ANDERSON, REEVES ET STODOLA⁷. L'isolement de cette substance que nous appelons *acide γ -mycolique BCG*, a été facilité par sa faible solubilité dans l'éther. Cet acide est également un *acide mycolonique*. Nous décrirons plus tard les acides α et β -mycoliques du BCG qui sont éthero-solubles.

Après isolement des acides mycoliques bruts, et après chromatographie selon ASSELINEAU ET LEDERER², nous obtenons l'*acide γ -mycolique BCG*, par précipitation dans l'éther. Après plusieurs reprécipitations, il se présente sous forme d'amas microcristallins incolores, fondant à 70–72°. Calculé pour $C_{87}H_{172}O_4$: C 81.49 %, H 13.52 %, P.M. 1282; trouvé: C 81.61 %, H 13.39 %, OCH_3 0 %, P.M. 1250 (par titrage).

L'*ester méthylrique* de l'acide γ -mycolique BCG, préparé avec le diazométhane et purifié par chromatographie sur alumine (comme tous les produits décrits ici), fond à 54–56°. Calculé pour $C_{88}H_{174}O_4$: C 81.53 %, H 13.53 %, OCH_3 2.39 %; trouvé: C 81.50, 81.43, 81.79 %; H 13.65, 13.47, 13.61 %, OCH_3 2.53 %.

* 17ème Communication sur les constituants du bacille tuberculeux; pour la 16ème communication, voir⁸.

** Les analyses élémentaires et la titration de ces acides laissent une marge d'erreur correspondant à environ $\pm 5 CH_2$; nous adoptons provisoirement des formules en C_{88} pour les acides méthoxylés, et en C_{87} pour les acides dépourvus de méthoxyle. Pour des revues récentes de la chimie des acides mycoliques, voir⁸.

La réduction de l'acide par LiAlH_4 donne l'alcool γ -mycolique, p.f. $61-63^\circ$. Calculé pour $\text{C}_{87}\text{H}_{176}\text{O}_3$: C 82.25 %, H 13.96 %; trouvé: C 82.64 %, H 13.64 %.

Le traitement de l'acide γ -mycolique par l'anhydride acétique bouillant en présence de KHSO_4 fondu conduit à l'acide anhydro γ -mycolique, p.f. $42-45^\circ$. Cet acide présente le spectre d'absorption caractéristique des acides α, β insaturés (λ_{max} à $220 \text{ m}\mu$; $\epsilon = 12,000$.) Calculé pour $\text{C}_{87}\text{H}_{170}\text{O}_3$: C 82.65 %, H 13.55 %; trouvé: C 82.28 %, H 13.82 %.

La pyrolyse de l'acide γ -mycolique a donné, avec 16 % de rendement (théorie 31 %), l'acide n -hexacosanoïque, p.f. $84-86^\circ$, que Mme. S. BARBEZAT* a eu l'amabilité d'identifier par son spectre de diffraction aux rayons-X. Calculé pour $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}_2$: P.M. 397; trouvé: P.M. 414 (par titrage).

La deshydratation en acide α, β insaturé, et la pyrolyse² prouvent que l'acide γ -mycolique BCG, a également la structure générale (I).

L'oxime de l'acide γ -mycolique BCG, préparée d'après DEMARTEAU ET LEDERER⁶ fond à $52-54^\circ$. Calculé pour $\text{C}_{87}\text{H}_{173}\text{O}_4\text{N}$: C 80.54 %, H 13.44 %, N 1.08 %; trouvé: C 80.79, 80.32 %; H 13.45, 13.69 %, N 1.40 %.

Le monoacétate de l'acide γ -mycolique est préparé par traitement de l'acide avec le chlorure d'acétyle dans la pyridine. P.f. $43-46^\circ$. Calculé pour $\text{C}_{89}\text{H}_{174}\text{O}_5$: C 80.71 %, H 13.24 %; trouvé: C 80.72 %, H 13.05 %.

L'oxydation chromique de l'ester méthylique avec un excès de CrO_3 donne un cétoester neutre, p.f. $52-54^\circ$. Calculé pour $\text{C}_{88}\text{H}_{172}\text{O}_4$: C 81.66 %, H 13.40 %; trouvé: C 81.79, 81.60 %, H 13.40, 13.56 %. Sa saponification donne une dicétone neutre, p.f. $74-78^\circ$, par décarboxylation du β -cétoacide intermédiaire. Calculé pour une dicétone mycolique, $\text{C}_{86}\text{H}_{170}\text{O}_2$: C 83.55 %, H 13.86 %; trouvé: C 83.62, 83.30 %, H 14.11, 13.84 %.

La formation d'une substance neutre prouve que l'acide γ -mycolique BCG, est un acide cétonique et non aldéhydique. C'est donc un acide mycolonique⁸. Il diffère des acides décrits par DEMARTEAU ET LEDERER⁶ par son point de fusion plus élevé et par sa plus faible solubilité dans l'éther.

On n'a pas encore trouvé d'acides mycoloniques dans des souches humaines**; il se pourrait que la présence d'acides mycoloniques dans les souches bovines soit un nouveau caractère chimique distinguant les souches bovines des souches humaines.

Nous remercions la "Fondation Waksman pour le Développement des Études Microbiologiques en France" pour des subventions ayant facilité ce travail, la Ciba, AG, Bâle, pour avoir fait effectuer les microanalyses et Monsieur J. ASSELINEAU pour ses conseils techniques.

REFERENCES

- ¹ E. CHARGAFF, *Z. Physiol. Chem.*, 217 (1933) 115.
- ² J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 126.
- ³ F. H. STODOLA, A. LESUK, AND R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 126 (1938) 505.
- ⁴ J. ASSELINEAU, H. DEMARTEAU, ET E. LEDERER, *Compt. rend.*, 230 (1950) 877.
- ⁵ J. ASSELINEAU, Communication au 2^e Congrès Intern. de Biochimie, Paris (1952).
- ⁶ H. DEMARTEAU ET E. LEDERER, *Compt. rend.*, 235 (Séance du 16 juillet 1952; sous presse).
- ⁷ R. J. ANDERSON, R. E. REEVES, AND F. H. STODOLA, *J. Biol. Chem.*, 121 (1937) 649.
- ⁸ E. LEDERER, *Chemistry and Biochemistry of Mycobacteria*, in Colloquium on the Chemotherapy of Tuberculosis, Dublin (1951) p. 24; et *Chimie et biochimie des lipides des Mycobactéries*, rapport au 2^e Congrès Intern. de Biochimie, Paris (1952).

Reçu le 7 juillet 1952

* Laboratoire des rayons X du C.N.R.S. à Bellevue.

** J. ASSELINEAU, essais inédits.