

# EXPERIENTIA

Vol. VII - Fasc. 8

Pag. 281-320

15. VIII. 1951

## Recherches récentes sur la chimie des lipides du bacille tuberculeux<sup>1</sup>

Par JEAN ASSELINÉAU et EDGAR LEDERER, Paris<sup>2</sup>

Le bacille tuberculeux présente une teneur en lipides remarquablement élevée, puisqu'elle peut atteindre 30 à 40% de son poids sec. La constitution si particulière de ces lipides a fait l'objet de nombreux travaux, parmi lesquels ceux d'ANDERSON et de ses collaborateurs occupent une place fondamentale. D'excellentes revues d'ensemble sur la chimie des lipides du bacille tuberculeux ont déjà été publiées par ANDERSON<sup>3</sup> entre 1939 et 1943, et des revues plus générales par ROULET et BRENNER<sup>4</sup> en 1941 et par SEIBERT<sup>5</sup> en 1950.

ANDERSON a décrit en 1927 une méthode très utile de séparation de ces lipides en plusieurs groupes bien distincts<sup>6</sup>: graisses solubles dans l'acétone, fraction phosphatidique (insoluble dans l'acétone), cires solubles dans le chloroforme et lipides liés.

1° *Graisses solubles dans l'acétone.* Dans cette fraction, il y a de 20 à 50% d'acides gras libres; le reste est constitué non de glycérides, mais d'esters d'acides gras avec le disaccharide *tréhalose*<sup>7</sup>. Nous parlerons plus tard des acides gras. Rappelons la présence dans ces graisses de petites quantités d'acides aromatiques (acides phényl-acétique, salicylique et anisique)<sup>8</sup>.

Les graisses de souches humaines et du BCG contiennent un pigment naphtoquinonique que FRANCIS et ses collaborateurs<sup>9</sup> ont isolé sous forme d'une huile jaune ressemblant à la vitamine K<sub>2</sub>. Il est probable que le *phthiocol*, point de fusion 174°C (méthyl-1,hydroxy-2-naphtoquinone,1,4), isolé par NEWMAN et ANDERSON<sup>10</sup> est un artefact formé par action de l'alcali sur le «précurseur» de FRANCIS et ses collaborateurs<sup>9</sup>. FIESER et ses collaborateurs<sup>11</sup> ont déjà émis cette hypothèse en

<sup>1</sup> D'après une conférence faite par E. LEDERER devant la Société Chimique de Zurich, le 22 novembre 1950, et la Société Chimique de Bâle, le 23 novembre 1950.

<sup>2</sup> Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris 5e.

<sup>3</sup> R. J. ANDERSON, Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe 3, 145 (1939); Harvey Lectures 271 (1939-1940); Chem. Rev. 29, 225 (1941); Yale J. Biol. Med. 15, 311 (1943).

<sup>4</sup> F. ROULET et M. BRENNER, Zentralbl. gesam. Tuberk. Forsch. 56, 193 (1941).

<sup>5</sup> F. B. SEIBERT, Ann. Rev. Microbiol. 4, 35 (1950).

<sup>6</sup> Le schéma de cette méthode a été exposé récemment par S. RAFFEL dans Exper. 6, 410 (1950).

<sup>7</sup> R. J. ANDERSON et M. S. NEWMAN, J. Biol. Chem. 101, 499 (1933).

<sup>8</sup> Voir J. ASSELINÉAU, Thèse Doctorat ès Sciences (Paris 1950).

<sup>9</sup> J. FRANCIS, J. MADINAVEITIA, H. M. MACTURK et G. A. SNOW, Nature 163, 365 (1949).

<sup>10</sup> R. J. ANDERSON et M. S. NEWMAN, J. Biol. Chem. 101, 773 (1933); 103, 197 (1933).

<sup>11</sup> L. F. FIESER, W. P. CAMPBELL et E. M. FRY, J. Amer. Chem. Soc. 61, 2206 (1939).

1939 et PARSHIN<sup>1</sup> a trouvé qu'il n'y a pas de phthiocol libre dans le bacille tuberculeux. Nous pouvons confirmer l'absence de phthiocol libre dans les graisses de souches humaines et du BCG.

2° *Fraction phosphatidique.* L'acétone à l'ébullition sépare cette fraction en une partie insoluble — les phosphatides vrais — et une partie soluble, dépourvue de phosphore, que nous appelons les *cires A*.

a) *Phosphatides.* Il est bien connu que la composition des bacilles varie avec celle du milieu de culture. Cette variation peut être très importante puisque des bacilles de souche humaine H-37, cultivés sur milieu de LONG où le glycérol a été remplacé par du dextrose, ne renferment pas de phosphatide<sup>2</sup>.

Les phosphatides ne constituent généralement que 0,5 à 1,5% du bacille et renferment de l'azote (environ 0,4%), principalement sous forme ammoniacale; aucune base azotée telle que choline ou colamine n'a pu être mise en évidence. D'ailleurs, certains auteurs (K. BLOCH<sup>3</sup>, BOISSEVAIN et RYDER<sup>4</sup>, MACHEBŒUF<sup>5</sup>, PANGBORN<sup>6</sup>) obtiennent après purification poussée de leurs échantillons, des préparations ne renfermant plus d'azote, ou seulement des traces. Dans la constitution des phosphatides entrent environ 60% d'acides gras, formant un mélange très complexe d'acides saturés, insaturés et ramifiés, où sont présents notamment les acides tuberculostéarique et phthioïque. Ces acides gras sont liés à des polyosides phosphorylés, renfermant du glycérol, du mannose et de l'inositol. Mais la composition de ces polyosides semble varier suivant les souches, de sorte qu'ANDERSON et ses collaborateurs<sup>7</sup> en concluent que «chaque lot de bacilles cultivé sur milieu artificiel, élabore des composés organo-phosphoriques différents». Récemment, ANDERSON et SÜTÖ-NAGY<sup>8</sup> ont isolé à partir de phosphatides de bacilles résiduaires de fabrication de tuberculine, des *acides*

<sup>1</sup> A. N. PARSHIN, Biokhimiya 11, 53 (1946).

<sup>2</sup> M. M. CREIGHTON, L. H. CHANG et R. J. ANDERSON, J. Biol. Chem. 154, 569 (1944).

<sup>3</sup> K. BLOCH, Z. physiol. Chem. 224, 1 (1936); Biochem. Z. 285, 372 (1936).

<sup>4</sup> C. H. BOISSEVAIN et C. T. RYDER, Amer. Rev. Tuberc. 24, 751 (1931).

<sup>5</sup> M. A. MACHEBŒUF et M. FAURE, C. r. Acad. Sci. 209, 700 (1939).

<sup>6</sup> M. C. PANGBORN, Discussions Faraday Soc. 6, 110 (1949).

<sup>7</sup> G. I. DE SÜTÖ-NAGY et R. J. ANDERSON, J. Biol. Chem. 171, 749 (1947).

<sup>8</sup> G. I. DE SÜTÖ-NAGY et R. J. ANDERSON, J. Biol. Chem. 171, 761 (1947).

*inosito-monophosphorique* et *inosito-glycéro-diphosphophosphate*.

Notons, en passant, la richesse du bacille tuberculeux en *inositol*, qui peut atteindre jusqu'à 9% du poids sec<sup>1</sup>. Il n'est pas exclu que l'action tuberculostatique de la *streptomycine* soit due à un antagonisme envers l'inositol du bacille; RHYMER et ses collaborateurs<sup>2</sup> ont montré, en effet, que le lipositol, phosphatide naturel végétal et animal, contenant de l'inositol, inhibe l'action bactériostatique de la *streptomycine*.

b) Les cires A sont essentiellement un mélange d'esters de *phthiocérol*, dialcool ramifié et méthoxylé,  $C_{35}H_{72}O_3$ , point de fusion 73°C (STODOLA et ANDERSON<sup>3</sup>). Par étude de films monomoléculaires, STÄLLBERG et STENHAGEN<sup>4</sup> ont trouvé que le phthiocérol est constitué par une longue chaîne avec un ou plusieurs groupes polaires près d'une extrémité. Puis, travaillant sur le *phthiocérane*, préparé par GINGER et ANDERSON<sup>5</sup>. (hydrocarbure correspondant au phthiocérol), STÄLLBERG, STENHAGEN, SHEPPARD, SUTHERLAND et WALSH<sup>6</sup> ont trouvé que la chaîne fondamentale de cet hydrocarbure est identique au *méthyl-4-tritriacontane*. STÄLLBERG, STENHAGEN et STENHAGEN<sup>7</sup> ont cherché à obtenir des renseignements complémentaires sur la configuration stérique du phthiocérane par synthèse. Jusqu'ici, le phthiocérol a été isolé de souches humaines (H-37, A-10, A-12, A-13 et A-14) et de la souche bovine *Vallée* par ANDERSON<sup>8</sup> et de la souche humaine *Test* et du BCG par ASSELINÉAU<sup>9</sup>.

A partir de bacilles aviaires, de *M. phlei* et d'un «bacille de la lèpre», ANDERSON<sup>8</sup> a isolé, au lieu de phthiocérol, un mélange de *d-eicosanol-2* et de *d-octadécanol-2*.

Notons encore la présence d'acide mycolique libre dans les cires A de la souche humaine *Test*.

*Acides gras des graisses et phosphatides.* Les acides gras de ces fractions constituent un mélange très complexe; deux d'entre eux ont attiré l'attention d'un grand nombre de chercheurs: *l'acide tuberculostéarique* et *l'acide phthioïque*, qui ont été isolés pour la première fois par ANDERSON.

D'une étude cristallographique aux rayons X de *l'acide tuberculostéarique*, VELICK<sup>10</sup> a conclu que l'acide naturel doit être un isomère optique de l'acide méthyl-

10-stéarique (une telle structure ayant été attribuée à cet acide par SPIELMAN<sup>1</sup>). STÄLLBERG-STENHAGEN<sup>2</sup> a synthétisé les deux isomères optiques. Par comparaison de l'acide naturel et de ses dérivés avec les acides actifs qu'ils ont synthétisés, PROUT, CASON et INGERSOLL<sup>3</sup> ont établi que cet acide est constitué par l'isomère lévogyre de l'acide méthyl-10-stéarique, son pouvoir rotatoire ayant échappé au cours des premières recherches en raison de sa très faible valeur. Une nouvelle synthèse de l'acide ( $\pm$ )-tuberculostéarique par la méthode de KOLBE vient d'être décrite par LINSTEAD, LUNT et WEEDON<sup>4</sup>.

En se basant sur des considérations théoriques relatives au pouvoir rotatoire, CASON et PROUT<sup>5</sup> ont montré que *l'acide phthioïque* ne peut être l'acide triméthyl-3-13-19-tricosanoïque, comme POLGAR et ROBINSON<sup>6</sup> l'avaient pensé, ainsi que WILSON<sup>7</sup>. Grâce à une méthode de fractionnement des acides par cristallisation des semicarbazones de leurs acétol-esters<sup>8</sup>, CHANLEY et POLGAR<sup>9</sup> ont pu isoler des acides phthioïques en  $C_{26}$ ,  $C_{28}$  et  $C_{30}$  et montrer qu'il s'agit en réalité d'*acides  $\alpha, \beta$ -éthyléniques*, ramifiés, possédant notamment un *méthyl en  $\alpha$* . Presque simultanément, CASON et SUMRELL<sup>10</sup>, travaillant sur 24 g de phthioate de méthyle provenant d'ANDERSON, ont isolé un acide  $C_{28}H_{54}O_2$ ,  $\alpha, \beta$ -éthylénique, possédant probablement quatre ramifications, dont une en  $\alpha$  et peut-être une autre en  $\gamma$ .

A partir des cires extraites par le chloroforme, de bacilles résiduaires de fabrication de tuberculine, GINGER et ANDERSON<sup>11</sup> ont isolé un acide lévogyre en  $C_{30}H_{60}O_2$ , qu'ils ont appelé *acide mycocérosique*; on ne sait encore rien sur sa constitution chimique.

3° *Cires extraites par le chloroforme.* Ces cires représentent jusqu'à 12% du poids sec des bacilles. ANDERSON a montré qu'elles sont constituées par des mélanges d'esters entre le glycérol, du phthiocérol et des polysaccharides (à base de galactose, mannose et arabinose) d'une part, et des acides gras d'autre part; le plus important de ces derniers est un acide hydroxylé à très haut poids moléculaire, appelé *acide mycolique*. Nous préciserons d'abord la structure de cet acide et passerons ensuite à l'étude des complexes lipopolysaccharidiques dans lesquels l'acide mycolique se trouve engagé.

<sup>1</sup> G. BROWNLEE, Ann. Rep. progr. Chem. 45, 292 (1948).

<sup>2</sup> I. RHYMER, G. I. WALLACE, L. W. BYERS et H. E. CARTER, J. Biol. Chem. 169, 457 (1947).

<sup>3</sup> F. H. STODOLA et R. J. ANDERSON, J. Biol. Chem. 114, 467 (1936).

<sup>4</sup> S. STÄLLBERG et E. STENHAGEN, J. Biol. Chem. 143, 171 (1942).

<sup>5</sup> L. G. GINGER et R. J. ANDERSON, J. Biol. Chem. 157, 213 (1945).

<sup>6</sup> S. STÄLLBERG, E. STENHAGEN, N. SHEPPARD, G. B. SUTHERLAND et A. WALSH, Nature 160, 580 (1947).

<sup>7</sup> S. STÄLLBERG-STENHAGEN et E. STENHAGEN, J. Biol. Chem. 173, 383 (1948).

<sup>8</sup> R. J. ANDERSON, Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe 3, 145 (1939); Harvey Lectures 271 (1939-1940); Chem. Rev. 29, 225 (1941); Yale J. Biol. Med. 15, 311 (1943).

<sup>9</sup> J. ASSELINÉAU, Thèse Doctorat ès Sciences (Paris 1950).

<sup>10</sup> S. F. VELICK, J. Biol. Chem. 154, 497 (1944).

<sup>11</sup> M. A. SPIELMAN, J. Biol. Chem. 106, 87 (1934).

<sup>2</sup> S. STÄLLBERG-STENHAGEN, Ark. Kemi Min. Geol. [A] 26, N° 12 (1948).

<sup>3</sup> F. S. PROUT, J. CASON et A. W. INGERSOLL, J. Amer. Chem. Soc. 69, 1233 (1947); 70, 298 (1948).

<sup>4</sup> R. P. LINSTEAD, J. C. LUNT et B. C. L. WEEDON, J. Chem. Soc. 1950, 3331.

<sup>5</sup> J. CASON et F. S. PROUT, J. Amer. Chem. Soc. 70, 879 (1948).

<sup>6</sup> N. POLGAR et R. ROBINSON, J. Chem. Soc. 1945, 389.

<sup>7</sup> C. V. WILSON, J. Amer. Chem. Soc. 67, 2161 (1945).

<sup>8</sup> N. POLGAR, Biochem. J. 42, 206 (1948).

<sup>9</sup> J. D. CHANLEY et N. POLGAR, Nature 166, 693 (1950).

<sup>10</sup> J. CASON et G. SUMRELL, J. Amer. Chem. Soc. 72, 4837 (1950).

<sup>11</sup> L. G. GINGER et R. J. ANDERSON, J. Biol. Chem. 157, 203 (1945).

Tableau I  
Acides mycoliques isolés par ANDERSON

	humaine	bovine			Souche			aviaire			Phlei	Lèpre
		tête	coeur	queue	α	β	γ					
Point de fusion . . . . .	54-56°	71-75	56-58	52-54°	69-70	60-61°	65°	57-60°	65°			
Poids moléculaire titrage . . . . .	1284	1203	1219	1180	510	1290	700	965				
Rast . . . . .	1117							1000				
$[\alpha]_D(\text{CHCl}_3)$ . . . . .	+1,8°	+1,5°	+2,7°	+1,7°	+5,6°	+5,5°	+5,3°	+6,1°	+4,0°			
Formule proposée . . . . .	$\text{C}_{88}\text{H}_{176}\text{O}_4$				$(\text{C}_{88}\text{H}_{74}\text{O}_3)_2$	$\text{C}_{88}\text{H}_{174}\text{O}_3$		$\text{C}_{70}\text{H}_{188}\text{O}_6$				
Indice d'iode . . . . .	0				6,5	5,5	7	15,2	6			
Acides gras libérés par pyrolyse	$\text{C}_{26}$			$\text{C}_{26}$	$\text{C}_{24}^* + \text{C}_{26}$	$\text{C}_{24}$		$\text{C}_{24}$				

\* ANDERSON avait proposé pour cet acide une structure ramifiée en  $\text{C}_{25}$ ; STÄLLBERG-STENHAGEN et STENHAGEN (J. Biol. Chem. 165, 599 [1946]) ont montré qu'il s'agit en réalité d'un mélange d'acides normaux en  $\text{C}_{24}$  et  $\text{C}_{26}$ .

A.-*Acide mycolique*. ANDERSON et ses collaborateurs<sup>1</sup> ont montré (dans le cas de l'acide isolé de la souche humaine *H-37*) qu'il s'agit d'un acide hydroxylé et méthoxylé, répondant à la formule approximative  $\text{C}_{88}\text{H}_{176}\text{O}_4$ . Par chauffage sous vide, cet acide se pyrolyse avec libération d'acide *n*-hexacosanoïque, tandis que par oxydation chromique, il est coupé en un mélange complexe d'acides gras, parmi lesquels trois ont pu être identifiés: l'acide stéarique, l'acide *n*-hexacosanoïque et l'acide hexadécane-1,16-dicarboxylique. Des acides analogues ont été isolés par ANDERSON et ses collaborateurs de bactilles de souches bovine et aviaire, et de *M. phlei* et d'un bacille de la lèpre<sup>2</sup> (tabl. I). Leur

poids moléculaire est compris entre 1000 et 1300, ils possèdent un hydroxyle, se coupent par pyrolyse avec libération d'un acide en  $\text{C}_{24}$  ou  $\text{C}_{26}$ , et sont *acido-résistants*.

Cherchant à purifier l'acide mycolique isolé de la souche humaine *Test*, ASSELINÉAU et LEDERER<sup>1</sup> ont séparé par chromatographie sur alumine deux acides: acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -mycoliques, le dernier ne constituant qu'environ 10% du mélange initial (voir tabl. II). Les analyses élémentaires de ces deux acides et de leurs dérivés donnent des résultats pratiquement identiques et semblent confirmer la formule  $\text{C}_{88}\text{H}_{176}\text{O}_4$  d'ANDERSON (tabl. III). Par déshydratation, les deux acides

Tableau II

Propriétés des acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -mycoliques et de leurs dérivés<sup>3</sup>

	$\alpha$	$\beta$
Point de fusion . . . . .	55-56°	71-73°
Sel de potassium . . . . .	Soluble dans l'éther	Presque insoluble dans l'éther
$[\alpha]_D(\text{CHCl}_3)$ . . . . .	+1,8° ± 0,5	+2,3° ± 0,5
Poids moléculaire (titrage) . . . . .	1280, 1290	1290, 1300
Ester méthylique . . . . .	± 50	± 50
Acétate de l'acide . . . . .	Point de fusion: 43-46°	Point de fusion: 52-55°
Acétate de l'ester . . . . .	40-42°	44-48°
Alcool mycolique . . . . .	33-35°	42-44°
Acide anhydro-mycolique	50-52°	60-63°
Anhydro-mycolate de méthyle. . . . .	36-38°	36-38°
	34-36°	34-36°

Tableau III  
Composition élémentaire des acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -mycoliques et de leurs dérivés (souches humaines, *Test* et AESCHBACHER)

	$\alpha$		$\beta$		
	C	H	C	H	
Acide mycolique	$\text{C}_{88}\text{H}_{176}\text{O}_4$	+0,07 +0,13	-0,38 -0,24	-0,13 +0,30	-0,14
Ester méthylique	$\text{C}_{89}\text{H}_{178}\text{O}_4$	-0,04	$\text{OCH}_3$	-0,41	+0,28
Acétate d'acide	$\text{C}_{90}\text{H}_{178}\text{O}_5$	+0,25		+0,06	-0,30
Acétate d'ester méthylique	$\text{C}_{91}\text{H}_{180}\text{O}_5$	+0,33		-0,36	
Alcool mycolique	$\text{C}_{88}\text{H}_{178}\text{O}_3$	+0,12		-0,31	
Acide anhydro-mycolique (IV)	$\text{C}_{88}\text{H}_{174}\text{O}_3$	+0,13	$\text{OCH}_3$	-0,23	+0,34
		+0,14			-0,10
Alcool anhydro-mycolique	$\text{C}_{88}\text{H}_{176}\text{O}_9$	+0,06		-0,05	
Mycolane	$\text{C}_{87}\text{H}_{176}$	+0,18		-0,25	
Méthoxy-nor-mycolanone (II)	$\text{C}_{87}\text{H}_{174}\text{O}_2$	+0,21		± 0,00	
Methoxy-oxo-mycolanoate de méthyle (III)	$\text{C}_{88}\text{H}_{176}\text{O}_4$	-0,21		-0,01	

Les chiffres de ce tableau indiquent les écarts en % des résultats d'analyse par rapport aux chiffres théoriques (d'après J. ASSELINÉAU et E. LEDERER, Biochim. Biophys. acta 7, 126 [1951] (voir formules p. 285).

1 F. H. STODOLA, A. LESUK et R. J. ANDERSON, J. Biol. Chem. 126, 505 (1938). — A. LESUK et R. J. ANDERSON, J. Biol. Chem. 136, 603 (1940).

<sup>2</sup> Le bacille de Hansen n'ayant jamais pu être cultivé *in vitro*, il s'agit plutôt d'un bacille paratuberculeux. — J. CASON et R. J. ANDERSON, J. Biol. Chem. 126, 527 (1938). — R. J. ANDERSON et M. M. CREIGHTON, J. Biol. Chem. 129, 57 (1939). — R. L. PECK et R. J. ANDERSON, J. Biol. Chem. 140, 89 (1941). — R. J. ANDERSON, J. A. CROWDER, M. S. NEWMAN et F. H. STODOLA, J. Biol. Chem. 113, 637 (1936).

<sup>3</sup> J. ASSELINÉAU et E. LEDERER, C. r. Acad. Sci. 228, 1892 (1949).

Tableau IV  
Acides mycoliques de souches humaines

	H 37- ANDERSON	H 37-Rv	Souche H 37-Ra	R <sub>1</sub>	L-25
Virulence . . . . .	++	+++			?
Acide mycolique . . .		$\alpha$	$\beta$		$\beta$
Point de fusion . . . .	56°	53°	69°		53°
Poids moléculaire (titrage) . . . . .	1284	1270	2,08	1290	1320
% OCH <sub>3</sub> (théor. 2,36) .	1,4	1,37		1,68	1,21
Formule* probable . . .	C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>88</sub> H <sub>176</sub> O <sub>4</sub>
	+ C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>4</sub>	+ C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>4</sub>	+ C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>4</sub>	+ C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>3</sub>	+ C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>4</sub>
Fonctions . . . . .	- OH - OCH <sub>3</sub>	- OH-OH + OCH <sub>3</sub> OH	- OH	- OH + OH OCH <sub>3</sub>	- OH - OH OH

\* Nous adoptons comme hypothèse de travail des formules en C<sub>88</sub> pour les acides mycoliques méthoxylés, et en C<sub>87</sub> pour ceux qui sont dépourvus de méthoxyle.

mycoliques donnent un *acide anhydro-mycolique* apparemment identique. Les acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -mycoliques sont donc vraisemblablement des stéréo-isomères<sup>1</sup>. Il n'est pas possible d'affirmer que les deux acides sont des substances pures, mais 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>2</sup> mentionnent des essais biologiques sur deux préparations d'acide mycolique fournies par ANDERSON et fondant respectivement à 55-56°C et 73-75°C.

La formule C<sub>88</sub>H<sub>176</sub>O<sub>4</sub> est actuellement la plus probable; elle est à  $\pm 5$  C et  $\pm 10$  H exacte; les méthodes analytiques ne permettent pas de précision plus grande<sup>3</sup>.

Nos acides présentent pour la première fois des teneurs en méthoxyle concordant avec les chiffres théoriques (tabl. III); l'acide mycolique d'ANDERSON devait en effet consister en un mélange d'acides méthoxylés et non méthoxylés, comme nous en avons récemment isolés de certaines souches (voir tabl. IV).

Les acides anhydro-mycoliques (IV) présentent dans leur spectre ultra-violet une forte bande d'absorption vers 220 m $\mu$ , caractéristique de la conjugaison de la double liaison avec le carboxyle. 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<sup>-1</sup> qui manque dans les acides

<sup>1</sup> Note ajoutée à la correction des épreuves (20/7/1951): Dans une note récente (J. ASSELINÉAU, E. GANZ et E. LEDERER, C. r. Acad. Sci. 232, 2050 [1951]), nous avons montré que les acides  $\alpha$ -et  $\beta$ -mycoliques diffèrent par leur reste R et ne sont pas nécessairement des isomères. Les acides  $\alpha$ -et  $\beta$ -anhydro-mycoliques ne sont pas identiques, d'après les spectres infra-rouges (voir formules p. 285).

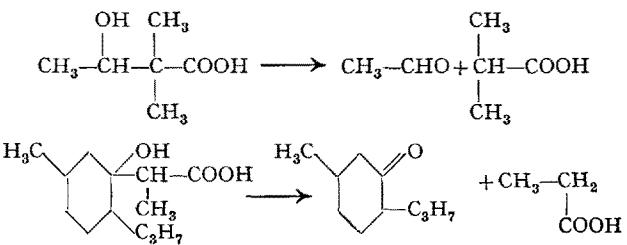
<sup>2</sup> B. GERSTL, R. TENNANT et O. PELZMAN, Amer. J. Path. 21, 1007 (1945).

<sup>3</sup> Pour une discussion détaillée de cette question voir J. ASSELINÉAU et E. LEDERER, Biochim. Biophys. Acta 7, 126 (1951).

mycoliques). Deux positions pouvaient alors être envisagées pour l'hydroxyle des acides mycoliques: soit en  $\alpha$ , soit en  $\beta$ , par rapport au carboxyle. Nous avons pu prouver que l'hydroxyle n'est pas en  $\alpha$ : en effet, les acides mycoliques ne sont pas décarboxylés par le tétracétate de plomb, dans les conditions où les acides  $\beta$ -hydroxylés le sont; d'autre part, les alcools mycoliques ne sont pas coupés par l'acide périodique comme les 1,2-glycols.

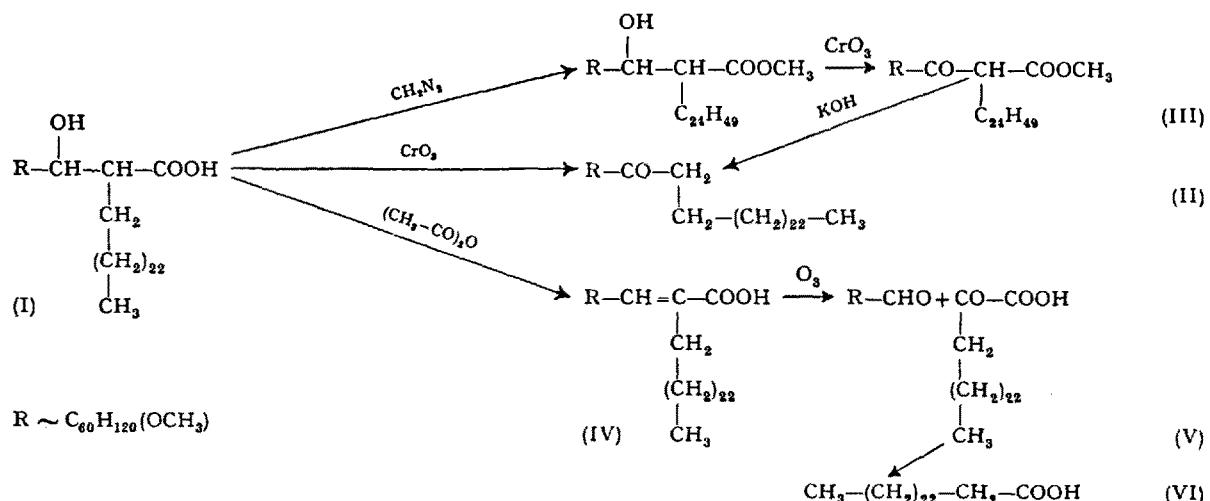
Enfin, nous avons prouvé que l'hydroxyle est en  $\beta$ <sup>1</sup>; l'acide  $\alpha$ -mycolique (de souche *Test*) fournit en effet par oxydation chromique ménagée une cétone décarboxylée (II), comme le montre l'analyse élémentaire et le spectre d'absorption. D'après une nomenclature ayant pour base le *mycolane*, hydrocarbure C<sub>87</sub>H<sub>176</sub> correspondant à l'acide mycolique, nous appelons cette cétone *méthoxynor-mycolanone*. Par oxydation dans les mêmes conditions d' $\alpha$ -mycolate de méthyle, nous avons obtenu un ester  $\beta$ -cétonique (III), qui par saponification redonne la cétone décarboxylée (II)<sup>1</sup>. Ces faits sont en accord avec la *position en  $\beta$  de l'hydroxyle*.

Un tel résultat n'était compatible avec la libération d'acide *n*-hexacosanoïque par pyrolyse que si l'on admettait la présence d'une ramifications en C<sub>24</sub> sur le carbone  $\alpha$  (I). Il est en effet connu depuis longtemps que des acides  $\beta$ -hydroxylés, porteurs en position  $\alpha$  d'une ou de deux ramifications<sup>2</sup>, sont scindés par pyrolyse d'une manière analogue:



<sup>1</sup> J. ASSELINÉAU, C. r. Acad. Sci. 230, 1620 (1950).

<sup>2</sup> H. SCHNAPP, Ann. Chem. 201, 62 (1880). - O. WALLACH, Ann. Chem. 365, 255 (1909).



Nous avons pu effectivement prouver l'existence d'une ramification en  $C_{24}$  sur le carbone  $\alpha$  par ozonisation de l'acide anhydro-mycolique (IV), et isolement d'acide *n*-pentacosanoïque (VI), formé à partir de l'acide  $\alpha$ -céto-hexacosanoïque (V) attendu. Les acides mycoliques *Test* sont donc des acides  $\beta$ -hydroxylés, possédant en  $\alpha$  du carboxyle une chaîne aliphatique normale en  $C_{24}$ <sup>1</sup>.

Ces résultats nous ont conduit à définir les acides mycoliques comme «acides gras à haut poids moléculaire, hydroxylés en  $\beta$  et portant en  $\alpha$  une longue chaîne aliphatique»<sup>2</sup>. Il existe d'autres ramifications, puisque le dosage de  $C-CH_3$  d'après KUHN et ROTH donne environ quatre molécules d'acide acétique (pour l'acide mycolique *Test*).

Avec H. DEMARTEAU<sup>3</sup>, nous avons isolé des acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -mycoliques à partir des souches *H-37 Rv* et *H-37 Ra*; l'acide  $\alpha$ -mycolique de *H-37 Ra* est dépourvu de méthoxyle et contient deux hydroxyles acétylables (tabl. IV). ASSELINEAU<sup>4</sup> a étudié les acides mycoliques isolés des souches *R<sub>1</sub>* et *L-25*, et montré que ces acides possèdent le même type de structure (I). A partir de la souche bovine *Vallée*, DEMARTEAU<sup>5</sup> a isolé trois acides mycoliques différents; des acides analogues existant dans les souches bovines *Marmorek* et *BCG* sont en cours d'étude (tabl. V). ASSELINEAU<sup>6</sup> a montré la présence d'acides mycoliques du même type dans trois souches de bacilles paratuberculeux (*souche Bruynoghe et Adant*, une souche isolée de l'eau de Seine, et *M. agreste*).

B. - *Complexes lipopolysaccharidiques*. HAWORTH<sup>7</sup> a préparé, avec STACEY, un complexe à haut poids molé-

culaire par extraction de bacilles secs par de l'urée ou de la  $\beta$ -hydroxy-propionamidine<sup>1</sup>. L'hydrolyse de ce complexe (renfermant 8% de N et qui aurait des propriétés antigéniques), donne les produits suivants: acide désoxy-ribonucléique (3%), peptides (6%), aminopolysaccharides (30%), lipides (57% ; contenant de l'acide mycolique).

Tableau V  
Acides mycoliques de souches bovines

Acide mycolique Souche	Point de fusion	Formule probable	Fonctions			
			OH	OCH <sub>3</sub>		
Vallée <sup>2</sup>	$\alpha$ . . .	67°	C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>3</sub>	1	0	
	$\beta$ . . .	56°	C <sub>88</sub> H <sub>174</sub> O <sub>4</sub>	1	1	
	$\gamma$ . . .	64°	C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>4</sub>	2	0	
BCG <sup>3</sup>	$\alpha$ cires libres		58°	C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>3</sub>	1	0
	$\psi$ } lipides liés	70°	C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>4</sub>	2	0	
			C <sub>87</sub> H <sub>174</sub> O <sub>3</sub>	1	0	

HAWORTH, KENT et STACEY<sup>4</sup> ont étudié en détail la structure du polysaccharide. Après méthylation et hydrolyse acide, ces auteurs ont isolé les produits suivants: triméthyl-2,3,5-méthyl- $\beta$ -arabofuranoside (12,8%), diméthyl-3,5-méthyl- $\beta$ -arabofuranoside (30,9%), triméthyl-2,3,6-méthyl- $\beta$ -galactopyranoside (33,8%), diméthyl-3,4-méthyl- $\beta$ -mannopyranoside (14,4%) et un diméthyl-méthyl- $\beta$ -glucosaminide (8%). Ceci amène les auteurs à attribuer à ce polysaccharide une structure ramifiée, indiquée ci-dessous.

<sup>1</sup> Notons que HAWORTH et ses collègues, ainsi que CHOURCOUN, ont travaillé sur des bactéries tuées par la chaleur; nous avons évité l'action de la chaleur en plaçant d'après ANDERSON les bacilles vivants dans un mélange d'alcool et d'éther.

<sup>2</sup> H. DEMARTEAU, C. r. Acad. Sci. 232, 2494 (1951).

<sup>3</sup> Résultats inédits de A. GINSBURG.

<sup>4</sup> W. N. HAWORTH, P. W. KENT et M. STACEY, J. Chem. Soc. 1948, 1220.

<sup>1</sup> J. ASSELINEAU et E. LEDERER, Nature 166, 782 (1950); Biochim. Biophys. Acta 7, 126 (1951).

<sup>2</sup> J. ASSELINEAU et E. LEDERER, Biochim. biophys. acta 7, 126 (1951).

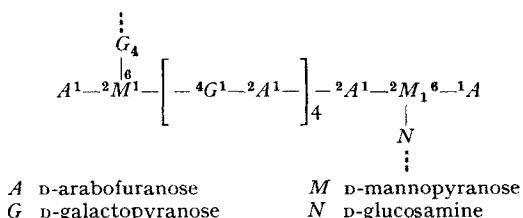
<sup>3</sup> J. ASSELINEAU, H. DEMARTEAU et E. LEDERER, C. r. Acad. Sci. 230, 877 (1950).

<sup>4</sup> J. ASSELINEAU, Essais inédits.

<sup>5</sup> H. DEMARTEAU, C. r. Acad. Sci. 232, 2494 (1951).

<sup>6</sup> J. ASSELINEAU, Thèse Doctorat ès Sciences (Paris 1950).

<sup>7</sup> W. N. HAWORTH, J. Chem. Soc. 1947, 585.



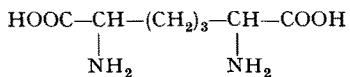
Notons que c'est la première fois que l'on ait trouvé le D-arabofuranose dans la nature.

CHOUCROUN<sup>1</sup> a obtenu un lipopolysaccharide appelé «Pmko» à partir de bacilles séchés, épuisés par l'huile de vaseline. Le dioxane en précipite un complexe du lipopolysaccharide avec des substances azotées. En traitant ce complexe par du chloroforme contenant du méthanol, on obtient le lipopolysaccharide brut en solution.

A partir des cires purifiées (préparées selon ANDERSON), ASSELINÉAU et LEDERER<sup>2</sup> ont isolé une fraction insoluble dans l'acétone bouillante, qui présente à peu près les mêmes propriétés physiques et chimiques que la substance Pmko de CHOUCROUN. Cette fraction est constituée par un lipopolysaccharide azoté et phosphoré qui n'est certainement pas encore pur; d'ailleurs, il est fractionnable par centrifugation à grande vitesse en solution dans l'éther de pétrole. Une telle fraction, isolée à partir de la souche humaine *Test*, renferme 1,0% d'azote et 0,12% de phosphore, et présente une acidité libre correspondant à 2 mm<sup>3</sup> de potasse 0,1 N par milligramme<sup>3</sup>.

Le poids moléculaire du lipopolysaccharide est d'environ 16 000.

Par saponification, ce lipopolysaccharide libère environ 50% de partie lipidique, constituée par 45% (par rapport au complexe initial) d'acide mycolique et 5% d'acides gras de poids moléculaire moyen 280<sup>4</sup>. Le reste de la molécule consiste en un polysaccharide renfermant tout l'azote du lipopolysaccharide et le phosphore. Environ un quart de cet azote se trouve sous forme ammoniacale; le reste est principalement dû à la présence de trois acides aminés<sup>5</sup>: l'*acide glutamique*, l'*alanine*, et un nouvel acide aminé: l'*acide  $\alpha, \epsilon$ -diamino-pimélique*, isolé par WORK du bacille diphtérique<sup>6</sup>.



D'après des dosages d'azote aminé, il est vraisemblable que ces trois acides aminés sont engagés dans des liaisons peptidiques.

<sup>1</sup> N. CHOUCROUN, C. r. Acad. Sci. 210, 749 et 511 (1940); Amer. Rev. Tuberc. 56, 203 (1947).

<sup>2</sup> J. ASSELINÉAU et E. LEDERER, Bull. Soc. chim. biol. 31, 492 (1949).

<sup>3</sup> J. ASSELINÉAU, Thèse Doctorat ès Sciences (Paris 1950).

<sup>4</sup> J. ASSELINÉAU, C. r. Acad. Sci. 229, 791 (1949).

<sup>5</sup> J. ASSELINÉAU, Thèse Doctorat ès Sciences (Paris 1950). — J. ASSELINÉAU, N. CHOUCROUN et E. LEDERER, Biochim. biophys. acta 5, 197 (1950).

<sup>6</sup> E. WORK, Bull. Soc. chim. biol. 31, 138 (1949); Biochim. biophys. acta 5, 204 (1950); Nature 165, 74 (1950).

sons peptidiques. La réaction de DISCHE, ainsi que le spectre d'absorption du polysaccharide (bande vers 265 m $\mu$ ), montre qu'une partie du phosphore est liée sous forme d'acide désoxyribonucléique, qui constitue peut-être seulement une impureté. Nous avons trouvé des résultats analogues pour une préparation de Pmko purifié<sup>1</sup>.

Le poids moléculaire du polysaccharide (que RAFFEL<sup>2</sup> appelle *W*) serait d'environ 7000 à 8000. Comme celui de HAWORTH, KENT et STACEY<sup>3</sup>, il est constitué par du galactose, du mannose et de l'arabinose; mais il renferme beaucoup moins d'azote que celui décrit par ces auteurs<sup>3</sup> (1,4% au lieu de 4,7%). D'ailleurs, nous n'avons pu mettre en évidence de glucosamine par chromatographie sur papier. Ces polysaccharides donnent, à très forte dilution, une précipitation avec des sérum d'animaux tuberculeux<sup>4</sup>. L'acidité du lipopolysaccharide peut être due à des groupes hydroxyles phosphoriques et au carboxyle libre de l'acide glutamique. L'acide mycolique est lié au polysaccharide, sous forme d'ester, par son carboxyle. Une réduction par LiAlH<sub>4</sub> détache l'acide mycolique sous forme d'alcool mycolique<sup>5</sup>. Des analogies assez étroites existent entre notre lipopolysaccharide et une fraction «*infiltrable*» isolée par ANDERSON, REEVES et STODOLA<sup>6</sup> des lipides liés de bacilles de souche humaine *A-10*<sup>7</sup>.

Les caractéristiques de lipopolysaccharides isolés d'un certain nombre de souches de mycobactéries sont mentionnées dans les tableaux VI et VII. On peut voir que toutes les souches humaines virulentes étudiées renferment un tel lipopolysaccharide à haut point de fusion, caractérisé par la présence des mêmes trois acides aminés<sup>8</sup> (voir fig. 1). Les lipopolysaccharides isolés de *H-37Ra* (avirulent) et de souches bovines ou de BCG en sont exempts<sup>9</sup>. Cependant ces bacilles renferment de l'acide  $\alpha, \epsilon$ -diamino-pimélique; GENDRE et LEDERER<sup>10</sup> ont en effet mis au point une méthode permettant la détection et le dosage semi-quantitatif de cet acide aminé. Appliquant cette méthode à des hydrolysats de bacilles entiers de 15 souches de mycobactéries (5 humaines, 4 bovines, 1 aviaire et 5 paratuberculeuses),

<sup>1</sup> J. ASSELINÉAU, N. CHOUCROUN et E. LEDERER, Biochim. biophys. acta 5, 197 (1950).

<sup>2</sup> S. RAFFEL, Exper. 6, 410 (1950).

<sup>3</sup> W. N. HAWORTH, P. W. KENT et M. STACEY, J. Chem. Soc. 1948, 1220.

<sup>4</sup> R. J. ANDERSON, Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe 3, 145 (1939); Harvey Lectures 271 (1939-1940); Chem. Rev. 29, 225 (1941); Yale J. Biol. Med. 15, 311 (1943).

<sup>5</sup> J. ASSELINÉAU, Thèse Doctorat ès Sciences (Paris 1950).

<sup>6</sup> R. J. ANDERSON, R. E. REEVES et F. H. STODOLA, J. Biol. Chem. 121, 649 (1937).

<sup>7</sup> Notre lipopolysaccharide est cependant facilement filtrable sur bougie CHAMBERLAND L3.

<sup>8</sup> J. ASSELINÉAU et E. LEDERER, C. r. Acad. Sci. 230, 142 (1950).

<sup>9</sup> Il convient de faire remarquer ici que, contrairement à ce qui avait été avancé dans notre note (8), le lipopolysaccharide de BCG ne renferme pas d'acides aminés; les «nombreux acides aminés» mentionnés provenaient de débris bacillaires encore présents dans notre préparation.

<sup>10</sup> T. GENDRE et E. LEDERER, Biochim. biophys. acta 1951, sous presse.

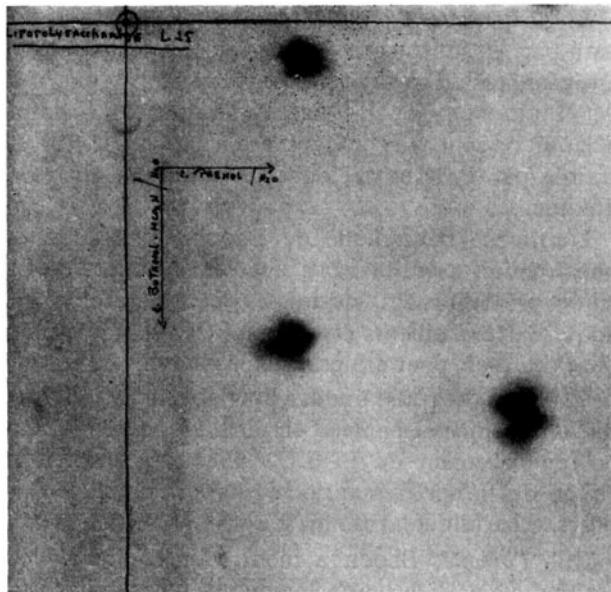


Fig. 1. Chromatographie sur papier d'un hydrolysat du lipopolysaccharide de la souche humaine *L.25* (isolée d'une lésion lupique); les trois taches correspondent à l'acide  $\alpha,\epsilon$ -diaminopimélique, l'acide glutamique et lalanine (de haut en bas).

ils ont trouvé des teneurs en acide diaminopimélique de 0,2 à 0,7% du poids sec des bacilles. *Toutes les souches de mycobactéries* en contiennent; il ne semble pas y avoir de différence quantitative suivant la virulence des bacilles.

### 3° Rapport entre la virulence des bacilles et les fractions lipidiques

Examinant la composition des lipides des deux variants *Rv* et *Ra* de la souche humaine *H-37*, MARTIN<sup>1</sup> a observé que la souche virulente *Rv* renferme deux fois plus de lipides que la souche avirulente *Ra*.

*Rapport entre virulence et lipopolysaccharide.* Au cours d'une étude systématique des lipopolysaccharides isolés d'un certain nombre de souches humaines et bovines, ASSELINEAU et LEDERER<sup>2</sup> ont remarqué un parallélisme entre la virulence d'une souche et sa teneur en lipopolysaccharide (voir tabl. VI et VII). (Le cas des souches *L-25* et *L-65*, d'origine lupique, est plus difficile à interpréter; aux essais de virulence habituels, ces deux souches se sont comportées comme avirulentes, mais il faut tenir compte de ce que le lupus n'a jamais pu être reproduit expérimentalement).

En plus des différences entre *H-37-Rv* (virulent) et *H-37-Ra* (avirulent) marquées dans le tableau VI, nous avons observé que *H-37-Rv* contient 0,5% du poids sec des bacilles en cires solubles dans l'acétone bouillante, consistant en 68% d'acide mycolique libre, tandis que *H-37-Ra* contient 5,6% de ces cires et qui sont presque exemptes d'acide mycolique libre.

<sup>1</sup> G. MARTIN, J. Amer. Chem. Soc. 60, 768 (1938).

<sup>2</sup> J. ASSELINEAU et E. LEDERER, C. r. Acad. Sci. 230, 142 (1950).

Tableau VI  
Lipopolysaccharides de diverses souches humaines

Souches	AESCH-BACHER	<i>H-37-Rv</i>	Test	<i>R-1</i>	<i>H-37-Ra</i>
Virulence . . .	++	++	++	+	—
% de bacilles secs	7,6	7,3	6,2	2,1	0,54
Point de fusion .	223°	225°	230°	215°	57°
N% . . . . .	1,22	1,1	1	1,0	traces
P% . . . . .	0,34	0,18	0,11	—	0,37
Acides aminés .	Al. Gl. Pim.	Al. Gl. Pim.	Al. Gl. Pim.	Al. Gl. Pim.	0
Réaction DUBOS	++	++	++	++	—

Al. = Alanine. Gl. = Acide glutamique. Pim. = Acide  $\alpha,\epsilon$ -diaminopimélique.

Etant donné que les souches bovines *Vallée*, *Dupré* et *Marmorek* sont également virulentes, mais contiennent des lipopolysaccharides dépourvus d'acides aminés, il ne semble pas que ces amino-acides jouent un rôle essentiel dans la virulence (tabl. VII).

Tableau VII  
Lipopolysaccharides de souches

Souches	Bovines			humaines isolées de lésions lupiques	
	Vallée	Marmorek	BCG	<i>L-25</i>	<i>L-65</i>
Virulence . . .	+	++	—	?	?
% de bacilles secs	0,56	2,8	1,6	4,5	1,3
Point de fusion .	160-170°	193-196°	140-170°	175-185°	175-185°
N% . . . . .	0,24	0,11	0,33	1,01	0,60
P% . . . . .		0,1	0,2		0,25
Acides aminés .	0	0	0*	Al. Gl. Pim.	Al. Gl. Pim.

Al. = Alanine. Gl. = Acide glutamique. Pim. = Acide  $\alpha,\epsilon$ -diaminopimélique.

\* Voir note 9 page 286.  
Les résultats de ce tableau proviennent d'essais inédits de J. ASSELINEAU et H. DEMARTEAU.

*Réaction de Dubos et Middlebrook.* DUBOS et MIDDLEBROOK<sup>1</sup> ont décrit une réaction permettant de distinguer les souches virulentes et avirulentes. Les bacilles, mis en suspension dans un tampon alcalin et additionnés de rouge neutre, se colorent en rouge s'ils sont virulents, en jaune s'ils sont avirulents. HAUDUROY et POSTERNAK<sup>2</sup> confirment la valeur de cette réaction. En appliquant la réaction de Dubos à nos fractions de cires, nous avons trouvé que l'acide mycolique se colore en rose et que le lipopolysaccharide des souches humaines virulentes se colore en rouge intense. Les fractions analogues des souches avirulentes se colorent plus faiblement<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> R. J. DUBOS et G. MIDDLEBROOK, Amer. Rev. Tuberc. 58, 698 (1948).

<sup>2</sup> P. HAUDUROY et Y. POSTERNAK, Ann. Inst. Pasteur 77, 91 (1949); C. r. Acad. Sci. 228, 781 (1949).

<sup>3</sup> J. ASSELINEAU et E. LEDERER, C. r. Acad. Sci. 230, 142 (1950).

La fixation du colorant basique peut s'expliquer par salification des groupes acides du lipopolysaccharide.

*Cord factor.* DUBOS et MIDDLEBROOK<sup>1</sup>, reprenant une vieille observation de KOCH, ont montré que l'orientation des bacilles en cordes dans les cultures est caractéristique des souches virulentes et du BCG; les souches avirulentes ne forment que des amas irréguliers de bacilles. BOEHM<sup>2</sup> a montré que ces cordes sont biréfringentes.

Partant de l'hypothèse de l'existence dans les bacilles virulents d'un facteur chimique responsable de la formation des cordes, BLOCH<sup>3</sup> a isolé par extraction à l'éther de pétrole de bacilles virulents et jeunes (souche *H-37-Rv*), une fraction lipidique, qu'il appelle *cord factor*. Les bacilles extraits restent vivants, mais ont perdu la capacité de former des cordes, et en outre leur virulence. Le *cord factor* possède des propriétés toxiques vis-à-vis de la souris, après une deuxième injection, et la faculté d'inhiber la migration des leucocytes *in vitro*. Il semble toutefois que la propriété de formation de cordes et la toxicité soient dues à deux facteurs distincts, le *cord factor* étant un mélange de plusieurs substances.

#### 4° Propriétés biologiques des fractions lipidiques

A. - *Production de tubercules.* SABIN<sup>4</sup> a montré en 1930 que l'injection de phosphatides extraits du bacille tuberculeux entraîne la production de tubercules; c'est à l'acide phthioïque de cette fraction qu'a été attribuée cette propriété. Cependant, ROULET et BLOCH<sup>5</sup> ont observé que les acides phosphatidiques de BLOCH<sup>6</sup> sont plus actifs que l'acide phthioïque lui-même. L'activité d'acides gras synthétiques se rapprochant plus ou moins du type phthioïque a donné lieu à de nombreux travaux, qui ont été exposés récemment par ROBINSON<sup>7</sup> et par WEITZEL<sup>8</sup>.

Cependant, les phosphatides ne sont pas les seules fractions lipidiques responsables de la formation de cellules géantes: GERSTL, TENNANT et PELZMAN<sup>9</sup> ont montré que les acides mycoliques possèdent aussi cette propriété. DELAUNAY a obtenu des résultats semblables avec nos lipopolysaccharides<sup>10</sup>. La formation de cellules géantes semble être une propriété générale d'acides gras ayant plusieurs ramifications.

<sup>1</sup> G. MIDDLEBROOK, R. J. DUBOS et C. H. PIERCE, J. Exp. Med. 86, 175 (1947).

<sup>2</sup> G. BOEHM, Exper. 6, 445 (1949).

<sup>3</sup> H. BLOCH, Amer. Rev. Tuberc. 61, 270 (1950); J. Exp. Med. 91, 197 (1950).

<sup>4</sup> F. R. SABIN, C. A. DOAN et C. E. FORKNER, J. Exp. Med. 52, suppl. 3 (1930).

<sup>5</sup> F. ROULET et K. BLOCH, Virchows Arch. 298, 311 (1936).

<sup>6</sup> K. BLOCH, Z. physiol. Chem. 224, 1 (1936); Biochem. Z. 285, 372 (1936).

<sup>7</sup> R. ROBINSON, Nature 158, 816 (1946).

<sup>8</sup> G. WEITZEL, Angew. Chem. 60, 263 (1948).

<sup>9</sup> B. GERSTL, R. TENNANT et O. PELZMAN, Amer. J. Path. 21, 1007 (1945).

<sup>10</sup> A. DELAUNAY, J. ASSELINÉAU et E. LEDERER, C. r. Soc. Biol. 1951, sous presse.

B. - *Formation d'anticorps.* Le phosphatide préparé par ANDERSON possède également des propriétés antigéniques<sup>1</sup>. D'autres préparations, telles que celle de MACHEBŒUF et FAURE<sup>2</sup> (pratiquement exempte d'azote) ne sont plus qu'haptènes. Cette question a été traitée par PANGBORN<sup>1</sup> dans le cadre des antigènes lipidiques.

L'antigène méthylique de BOQUET et NÈGRE est une fraction extraite par l'alcool méthylique de bacilles préalablement dégraissés par l'acétone; son activité doit d'ailleurs être due à la présence de phosphatides (voir pour ses propriétés NÈGRE<sup>3</sup>).

CHOUCROUN<sup>4</sup> pense que son lipopolysaccharide *Pmko* est antigénique et pourrait servir à des immunisations en remplacement du BCG. De même, HAWORTH attribue des propriétés antigéniques au complexe lipopolysaccharidique azoté qu'il a isolé<sup>5</sup> (voir page 285).

C. - *Toxicité.* BLOCH a montré que le *cord factor* est toxique pour la souris, lorsqu'une seconde injection est effectuée; une seule injection, même à dose élevée, est sans action. NÈGRE<sup>3</sup> rapporte des faits analogues avec des extraits acétонiques de bacilles humains, actifs seulement après plusieurs injections. Des extraits acétонiques de bacilles paratuberculeux (*M. phlei*) sont inoffensifs dans les mêmes conditions.

Nos lipopolysaccharides sont dépourvus de toute toxicité; ce fait a été établi par RAYNAUD<sup>6</sup> et par BLOCH<sup>6</sup>.

D. - *Etablissement de l'hypersensibilité retardée.* Cette question a été traitée très en détail par RAFFEL<sup>7</sup> dans cette revue. Lui, ainsi que CHOUCROUN<sup>4</sup> ont montré le rôle joué dans l'établissement de ce phénomène par les cires, et plus particulièrement par le lipopolysaccharide *Pmko*.

E. - *Inhibition de la migration des leucocytes.* ALLGÖWER et BLOCH<sup>8</sup> ont montré que la migration des leucocytes ayant phagocyté des bacilles tuberculeux virulents, est inhibée *in vitro*, alors que les bacilles avirulents sont sans action. Depuis, BLOCH<sup>9</sup> a montré que le *cord factor* est responsable de cette inhibition.

DELAUNAY, CHOUCROUN, BAZIN et ROBINEAU<sup>10</sup> ont étudié le chimiotactisme présenté par les leucocytes pour des grains d'amidon. Ces auteurs ont constaté que des bacilles virulents (*H-37-Rv*) inhibent le chimiotactisme après phagocytose, mais que des bacilles avirulents (*H-37-Ra*) sont susceptibles de l'inhiber

<sup>1</sup> M. C. PANGBORN, Discussions Faraday Soc. 6, 110 (1949).

<sup>2</sup> M. A. MACHEBŒUF et M. FAURE, C. r. Acad. Sci. 209, 700 (1939).

<sup>3</sup> L. NÈGRE, *Les lipoïdes dans les bacilles tuberculeux et la tuberculose* (Masson, Paris 1950).

<sup>4</sup> N. CHOUCROUN, C. r. Acad. Sci. 210, 749 et 511 (1940); Amer. Rev. Tuberc. 56, 203 (1947).

<sup>5</sup> W. N. HAWORTH, J. Chem. Soc. 1947, 585.

<sup>6</sup> Essais inédits.

<sup>7</sup> S. RAFFEL, Exper. 6, 410 (1950).

<sup>8</sup> M. ALLGÖWER et H. BLOCH, Amer. Rev. Tuberc. 59, 562 (1949).

<sup>9</sup> H. BLOCH, Amer. Rev. Tuberc. 61, 270 (1950); J. Exp. Med. 91, 197 (1950).

<sup>10</sup> N. CHOUCROUN, A. DELAUNAY, S. BAZIN et R. ROBINEAU, C. r. Acad. Sci. 232, 1325 (1951).

aussi, si la phagocytose a été massive; il n'y a donc entre les deux variétés de bacilles qu'une différence quantitative. En outre, ces auteurs ont montré que le lipopolysaccharide Pmko possède la propriété d'inhiber le chimiotactisme, ainsi que notre lipopolysaccharide.

### 5° Acido-résistance

Les mycobactéries sont très difficiles à colorer par les méthodes et colorants habituels, mais chauffées pendant quelques minutes avec une solution de fuchsine phéniquée, elles sont colorées en rouge foncé et résistent à la décoloration par l'alcool acide; c'est ce phénomène, découvert par PAUL EHRLICH, que l'on appelle *acido-résistance* et qui sert aux bactériologistes pour le dépistage des mycobactéries. L'explication de l'acido-résistance est encore très controversée.

Depuis qu'ANDERSON a montré que l'acide mycolique est le seul constituant acido-résistant du bacille tuberculeux, on pouvait croire le problème résolu, mais il n'en est rien. Car l'acido-résistance du bacille est détruite par simple broyage, ou par ébullition avec de l'acide chlorhydrique dilué<sup>1</sup>, traitements qui ne détruisent pas l'acide mycolique. De plus, nous avons trouvé<sup>2</sup> (ainsi qu'ANDERSON et FETHKE<sup>3</sup>) que les esters de l'acide mycolique ne sont pas acido-résistants; or, la plus grande partie de l'acide mycolique se trouve dans le bacille sous forme estérifiée, liée à des polysaccharides.

En ce qui concerne l'acido-résistance de l'acide mycolique, nous avons montré, en étudiant plusieurs de ses dérivés, que la présence d'un carboxyle libre et de son hydroxyle est nécessaire; l'acide anhydro-mycolique n'est plus acido-résistant; les deux acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -mycoliques sont acido-résistants. Nous pensons que la fuchsine, colorant basique, est fixée par le carboxyle et par une valence secondaire sur l'hydroxyle en  $\beta$ .

Bien qu'ayant montré la présence d'acide mycolique libre dans certaines souches de bacilles virulents, et l'existence de certaines fractions de cires, dans lesquelles l'acide mycolique est libéré au cours du chauffage avec le colorant, nous avons conclu que ces fractions, d'importance pondérale relativement faible, pouvaient difficilement être responsables de l'acido-résistance du bacille entier.

Il semble que les observations de YEGIAN et VANDERLINDE<sup>4</sup> faisant intervenir la perméabilité cellulaire, apportent la clé du problème. D'après ces auteurs, la plus grande partie du colorant se trouve à l'état libre, à l'intérieur de la cellule; il y a été introduit au cours du chauffage avec la fuchsine phéniquée, et les cellules

étant imperméables à l'alcool acidulé à froid, le colorant y reste emprisonné; il peut cependant en être enlevé par l'alcool bouillant. Les cellules ainsi décolorées peuvent être recolorées à nouveau. On comprend dès lors qu'un simple broyage suffise à détruire l'acido-résistance du bacille entier<sup>1</sup>, broyage qui ne détruit évidemment pas l'acide mycolique.

Certaines souches de bacilles paratuberculeux peuvent perdre leur acido-résistance; dans une de ces souches, ASSELINÉAU<sup>2</sup> a montré l'existence d'un acide mycolique acido-résistant. Ceci vient à l'appui de notre thèse d'après laquelle l'acide mycolique n'a pas nécessairement un rôle direct à jouer dans l'acido-résistance du bacille entier.

On peut objecter à toutes ces recherches qu'elles sont effectuées sur des bacilles cultivés depuis de longues années sur des milieux synthétiques. Il est indéniable que ce traitement a modifié la composition des bacilles. D'ailleurs, ANDERSON et ses collaborateurs<sup>3</sup> n'ont pas pu mettre en évidence d'acide phthioïque ou de phthiocol dans les extraits lipidiques de lésions tuberculeuses pulmonaires. Il est certain qu'il serait très intéressant d'étudier la composition chimique de bacilles fraîchement isolés de lésions et cultivés dans des conditions se rapprochant le plus possible de celles existant dans les organes des mammifères.

Nous tenons à remercier le Professeur J. TREFOUËL, Directeur de l'Institut Pasteur, et le Dr J. BRETEY, Chef de service, qui nous ont accordé toutes facilités pour l'approvisionnement en bacilles. Nous remercions également la ELLA SACHS PLOTZ Foundation for the Advancement of Science (Boston), et la Fondation WAKSMAN pour le développement des Etudes microbiologiques en France, pour des subventions ayant facilité notre travail.

### Summary

After a short general survey of recent research on the lipids of mycobacteria, a more detailed treatment is given of the chemistry of the mycolic acids, which make up 8.3% of the dry weight of the human virulent strain studied. Chromatography separates them into two acids ( $\alpha$  and  $\beta$ , table II). The elementary analysis of the two mycolic acids and of a number of their derivatives confirms the molecular formula  $C_{88}H_{176}O_4$  proposed by ANDERSON in 1938 (table III). 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 one.

The hydroxyl group of the mycolic acids is in the  $\beta$ -position with respect to the carboxyl group. The mycolic acids of the two virulent human strains studied in detail have an unbranched side chain of 24 carbon atoms in the  $\alpha$ -position. The pyrolysis of mycolic acid, which leads to *n*-hexacosanoic acid, is a reaction characteristic of  $\beta$ -hydroxy-acids having a side chain in the  $\alpha$ -position.

Mycolic acids, at least one of which is present in all the strains of mycobacteria examined up to now (table IV, V), are defined as  $\beta$ -hydroxy-acids of high molecular

<sup>1</sup> H. SHERMAN, J. Inf. Diseases 12, 249 (1913). — T. H. BENIANS, J. Path. Bact. 17, 199 (1912-1913).

<sup>2</sup> J. ASSELINÉAU et E. LEDERER, Bull. Soc. chim. biol. 31, 492 (1949).

<sup>3</sup> N. FETHKE et R. J. ANDERSON, Amer. Rev. Tuberc. 57, 294 (1948).

<sup>4</sup> D. YEGIAN et R. J. VANDERLINDE, J. Bact. 54, 777 (1947).

<sup>1</sup> H. SHERMAN, J. Inf. Diseases 12, 249 (1913). — T. H. BENIANS, J. Path. Bact. 17, 199 (1912-1913).

<sup>2</sup> J. ASSELINÉAU, Thèse Doctorat ès Sciences (Paris 1950).

<sup>3</sup> R. J. ANDERSON, R. E. REEVES, M. M. CREIGHTON et W. C. LOTHROP, Amer. Rev. Tuberc. 48, 65 (1943).

weight which contain a long aliphatic side chain in the  $\alpha$ -position.

The mycolic acids are mostly linked up, in the bacilli within acetone-insoluble lipopolysaccharides of high molecular weight. Human virulent strains differ from others by containing three characteristic amino acids in their lipopolysaccharide (alanine, glutamic acid, and

$\alpha, \epsilon$ -diamino-pimelic acid) (fig. 1). The percentage of this N-containing lipopolysaccharide seems to be roughly parallel to the virulence of the strains (tables VI, VII).

The last chapter discusses the biological properties of the different lipid fractions. Particular attention is paid to the cord factor of H. BLOCH and to the problem of acid-fastness.

## Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. — Für die kurzen Mitteilungen ist ausschließlich der Autor verantwortlich. — Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. — The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

### *o*-Quinones as Dienophiles

In view of the recent publication<sup>1</sup> concerning the reactions between *o*-quinones and olefines, we would like to state our results. Full details will be published elsewhere.

*o*-Benzooquinone in ether reacts rapidly with excess cyclo-pentadiene to give a pale yellow, rather unstable adduct of the formula  $C_{17}H_{14}O_4$ ; i. e. two molecules of quinone to one of diene.

Dissolved in dry ether, tetrabrom-*o*-benzoquinone reacts rapidly with cyclopentadiene at room temperature, to give 3 products:

(1) This is deposited from the reaction mixture in 26% yield. It is a diketone, m. p. 205° (dec.), giving a quinoxaline m. p. 215° (dec.). This quinoxaline has also been described by HORNER and MERZ<sup>1</sup> (l. c.). The diketone readily adds water to give a colourless, thermally unstable hydrate.

(2) The benzodioxan derivative described by the above authors, m. p. 122° from ethanol; crystallised from benzene it forms solvated crystals, m. p. 96°, which effloresce in air. Yield—30%.

(3) A very small amount of a yellow substance, m. p. 140°, of the same empirical formula as 1, but in contrast to it, containing reactive bromine. On heating above its melting point it rearranges to give 1.

A quantity of tar is formed as well.

In suspension in acetone, 4-acetylamino-*o*-benzoquinone adds cyclopentadiene to give a yellow, thermally unstable adduct, m. p. c. 145° (dec.), of formula  $C_{13}H_{14}O_3N$ . This fails to give a quinoxaline, but is readily converted by dilute alkali to a colourless isomer, m. p. 200° (dec.), which gives the characteristic colour reactions of catechol, and can readily be oxidised to a red substance.

An attempt to add butadiene to tetrabrom-*o*-benzoquinone in ether at 100° gave a very small amount of a colourless, unidentified substance. Attempts to add butadiene to the other two quinones, and an attempt to add furan to *o*-benzoquinone failed.

J. A. BARLTROP and JOHN A. D. JEFFREYS

The Dyson Perrins Laboratory, Oxford, December 30, 1950.

### Zusammenfassung

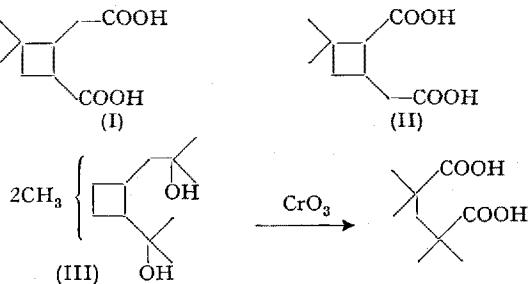
Beim Zusatz von Cyclopentadien zu *o*-Benzochinon entsteht eine Verbindung, in welcher zwei Moleküle von Chinon an einem Molekül von Dien gebunden sind. Butadien und Furan werden nicht addiert.

Cyclopentadien gibt mit Tetrabrom-*o*-benzochinon drei Stoffe; ein Diketon, ein Benzodioxan und einen dritten Stoff von unbekannter Bauart. Bei Verwendung von Butadien haben wir nur Spuren eines Produktes gefunden.

4-Acetylamino-*o*-benzochinon addiert Cyclopentadien unter Bildung eines Diketones, welches beim Zusatz von Natronlauge sehr glatt in ein Catechol übergeht. Butadien reagiert nicht.

### Zur Konstitution der Caryophyllensäure

In der Literatur ist die Ansicht vertreten worden, daß eine Entscheidung zwischen den auf Grund des oxydativen Abbaus<sup>1</sup> für die Caryophyllensäure in Frage kommenden Konstitutionsformeln (I) und (II) nur durch Synthese möglich sei.



D. H. R. BARTON<sup>2</sup> hat hingegen kürzlich darauf hingewiesen, daß die Oxydation des Tetramethylglykols (III) zu  $\alpha, \alpha, \alpha', \alpha'$ -Tetramethylglutarsäure<sup>3</sup> für die Caryophyllensäure die Formel (II) ausschließt. In Übereinstimmung damit haben F. L. DAWSON und G. R. RAMAGE<sup>4</sup> fest-

<sup>1</sup> W. C. EVANS, G. R. RAMAGE und J. L. SIMONSEN, J. Chem. Soc. London 1934, 1806. — L. Ruzicka und W. ZIMMERMANN, Helv. chim. acta 18, 219 (1935).

<sup>2</sup> D. H. R. BARTON, J. org. Chem. 15, 457 (1950).

<sup>3</sup> L. Ruzicka, J. C. BARDHAN und A. H. WIND, Helv. chim. acta 14, 423 (1931).

<sup>4</sup> F. L. DAWSON und G. R. RAMAGE, J. Chem. Soc., London 1950, 3523.