

CARACTERISATION DE GLYCOLIPIDES DANS UNE SOUCHE DE *NOCARDIA BRASILIENSIS* *

M.A. LANÉELLE et J. ASSELINEAU

Laboratoire de Chimie-Biologique, 84 Grande Rue St-Michel, 31-Toulouse, France

Received 27 January 1970

Several glycolipid fractions have been isolated from the bound lipids of *N. brasiliensis*. The main fraction was characterized as a monoester of nocardomycolic acids and D-arabinose. Fractionation of the free lipids yielded a glycolipid fraction consisting of nocardomycolic acids, arabinose, galactose and several amino acids. This last fraction appears to be similar to wax D of *Mycobacteria*; mild acid treatment of this fraction produced arabinose mononocardomycolate.

Certains constituants des lipides de *Nocardia*, tels que les acides nocardomycoliques [1, 2] et les nocardones [3, 4], ont fait l'objet d'études détaillées. Cependant, il existe peu d'information sur la nature des lipides complexes, en dehors de l'existence de mannosides de phosphatidyl-inositol [2], et des peptidolipides chez *N. asteroides* [5].

On pouvait se demander si la similitude de structure entre acides mycoliques et acides nocardomycoliques se poursuit jusque dans leurs combinaisons complexes, et si ces acides font partie, les uns et les autres, de molécules susceptibles de jouer des rôles analogues dans la vie de la cellule.

Plusieurs glycolipides contenant des acides mycoliques ont été isolés des lipides des *Mycobactéries* [6]. Nous avons recherché si des glycolipides contenant des acides nocardomycoliques existent chez des *Nocardia*. Dans la présente note, nous décrivons l'isolement, à partir des lipides libres et des lipides liés de *N. brasiliensis*, de plusieurs fractions glycolipidiques à acides nocardomycoliques.

Les lipides liés ont été extraits selon Azuma et Yamamura [7], et chromatographiés sur florisol. Avec du chloroforme contenant une proportion croissante

de méthanol, plusieurs fractions de glycolipides sont isolées, dont l'hydrolyse fournit, soit de l'arabinose, soit de l'arabinose et du galactose.

La fraction la moins adsorbée (éluee par chloroforme-méthanol 95:5) $\{\alpha\}_D + 16^\circ$ (chloroforme, $c = 2,0$) présente un spectre I.R. d'esters de sucre (bande CO ester à $5,75 \mu\text{m}$, forte absorption entre 8 et $10 \mu\text{m}$, bande $(\text{CH}_2)_x$ à $13,9 \mu\text{m}$).

Par transestérification (3 h à 37°C dans KOH méthanolique 0,5 N), elle est scindée en esters d'acides gras et partie hydrosoluble. Le seul constituant hydrosoluble décelable est l'arabinose libre. Les esters d'acides gras migrent, en chromatographie en couche mince (silicagel G), comme des nocardomycolates de méthyle. L'examen de leur spectre de masse met en évidence quatre constituants prépondérants, A, B, C et D (formules brutes respectives des acides libres: $\text{C}_{56}\text{H}_{106}\text{O}_3$, $\text{C}_{56}\text{H}_{108}\text{O}_3$, $\text{C}_{58}\text{H}_{110}\text{O}_3$, $\text{C}_{60}\text{H}_{114}\text{O}_3$), accompagnés d'homologues inférieurs en $\text{C}_{52}\text{H}_{100}\text{O}_3$, $\text{C}_{54}\text{H}_{104}\text{O}_3$ et $\text{C}_{54}\text{H}_{102}\text{O}_3$. Le pouvoir rotatoire fortement dextrogyre de ce lipide montre qu'il contient du D-arabinose; cette fraction consiste donc en nocardomycolates de D-arabinose.

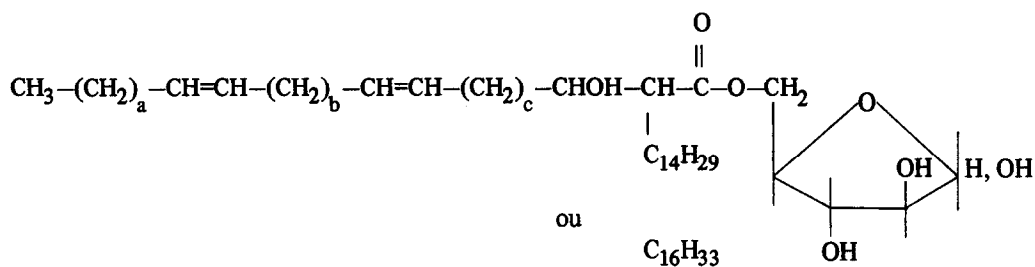
Ce mélange d'esters de sucre est peracétylé (par l'anhydride acétique dans la pyridine). Le spectre de masse du produit peracétylé montre qu'il s'agit de monoesters, renferment quatre constituants principaux, correspondants aux acides nocardomycoliques A, B, C et D. Ce spectre présente un pic à m/e 217 dû à l'ion oxonium réarrangé provenant du sucre [8, 9].

* 23e communication sur la chimie des micro-organismes; 22e communication: J.F. Toccanne et M. Welby-Gieusse, Tetrahedron, sous presse. Ce travail fait partie de la thèse de Doctorat es-Sciences que M.A. Lanéelle a soutenue le 20 Décembre 1969.

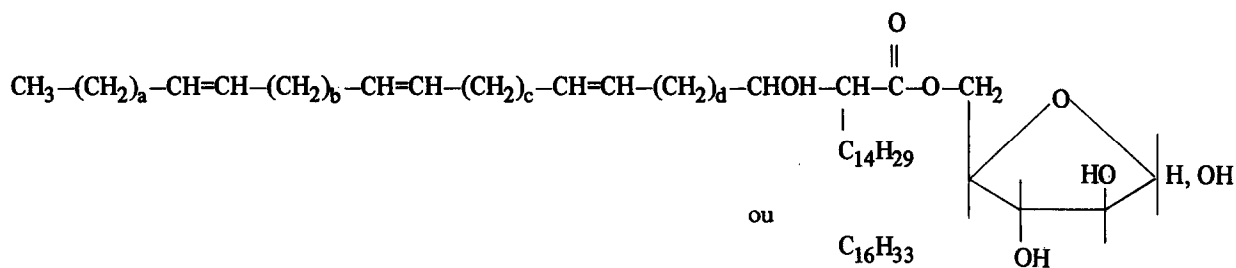
Tableau 1
Principaux pics observés dans le spectre de masse des nocardomycolates d'arabinose.

Acides nocardomycoliques (formules brutes)	Nocardomycolates d'arabinose acétylés (poids moléculaire)	Pics de plus haute masse		pic résultant du départ du sucre + partie de 1 H $R-CH=C-\overset{+}{C}\equiv O$ C_nH_{2n+1} (n = 14 ou 16)* m/e
		départ de 2 CH_3CO_2H m/e	départ de 4 CH_3CO_2H m/e	
A-C ₅₆ H ₁₀₆ O ₃	C ₆₉ H ₁₂₂ O ₁₁ (1126)	1006 (1126-120)	886 (1126-240)	790
C-C ₅₆ H ₁₀₈ O ₃	C ₆₉ H ₁₂₄ O ₁₁ (1128)	1008 (1128-120)	888 (1128-240)	792
C-C ₅₈ H ₁₁₀ O ₃	C ₇₁ H ₁₂₆ O ₁₁ (1154)	1034 (1154-120)	914 (1154-240)	818
D-C ₆₀ H ₁₁₄ O ₃	C ₇₃ H ₁₃₀ O ₁₁ (1182)	1062 (1182-120)	942 (1182-240)	846

* pour un acide nocardomycolique $R-CHOH-CH(COOH)-C_{14}$ ou $16H_{29}$ ou 33 .



I $a + b + c = 32, 34$



II $a + b + c + d = 32, 34, 36$.

Les principaux pics observés dans la région des masses élevées sont mentionnés dans le tableau 1 (voir 8 et 9). Le spectre de R.M.N. confirme la nature mono-nocardomycolate d'arabinose de ce produit. Ni le spectre de masse, ni le spectre de R.M.N., ne permettent de conclure quant à la position du reste acyle sur l'arabinose. Si l'analogie entre mycolates d'arabinose et nocardomycolates d'arabinose est effective, les nocardomycolates d'arabinose auraient pour formules (I) et (II) (la position 5 du reste mycoloylé sur l'arabinofuranose ayant été démontrée [7]).

Les fractions de lipides liés plus adsorbées sur florissil contiennent des nocardomycolates d'oligosaccharides constitués d'arabinose. Une de ces fractions (élue par chloroforme-méthanol 9:1) consiste en mononocardomycolates d'arabinosyl-arabinose. Par saponification, elle fournit un constituant hydrosoluble qui se comporte, en chromatographie sur papier, comme un disaccharide, et qui libère uniquement de l'arabinose par hydrolyse acide.

D'autre part, en appliquant aux lipides "libres" de cette bactérie le mode de fractionnement habituellement utilisé dans le cas des lipides de mycobactéries, [6], nous avons isolé, en faible proportion, une fraction de "cires D".

La saponification des cires D libère des acides gras, dont les esters méthyliques se comportent en chromatographie sur couche mince, comme des nocardomycolates de méthyle. L'hydrolyse acide fournit une partie hydrosoluble dans laquelle nous avons caractérisé le galactose et l'arabinose. Un hydrolysât (obtenu par action de HCl 4 N à 110°C pendant 4 h) a été chromatographié sur charbon-célite (1:1 p/p), ce qui nous a permis de mettre en évidence de la glucosamine, (en faible proportion) et de l'acide muramique. L'analyse des acides aminés (après hydrolyse par HCl 6 N à 110°C pendant 16 h) montre la présence d'alanine, acides glutamique et diaminopimélique, à côté de quelques autres. Ces divers constituants sont les constituants caractéristiques des peptido-glycolipides des cires D de Mycobactéries [6].

Enfin, en traitant les cires D de *N. brasiliensis* par le même solvant acide qui est utilisé pour l'extraction des lipides liés [7], on obtient un produit partiellement hydrolysé à partir duquel nous avons isolé par chromatographie sur couche mince, une fraction glycolipidique (révélée par le réactif des glycolipides [10]), ayant les mêmes propriétés que les mono-nocardomycolates d'arabinose isolés des lipides liés.

Rappelons que, dans ces conditions, des mycolates d'arabinose sont isolés des cires D de mycobactéries [11]. Ces résultats mettent en évidence, chez *N. brasiliensis*, une fraction peptido-glycolipidique, dans laquelle des acides nocardomycoliques estérifient des résidues d'arabinose.

La souche de *Nocardia* étudiée renferme donc une fraction peptido-glycolipidique qui possède les mêmes constituants que les cires D de *M. tuberculosis*. D'autre part, l'isolement de nocardomycolates d'arabinose, plus ou moins riches en résidus d'arabinose, à partir des liés, traduit l'existence d'esters nocardomycoliques de polysaccharides liés à des structures insolubles (par exemple, peptidoglycane). Cette situation est tout à fait parallèle à celle qui a été observée chez les Mycobactéries [12].

Les cellules tuées de Mycobactéries possèdent des propriétés adjuvantes [13], et des *Nocardia* peuvent remplacer les Mycobactéries dans la préparation de l'adjuvant de Freund [13]. Les peptido-glycolipides des cires D de Mycobactéries, qui sont douées de propriétés adjuvantes [14], sont très probablement responsables, en partie au moins, de l'activité adjuvante de cellules de Mycobactéries. La présence de peptido-glycolipides similaires chez les Mycobactéries et chez les *Nocardia* est en accord avec la similitude de comportement des corps bactériens dans ce phénomène. Azuma [15] a isolé des nocardomycolates d'arabinose à partir d'une souche de *N. asteroides*, ce qui montre que ce type de constituant peut exister chez diverses espèces de *Nocardia*.

Référence

- [1] C.Bordet, A.M.Etemadi, G.Michel et E.Lederer, Bull. Soc. Chim. France (1965) 234.
- [2] M.A.Lanéelle, J.Asselineau et G.Castelnuovo Ann. Inst. Pasteur 108 (1965) 69.
- [3] C.Bordet et G.Michel, Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) Ser. C 262 (1966) 1810.
- [4] M.A.Lanéelle, Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) 263 (1966) 560.
- [5] M.Guinand et G.Michel, Biochim. Biophys. Acta 125 (1966) 75.
- [6] J.Asselineau, The bacterial lipids, ed. Herman (Paris, 1966) p. 239.
- [7] I.Azuma et Y.Yamamura, J. Biochem. Japan 52 (1962) 200; 53 (1963) 275.

- [8] A.Adam, M.Senn, E.Vilkas et E.Lederer, *European J. Biochem.* 2 (1967) 460.
- [9] N.P.V.Acharya, M.Senn et E.Lederer, *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) Ser. C* 264 (1967) 2173.
- [10] N.Shaw, *Biochim. Biophys. Acta* 164 (1968) 435.
- [11] I.Azuma, H.Kimura et Y.Yamamura, *J. Biochem. Japan* 57 (1965) 571.
- [12] I.Azuma, Y.Yamamura et K.Fukushi, *J. Bacteriol.* 96 (1968) 1885.
- [13] J.Freund, *Advan. Tuberculosis Res.* 7 (1956) 130.
- [14] R.G.White, P.Jolles, D.Samour et E.Lederer, *Immunology* 7 (1964) 158.
- [15] I.Azuma, communication personnelle.