

ISOLEMENT DE NOUVEAUX ACIDES MYCOLIQUES DES  
SOUCHES HUMAINES TEST, R<sub>1</sub> ET L-25 DE  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

PRÉSENCE D'UN ACIDE MYCOLONIQUE DANS UNE SOUCHE HUMAINE\*

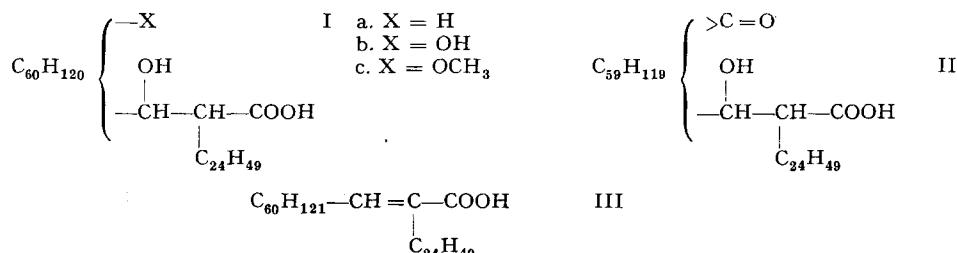
par

J. ASSELINÉAU

*Institut de Biologie physico-chimique, Paris (France)*

Au cours d'études antérieures, nous avons isolé des souches humaines virulentes *Test* et *Aeschbacher* de *M. tuberculosis*<sup>8</sup> deux acides mycoliques C<sub>88</sub>H<sub>178</sub>O<sub>4</sub>, appelés  $\alpha$  et  $\beta$ , et montré qu'ils possèdent la structure Ic, caractérisée par la libération par pyrolyse d'acide *n*-hexacosanoïque. Des acides  $\alpha$  et  $\beta$  mycoliques présentant le même type de structure, ont été isolés des deux variants Ra et Rv de la souche humaine H-37 (Ib, Ic)<sup>6</sup>.

Etendant notre étude des acides mycoliques aux souches humaines peu virulentes R<sub>1</sub> et L-25, nous avons observé la présence d'une nouvelle classe d'acides mycoliques, qui répondent à la formule approximative C<sub>87</sub>H<sub>174</sub>O<sub>3</sub><sup>\*\*</sup>. En plus du carboxyle, ces acides ne renferment dans leur molécule qu'un hydroxyle, situé en  $\beta$  par rapport au carboxyle comme le montre le comportement à la pyrolyse. Nous avons également isolé un acide de ce type de la souche humaine *Test*, ainsi qu'un acide méthoxylé C<sub>88</sub>H<sub>178</sub>O<sub>3</sub>. D'autre part, DEMARTEAU ET LEDERER<sup>11</sup> ont isolé de souches bovines, un nouveau type d'acide mycolique, caractérisé par la présence, dans le radical R (II), d'un groupement cétonique. Cet acide cétonique, C<sub>87</sub>H<sub>172</sub>O<sub>4</sub>, a été appelé *acide mycolonique*. GINSBURG ET LEDERER<sup>13</sup> ont observé la présence d'un acide mycolonique dans les lipides du B.C.G. Pour la première fois, nous avons isolé un acide de ce type à partir d'une souche humaine: la souche R<sub>1</sub>.



\* 19<sup>e</sup> communication sur les Constituants du Bacille tuberculeux; 18<sup>e</sup> comm., voir (10); ce travail a fait l'objet d'une communication au II<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie (Paris, juillet 1952).

\*\* Rappelons que par convention, nous adoptons une formule en C<sub>88</sub> pour les acides méthoxylés, et en C<sub>87</sub> pour les acides non-méthoxylés (voir 14).

Bibliographie p. 461.

### I. Acides mycoliques de la souche R<sub>1</sub>

L'acide mycolique brut est préparé de la manière habituelle, par saponification des cires extraites par le chloroforme<sup>16</sup>. Par chromatographie sur alumine de cet acide, nous avons isolé un acide  $\alpha$  et un acide  $\beta$  (par ordre d'élution). La chromatographie des esters méthyliques a permis de séparer l'acide  $\alpha$  en deux acides distincts :  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , respectivement mono- et di-hydroxylés. Trois acides mycoliques différents existent donc dans les lipides de la souche R<sub>1</sub>:

#### a. Acide $\alpha_1$ mycolique: C<sub>87</sub>H<sub>174</sub>O<sub>3</sub>, F 57-59°

Cet acide présente une structure du type Ia, comme le montre l'obtention d'acide *n*-hexacosanoïque par pyrolyse: il possède donc son hydroxyle en  $\beta$ <sup>8</sup>. Etant donné que la plupart des acides mycoliques possèdent un deuxième hydroxyle (méthylé ou non), on aurait pu s'attendre à trouver une double liaison à la place de l'hydroxyle absent. Or, l'ozonisation montre que cet acide est saturé.

#### b. Acide $\alpha_2$ mycolique: C<sub>87</sub>H<sub>174</sub>O<sub>4</sub>, F 56-58°

Cet acide est le constituant principal de l'acide mycolique brut (Tableau I). L'étude chimique de sa constitution montre qu'il s'agit d'un acide dihydroxylé, présentant la structure Ib; les détails de cette étude seront exposés ailleurs<sup>5</sup>.

TABLEAU I

ACIDES MYCOLIQUES ISOLÉS DES SOUCHES HUMAINES R<sub>1</sub> ET L-25 DE *M. tuberculosis*

Souche Acides mycoliques	R <sub>1</sub>			L-25	
	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$
% de l'acide mycolique brut	20	60	20	33	45
Point de fusion	57-59°	56-58°	68-73°	51-53°	53-55°
P.M. (titrage)	1260-1280	1300-1310	1260-1300	1300-1320	1290-1310
Pyrolyse: acide présent dans le distillat	22 %	25 %	27 %	18 %	25 %
acide <i>n</i> -hexacosanoïque					
Formule probable	C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>87</sub> H <sub>172</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>3</sub> + C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>3</sub>
Groupes fonctionnels	—OH	—OH —OH	>C=O —OH	—OH + —OCH <sub>3</sub>	—OH
Ester méthylique F	45-49°	45-49° acide	50-55° acide	40-42°	42-44° acide
Produit de deshydration F	—	bis-anhydro 42-43°	mono-anhydro 50-52°	—	mono-anhydro 39-41°

#### c. Acide $\beta$ mycolique: C<sub>87</sub>H<sub>172</sub>O<sub>4</sub>, F 68-73°

Cet acide se coupe par pyrolyse, avec l'égradation d'acide *n*-hexacosanoïque, ce qui permet de lui attribuer également un hydroxyle en  $\beta$  par rapport au carboxyle, et une

Bibliographie p. 461.

ramification de 24 atomes de carbones en  $\alpha^8$ . Sous l'action de l'anhydride acétique bouillant en présence de  $\text{KHSO}_4$ , dans des conditions énergiques, il fournit seulement un dérivé *mono-anhydro*,  $F\ 50\text{--}52^\circ\ C_{87}\text{H}_{170}\text{O}_3$ , où la double liaison est conjuguée avec le carboxyle (spectre U.V.:  $\lambda_{\text{max}}\ 219\ \mu$ ,  $\epsilon = 12,600$ ). Ce résultat s'explique par la nature probablement cétonique du quatrième atome d'oxygène: en effet, à partir de l'acide libre, nous avons pu préparer une *oxime*,  $F\ 54\text{--}57^\circ\ C_{87}\text{H}_{173}\text{O}_4\text{N}$ . L'acide  $\beta$  mycolique  $R_1$  est donc un *acide mycolonique* (II), du genre de ceux récemment isolés de souches bovines<sup>11,13</sup>.

## 2. Acides mycoliques de la souche L-25

A partir des cires extraites par le chloroforme de bacilles de souche L-25 (6.2% du poids sec des bacilles), nous avons isolé suivant la technique habituelle<sup>3</sup>, la fraction des cires D (qui constitue 4.5% du poids sec des bacilles). Par saponification, les cires D ont fourni 51% de polysaccharide, 11.5% d'acides gras et 40% d'acide mycolique brut.

La chromatographie sur alumine de l'acide mycolique brut a permis de séparer un acide  $\alpha$  mycolique,  $F\ 51\text{--}53^\circ$ , peu adsorbé, qui est encore un mélange d'acide méthoxylé et non-méthoxylé  $C_{87}\text{H}_{174}\text{O}_3$  et  $C_{88}\text{H}_{176}\text{O}_3$ , et un acide  $\beta$  mycolique,  $F\ 53\text{--}55^\circ\ C_{87}\text{H}_{174}\text{O}_3$  (Tableau I). Ces deux acides répondent à la formule Ia, comme le montre l'obtention d'acide *n-hexacosanoïque* par pyrolyse. Les alcools correspondants ont été préparés par action de  $\text{LiAlH}_4$ . Un *acide anhydro-mycolique* (III),  $F\ 39\text{--}41^\circ\ C_{87}\text{H}_{172}\text{O}_2$ , a été préparé à partir de l'acide  $\beta$ .

La souche L-25 est la première souche humaine étudiée jusqu'à maintenant, qui ne renferme pratiquement que des acides mycoliques en  $\text{O}_3$ . En particulier, elle est dépourvue d'un acide mycolique fortement adsorbé sur alumine, peu soluble dans l'éther et à point de fusion élevé (environ  $70^\circ$ ), qui a été observé dans toutes les autres souches humaines étudiées (constituant en général l'acide  $\beta$ ).

## 3. Acides mycoliques de la souche Test

Nous avons décrit antérieurement en détail<sup>8</sup> l'isolement d'acides  $\alpha$  et  $\beta$  mycoliques, correspondant à la formule Ic. La constitution chimique de l'acide  $\alpha$  fait d'ailleurs l'objet d'un travail récent<sup>9</sup>.

A partir de l'acide mycolique brut de cette souche, nous avons isolé deux autres acides,  $\gamma$  et  $\delta$ , (qui ne correspondent qu'à environ 3 à 5% de l'acide brut), en mettant à profit, soit leur plus forte adsorption sur alumine, soit la plus grande résistance de leurs esters méthyliques à la saponification. Dans les deux cas, c'est le mélange des acides  $\gamma$  et  $\delta$ , non-méthoxylé et méthoxylé, qui est obtenu. Par chromatographie des esters méthyliques, nous avons pu séparer l'*acide  $\gamma$  mycolique*,  $F\ 56\text{--}57^\circ\ C_{87}\text{H}_{174}\text{O}_3$  et l'*acide  $\delta$  mycolique*,  $F\ 59\text{--}60^\circ\ C_{88}\text{H}_{176}\text{O}_3$  (Tableau II). L'acide  $\delta$  mycolique est le premier acide mycolique isolé, portant seulement un méthoxyle; cet acide ne se coupe pas de la manière habituelle par pyrolyse. Etant donné que le blocage de l'hydroxyle en 3 des acides mycoliques suffit à faire disparaître cette propriété<sup>8</sup>, il n'est pas exclu que le méthoxyle occupe cette position. Le manque de substance nous a empêché de soumettre cet acide à un traitement par l'anhydride acétique en présence de  $\text{KHSO}_4$ , qui fournirait un acide  $\alpha\beta$  insaturé, si le méthoxyle était en 3.

TABLEAU II

ACIDES MYCOLIQUES ISOLÉS DE LA SOUCHE HUMAINE *Test de M. tuberculosis*

Acides mycoliques	$\alpha^*$	$\beta^*$	$\gamma$	$\delta$
% de l'acide mycolique brut	70	15	1.5	1.5
Point de fusion	55-56°	71-73°	56-57°	59-60°
P.M. (titrage)	1280-1290	1290-1300	1240-1260	1250-1260
Acide de pyrolyse	28%	26%	27%	traces
			Acide <i>n</i> -hexacosanoïque	
Formule probable	$C_{88}H_{178}O_4$	$C_{88}H_{178}O_4$	$C_{87}H_{174}O_3$	$C_{88}H_{176}O_3$
Groupes fonctionnels	—OH —OCH <sub>3</sub>	—OH —OCH <sub>3</sub>	—OH	—OCH <sub>3</sub>
Ester méthylique F	43-46°	52-55°	42-43°	39-42°

\* Ces acides ont déjà été décrits antérieurement<sup>8</sup>.

#### 4. Relations des divers acides mycoliques de souches humaines entre eux

Il est évidemment assez important de rechercher si deux acides mycoliques, de souches différentes, présentant le même point de fusion et la même formule brute, sont identiques ou non. Ce problème est très difficile à résoudre, en raison de l'absence d'abaissement de point de fusion de mélange dans cette série; la spectrographie infrarouge elle-même n'apporte pratiquement aucune aide, puisque les acides  $\alpha$  et  $\beta$  mycoliques *Test*, de constitution différente<sup>7</sup>, fournissent des spectres d'absorption I.R. presqu'identiques. Ce n'est que par comparaison d'un certain nombre de dérivés, que l'on peut rendre probable l'identité de deux acides mycoliques.

L'acide  $\alpha_1$  mycolique R<sub>1</sub> ( $C_{87}H_{174}O_3$ ) est élut d'une colonne d'alumine (act. II) en même temps que l'acide  $\alpha_2$ , et avant l'acide  $\beta$ . Au contraire, l'acide  $\gamma$  mycolique *Test*, de même formule brute, est fortement adsorbé sur alumine, et n'est élut qu'après l'acide  $\beta$  mycolique *Test*, par de l'éther renfermant des pourcentages élevés d'acide acétique. Ce fait permet de conclure à la non-identité probable des acides  $\alpha_1$  mycolique R<sub>1</sub> et  $\gamma$  mycolique *Test*: le manque de substance nous a empêché de chromatographier le mélange de ces deux acides, opération qui est nécessaire pour être sûr de leur non-identité.

Le comportement sur alumine ne permet pas de différencier les acides  $\alpha_1$  mycolique R<sub>1</sub> et  $\beta$  mycolique L-25, et trop peu de dérivés de ces acides ont été préparés pour pouvoir les comparer.

L'acide  $\alpha_2$  mycolique R<sub>1</sub> est différent de l'acide dihydroxylé qui est présent dans l'acide  $\alpha$  mycolique *Brévannes*<sup>2</sup>. En effet, à partir de l'acide  $\alpha_2$  mycolique R<sub>1</sub> nous avons obtenu une dicétone F 72-74°, dont l'oxime fond à 54-57°<sup>5</sup>, tandis que AEBI ET LEDERER<sup>1</sup> ont préparé, à partir de l'acide  $\alpha$  mycolique *Brévannes* une dicétone F 81-83°, dont l'oxime fond à 44-46°.

L'acide  $\beta$  mycolique R<sub>1</sub> est le premier acide mycolonique isolé d'une souche humaine de *M. tuberculosis*. Les acides mycoliques des souches humaines antérieurement étudiées *Aeschbacher*, *Test*<sup>8</sup>, H-37 Ra et Rv<sup>6</sup>, L-25, ne semble pas en renfermer, tout au moins en quantité importante. L'isolement d'un acide mycolonique d'une souche humaine, exclut la possibilité de différencier par la présence de ce constituant, les souches humaines ou bovines de Bacille tuberculeux. L'acide  $\beta$  mycolique R<sub>1</sub> semble se rapprocher de l'acide  $\gamma$  mycolique isolé du B.C.G. par GINSBURG ET LEDERER<sup>13</sup>:

	ac.libre	ester Me	mono-anhydro	oxime
ac. $\beta$ mycolique R <sub>1</sub>	F 68-73	50-55°	50-52°	54-57°
ac. $\gamma$ mycolique B.C.G.	70-72°	54-56°	42-45°	52-54°

L'identité de ces deux acides est donc assez probable, les points de fusion de ces substances micro-cristallines n'étant pas toujours très précis.

Les acides  $\gamma$  mycolique  $T_{est}$  et  $\beta$  mycolique  $R_1$ , qui renferment dans leur molécule, soit un seul hydroxyle, soit un hydroxyle et une fonction faiblement polaire ( $C = O$ ), sont cependant plus fortement adsorbés sur alumine que des acides dihydroxylés, tels que l'acide  $\alpha_2$  mycolique  $R_1$ . Ces acides doivent donc posséder dans leur molécule une particularité, peut-être simplement d'ordre stéréochimique, qui les rend plus fortement adsorbables.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

##### *Isolement des acides mycoliques $R_1$*

30 g de cires extraites par le chloroforme (provenant de l'extraction de bacilles de souche  $R_1^*$  cultivés pendant 4 semaines sur milieu de Sauton) sont dissoutes dans 300 ml de benzène, additionnées d'une solution de 10 g de potasse dans 300 ml de méthanol, et chauffées 16 heures à reflux. Par traitement du produit de la saponification de la manière habituelle, 20.5 g d'étherosoluble sont isolés, d'où l'acide mycolique brut est séparé par précipitation de la solution éthérée par 2 volumes de méthanol. Cette opération est recommandée une deuxième fois, ce qui fournit un précipité blanc (9.5 g) d'acide mycolique brut. En solution, restent une fraction neutre amorphe (350 mg) et environ 9 g d'acides gras inférieurs. Par cristallisation de ces derniers dans le benzène et le méthanol, presqu' 1 g d'un acide a pu être isolé, dont le point de fusion ( $85-87^\circ$ ) et la titration (P.M. 376) montrent qu'il doit s'agir d'*acide n-hexacosanoïque* (F  $88^\circ$ , P.M. 382); ester méthylique, F  $61^\circ$ :

trouvé      C 78.89 %      H 13.00 %  
                78.61            13.30

$C_{27}H_{54}O_2$  calc.      C 78.96      H 13.25

9.1 g d'acide mycolique brut sont chromatographiés sur 160 g d'alumine (act. II):

I:	a	600 ml éther de pétrole-benzène 50 %	438 mg	fractions neutres
	b	600 ml benzène	158	} F $70-72^\circ$
	c	600 ml éther	21	
	d	600 ml éther	1	
	e	600 ml éther-acide acétique 0.15 %	0	
	f	600 ml éther-acide acétique 0.15 %	385	F $53-56^\circ$ **
	g	600 ml éther-acide acétique 0.20 %	5958	$57-59^\circ$
	h	600 ml éther-acide acétique 0.30 %	842	$60-72^\circ$
	i	600 ml éther-acide acétique 0.30 %	530	$65-72^\circ$
	j	600 ml éther-acide acétique 0.50 %	322	$68-73^\circ$
	k	600 ml éther-acide acétique 2.0 %	5	
		Total	8660 mg (95%)	

L'éluat g est méthylé par le diazométhane; 1.5 g d'ester méthylique brut obtenu, est chromatographié sur 22 g d'alumine (préparée selon DUPONT, DULOU ET VILKAS<sup>12</sup>; act. I-II):

II:	a	200 ml éther de pétrole	0 mg
	b	150 ml éther de pétrole-benzène 5 %	0
	c	150 ml éther de pétrole-benzène 10 %	2
	d	100 ml éther de pétrole-benzène 20 %	27
	e	100 ml éther de pétrole-benzène 20 %	8
	f	150 ml éther de pétrole-benzène 20 %	1
	g	150 ml éther de pétrole-benzène 30 %	70
	h	150 ml éther de pétrole-benzène 50 %	209
	i	150 ml éther de pétrole-benzène 50 %	98
	j	150 ml benzène	205
	k	150 ml benzène-éther 5 %	461
	l	150 ml benzène-éther 10 %	188
	m	200 ml éther	128
		Total	1397 mg (93%).

\* Pour l'histoire de la souche  $R_1$ , voir<sup>15</sup>.

\*\* Les points de fusion indiqués à chaque chromatographie, ont été pris sur les substances obtenues après dissolution de chaque fraction dans l'éther et précipitation par 2 volumes de méthanol, à l'aide de l'appareil de KOFLER.

*Acide  $\alpha_1$  mycolique*

L'éluat *h* de la chromatographie II fournit à l'analyse:

trouvé	C 82.33 %	H 13.53 %	OCH <sub>3</sub> 2.56 %
C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>3</sub> calc.	82.34	13.90	2.43

Par saponification, il fournit l'*acide  $\alpha_1$  mycolique*, F 57-59°:

trouvé	C 82.22 %	H 13.59 %	P.M. (titrage) 1260
C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>3</sub> calc.	82.39	13.83	1268

Dosage de C-CH<sub>3</sub>: trouvé 3.92 %; calc. pour 1 CH<sub>3</sub>: 1.18. Cet acide doit donc posséder 4 CH<sub>3</sub>, c'est à dire qu'il doit avoir 3 ramifications.

75 mg d'*acide  $\alpha_1$  mycolique*, en solution dans 5 ml de tétrachlorure de carbone, ont été soumis pendant 5 heures, à l'action d'un courant d'oxygène ozonisé, en refroidissant vers -10°; L'*acide  $\alpha_1$  mycolique* a été récupéré inchangé (F 58-59°).

La technique de la réaction de pyrolyse des acides mycoliques a déjà été décrite en détail<sup>3,8</sup>.

*Acide  $\alpha_2$  mycolique*

L'éluat *h* de la chromatographie II, fournit un ester méthylique F 45-49°:

trouvé	C 81.75 %	H 13.73 %	OCH <sub>3</sub> 2.56 et 2.52 %
C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>4</sub> calc.	81.41	13.66	2.44

Par saponification, l'*acide  $\alpha_2$  mycolique*, F 56-58°, est obtenu:

trouvé	C 81.72 %	H 13.43 %	OCH <sub>3</sub> 0	P.M. (titrage) 1310
C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>4</sub> calc.	81.36	13.66	0	1284

Dosage de C-CH<sub>3</sub>: trouvé 3.90%; calculé pour 1 CH<sub>3</sub>: 1.15%.

*Acide  $\beta$  mycolique*

L'éluat *j* de la chromatographie I, fournit l'*acide  $\beta$  mycolique*:

trouvé	C 81.47 %	H 13.46 %	OCH <sub>3</sub> 0	P.M. (titrage) 1265
	81.37	13.74		
C <sub>87</sub> H <sub>172</sub> O <sub>4</sub> calc.	C 81.48	H 13.52		1282

L'*ester  $\beta$  mycolique*, obtenu par méthylation par le diazométhane, est purifié par chromatographie; l'éluat au tétrachlorure de carbone est constitué par un solide blanc, F 50-55°:

trouvé	C 81.21 %	H 13.38 %	OCH <sub>3</sub> 2.16 %
C <sub>88</sub> H <sub>174</sub> O <sub>4</sub> calc.	81.53	13.53	2.39

*Deshydration*: 160 mg d'*acide  $\beta$  mycolique* sont chauffés à reflux dans 10 ml d'anhydride acétique, avec 300 mg de KHSO<sub>4</sub> fraîchement fondu, en agitant, pendant 4 heures. Le produit de la réaction, isolé de la manière habituelle, est saponifié pendant 4 heures, par chauffage avec 5 ml de benzène et 5 ml de potasse méthanolique à 5%. Le produit obtenu est chromatographié sur alumine: l'éluat à l'éther (42%) est constitué par un solide blanc, F 50-52°, correspondant à un acide mono-anhydro-2,3 mycolique; spectre U.V.:  $\lambda_{\text{max}}$  219 m $\mu$ ,  $\epsilon = 12,600$  (hexane);

Trouvé	C 82.69 %	H 13.48 %	P.M. (titrage) 1250
C <sub>87</sub> H <sub>170</sub> O <sub>3</sub> calc.	82.64	13.55	1264

*Oximation*. 230 mg d'*acide  $\beta$  mycolique*, dissous dans 6 ml de benzène, sont chauffés à reflux avec 150 mg de chlorhydrate d'hydroxylamine et 225 mg d'acétate de sodium dans 30 ml d'alcool à 80° pendant 40 heures. Le produit de la réaction est chromatographié sur 8 g d'alumine (act. II): par élution à l'éther, on obtient 34% d'un solide blanc, F 54-57°,

trouvé	C 80.30 %	H 13.22 %	N 1.03 %	P.M. (titrage) 1196
C <sub>87</sub> H <sub>173</sub> O <sub>4</sub> calc.	80.54	13.44	1.08	1297

Par élution à l'éther-acide acétique 0.5%, 55% d'un solide blanc, F 55-57°, sont obtenus:

trouvé	C 80.56 %	H 13.49 %	N 1.03 %	P.M. (titrage) 1245.
--------	-----------	-----------	----------	----------------------

Ces deux fractions, probablement identiques, sont constituées par la mono-oxime attendue.

*Isolement des acides mycoliques L-25*

2,247 g de cires extraites par le chloroforme (provenant de l'extraction de bacilles de souche L-25\* cultivés pendant 6 semaines sur milieu de Sauton) ont été fractionnées de la manière habituelle<sup>3</sup>

\* La souche L-25 a été isolée en 1940 par le Dr CANETTI d'une lésion lupique.

en: *cires B* (244 mg, 10.8 % des cires brutes), *cires C* (327 mg, 14.5 % des cires brutes) et *cires D* (1.650 g, 73.4 %). Les cires D sont constituées par une fraction lipo-polysaccharidique, F 175-180°, qui renferme 1.0 % d'azote et 0.35 % de phosphore. Par chromatographie sur papier d'un hydrolysat acide, trois acides aminés ont été mis en évidence: alanine, acide glutamique, et acide  $\alpha$ - $\epsilon$ -diaminopimélique (voir 14).

1.130 mg de cires D ont été saponifiées pendant 72 heures, par chauffage à reflux avec 50 ml de benzène et 50 ml de potasse méthanolique à 5 %. 576 mg d'un polysaccharide insoluble sont séparés par filtration, et 597 mg d'étherosoluble sont obtenus. Par précipitation de la solution éthérée de ce dernier par 2 volumes de méthanol, 453 mg (soit 40 % des cires D) d'acide mycolique brut sont isolés.

435 mg de cet acide ont été chromatographiés sur 10 g d'alumine (act. II):

a	50 ml benzène	5 mg
b	50 ml benzène-éther 10 %	2
c	50 ml éther	44
d	50 ml éther	39
e	50 ml éther	25
f	50 ml éther	20
g	50 ml éther	17
h	50 ml éther-acide acétique 0.1 %	50
i	50 ml éther-acide acétique 0.1 %	152
j	50 ml éther-acide acétique 0.1 %	31
k	50 ml éther-acide acétique 0.1 %	22
l	50 ml éther-acide acétique 0.5 %	16
Total		423 mg (97 %)

#### Acide $\alpha$ mycolique

Les éluats c, d et e sont réunis; après précipitation de leur solution éthérée par 2 volumes de méthanol, ils fournissent une poudre blanche, micro-cristalline, F 51-53°:

trouvé	C 82.12 %	H 13.68 %	OCH <sub>3</sub> 1.21 %	P.M. (titrage) 1299 et 1322
C <sub>88</sub> H <sub>178</sub> O <sub>3</sub> calc.	82.42	13.82	2.43	1282

L'ester méthylique a été préparé par action d'une solution éthérée de diazométhane: solide blanc, neutre, F 42-46°,

trouvé	C 82.49 %	H 13.74 %
C <sub>88</sub> H <sub>178</sub> O <sub>3</sub> calc.	82.46	13.84

30 mg de cet acide, en solution dans 10 ml d'éther, ont été réduits en *alcool mycolique*, par action d'un excès d'une solution éthérée de LiAlH<sub>4</sub>; l'alcool, purifié par précipitation de sa solution éthérée par le méthanol, se présente sous forme d'une poudre blanche, neutre, F 48-50°,

trouvé	C 83.11 %	H 14.08 %
C <sub>88</sub> H <sub>178</sub> O <sub>2</sub> calc.	83.33	14.20

#### Acide $\beta$ mycolique

Les éluats h, i et j réunis, fournissent, après précipitation de leur solution éthérée par le méthanol, une poudre blanche, F 53-55°,

trouvé	C 82.42 %	H 13.84 %	OCH <sub>3</sub> 0	P.M. (titrage) 1286 et 1308
C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>3</sub> calc.	82.39	13.83		1268

L'ester méthylique, préparé par action d'une solution éthérée de diazométhane, consiste en une poudre blanche, F 42-44°,

trouvé	C 82.35 %	H 13.47 %	OCH <sub>3</sub> 2.56 %
	82.12	13.59	
C <sub>88</sub> H <sub>178</sub> O <sub>3</sub> calc.	82.34	13.90	2.43

L'alcool mycolique a été préparé à partir de 20 mg d'acide  $\beta$ , comme dans le cas de l'acide  $\alpha$ ; solide blanc, neutre, F 45-48°,

trouvé	C 83.22 %	H 14.14 %
C <sub>87</sub> H <sub>176</sub> O <sub>2</sub> calc.	83.30	14.22

L'acide anhydro-mycolique a été obtenu par chauffage à reflux de 105 mg d'acide, avec 10 ml d'anhydride acétique, en présence de 500 mg de KHSO<sub>4</sub> fondu et pulvérisé. Le produit de la réaction, isolé de la manière habituelle, a été chromatographié sur 2 g d'alumine (act. II). L'éluat éthéré

Bibliographie p. 461.

fournit un solide légèrement jaune, (41 %), F 39-41°; spectre U.V.:  $\lambda_{\text{max}}$  220 m $\mu$ ,  $\epsilon = 13,550$  (hexane);

trouvé	C 83.30 %	H 13.77 %	P.M. (titrage) 1230
$\text{C}_{87}\text{H}_{172}\text{O}_2$ calc.	83.57	13.86	1249

#### *Isolement des acides $\gamma$ et $\delta$ mycoliques Test*

L'obtention de l'acide mycolique brut, et des acides  $\alpha$  et  $\beta$ , à partir des cires extraites par le chloroforme, de bacilles de souche *Test*, a déjà été décrite en détail<sup>8,8</sup>.

Les dernières fractions de chromatographie sur alumine de l'acide mycolique brut (élues par de l'éther renfermant environ 1% d'acide acétique) consistent en un solide fondant vers 56-58°, qui fournit à l'analyse:

trouvé	C 82.79 %	H 13.74 %	OCH <sub>3</sub> 1.6 %
$\text{C}_{87}\text{H}_{174}\text{O}_3$ calc.	82.39	13.83	

La teneur en méthoxyle montrant qu'il s'agit d'un mélange, cet acide a été estérifié par le diazo-méthane, et l'ester méthylique obtenu (418 mg) a été chromatographié sur 13 g d'alumine (act. I):

a	50 ml éther de pétrole	0 mg
b	50 ml éther de pétrole-benzène 10 %	0
c	50 ml éther de pétrole-benzène 20 %	0
d	50 ml éther de pétrole-benzène 30 %	1
e	100 ml éther de pétrole-benzène 50 %	105 F 39-42°
f	100 ml benzène	54 38-45°
g	100 ml benzène-éther 2 %	152 42-43°
h	50 ml benzène-éther 5 %	85 38-43°
i	50 ml éther	3
Total		399 mg (95 %)

#### *Acide $\gamma$ mycolique*

L'éluat *g* est constitué par un ester méthylique F 42-43°,

trouvé	C 82.12 %	H 13.89 %	OCH <sub>3</sub> 2.40 %
$\text{C}_{88}\text{H}_{176}\text{O}_3$ calc.	82.42	13.82	2.43

Par saponification par la potasse méthanolique pendant 16 heures, l'acide correspondant est obtenu sous forme d'une poudre blanche, F 56-57°,

trouvé	C 82.62 %	H 13.89 %	OCH <sub>3</sub> 0	P.M. (titrage) 1243 et 1256
$\text{C}_{87}\text{H}_{174}\text{O}_3$ calc.	82.39	13.83	0	1268

#### *Acide $\delta$ mycolique*

L'éluat *e* fournit un ester méthylique F 39-42°,

trouvé	C 82.04 %	H 13.71 %	OCH <sub>3</sub> 4.50 %
$\text{C}_{89}\text{H}_{178}\text{O}_3$ calc.	82.46	13.84	4.78

Par saponification (dans les mêmes conditions que pour l'ester  $\gamma$  mycolique), l'acide  $\delta$  mycolique est obtenu sous forme d'un solide blanc, F 59-60°,

trouvé	C 82.30 %	H 13.67 %	OCH <sub>3</sub> 2.83 %	P.M. (titrage) 1248 et 1261
$\text{C}_{88}\text{H}_{176}\text{O}_3$ calc.	82.42	13.82	2.43	1282.

#### REMERCIEMENTS

Nous sommes heureux de remercier Monsieur E. LEDERER de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail. Nous remercions également Monsieur le Pr. J. TREFOUËL, Directeur de l'Institut Pasteur, et Monsieur le Dr. J. BRETEY, chef de service, qui nous ont fourni les cultures de bacilles utilisées. Ce travail a bénéficié d'une subvention (accordée au laboratoire de M. E. LEDERER) de la Fondation Waksman pour le Développement des Etudes microbiologiques en France. Les micro-analyses ont été effectuées dans les laboratoires d'analyse de la CIBA.

## RÉSUMÉ

Des acides mycoliques, possédant seulement trois atomes d'oxygène dans leur molécule, ont été mis en évidence dans les souches humaines *Test*, L-25 et R<sub>1</sub> de *M. tuberculosis*. Les acides  $\gamma$  mycolique *Test*,  $\beta$  mycolique L-25 et  $\alpha_1$  mycolique R<sub>1</sub> ont la formule approximative C<sub>87</sub>H<sub>174</sub>O<sub>3</sub> et possèdent un hydroxyle en  $\beta$  et une chaîne de 24 atomes de carbone en  $\alpha$  du carboxyle (Ia).

L'acide  $\beta$  mycolique R<sub>1</sub>, C<sub>87</sub>H<sub>172</sub>O<sub>4</sub>, renferme un groupe cétonique, et s'apparente aux acides mycoloniques isolés de souches bovines<sup>11,13</sup>. C'est le premier acide mycolonique observé dans une souche humaine.

Les acides  $\alpha_2$  mycolique R<sub>1</sub> et  $\alpha$  mycolique *Brévannes* (C<sub>87</sub>H<sub>174</sub>O<sub>4</sub>) sont différents l'un de l'autre, ainsi que probablement, les acides  $\alpha_1$  mycolique R<sub>1</sub> et  $\gamma$  mycolique *Test* (C<sub>87</sub>H<sub>174</sub>O<sub>3</sub>).

## SUMMARY

Mycolic acids, possessing only 3 oxygen atoms in their molecules, have been demonstrated in human strains *Test*, L-25 and R<sub>1</sub> of *M. tuberculosis*.  $\gamma$ -mycolic *Test*,  $\beta$ -mycolic L-25 and  $\alpha_1$ -mycolic R<sub>1</sub> acids have the approximate formula C<sub>87</sub>H<sub>174</sub>O<sub>3</sub> and possess a hydroxyl radical in the  $\beta$  position and a chain of 24 carbon atoms in  $\alpha$  position of the carboxyl (Ia).

$\beta$ -mycolic R<sub>1</sub> acid, C<sub>87</sub>H<sub>172</sub>O<sub>4</sub>, possesses a keto group and is related to the mycolonics acids isolated from bovine strains<sup>11,13</sup>. It is the first mycolonics acid observed in a human strain.

$\alpha_2$ -mycolic R<sub>1</sub> and  $\alpha$ -mycolic *Brévannes* acids (C<sub>87</sub>H<sub>174</sub>O<sub>4</sub>) are different from one another, as well as, probably,  $\alpha_1$ -mycolic R<sub>1</sub> and  $\gamma$ -mycolic *Test* acids (C<sub>87</sub>H<sub>174</sub>O<sub>3</sub>).

## ZUSAMMENFASSUNG

Mykolsäuren, die nur drei Atome Sauerstoff im Molekül besitzen, wurden in den humanen Stämmen *Test*, L-25 und R<sub>1</sub> von *M. tuberculosis* nachgewiesen. Die *Test*- $\gamma$ -Mykolsäure, die L-25- $\beta$ -Mykolsäure und die R<sub>1</sub>- $\alpha_1$ -Mykolsäure haben die ungefähre Formel C<sub>87</sub>H<sub>174</sub>O<sub>3</sub> und besitzen ein Hydroxyl in  $\beta$ - und eine Kette mit 24 Kohlenstoffatomen in  $\alpha$ -Stellung zur Carboxyl-gruppe (Ia).

Die R<sub>1</sub>- $\beta$ -Mykolsäure, C<sub>87</sub>H<sub>172</sub>O<sub>4</sub>, enthält eine Ketogruppe und ist mit den aus bovinen Stämmen isolierten Mykolonsäuren verwandt<sup>11,13</sup>. Es ist dies die erste Mykolonsäure, die in humanen Stämmen beobachtet wurde.

Die R<sub>1</sub>- $\alpha_2$ -Mykolsäure und die *Brévannes*- $\alpha$ -Mykolsäure (C<sub>87</sub>H<sub>174</sub>O<sub>4</sub>) sind von einander verschieden, sowie wahrscheinlich auch die R<sub>1</sub>- $\alpha_1$ -Mykolsäure und die *Test*- $\gamma$ -Mykolsäure (C<sub>87</sub>H<sub>174</sub>O<sub>3</sub>).

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. AEBI ET E. LEDERER, *Helv. Chim. Acta*, sous presse.
- 2 A. AEBI, J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Bull. soc. chim. biol.*, sous presse.
- 3 J. ASSELINEAU, *Acides mycoliques et cires du Bacille tuberculeux*, Thèse Doctorat es sc. Paris 1950 (Ed. Arnette 1951).
- 4 J. ASSELINEAU, *Bull. soc. chim.*, (1952) 557.
- 5 J. ASSELINEAU, *Bull. soc. chim.*, sous presse.
- 6 J. ASSELINEAU, H. DEMARTEAU ET E. LEDERER, *Compt. rend.*, 230 (1950) 877.
- 7 J. ASSELINEAU, E. GANZ ET E. LEDERER, *Compt. rend.*, 232 (1951) 2050.
- 8 J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 126.
- 9 J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Bull. soc. chim.*, (1953).
- 10 M. BARBIER ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 330.
- 11 H. DEMARTEAU ET E. LEDERER, *Compt. rend.*, 235 (1952) 265.
- 12 G. DUPONT, R. DULOU ET M. VILKAS, *Bull. soc. chim.*, 42 (1948) 785.
- 13 A. GINSBURG ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 328.
- 14 E. LEDERER, *Chimie et Biochimie des lipides des Mycobactéries*, 31 pp., rapport au II<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie, Paris 1952.
- 15 W. STEENKEN ET L. U. GARDNER, *Am. Rev. Tuberc.*, 54 (1946) 51.
- 16 F. H. STODOLA, A. LESUK ET R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 126 (1938) 505.

Reçu le 14 octobre 1952