

ISOLEMENT D'UN DIGALACTOSIDE ET D'UN MYCOLATE DE DIARABINOSIDE A PARTIR DE CIRES D D'UNE SOUCHE HUMAINE VIRULENTE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* *

E.VILKAS et J.MARKOVITS

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette

Reçu le 18 Octobre 1968

1. Introduction

Les cires D, peptidoglycocolipides macromoléculaires de *Mycobacterium tuberculosis*, présentent une grande parenté structurale avec les parois de ces bactéries et semblent jouer un rôle très important dans des phénomènes immunologiques [1-5].

Récemment, nous avons décrit quelques propriétés du polysaccharide des cires D d'une souche humaine virulente de *M. tuberculosis* (souche Prévois). Ce polysaccharide est un arabinogalactane contenant de l'arabinose et du galactose en proportions approximatives $\frac{5}{2}$; les unités d'arabinose sont liées, pour la plupart, par une liaison glycosidique en 1-5, tandis que celles du galactose sont liées en 1-4 [6].

Afin d'élucider sa structure plus en détail, nous avons cherché à obtenir, par hydrolyse partielle, des oligosaccharides contenant un nombre d'oses limité.

Dans la présente communication, nous rapportons l'obtention, à partir de cires D intactes, d'un digalactoside et d'un mycolate d'arabinobiose par extraction au moyen d'acide trichloroacétique.

2. Matériel et méthodes

Les cires D de la souche Prévois ont été préparées selon la méthode décrite précédemment [6]. Leur extraction a été effectuée par l'acide trichloroacétique à 10% en chauffant le mélange réactionnel pendant 4 h à 60°, puis pendant 20 h à 40°, sous agitation. Les

* 111ème communication sur les constituants des Mycobactéries; 110ème comm., voir E.Vilkas, J.M.Delaumény et C. Nacasch, Biochim. Biophys. Acta 158 (1968) 147.

phases organique et hydrosoluble sont séparées par épuisement de cette dernière par le chloroforme et l'éther. Les solutions organiques sont concentrées sous pression réduite et les solutions aqueuses lyophilisées.

Pour les chromatographies sur papier Whatman no. 1, on utilise comme solvants:

- a) butanol-acide acétique-eau, 4:1:5
- b) isopropanol-acide acétique-eau, 3:1:1
- c) butanol-pyridine-eau, 6:4:3
- d) butanol-éthanol-eau, 10:1:2
- e) acétone-eau, 9:1

Les révélations sont faites par NO_3Ag alcalin ou par le phtalate d'aniline.

Les oxydations periodiques sont effectuées par NaIO_4 , 0,05 M à la température ambiante, à l'obscurité, pendant 48 à 72 h. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à 0° et additionné d'éthanol. L'iode de soude formé est filtré et le produit d'oxydation chromatographié sur papier. La réduction par NaBH_4 est faite à la température ambiante, pendant 2 à 3 heures, puis la solution traitée par Dowex 50 (H^+) et débarrassée du borate par évaporations sous vide avec du méthanol. Les hydrolyses acides sont effectuées par HCl 1,5 N pendant 4 à 6 h.

3. Résultats et discussion

The produit d'extraction par l'acide trichloroacétique a pu être séparé en deux fractions:

- a) une fraction hydrosoluble,
- b) une fraction chloroformosoluble.

3.1. Fraction hydrosoluble

La chromatographie sur papier de cette fraction dans les solvants A, B et C montre la présence de grandes quantités d'arabinose et galactose libres, accompagnés toutefois de différents oligosaccharides.

Par chromatographie préparative dans le solvant B, pendant 5 jours, avec écoulement du solvant, nous avons pu isoler une substance ayant une vitesse de migration voisine de celle du tréhalose (R_f tréhalose: 0,82). Son hydrolyse acide fournit uniquement du D-galactose, $[\alpha]_D + 80^\circ$, identifié par chromatographie sur papier. Le dosage par la méthode au phénol-acide sulfurique [7] montre que cette substance est composée uniquement de sucres réducteurs. La réduction par NaBH_4 effectuée sur le produit élué du papier, complète après 2 h 30, suivie du dosage de sucres par la même méthode, permet d'observer une diminution de 44% de l'intensité d'absorption. La présence de borate ne gêne pas le dosage [8].

Le produit est également soumis à l'oxydation périodique suivie de la réduction par NaBH_4 . Après le traitement habituel, le produit de la réaction est chromatographié dans le solvant E; il contient uniquement du glycérol $R_f = 0,6$ et du thréitol $R_f = 0,54$.

Ces résultats permettent de conclure que la substance étudiée est un *digalactoside dont les deux galactoses sont liés en 1-4* *.

3.2. Fraction chloroformsoluble

La partie liposoluble, après méthylation par le diazométhane, a été chromatographiée sur trisilicate de Mg-célite (2:1) en utilisant comme éluant le chloroforme pur, puis le chloroforme contenant des quantités croissantes de méthanol.

La fraction élue par le chloroforme à 2% de méthanol est un glycolipide dont l'hydrolyse acide libère des acides mycoliques et de l'arabinose.

Le dosage des sucres montre la présence de 22% d'arabinose. Les acides mycoliques ont pu être identifiés par la chromatographie en couche mince de leurs esters méthyliques [9]. Leur spectre de masse (MS9 avec introduction directe) confirme qu'il s'agit du même type d'acide mycolique que celui identifié précédemment dans le cord factor de la même souche [10].

* Un disaccharide ayant un comportement chromatographique et des propriétés analogues a été isolé dans notre laboratoire à partir des parois de deux souches de *M. tuberculosis*: H37R_v et H37R_a (C.Nacasch et E.Vilkas, mémoire en cours de rédaction).

L'hydrolyse alcaline (NaOH 0,5 N à 37° pendant 2 h) du glycolipide fournit l'acide mycolique et un produit migrant dans le solvant D (5 jours) également dans le voisinage du tréhalose (R_f tréhalose: 0,97). Ce produit est isolé, comme le digalactoside, par chromatographie préparative sur papier dans les mêmes conditions; par hydrolyse acide il donne uniquement de l'arabinose. Les dosages de sucres présents avant et après sa réduction par NaBH_4 indiquent qu'il s'agit d'un diarabinoside.

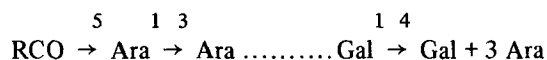
La libération d'acide mycolique et de l'arabinobiose au cours de l'hydrolyse alcaline montre que l'acide gras est lié par une liaison ester à l'arabinose.

L'arabinobiose est soumis à l'oxydation périodique suivie de réduction par NaBH_4 et hydrolyse acide. Les chromatographies sur papier des produits obtenus dans les solvants A et E permettent d'identifier le glycérol ($R_f = 0,50$ solvant A) et l'érythritol ($R_f = 0,38$, même solvant). L'obtention de l'érythritol à partir d'arabinose réducteur semble indiquer une liaison 1-3 entre les deux pentoses.

Rappelons que parmi les produits d'oxydation périodique du polysaccharide intact nous avons pu retrouver environ 1 mol d'arabinose sur 7 sucres non oxydé. D'autre part, la perméthylation du polysaccharide permet d'obtenir à côté des tri- et di-*O*-méthylarabinoses, un dérivé monométhylé [6] donnant un test négatif avec le chlorure de triphényl tétrazolium [11], donc très probablement le 2-*O*-méthylarabinose.

Un mycolate de diarabinose a été déjà isolé par les auteurs japonais à partir des lipides liés d'une souche de *M. tuberculosis* [12], mais sans aucune précision quant à la liaison entre les deux sucres. A partir de cires D les mêmes auteurs ont obtenu un mycolate d'arabinose dans lequel l'acide mycolique estérifie l'hydroxyle-5 de l'arabinose [13].

D'après ces résultats, nous pouvons envisager pour le polysaccharide des cires D la structure partielle suivante:



RCOOH = acides mycoliques.

Il reste à déterminer la position des trois autres molécules d'arabinose. Nous pensons pouvoir résoudre ce problème en étudiant les oligosaccharides formés par acétolyse du polysaccharide des cires D. Les faibles quantités de produits de dégradation obtenues rendent cette étude très délicate.

Remerciements

Ce travail a bénéficié d'une aide financière de l'Organisation Mondiale de la Santé, Genève.

Références

- [1] R.G.White, L.Bernstock, R.G.S.Johns et E.Lederer, *Immunology* 1 (1958) 54.
- [2] C.M.Pearson, B.H.Waksman et J.T.Sharp, *J. Exp. Med.* 113 (1961) 485.
- [3] R.G.White, P.Jollès, D.Samour et E.Lederer, *Immunology* 7 (1964) 71.
- [4] A.Tanaka, K.Tanaka, T.Tsubone, Y.Kuroda et K.Sugiyama, *Int. Arch. Allergy* 28 (1965) 340.
- [5] F.Bonhomme, C.Boucheron, D.Migliore et P.Jollès, *C.R. Acad. Sci.* 263 (1966) 1422.
- [6] E.Vilkas, J.M.Delaumény et C.Nacasch, *Biochim. Biophys. Acta* 158 (1968) 150.
- [7] M.Dubos, M.Gilles, K.A.Hamilton, P.A.Rebers et F.Smith, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350.
- [8] S.Peat, W.J.Whelan et J.G.Roberts, *J. Chem. Soc.* (1956) 2258.
- [9] G.Lanéelle, *C.R. Acad. Sci.* 257 (1963) 781.
- [10] A.Adam, M.Senn, E.Vilkas et E.Lederer, *European J. Biochem.* 2 (1967) 460.
- [11] W.E.Trevelyan, D.P.Procter et J.S.Harrison, *Nature* 166 (1950) 444.
- [12] I.Azuma et Y.Yamamura, *J. Biochem. Tokyo* 52 (1962) 200.
- [13] I.Azuma et Y.Yamamura, *J. Biochem. Tokyo* 53 (1963) 275; *ibid.* 57.