

SUR L'ISOLEMENT ET LA CONSTITUTION CHIMIQUE  
DES ACIDES MYCOLIQUES DE *MYCOBACTERIUM PHLEI* ET DE  
*MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*\*

par

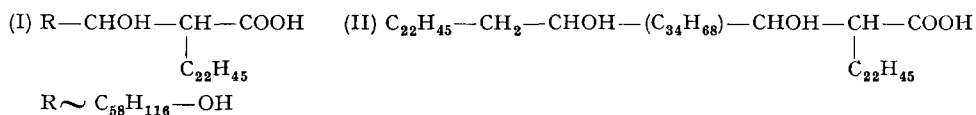
M. BARBIER ET E. LEDERER

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

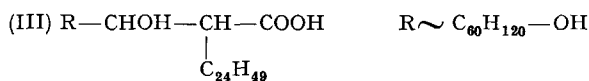
PECK ET ANDERSON<sup>2</sup> ont en 1931 isolé de *Mycobacterium phlei* un acide mycolique pour lequel ils ont proposé la formule  $C_{70}H_{138}O_6$ . Ils ont montré que cet acide était hydroxylé et dicarboxylique, et que la pyrolyse donnait un acide  $C_{24}H_{48}O_2$  qu'ils pensaient être ramifié. De plus, ils ont envisagé l'existence de deux isomères. PECK ET ANDERSON ont proposé pour ces deux substances les noms d'acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -phlei-mycoliques.

Les acides mycoliques de *M. smegmatis* ne semblent pas avoir encore été étudiés.

Dans le présent mémoire nous décrivons deux acides phlei-mycoliques isolés de *M. phlei* et trois acides smegma-mycoliques isolés de *M. smegmatis*, et nous montrons qu'ils ont tous la formule brute  $C_{83}H_{166}O_4 \pm 5CH_2$  et la structure générale (I). Nous proposons pour l'acide  $\alpha$ -smegma-mycolique la formule partielle II.



Rappelons que des travaux récents de notre laboratoire ont montré que les acides mycoliques de souches humaines et bovines de *Mycobacterium tuberculosis* ont environ 88 atomes de carbone, et qu'ils ont la structure générale (III):



R est un reste aliphatique ramifié comportant environ 60 atomes de carbone et portant le plus souvent un OH ou un  $OCH_3$  ou un  $CO$ <sup>3,4,5,6</sup>.

#### *Isolement des acides phlei-mycoliques*

Nous avons isolé les acides mycoliques de *M. phlei* à partir des cires C et D, ainsi qu'à partir des lipides liés\*\*. La saponification des cires C donne environ 45% d'acides mycoliques; la saponification des cires D en fournit plus de 50%. Les lipides liés donnent environ 30% d'acides mycoliques. L'acide mycolique brut se présente sous forme d'une poudre incolore, F. 55°.

\* 27ème communication sur les constituants des Mycobactéries; 26ème communication, voir<sup>1</sup>.

\*\* Au sujet de la nomenclature des fractions lipidiques, voir p.ex.<sup>4</sup>.

*M. phlei* contient environ 4.8% d'acides mycoliques (par rapport au poids sec des bacilles).

La chromatographie sur alumine du mycolate de méthyle brut permet de le

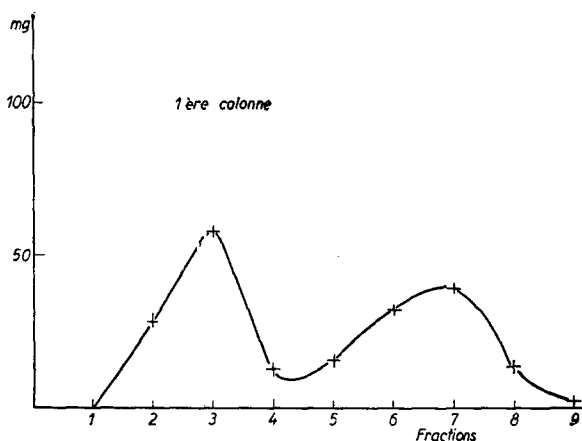


Fig. 1. Diagramme d'élution d'un mélange de 100 mg d' $\alpha$ -phlei-mycolate de méthyle avec 100 mg de  $\beta$ -phlei-mycolate de méthyle.

séparer en deux fractions distinctes correspondant aux acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -phlei-mycoliques. L'ester  $\alpha$ -phlei-mycolique est élué par du benzène contenant 10 ou 20% d'éther, et l'ester  $\beta$  par l'éther. Ces deux esters fondent à 45° et leurs analyses élémentaires concordent avec la formule  $C_{84}H_{168}O_4 \pm 5CH_2$ . Les deux acides obtenus par saponification fondent à 55° et leurs analyses élémentaires concordent avec la formule  $C_{83}H_{166}O_4 \pm 5CH_2$ . Étant donné l'identité des points de fusion des deux acides, de leurs esters, et de leur composition élémentaire, nous avons cherché à vérifier si les acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -phlei-mycoliques étaient vraiment différents. Nous avons utilisé trois colonnes de même dimension, contenant les mêmes quantités d'une même alumine et avons élué dans chaque cas par des volumes identiques du même solvant. Sur la première colonne, nous avons chromatographié 200 mg d'un mélange de quantités égales des esters  $\alpha$ - et  $\beta$ -phlei-mycoliques précédemment isolés; sur la seconde colonne nous avons chromatographié 200 mg d'ester  $\alpha$  seul, et sur la troisième 200 mg d'ester  $\beta$  seul. Les Figs. 1 et 2 montrent que le mélange des esters  $\alpha$  et  $\beta$  donne deux maxima d'élution tandis que chaque ester seul ne donne qu'un seul maximum d'élution et que l'ester  $\alpha$  est élué avant l'ester  $\beta$ .

La spectrographie infrarouge a confirmé que les acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -phlei-mycoliques sont différents. Les courbes d'absorption infrarouge des esters méthyliques des deux acides montrent en effet des différences très nettes: l'ester  $\alpha$  présente une bande à 5.80  $\mu$  avec une épaule à 5.70  $\mu$ , tandis que l'ester  $\beta$  présente deux bandes très nettes, l'une à 5.74  $\mu$ , l'autre à 5.82  $\mu$ ; de plus il y a des différences assez prononcées dans les bandes d'absorption des deux esters entre 7.50  $\mu$  et 8.25  $\mu$ .

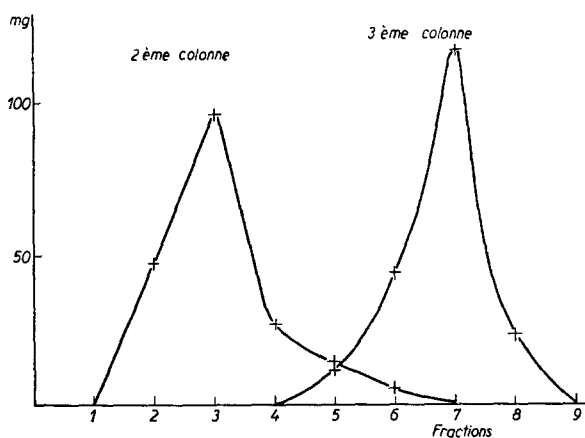


Fig. 2. Diagramme d'élution de 200 mg d' $\alpha$ -phlei-mycolate de méthyle (2ème colonne) et de 200 mg de  $\beta$ -phlei-mycolate de méthyle (3ème colonne).

### *Isolement des acides smegma-mycoliques*

Les acides smegma-mycoliques ont été isolés par saponification des cires C et D de *M. smegmatis*, qui en contiennent 45 à 50%. Cette saponification effectuée sur les cires D donne 35% d'un acide très peu soluble dans l'éther, qui se rassemble à l'interface éther-eau. Par chromatographie sur alumine des esters méthyliques de la fraction éthérosoluble, nous avons pu isoler deux esters: l'ester  $\alpha$ -smegma-mycolique qui s'élue avec du benzène contenant 10% d'éther, et l'ester  $\beta$ -smegma-mycolique, qui s'élue avec l'éther\*. La chromatographie sur colonne de l'ester de la fraction insoluble ne donne qu'une seule fraction, élue avec un mélange de benzène contenant 50% d'éther. Nous avons appelé cette substance: acide  $\gamma$ -smegma-mycolique.

Les acides mycoliques des lipides libres de *M. smegmatis* représentent 3.7% du poids sec des bacilles.

### *Sur la structure chimique des acides phlei- et smegma-mycoliques*

Les essais décrits ci-dessous, effectués sur chacun des deux acides phlei-mycoliques, et des trois acides smegma-mycoliques, ont donné des résultats pratiquement semblables:

1. *Formule brute.* Les titrages d'acidité, et les dosages de méthoxyle effectués sur les esters méthyliques, sont en accord avec un poids moléculaire d'environ  $1,200 \pm 50$ ; le poids moléculaire théorique pour la formule  $C_{83}H_{166}O_4$ \*\* que nous proposons est de 1226.

Les analyses élémentaires des acides mycoliques et de leurs dérivés indiquent la présence de 4 oxygènes pour environ 83 carbones; aucun des 5 acides ne contient de méthoxyle.

2. *Ramifications.* La pyrolyse de ces acides donne environ 25% d'un acide cristallisé, F. 80°, qui est dans chaque cas identique à l'acide tétracosanoïque normal,  $C_{24}H_{48}O_2$  (distance réticulaire: 52.7 Å)<sup>†, ††</sup>. Les résultats acquis en ce qui concerne la pyrolyse des acides mycoliques des souches humaines et bovines<sup>3-6</sup> nous permettent d'attribuer aux 5 acides mycoliques de *M. phlei* et de *M. smegmatis*, la structure (I) caractérisée par une ramification  $C_{22}H_{45}$  en  $\alpha$  du carboxyle; cette structure se trouve confirmée par d'autres réactions mentionnées ci-dessous.

Le dosage de  $C-CH_3$  d'après GINGER<sup>7</sup> (modification de la méthode de KUHN-ROTH) indique que les acides mycoliques contiennent au moins trois ramifications.

3. *Nature des fonctions.* La présence d'un carboxyle ressort des faits suivants: formation d'un ester méthylique (V) par action du diazo-méthane, résultat des titrages, présence d'une bande à 5.9  $\mu$  dans le spectre infra-rouge des acides, réduction de ces acides par  $LiAlH_4$  en alcools mycoliques,  $C_{83}H_{168}O_3 \pm 5CH_2$  (VI).

Les acides phlei- et smegma-mycoliques ne réagissent pas avec l'hydroxylamine,

\* La méthode des trois colonnes a permis de vérifier ici également que les acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -smegma-mycoliques étaient différents.

\*\* Précisons la signification que nous attribuons à cette formule en  $C_{83}$ . Nous avons adopté des formules en  $C_{88}$  pour les acides mycoliques méthoxylés ayant une chaîne latérale  $C_{24}H_{49}$  et une formule en  $C_{87}$  pour les acides mycoliques non méthoxylés ayant cette même chaîne latérale<sup>3, 4, 5</sup>.

Dans une note préliminaire<sup>11</sup>, nous avons adopté pour les acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -phlei-mycoliques la formule  $C_{85}H_{170}O_4 \pm 5CH_2$  en tenant compte du fait que leur chaîne latérale en  $\alpha$  est en  $C_{22}$  au lieu d'être en  $C_{24}$ . Cependant nous verrons par la suite qu'il y a tout lieu de croire que les acides phlei- et smegma-mycoliques contiennent deux chaînes en  $C_{22}$  au lieu de deux chaînes en  $C_{24}$ <sup>4, 5</sup> ce qui fait qu'ils contiennent 4 atomes de carbone de moins que les acides mycoliques en  $C_{87}$ . C'est pour cela que nous proposons la formule  $C_{83}H_{166}O_4 \pm 5CH_2$  pour ces acides.

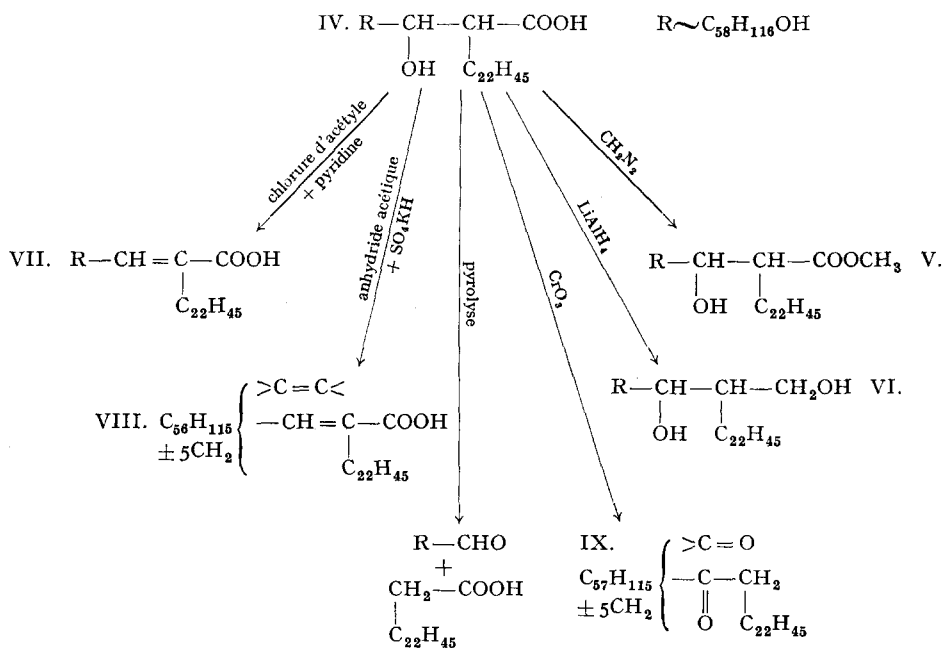
† Nous remercions Madame S. BARBEZAT, (Laboratoire des rayons X du CNRS) pour ces mesures.

†† Une souche de "bacille paratuberculeux" décrite par BRUYNOGHE ET ADANT contient également un acide mycolique qui donne à la pyrolyse l'acide tétracosanoïque (J. ASSELINEAU, essais inédits).

ils ne contiennent donc pas de groupement cétonique. Les deux autres oxygènes des acides phlei- et smegma-mycoliques appartiennent à des hydroxyles.

Des essais d'acétylation conduisent à l'élimination d'un hydroxyle avec formation d'un *acide mono-anhydro-mycolique*  $C_{83}H_{164}O_3 \pm 5CH_2$  (VII) ayant le spectre d'absorption caractéristique des acides  $\alpha,\beta$ -insaturés; ( $\lambda_{max}$ . 218 m $\mu$ ;  $\epsilon = 12,000$ ).

En chauffant les acides mycoliques de *M. phlei* et de *M. smegmatis*, avec de l'anhydride acétique en présence de  $SO_4HK$  fondu, pendant 6 heures, on obtient des *acides bis-anhydro-mycoliques*  $C_{83}H_{162}O_2 \pm 5CH_2$  (VIII) ayant le même spectre d'absorption que les acides mono-anhydro-mycoliques; la deuxième double liaison n'est donc pas en conjugaison avec la première. A première vue nous serions tenté d'en conclure que le deuxième OH des acides mycoliques se trouve au delà du carbone 5; or dans le cas de l'acide  $\alpha$ -mycolique de la souche "Brévannes", AEBI, VILKAS ET LEDERER<sup>6</sup>, ont



montré que la position des hydroxyles en 3,5 est probable; ils ont obtenu un *acide bis-anhydro-mycolique*, ayant également un maximum à 218 m $\mu$  avec une seule double liaison en conjugaison avec le carboxyle. Dans ce cas, il faut admettre la formation d'une double liaison en 5,6 à partir de l'hydroxyle situé en 5, à moins qu'il y ait eu une transposition au cours de la déshydratation, conduisant à l'acide bis-anhydro-mycolique.

L'oxydation chromique des acides mycoliques donne des *dicétones neutres*  $C_{82}H_{162}O_2 \pm 5CH_2$  (IX) qui donnent elles-mêmes des dioximes  $C_{82}H_{164}O_2N_2 \pm 5CH_2$ ; l'obtention de ces dicétones (IX) prouve que *les deux hydroxyles des acides mycoliques sont secondaires*. Ces dicétones sont très stables à l'ébullition en présence de KOH et ne seraient donc pas des  $\beta$ -dicétones. Pour la dicétone obtenue à partir de l'acide  $\alpha$ -phlei-mycolique, nous avons vérifié par le spectre infra-rouge l'absence d'hydroxyle; les bandes à 5.75 et 5.82  $\mu$  correspondent à la présence de deux carbonyles.

Les acides phlei- et smegma-mycoliques, ne sont pas scindés par l'acide périodique; leurs deux hydroxyles ne forment donc pas un 1,2-glycol.

*Conclusions.* Les acides phlei- et smegma-mycoliques ont la structure (I = IV); un des hydroxyles est en 3, le deuxième est sur le carbone 5 ou au delà; le radical  $C_{58}H_{116}$  est saturé et porte encore au moins une ramification.

Quelles pourraient être les différences chimiques entre les 5 acides mycoliques décrits ici?

1. Un nombre d'atomes de carbone légèrement différent; ce cas nous paraît peu probable: la séparation chromatographique des acides  $\alpha$  et  $\beta$  serait alors pratiquement impossible.

2. En admettant que tous les acides aient le même nombre d'atomes de carbone, on peut prévoir des positions différentes des hydroxyles, ou des chaînes latérales, ou encore des configurations stériques différentes. Les 5 acides étudiés sont tous dextrogyres ( $[\alpha]_D = +5.5^\circ \pm 0.5^\circ$ ); la configuration des substituants en  $\alpha$  et  $\beta$  doit donc être identique; des différences stériques concernant des centres asymétriques éloignés du carboxyle ne changeraient que très peu la valeur de la rotation spécifique et seraient certainement suffisantes pour permettre la séparation chromatographique des acides  $\alpha$  et  $\beta$ .

Les Tableaux I et II indiquent les points de fusion et les résultats d'analyses des 5 acides mycoliques et de leurs dérivés; on notera que dans les séries  $\alpha$ - et  $\beta$  les points de fusion sont pratiquement identiques; les acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -smegma-mycoliques et leurs dérivés, fondent plus haut que les acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -phlei-mycoliques; les points de fusion les plus élevés se trouvent dans la série  $\gamma$ -smegma-mycolique\*, ce qui coïncide avec la solubilité très faible de cet acide.

Le fait que nous n'ayons pu retrouver les acides phlei-mycoliques précédemment

TABLEAU I  
ACIDES PHEI-MYCOLIQUES ET DÉRIVÉS

Composés	Calculé		Trouvé en série $\alpha$		F	Trouvé en série $\beta$		F
	C%	H%	C%	H%		C%	H%	
Acide $C_{83}H_{166}O_4$ (IV) $OCH_3$ (C)— $CH_3$	81.16	13.62	81.30 o	13.47	55°	80.97 o	13.52	55°
	1.23		2.92					
Ester méthylique (V) $C_{84}H_{168}O_4$ (O)— $CH_3$	81.21	13.63	81.20	13.36	45°	81.22	13.45	45°
	1.20		1.39					
Alcool $C_{83}H_{168}O_3$ (VI)	82.09	13.94	82.28	14.20	53°	82.39	13.93	53°
Acide mono-anhydro-mycolique (VII) $C_{83}H_{164}O_3$	82.37	13.66	82.28	13.78	53°	82.68	13.73	53°
Ester méthylique de l'acide bis-anhydro-mycolique $C_{84}H_{164}O_2$	83.64	13.70	83.56	13.76	50°			
Cétone neutre (IX) $C_{82}H_{162}O_2$	83.38	13.82	83.07	13.72	72°			
Acide de pyrolyse $C_{24}H_{48}O_2$	78.19	13.13	78.23	12.93	80°	78.52	13.38	80°

\* à l'exception de l'ester méthylique (V) et de la cétone (IX).

TABLEAU II  
 ACIDES SMEGMA-MYCOLIQUES ET DÉRIVÉS

Composés	Calculé		Trouvé en série $\alpha$		F	Trouvé en série $\beta$		F	Trouvé en série $\gamma$		F
	C%	H%	C%	H%		C%	H%		C%	H%	
Acide $C_{83}H_{166}O_4$ (IV) (O)CH <sub>3</sub> 3(C)CH <sub>3</sub>	81.16	13.62	81.00	13.36	61°	81.27	13.39	61°	81.23	13.86	70°
			0%			0%			0%		
		3.67%		3.14%			2.96%			2.70%	
Ester $C_{84}H_{168}O_4$ (V) (O)CH <sub>3</sub>	81.21	13.63	81.66	13.45	53°	81.49	13.60	53°	81.53	13.63	48°
		1.20%		1.24%			1.19%			1.16%	
Alcool $C_{83}H_{166}O_3$ (VI)	82.09	13.94	82.20	13.51	53°				82.35	13.41	55°
Cétone $C_{82}H_{162}O_2$ (IX)	83.38	13.82	83.77	14.06	69°				83.28	13.75	64°
Dioxime de la cétone $C_{82}H_{164}O_2N_2$	N: 2.31		2.16		53°						
Acide mono-anhydro- mycolique (VII) $C_{83}H_{164}O_3$	82.37	13.66	82.04	13.67	49°						
			$\epsilon = 13,580$ à 220 m $\mu$								
Ester bis-anhydro mycolique $C_{84}H_{164}O_2$	83.64	13.70	83.77	13.58	37°				83.58	13.65	45°
			(acide) $\epsilon = 13,200$ à 220 m $\mu$						$\epsilon = 13,000$ à 220 m $\mu$		
Acide de pyrolyse $C_{24}H_{48}O_2$	78.19	13.13	78.27	13.17	80°	78.32	13.13	80°	78.11	13.01	80°

décrits par PECK ET ANDERSON<sup>2</sup> peut provenir d'une différence importante entre le métabolisme des deux souches. Nous n'avons pas non plus retrouvé dans les lipides de notre souche de *M. phlei* les alcools secondaires: D-eicosanol-2, et D-octadécanol-2, isolés de *M. phlei* par PANGBORN ET ANDERSON<sup>8\*</sup>.

#### Acide $\alpha$ -smegma-mycolique

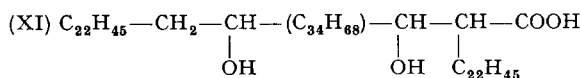
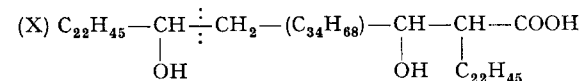
L'ozonisation de l'acide bis-anhydro- $\alpha$ -smegma-mycolique (VIII) a donné un mélange d'acides à partir duquel nous avons isolé environ 1.6 mol d'acide tricosanoïque normal. Nous avons identifié cet acide par son point de fusion, F. 78–80°, par son analyse élémentaire, par le titrage, et surtout par l'analyse aux rayons X (distance réticulaire, 51.0 Å). Une première molécule d'acide tricosanoïque doit se former à partir de la structure (VII) par oxydation de l'acide  $\alpha$ -céto-tétracosanoïque formé tout d'abord<sup>\*\*</sup>.

Le fait que l'ozonisation produit plus d'une molécule d'acide tricosanoïque, peut être expliqué en attribuant à l'acide  $\alpha$ -smegma-mycolique l'une ou l'autre des deux structures (X) et (XI).

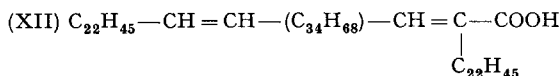
\* Pour plus de détails, voir<sup>9</sup>. PENSO<sup>14,15</sup> distingue plusieurs souches différentes de *M. phlei*.

\*\* L'ozonisation des acides anhydro-mycoliques de souches humaines et bovines ayant la structure  $R-CH=C-COOH$  donne l'acide pentacosanoïque<sup>3,4,6</sup>.



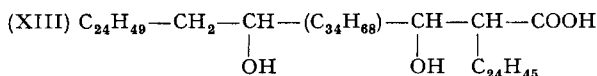


Elles peuvent toutes deux conduire à l'acide bis-anhydro-mycolique (XII):



Cependant, l'existence d'un corps de structure X est peu probable, car il serait dérivé d'un acide tricosanoïque (suivant la ligne pointillée); or, l'acide tricosanoïque ne semble pas exister dans *M. smegmatis*, puisque nous avons isolé d'emblée l'acide tétracosanoïque à l'état pur (voir ci-dessous).

La structure XI est très voisine de celle de l'acide  $\alpha_2$ -mycolique de la souche humaine R<sub>1</sub> (XIII) isolé par ASSELINEAU<sup>5</sup>:



#### Isolément de l'acide tétracosanoïque

Nous nous sommes demandés pourquoi la chaîne latérale en  $\alpha$ , des acides phlei- et

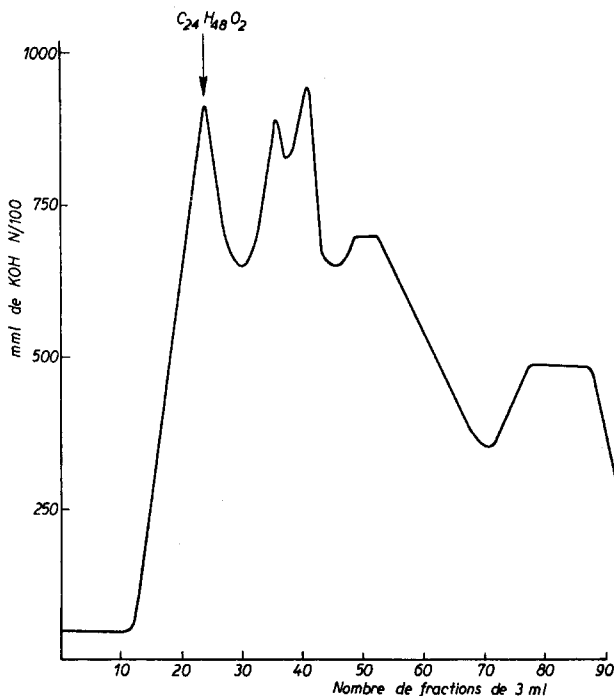


Fig. 3. Chromatographie des acides gras saturés de *M. phlei* sur acide silicique d'après RAMSEY ET PATTERSON<sup>13</sup>; isolement d'acide tétracosanoïque.

smegma-mycoliques est plus courte que celle des acides mycoliques isolés de *M. tuberculosis*. Ceci pourrait s'expliquer en admettant que *M. phlei* et *M. smegmatis* sont incapables de synthétiser l'acide hexacosanoïque, et que l'acide tétracosanoïque est le dernier terme de la série des acides gras normaux saturés que cet organisme soit capable de synthétiser\*. Pour vérifier cette hypothèse nous avons recherché dans les graisses de *M. phlei* et de *M. smegmatis* la présence des acides  $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$  et  $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}_2$ .

RAMSEY ET PATTERSON<sup>13</sup> ont décrit une méthode de chromatographie d'acides gras de  $\text{C}_{12}$  à  $\text{C}_{19}$  sur colonne d'acide silicique imbibé de 2-amino-pyridine. Les acides gras sont élués les uns après les autres, suivant la longueur de leur chaîne, l'acide le plus long sortant avec les premières fractions éluées.

En chromatographiant d'après

\* Pour des détails sur des hypothèses concernant la biosynthèse des acides mycoliques voir<sup>4</sup>.

RAMSEY ET PATTERSON<sup>13</sup> les acides gras saturés de *M. phlei* et de *M. smegmatis* nous avons dans chaque cas isolé l'acide tétracosanoïque F. 80°, identifié par l'analyse élémentaire, et le spectre de diffraction des rayons X, (distance réticulaire 52.7 Å) (Fig. 3). Ces essais semblent exclure la présence d'acide hexacosanoïque, car celui-ci aurait été élué le premier.

On peut en conclure qu'effectivement, *M. phlei* et *M. smegmatis* ne produisent pas d'acide hexacosanoïque, mais seulement l'acide tétracosanoïque. On comprend dès lors que les chaînes latérales des acides mycoliques de ces souches, doivent être plus courtes que celles des souches de *M. tuberculosis*, capables de synthétiser l'acide hexacosanoïque.

Nous remercions la "Fondation WAKSMAN pour le Développement des Etudes Microbiologiques en France" pour des subventions, et Monsieur J. TRÉFOUËL, Directeur de l'Institut Pasteur et le Dr. J. BRETEY, Chef du Service de la Tuberculose à cet Institut pour les cultures microbiennes.

#### DESCRIPTION DES EXPÉRIENCES

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

Les cires D de *M. phlei*\*, extraites trois fois à l'acétone bouillante, débarrassées des traces de bacilles par passage sur filtre de Seitz, se présentent sous forme d'une masse dure, brune, F. 45° (1.4 % du poids sec des bacilles),  $[\alpha]_D^{20} = +26^\circ \pm 10\%$  (dans le chloroforme,  $c = 4.0$  d = 2). Indice de saponification: 67. Indice d'iode: 49.

Elles ne contiennent pas de phosphore et seulement des traces d'azote, (moins de 0.05 %). Les hydrolysats concentrés n'ont jamais montré de réaction positive à la ninhydrine. La chromatographie sur colonne d'alumine ne donne qu'une fraction s'éluant avec l'éther de pétrole + benzène 20 % et fondant à 45°.

La saponification pendant trois heures par la potasse méthanolique à 5 % (avec 30 % de benzène) libère 65 % d'acides gras, principalement constitués d'acides mycoliques, 4 % d'un insaponifiable visqueux et environ 30 % d'hydrosoluble.

Les acides bruts sont extraits à l'éther après acidification et reprecipités une fois de l'acétone bouillante.

Les acides mycoliques bruts sont estérifiés par une solution de diazométhane. On dissout les acides dans l'éther et on ajoute un excès de solution de diazométhane dans l'éther. On abandonne une nuit, on concentre, et on précipite par le méthanol. La séparation des esters est effectuée par chromatographie sur colonne d'alumine:

1 g d'esters a été chromatographié sur une colonne de 26 g d'alumine neutralisée, d'activité I. Nous avons élué par des fractions de 150 ml.

1. éther de pétrole		0 mg	
2. éther de pétrole/benzène	9:1	0 mg	
3. éther de pétrole/benzène	4:1	0 mg	
4. éther de pétrole/benzène	2:1	0 mg	
5. éther de pétrole/benzène	1.5:1	0 mg	
6. éther de pétrole/benzène	1:1	0 mg	
7. benzène		0 mg	
8. benzène/éther	9:1	220 mg	64.2 % F. 43°
9. benzène/éther	4:1	315 mg	
10. benzène/éther	2:1	107 mg	
11. benzène/éther	1.5:1	28 mg	
12. benzène/éther	1:1	12 mg	24.3 % F. 43°
13. éther		145 mg	
14. éther		98 mg	
15. éther		14 mg	
Total:		939 mg	

Nous avons montré que les fractions 8, 9, 10 d'une part, (ester  $\alpha$ -phlei-mycolique) et les fractions 13, 14 d'autre part, (ester  $\beta$ -phlei-mycolique) étaient différentes, en utilisant la série suivante de chromatographies sur colonnes d'alumine.

Nous avons choisi trois colonnes de mêmes dimensions, et les avons chacune remplies avec 6 g de la même alumine neutralisée, d'activité I (fractions d'élution de 60 ml). Sur la première colonne, nous avons chromatographié 200 mg d'un mélange comprenant 100 mg d'ester  $\alpha$ -phlei-mycolique

\* Souche de l'Institut Pasteur cultivée 4 semaines sur milieu de Sauton.



et 100 mg d'ester  $\beta$ -phlei-mycolique. Sur la seconde colonne, nous avons chromatographié 200 mg d'ester  $\alpha$ -phlei-mycolique, et sur la troisième, 200 mg d'ester  $\beta$ -phlei-mycolique. Nous avons obtenu les résultats suivants (v. Figs. 1 et 2):

1. benzène		0 mg	0 mg	0 mg
2. benzène/éther 9:1		30 mg	48 mg	0 mg
3. benzène/éther 4:1		58 mg	97 mg	0 mg
4. benzène/éther 2:1		11 mg	26 mg	0 mg
5. benzène/éther 1,5:1		14 mg	18 mg	12 mg
6. benzène/éther 1:1		31 mg	5 mg	45 mg
7. éther		38 mg	traces	118 mg
8. éther/méthanol 1 %		12 mg	0 mg	22 mg
9. éther/méthanol 2 %		traces	0 mg	traces
Total:		194 mg	194 mg	197 mg

#### Acide $\alpha$ -phlei-mycolique

L'acide  $\alpha$ -phlei-mycolique a été obtenu par saponification de l'ester méthylique par la potasse méthanolique à 5 % en présence de benzène, durant trois heures. On acidifie par HCl, extrait à l'éther et précipite l'acide de la solution étherée concentrée par l'acétone. F. 53-55°.  $[\alpha]_D^{20} = +5.4 \pm 10\%$  (dans le chloroforme  $c = 3.5$ ,  $d = 2$ )<sup>\*</sup>.

L'ester  $\alpha$ -phlei-mycolique obtenu directement lors de la chromatographie du mélange d'esters  $\alpha$  et  $\beta$  fond à 43-45°.

L'alcool  $\alpha$ -phlei-mycolique a été préparé par action de l'hydrure double de lithium et d'aluminium (en excès, en suspension dans l'éther anhydre) sur l'acide également en solution dans l'éther anhydre. Après une nuit de contact à la température ambiante, on verse sur de la glace pilée et extrait à l'éther. Le produit ainsi obtenu est purifié par chromatographie sur alumine. L'alcool  $\alpha$ -phlei-mycolique fond à 53°.

L'acide mono-anhydro- $\alpha$ -phlei-mycolique est obtenu par chauffage de l'acide, au reflux de l'anhydride acétique, (50 ml d'anhydride pour 500 mg d'acide) en présence de 3 g de  $\text{SO}_4\text{HK}$  récemment fondu et pulvérisé. On chauffe ainsi une heure; après avoir hydrolysé l'anhydride acétique par l'eau, on extrait à l'éther et la substance récupérée est chauffée avec une solution de potasse méthanolique à 5 % en présence de 30 % de benzène, afin de saponifier les acétates pouvant s'être formés. Après deux heures de saponification, on acidifie par HCl, extrait par l'éther, et chromatographie la substance récupérée sur colonne d'alumine. Le rendement en produit pur (F. 50-53°,  $\lambda_{\text{max}}$  à 218  $\mu$ ,  $\epsilon = 11,340$  dans l'hexane) est d'environ 55 %.

Un essai d'acétylation a également conduit à l'acide mono-anhydro-mycolique:

100 mg d'acide sont dissous dans 1 ml de benzène anhydre; on ajoute 0.6 ml de pyridine anhydre, puis 0.2 ml de chlorure d'acétyle dans 0.5 ml de pyridine anhydre. On abandonne une nuit. Après hydrolyse et extraction à l'éther, le dérivé est chromatographié sur alumine. La fraction principale passe avec du benzène contenant 10 % d'éther, (sur alumine neutre d'activité II). Cette substance possède le maximum à 218  $\mu$  caractéristique des acides  $\alpha,\beta$ -insaturés; ( $\epsilon = 11,250$ ); F. 50-53°. L'analyse a montré qu'il s'agissait bien de l'acide mono-anhydro-mycolique.

L'acide bis-anhydro- $\alpha$ -phlei-mycolique a été préparé par une méthode analogue à celle décrite ci-dessus pour la préparation de l'acide mono-anhydro-mycolique, mais en prolongeant pendant six heures le temps de chauffage dans l'anhydride acétique. Après une saponification comme ci-dessus, le produit extrait à l'éther est esterifié par un excès de diazométhane en solution dans l'éther (on abandonne une nuit). La chromatographie sur colonne d'alumine permet de séparer facilement l'ester bis-anhydro-mycolique des autres produits de la réaction; il s'élue par l'éther de pétrole et un mélange d'éther de pétrole/benzène 9:1. Cet ester fond à 50° et présente à 218  $\mu$  le maximum caractéristique des acides  $\alpha,\beta$ -insaturés; ( $\epsilon = 11,450$  dans l'hexane); voir l'analyse élémentaire Tableau I. La saponification par la potasse méthanolique à 5 % pendant deux heures, en présence de 30 % de benzène, libère l'acide qui est extrait à l'éther après acidification par HCl. F. 52-54°.

L'oxydation chromique de l'acide  $\alpha$ -phlei-mycolique conduit à une dicétone neutre. 200 mg d'acide sont dissous dans 15 ml de benzène anhydre, et on ajoute une solution de 38 mg de  $\text{CrO}_3$  dans 5 ml d'acide acétique, (préalablement distillé sur  $\text{CrO}_3$ ). On laisse ainsi une nuit à 37°. Après addition de 5 ml d'éthanol, on ajoute de l'eau et extrait à l'éther. On purifie par passage sur colonne d'alumine; (3 g d'alumine neutre d'activité I, pour 110 mg de substance; fractions de 30 ml).

1. tétrachlorure de carbone		42 mg	} F. 72°*.
2. tétrachlorure de carbone/benzène 9:1		34 mg	
3. tétrachlorure de carbone/benzène 4:1		8 mg	
4. tétrachlorure de carbone/benzène 2:1		11 mg	
5. tétrachlorure de carbone/benzène 1,5:1		5 mg	
6. tétrachlorure de carbone/benzène 1:1		6 mg	
7. benzène		traces	

\* Pour les analyses élémentaires, voir Tableau I.

(Nous avons utilisé le tétrachlorure de carbone à cause de la très faible solubilité de la dicétone dans l'éther de pétrole.)

La pyrolyse de l'acide  $\alpha$ -phlei-mycolique, effectuée à 300° sous 0.01 mm libère environ 25 % d'acide n-tétracosanoïque, F. 80°, identifié par son analyse élémentaire et son spectre de diffraction des rayons X (distance réticulaire d'un acide authentique et de notre acide de pyrolyse: 52.7 Å).

#### Acide $\beta$ -phlei-mycolique

L'acide  $\beta$ -phlei-mycolique a été obtenu par saponification de l'ester méthylique par la potasse méthanolique à 5 %. Cet acide fond à 55°;  $[\alpha]_D^{20} = +5.4^\circ \pm 10\%$  (dans le chloroforme  $c = 4.0$  d = 2). L'équivalent moléculaire déterminé par titrage est de 1227 (moyenne de trois mesures: 1261, 1240, 1180), calculé pour  $C_{83}H_{166}O_4$ : 1226.

L'ester méthylique directement obtenu après la séparation chromatographique du mélange d'esters  $\alpha$  et  $\beta$  fond à 45°.

Les dérivés de l'acide  $\beta$ -phlei-mycolique ont été préparés d'après les méthodes déjà décrites pour les dérivés correspondants de l'acide  $\alpha$ . Les points de fusion et les résultats des analyses sont consignés dans le Tableau I.

#### Isolement de l'acide tétracosanoïque normal à partir des graisses de *M. phlei*

Les acides saturés isolés des graisses de *M. phlei* après saponification ont été distillés dans un tube à boules et la fraction distillant au-dessus de 165° sous 0.01 mm a été chromatographiée sur colonne d'acide silicique selon RAMSEY ET PATTERSON<sup>13</sup>. (La colonne est auparavant imprégnée d'un mélange d'alcool furfurylique et d' $\alpha$ -amino-pyridine; on élue par l'hexane saturé par ce mélange). Le diagramme de cette séparation est représenté sur la Fig. 3. Les acides élués ont été débarrassés des impuretés par passage aux sels de plomb. L'acide gras obtenu par décomposition de ces sels fondait à 80°. La détermination de l'équivalent moléculaire par titrage donne 360 (calculé pour  $C_{24}H_{48}O_2$ : 368).

Les points de fusion de mélange avec l'acide de pyrolyse d'une part, avec un acide tétracosanoïque de synthèse d'autre part, n'ont pas offert de dépression (F. 80°). L'analyse élémentaire et le spectre de diffraction des rayons X (distance réticulaire: 52.7 Å) montrent que cet acide est bien l'acide tétracosanoïque normal.

Analyse élémentaire: trouvé:	C 78.23 %	H 12.94 %
Calculé pour $C_{24}H_{48}O_2$ :	C 78.19 %	H 13.13 %

#### Isolement des acides smegma-mycoliques

Nous avons obtenu ces acides par saponification des cires C et D de *M. smegmatis*\*.

Les acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -smegma-mycoliques ont été séparés par chromatographie sur colonne d'alumine de leurs esters méthyliques. Ces esters ont été préparés par action d'une solution de diazométhane sur la fraction acide brute obtenue lors de la saponification.

1 g d'esters méthyliques a été chromatographié sur une colonne de 30 g d'alumine d'activité I; élution par des fractions de 150 ml.

1. éther de pétrole		0 mg	
2. éther de pétrole/benzène	9:1	0 mg	
3. éther de pétrole/benzène	4:1	0 mg	
4. éther de pétrole/benzène	2:1	0 mg	
5. éther de pétrole/benzène	1.5:1	0 mg	
6. éther de pétrole/benzène	1:1	0 mg	
7. benzène		0 mg	
8. benzène/éther	9:1	125 mg	} $\alpha$ -smegma-mycolate de méthyle F. 53°
9. benzène/éther	4:1	642 mg	
10. benzène/éther	2:1	86 mg	
11. benzène/éther	1.5:1	12 mg	} $\beta$ -smegma-mycolate de méthyle F. 53°
12. benzène/éther	1:1	7 mg	
13. éther		88 mg	
14. éther		11 mg	
Total:		971 mg	

Les  $\alpha$ - et  $\beta$ -smegma-mycolates de méthyle ainsi obtenus ont été chromatographiés une seconde fois séparément. L'ester  $\alpha$  passe de nouveau avec la fraction 9 et l'ester  $\beta$  avec la fraction 13. Ces deux substances fondent à 53°; elles se présentent sous forme d'une poudre incolore, microcristalline et sont solubles dans la plupart des solvants organiques usuels, à l'exception de l'alcool méthylique, de l'alcool éthylique et de l'acétone, dans lesquels elles ne sont solubles qu'à chaud.

\* No. 8152, National Collection of Type Cultures, London, cultivé 4 semaines sur milieu de Sauton.

La saponification de la cire D fournit environ 13 % d'une fraction peu soluble dans l'éther et se rassemblant à l'interphase eau-éther. Nous avons donné à cet acide le nom d'*acide  $\gamma$ -smegma-mycolique*.

L'acide  $\gamma$ -smegma-mycolique est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine de l'ester méthylque. Cet ester se prépare en faisant agir une solution de diazométhane sur une suspension de l'acide dans l'éther; au fur et à mesure que l'estérification se produit, il y a dissolution; après une nuit de contact, tout est dissous.

600 mg d'ester  $\gamma$ -smegma-mycolique ont été chromatographiés sur une colonne de 18 g d'alumine neutralisée d'activité I; élution par des fractions de 110 ml.

1. éther de pétrole		0 mg
2. éther de pétrole/benzène	9:1	0 mg
3. éther de pétrole/benzène	4:1	0 mg
4. éther de pétrole/benzène	2:1	0 mg
5. éther de pétrole/benzène	1.5:1	0 mg
6. éther de pétrole/benzène	1:1	0 mg
7. benzène		0 mg
8. benzène/éther	9:1	0 mg
9. benzène/éther	4:1	56 mg
10. benzène/éther	2:1	81 mg
11. benzène/éther	1.5:1	153 mg
12. benzène/éther	1:1	182 mg
13. éther		96 mg
14. éther		27 mg

Total: 595 mg

L'ester  $\gamma$ -smegma-mycolique fond à 45–48°. Il se présente sous forme d'une poudre incolore.

Les dérivés des acides  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -smegma-mycoliques ont été préparés d'après les méthodes déjà décrites pour les dérivés correspondants de l'acide  $\alpha$ -phlei-mycolique; les points de fusion et les résultats des analyses sont consignés dans le Tableau II.

#### Constitution de l'acide $\alpha$ -smegma-mycolique

##### Ozonisation de l'acide bis-anhydro- $\alpha$ -smegma-mycolique

430 mg d'acide bis-anhydro- $\alpha$ -smegma-mycolique, en solution dans 20 ml de tétrachlorure de carbone, ont été soumis durant six heures à un barbotage d'ozone, la température étant maintenue à 0° par un bain de glace. L'ozonide formé est ensuite extrait avec 5 ml d'éther et décomposé par un chauffage prolongé (4 heures) avec 10 ml d'eau. Après extraction par deux fois 5 ml d'éther, on lave les parties éthersolubles réunies, par une solution à 3 % de potasse, afin d'isoler les fractions acides. Nous avons ainsi obtenu 220 mg d'acides et environ 200 mg de neutres.

L'acide  $C_{23}H_{46}O_2$  a été isolé des fractions acides par chromatographie sur colonne d'acide silicique selon la méthode de RAMSEY ET PATTERSON<sup>13</sup>. Les éluats correspondant au premier maximum ont été recueillis séparément; l'acide gras récupéré après acidification par HCl et extraction à l'éther est difficile à purifier par distillation ou par cristallisation. Nous avons obtenu l'acide pur par passage préalable aux sels de plomb, cristallisation de ces derniers dans l'alcool et récupération après acidification par  $NO_3H$  dilué. Nous avons obtenu 155 mg d'acide brut, c'est-à-dire plus d'une molécule d'acide  $C_{23}H_{46}O_2$  à partir de 220 mg de fraction acide provenant de l'ozonolyse. (Théorie pour une molécule d'acide tricosanoïque: 124.7 mg; pour deux molécules: 249.4 mg.)

Analyse élémentaire: trouvé:	C 77.85 %	H 12.91 %
Calculé pour $C_{23}H_{46}O_2$ :	77.90	13.08

Cet acide a également été identifié par son spectre de diffraction des rayons X (distance réticulaire 51.0 Å) ainsi que par des titrages, effectués parallèlement sur l'acide d'ozonolyse, l'acide palmitique, l'acide béhénique et l'acide tétracosanoïque (pour plus de détails voir<sup>9</sup>).

##### Isolément de l'acide tétracosanoïque à partir des graisses de *M. smegmatis*

La technique de l'isolément a été décrite ci-dessus. L'acide, F. 80°, a été identifié par son spectre de diffraction des rayons X (distance réticulaire 52.7 Å) ainsi que par son analyse élémentaire:

Trouvé:	C 78.11 %	H 13.01 %
Calculé pour $C_{24}H_{48}O_2$ :	78.19	13.13

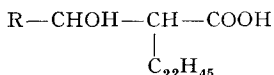
Les microanalyses de ce travail ont été effectuées dans le laboratoire microanalytique de la Ciba à Bâle (direction Dr. H. GYSEL).

## RÉSUMÉ

La souche de *Mycobacterium phlei* que nous avons étudiée contient deux acides mycoliques dextrogyres, F. 55°, que nous appelons acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -phlei-mycoliques; seules la chromatographie sur alumine et la spectrographie infrarouge permettent de les distinguer. Ces deux acides sont dépourvus de méthoxyle et correspondent à la formule brute  $C_{83}H_{166}O_4 \pm 5CH_2$ .

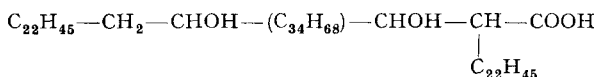
La souche de *M. smegmatis* que nous avons étudiée contient trois acides smegma-mycoliques ( $\alpha$ : F. 61°,  $\beta$ : F. 61° et  $\gamma$ : F. 70°); ces acides sont également dextrogyres, dépourvus de méthoxyle et correspondent à la formule brute  $C_{83}H_{166}O_4 \pm 5CH_2$ .

Les cinq acides mycoliques décrits ici donnent à la pyrolyse de l'acide tétracosanoïque et ont la formule partielle



où R est un reste  $C_{58}H_{117}O$  aliphatique hydroxylé, comportant au moins deux chaînes.

Nous proposons pour l'acide  $\alpha$ -smegma-mycolique la formule partielle



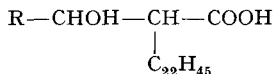
Contrairement aux souches humaines et bovines de *M. tuberculosis*, les deux souches saprophytes examinées ici semblent incapables de synthétiser l'acide hexacosanoïque; dans ces souches c'est l'acide tétracosanoïque qui est le terme le plus élevé de la série des acides gras normaux. Nous pensons que ceci explique pourquoi les acides mycoliques des souches saprophytes ont une chaîne latérale  $C_{22}H_{45}$  en  $\alpha$  du carboxyle, tandis que les acides mycoliques de *M. tuberculosis* ont une chaîne latérale correspondante  $C_{24}H_{49}$ .

## SUMMARY

The strain of *Mycobacterium phlei* that has been studied contains two dextrorotatory mycolic acids which are called  $\alpha$ - and  $\beta$ -phlei-mycolic acids. They can only be distinguished by chromatography on alumina and infrared spectrography. The two acids contain no methoxyl and correspond to the molecular formula  $C_{83}H_{166}O_4 \pm 5CH_2$ .

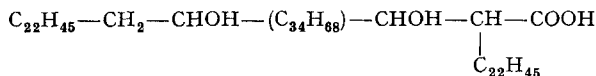
The strain of *M. smegmatis* that has been studied contains three smegma-mycolic acids ( $\alpha$ : m.p. 61°,  $\beta$ : m.p. 61°, and  $\gamma$ : m.p. 70°); these acids are also dextrorotatory, contain no methoxyl and correspond to the molecular formula  $C_{83}H_{166}O_4 \pm 5CH_2$ .

The five mycolic acids described here yield tetracosanoic acid on pyrolysis and have the structural formula



where R is an aliphatic hydroxyl-containing residue  $C_{58}H_{117}O$  having at least two chains.

The structural formula proposed for  $\alpha$ -smegma-mycolic acid is



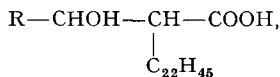
In contrast to the human and bovine strains of *M. tuberculosis*, the two saprophyte strains examined here seem incapable of synthesizing hexacosanoic acid; in these strains tetracosanoic acid is the highest member of the series of normal fatty acids. We think that this explains why the mycolic acids from saprophyte strains have a side chain  $C_{22}H_{45}$  in the  $\alpha$ -position of the carboxyl group, while mycolic acids from *M. tuberculosis* have a corresponding side chain  $C_{24}H_{49}$ .

## ZUSAMMENFASSUNG

Der Stamm von *Mycobacterium phlei*, welchen wir untersucht haben, enthält zwei rechtsdrehende Mykolsäuren, die wir  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phlei-Mykolsäuren nennen; diese Säuren können lediglich durch Chromatographie an Aluminiumoxyd und durch Infrarotspektrographie unterschieden werden. Die beiden Säuren enthalten kein Methoxyl und entsprechen der Bruttoformel  $C_{83}H_{166}O_4 \pm 5CH_2$ .

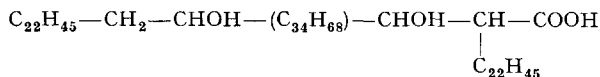
Der Stamm von *M. smegmatis*, den wir untersucht haben, enthält drei Smegma-Mykolsäuren; ( $\alpha$ : F. 61°,  $\beta$ : F. 61° und  $\gamma$ : F. 70°); diese Säuren sind ebenfalls rechtsdrehend, enthalten kein Methoxyl und entsprechen der Bruttoformel  $C_{83}H_{166}O_4 \pm 5CH_2$ .

Die fünf hier beschriebenen Mykolsäuren geben bei der Pyrolyse Tetracosansäure und haben die partielle Formel



wo R ein aliphatischer hydroxyl-haltiger Rest  $\text{C}_{68}\text{H}_{117}\text{O}$  ist, der mindestens zwei Ketten enthält.

Wir schlagen für die  $\alpha$ -Smegma-Mykolsäure die folgende partielle Formel vor:



Im Gegensatz zu den bei Mensch und Rind vorkommenden Stämmen von *M. tuberculosis*, scheinen die hier untersuchten zwei saprophytischen Stämme Hexacosansäure nicht synthetisieren zu können; bei diesen Stämmen ist die Tetracosansäure das höchste Glied der Reihe der normalen Fettsäuren. Dies erklärt unserer Ansicht nach warum die Mykolsäuren der saprophytischen Stämme in  $\alpha$ -Stellung zum Carboxyl eine Seitenkette  $\text{C}_{22}\text{H}_{45}$  haben, während die Mykolsäuren von *M. tuberculosis* eine Seitenkette  $\text{C}_{24}\text{H}_{49}$  enthalten.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. ASSELINEAU, *Compt. rend.*, 237 (1953) 1804.
- <sup>2</sup> R. L. PECK ET R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) 89.
- <sup>3</sup> J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 126.
- <sup>4</sup> J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe*, 10 (1953) 170.
- <sup>5</sup> J. ASSELINEAU, *Bull. soc. chim. France*, (1953) 427.
- <sup>6</sup> A. AEBI, E. VILKAS ET E. LEDERER, *Bull. soc. chim. France*, (1954) 79.
- <sup>7</sup> L. G. GINGER, *J. Biol. Chem.*, 156 (1944) 453.
- <sup>8</sup> M. C. PANGBORN ET R. J. ANDERSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 58 (1936) 10.
- <sup>9</sup> M. BARBIER, Thèse de Doctorat d'Université, Paris 1954.
- <sup>10</sup> A. LESUK ET R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 136 (1940) 603.
- <sup>11</sup> M. BARBIER ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 330.
- <sup>12</sup> M. BARBIER ET E. LEDERER, *Riassunti 6. Congresso Intern. Microbiologia*, Roma, 1 (1953) 87.
- <sup>13</sup> C. C. RAMSEY ET W. I. PATTERSON, *J. Assoc. Off. Agric. Chemists*, 31 (1948) 441.
- <sup>14</sup> G. PENSO, *Les bacilles paratuberculeux in Les bacilles tuberculeux*; Masson et Cie, Paris 1950.
- <sup>15</sup> G. PENSO, V. ORTALI, A. GAUDIANO, M. PRINCIVALLE, L. VELLA ET A. ZAMPIERI: Studi e ricerche sui micobatteri, VII. - Il Mycobacterium phlei. - *Rendiconti Ist. Sup. Sanità*, 14 (1951) 856.

Reçu le 17 février 1954