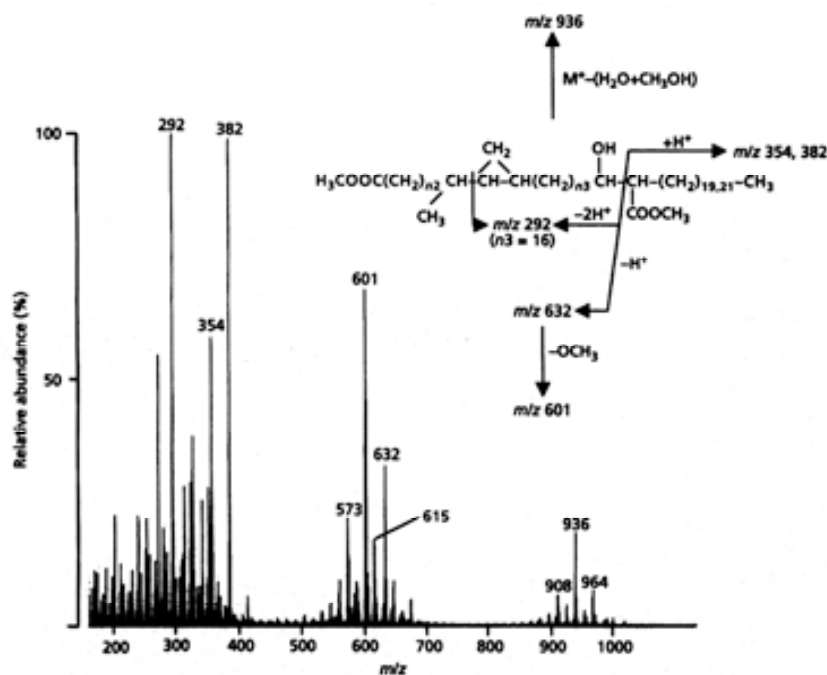


Detecció, purificació i caracterització estructural de compostos lipídics de la paret micobacteriana



Departament de Genètica i de Microbiologia
Unitat de Microbiologia
Grup de recerca en Micobacteris

Detecció, purificació i caracterització estructural de compostos lipídics de la paret micobacteriana

Tesi doctoral

setembre de 2011

Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i de Microbiologia
Unitat de Microbiologia
Grup de recerca en Micobacteris



Universitat Autònoma de Barcelona

pep astola vargas

Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Genètica i de Microbiologia
Unitat de Microbiologia
Grup de recerca en Micobacteris

Facultat de Biociències

Detecció, purificació i caracterització estructural
de compostos lipídics de la paret micobacteriana

Treball presentat pel pep astola vargas per
optar al grau de doctor en Microbiologia

Directora:

Marina Luquin Fernàndez

Bellaterra, setembre de 2011

Detecció, purificació i
caracterització estructural de
compostos lipídics de la paret
micobacteriana

Bellaterra, setembre de 2011

Esto está presentado como obra de ficción y no se dedica a nadie

C. Bukowski. Cartero.

Sumari

Presentació	pàg. 7
Acrònims	pàg. 9
Introducció	pàg. 12
I.1 Micobacteris: importància i característiques generals	pàg. 13
I.2 Envoltament cel·lular de <i>Mycobacterium</i>	pàg. 16
I.2.1 Membrana plasmàtica	pàg. 17
I.2.2 Paret cel·lular	pàg. 17
I.2.2.1 Organització	pàg. 17
I.2.2.2 Implicacions de la paret a les característiques del gènere <i>Mycobacterium</i>	pàg. 22
I.2.2.3 Components de la paret: estructura, funcions i distribució	pàg. 23
I.2.2.3.1 Peptidoglicà	pàg. 23
I.2.2.3.2 Arabinogalactà (AG)	pàg. 24
I.2.2.3.3 Àcids micòlics	pàg. 26
I.2.2.3.3.1 Valor taxonòmic dels àcids micòlics	pàg. 32
I.2.2.3.3.1.1 Anàlisi dels àcids micòlics per cromatografia de capa fina (CCF)	pàg. 35
I.2.2.3.3.1.2 Anàlisi dels àcids micòlics per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)	pàg. 36
I.2.2.3.4 Lípids i glicolípid associats a la paret (lliures)	pàg. 44
I.2.2.3.4.1 Lipoglicans	pàg. 44
I.2.2.3.4.1.1 Fosfatidilinositolmanòsids (PIMs)	pàg. 45
I.2.2.3.4.1.2 Lipoarabinomanà i lipomanà	pàg. 46
I.2.2.3.4.2 Trealoses acilades	pàg. 49
I.2.2.3.4.2.1 Trealosa dimicolat (CF)	pàg. 50
I.2.2.3.4.2.2 Sulfolípids (SLs)	pàg. 51

I.2.2.3.4.2.3 Lipooligosacàrids (LOS)	pàg. 52
I.2.2.3.4.2.4 Altres trealoses acilades	pàg. 53
I.2.2.3.4.3 Dimicocerosats de phthiocerol (DIMs)	pàg. 54
I.2.2.3.4.4 Glicolípidis fenòlics (PGLs)	pàg. 55
I.2.2.3.4.5 Glicopeptidolípidis (GPLs)	pàg. 57
I.3 <i>Mycobacterium gordonae</i> : trets característics	pàg. 59
I.4 <i>Mycobacterium brumae</i> : trets característics	pàg. 62
Objectius	pàg. 65
Materials i mètodes	pàg. 67
M.1 Cultiu de les soques	pàg. 68
M.2 Obtenció i derivatització dels extractes lipídics	pàg. 69
M.2.1 Obtenció dels extractes lipídics	pàg. 69
M.2.2 Derivatització dels productes saponificats a èsters metílics amb diazometà	pàg. 70
M.2.3 Derivatització dels productes saponificats a <i>p</i> -bromofenacil èsters	pàg. 71
M.2.4 Trencament oxidatiu dels dobles enllaços	pàg. 71
M.2.5 Derivatització dels productes saponificats a derivats pirròlids	pàg. 72
M.3 Purificació dels extractes	pàg. 72
M.3.1 Precipitació en acetona freda	pàg. 72
M.3.2 Precipitació en metanol fred	pàg. 73
M.3.3 Cromatografia líquida	pàg. 73
M.3.4 Cromatografia líquida en fase reversa	pàg. 74
M.3.5 Cromatografia de capa fina preparativa (CCFp)	pàg. 75
M.3.6 Cromatografia de capa fina argèntica	pàg. 76
M.4 Tècniques analítiques i instrumentació	pàg. 76
M.4.1 Cromatografia de capa fina (CCF)	pàg. 76
M.4.1.1 Reveladors específics utilitzats en CCF	pàg. 77
M.4.2 Espectrometria d'infraroig (IR)	pàg. 78

M.4.3 Anàlisi dels compostos lipídics per cromatografia gas-líquid (GLC) i cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS)	pàg. 78
M.4.4 Anàlisi del contingut d'àcids micòlics per HPLC	pàg. 79
M.4.5 Ressonància magnètica nuclear (RMN)	pàg. 80
M.4.6 Espectrometria de masses (MS)	pàg. 80
M.4.7 Rotació òptica	pàg. 81
M.4.8 Espectrometria de masses amb analitzador de temps de vol i desorpció làser assistida per matriu (MALDI-TOF/MS)	pàg. 81
M.4.9 Piròlisi dels èsters metílics d'àcids grassos	pàg. 81
M.4.10 Hidrogenació catalítica de dobles enllaços en alcohols de cadena llarga	pàg. 82
Resultats	pàg. 83
R.1 Estudi del <i>M. gordonae</i>	pàg. 84
R.1.1 Anàlisi del contingut en àcids micòlics per HPLC	pàg. 84
R.1.2 Anàlisi dels àcids micòlics per CCF	pàg. 84
R.1.3 Anàlisi dels àcids grassos, alcohols i productes de piròlisi dels àcids micòlics per GLC	pàg. 87
R.1.4 Purificació dels àcids micòlics per cromatografia líquida	pàg. 90
R1.5 Estudi estructural del compost problema del <i>M. gordonae</i>	pàg. 94
R.1.6 Estructura de la resta d'àcids micòlics: α -, metoxi- i ceto-micolats	pàg. 98
R.2 Estudi del <i>M. brumae</i>	pàg. 113
R.2.1 Anàlisi del contingut en àcids micòlics per HPLC	pàg. 113
R.2.2 Purificació i estudi estructural del pic desconegut	pàg. 116
Discussió	pàg. 129
Conclusions	pàg. 139

Bibliografia	pàg. 142
Articles	pàg. 169
Agraïments	pàg. 193

Sumari de figures

Figura 1	pàg. 18	figura 2	pàg. 19
Figura 3	pàg. 21	figura 4	pàg. 27
Figura 5	pàg. 36	figura 6	pàg. 37
Figura 7	pàg. 39	figura 8	pàg. 41
Figura 9	pàg. 43	figura 10	pàg. 45
Figura 11	pàg. 49	figura 12	pàg. 52
Figura 13	pàg. 57	figura 14	pàg. 58
Figura 15	pàg. 61	figura 16	pàg. 64
Figura 17	pàg. 85	figura 18	pàg. 86
Figura 19	pàg. 87	figura 20	pàg. 88
Figura 21	pàg. 89	figura 22	pàg. 91
Figura 23	pàg. 93	figura 24	pàg. 94
Figura 25	pàg. 95	figura 26	pàg. 97
Figura 27	pàg. 98	figura 28	pàg. 100
Figura 29	pàg. 101	figura 30	pàg. 102
Figura 31	pàg. 104	figura 32	pàg. 105
Figura 33	pàg. 106	figura 34	pàg. 108
Figura 35	pàg. 109	figura 36	pàg. 110
Figura 37	pàg. 114	figura 38	pàg. 115
Figura 39	pàg. 117	figura 40	pàg. 118
Figura 41	pàg. 118	figura 42	pàg. 120
Figura 43	pàg. 122	figura 44	pàg. 123
Figura 45	pàg. 124	figura 46	pàg. 125
Figura 47	pàg. 126	figura 48	pàg. 128

Sumari de taules

Taula 1	pàg. 28
Taula 2	pàg. 33
Taula 3	pàg. 111
Taula 4	pàg. 119
Taula 5	pàg. 122

Presentació

Els micobacteris són un grup de microorganismes que en la seva majoria són sapròfits, malgrat això aquest grup concentra agents causals d'enfermetats tan antigues i conegudes com la tuberculosi (TB) i la lepra juntament amb d'altres de més desconegudes com la úlçera de Buruli.

Si deixem de banda la TB i la lepra, trobem un important nombre de micobacteris, anomenats ambientals o micobacteris no tuberculosos (MNT), que malgrat el seu saprofitisme poden causar malalties secundàries en els éssers humans principalment a causa d'una immunosupressió. Dels més de 130 micobacteris MNT, aproximadament un terç podrien estar al darrera de les denominades micobacteriosis, dada a tenir en compte sobretot quan tractem amb enfermetats immunosupressores (la SIDA en seria l'exemple més conegut).

El grup de micobacteris MNT tenen una gran versatilitat d'ecosistemes on poden sobreviure, podent colonitzar ambients diversos entre els que destaca per la seva importància la xarxa d'aigües de distribució, inclosa la xarxa sanitària, el que fa que puguin estar en contacte amb la majoria de la població.

En aquest treball hem identificat primer, per purificar i caracteritzar després, dos components lipídics de la paret cel·lular de dos micobacteris ambientals com són el *Mycobacterium gordonae* i el *Mycobacterium brumae*. La característica comuna en ambdós treballs ha estat la identificació/detecció dels components problema mitjançant la tècnica de l'HPLC. Aquesta tècnica cromatogràfica ens ha permès descobrir un patró diferent al ja conegut i a partir d'aquí començar la feina de purificar i caracteritzar el/els compostos

responsables d'aquesta diferència. El fet de ser uns components capaços de modificar el patró cromatogràfic conegut d'aquelles espècies ja era un raó prou important per dur a terme la seva caracterització.

En relació amb els components estudiats al *M. brumae*, en realitat són una família de compostos, en el nostre laboratori es va fer la feina de la detecció, creixement del micobacteri i posterior purificació del compost. La seva caracterització estructural, excepte els estudis de RMN, i els estudis metabòlics es van dur a terme principalment a Toulouse degut a la manca d'experiència tècnica i d'aparells addients a la UAB.

Acrònims

ACP	<i>acyl carrier protein</i>
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AG	Arabinogalactà
AM	Arabinomanà
ATCC	<i>American type culture collection</i>
bp	<i>Boiling point</i>
CCF	Cromatografia de capa fina
CF/TDM	Cord factor/trealosa dimicolat
CheLAM	LAM del <i>M. xenopi</i>
CIP	<i>Collection Institut Pasteur</i>
CWS	<i>Cell wall skeleton</i>
DAP	Àcid diaminopimèlic
DATs	Diacil-trealoses
Dec-P	Decaprenil-fosfat
DIMs	Dimicocerosats de ptiocerol
EDL	<i>Electron dense layer</i>
ETL	<i>Electron transparent layer</i>
EMACs	èsters metílics d'àcids grassos
FAB-MS	Espectrometria de masses per bombardejament d'ions ràpids
FAS	<i>Fatty acyl synthase</i>
FID	detector d'ionització de flama

GC-MS	Cromatografia gasos acoblada a espectrometria de masses
GLC	Cromatografia gas-líquid
GPLs	Glicopeptidolípids
HMBC	<i>heteronuclear multiple bound correlation spectroscopy</i>
HPLC	Cromatografia líquida d'alta pressió
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy</i>
IWZ	<i>inner wall zone</i>
LAM	Lipoarabinomanà
LM	Lipomanà
LOS	Lipooligosacàrids
MALDI-TOF-MS	Espectrometria de masses amb analitzador de temps de vol i desorpció làser assistida per matriu
ManLAM	LAM manosilats
MKs	Menaquinones
MMDAG	Monomicolil-diacil-glicerol
MNT	Micobacteris no tuberculosos
MS	Espectrometria de masses
MWZ	<i>Medium wall zone</i>
OL	<i>Outer layer</i>
OM	<i>Outer membrane</i>
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PGLs	Glicolípid fenòlic
PILAM	LAM amb fosfoinositol
PIMs	Fosfatidil-inositol manòsids
PRA	Anàlisi ràpid de polimorfismes

acrònims

RMN	Ressonància magnètica nuclear
SDS	<i>Sodium-dodecyl-sulphate</i>
SLs	Sulfolípidis
TAG	Triacil-glicerol
TATs	Triacil-trealoses
TB	Tuberculosi
TBS	Àcid tuberculoesteàric
TMM	Trealosa monomicolat

Introducció

Introducció

I.1 Micobacteris: importància i característiques generals

Malgrat el seu nom, bacteri-fong, els micobacteris no es troben més relacionats amb els fongs que d'altres gèneres de bacteris. El nom només fa esment a la seva naturalesa hidrofòbica que fa que tinguin tendència a créixer de forma semblant a pel·lícules de floridura a la superfície dels medis líquids. Aquesta hidrofobicitat és deguda a l'alt contingut lipídic de la paret cel·lular, constituïda en un 60 % per lípids i glicolípid (Liu, 1999). És aquesta una de les característiques més importants d'aquest gènere, la gran varietat i quantitat de compostos lipídics que sintetitzen i que no es troben en la majoria d'altres gèneres de bacteris.

El gènere *Mycobacterium*, és l'únic gènere dintre la família *Mycobacteriaceae* (Eubacteria) dins de l'ordre *Actinomycetales* (Hartmans, 2006; Saviola, 2006) i comprèn més de 130 espècies (<http://www-sv.cict.fr/bacterio/m/Mycobacterium.html>). Es tracta d'un gènere de gran importància clínica per l'home ja que s'hi troben els agents causals de diverses malalties humanes amb taxes molt importants de morbiditat i mortalitat com ho són la TB i, en menor grau, la lepra.

Els micobacteris formen part d'un grup de bacteris grampositius, amb un ADN d'alt contingut en G+C. Es troben estretament relacionats amb els gèneres *Nocardia*, *Rhodococcus* i *Corynebacterium*, tots ells membres de la divisió *Actinobacteriaceae*.

El gènere *Mycobacterium* inclou paràsits obligats, sapròfits i formes intermitjies (Hartmans, 2006; Saviola, 2006). A partir de la seva importància clínica i epidemiològica el gènere ha estat classificat en

tres grans grups: El complex *Mycobacterium tuberculosis* del que formarien part els *M. tuberculosis*, *M. cannetti*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. pinnipedi* i *M. microti*, totes elles espècies causants de l'enfermetat tuberculosa en diferents animals. El segon gran complex seria el complex *M. leprae* i el tercer gran complex seria el que formarien els micobacteris no tuberculosos (MNT) també coneguts com a micobacteris atípics o ambientals.

Els micobacteris són bacils rectes o lleugerament corbats, a vegades ramificats, amb unes dimensions de 0,2-0,6 µm d'amplada per 1-10 µm de llargada (Hartmans, 2006). Malgrat es consideren grampositius no es tenyeixen correctament amb la tinció de gram (Wayne, 1986). De fet, existeix certa controvèrsia al voltant del seu gram perquè posseeixen característiques fisiològiques que són comuns en gramnegatius, com la presència de porines a la paret cel·lular i l'efecte letal del producte del gen *sacB* (Daffé, 1998). Es caracteritzen per la seva resistència a la decoloració àcid-alcohòlica, és a dir, la capacitat de les cèl·lules tenyides amb un colorant arilmetà com la fucsina, de retenir el color després de netejar amb un àcid mineral diluït (tinció de Ziehl-Neelsen). Al microscopi òptic s'observen els bacils tenyits de vermell per la incorporació de la fucsina (Saviola, 2006). Es consideren aerobis però algunes espècies sembrades en tubs amb agar només creixen al fons dels mateixos (Wayne, 1986).

La membrana cel·lular conté pigments que varien segons les espècies i que en algunes d'elles es troben presents en suficient quantitat com per a donar una coloració des de groc a taronja (Grange, 1996). La paret cel·lular presenta un peptidoglicà que conté àcid meso-diaminopimèlic, àcid muràmic, alanina, àcid glutàmic, glucosamina, arabinosa i galactosa (paret cel·lular de tipus IV) (Lechevalier, 1970) i conté uns àcids grassos de cadena molt llarga solubles en cloroform anomenats àcids micòlics (Wayne, 1986).

La majoria de soques de micobacteris presenten més d'un tipus de morfologia colonial malgrat que les colònies d'algunes espècies com el

M. tuberculosis són normalment rugoses i d'altres, com les del *Mycobacterium intracellulare*, en cultiu primari d'origen clínic, són llises (Wayne, 1986). El creixement és lent o molt lent, amb temps de generació que varien entre espècies des de les 2 h del *Mycobacterium smegmatis* a les 18 h del *M. tuberculosis* o a les 24h del *Mycobacterium leprae* (Chauhan, 2006; Saviola, 2006). La temperatura òptima de creixement varia dels 25°C als gairabé 45°C. El creixement en medi líquid es presenta en forma de micel·li o de filaments però una lleugera agitació normalment els fragmenta en formes bacil·lars o cocoïdes. La majoria d'espècies creixen en substrats molt simples, utilitzant amoni o aminoàcids com a font de nitrogen, glicerol com a font de carboni i sals minerals. Algunes espècies patògenes però són més exigents i necessiten suplementes, com compostos per transportar ferro (hemines i micobactines). *M. leprae* no pot ser cultivada fora de cèl·lules vives (Wayne, 1986). Contenen diferents grànuls d'inclusió, com cossos lipídics d'emmagatzematge. Aquests són particularment grans i abundants a *Mycobacterium kansasii* i *Mycobacterium marinum* (Grange, 1996).

Tenen hàbitats diversos. La majoria d'espècies viuen en zones humides com aigües superficials, bassals, rieres i estuaris però rarament en aigües subterrànies. També els trobem en llots i en sòls, especialment quan es troben enriquits amb matèria orgànica com compost o femta (Grange, 1996). A més de les aigües lliures, els podem trobar en concentracions altes en els suministres d'aigua de consum humà (Schulze-Robbecke, 1992). En els darrers anys s'ha demostrat la formació de biofilms per part de certs micobacteris (Chen, 2006; Falkinham, 2002; Recht, 2000) i fins i tot s'hipotetitza que aquest tipus de nínxol ecològic es presenti en infeccions *in vivo* i sigui un factor de resistència a agents quimioteràpics (Donlan, 2002).

El gènere *Mycobacterium* el podem dividir en sis grups si combinem dos paràmetres: velocitat de creixement i producció de pigments. Així tenim espècies de creixement ràpid, que produeixen colònies visibles en un període inferior a 7 dies a partir d'un inòcul diluït, i espècies de

creixement lent que en produeixen en un període superior a 7 dies (Wayne, 1986; Runyon, 1970; 1959). Amb la producció de pigments diferenciem entre espècies productores de pigments en presència de llum (fotocromògenes), en absència de llum (escotocromògenes) i no productores de pigments (no cromògenes).

I.2 Envoltament cel·lular de *Mycobacterium*

L'envoltament cel·lular comprèn la membrana plasmàtica, la paret cel·lular i l'anomenada càpsula, estructura que envoltaria només certs tipus de micobacteris.

L'envoltament cel·lular és a qui correspon la protecció del microorganisme respecte de l'ambient i el control dels compostos que entren i surten de la cèl·lula. És vital en la fisiologia del micobacteri com ho demostra el fet que la inhibició en la síntesi d'alguns dels seus constituents mata el microorganisme. També es troba estretament relacionada amb d'altres funcions biològiques tan importants com la virulència, la capacitat d'adhesió a superfícies i la motilitat (Barrera, 2007; Pinto, 2004; Martínez, 1999; Falkinham III, 1996). Les característiques més rellevants d'aquesta envoltament cel·lular són la seva baixa permeabilitat, que també fa que el creixement de l'organisme sigui lent, i el seu alt contingut lipídic, d'un 60% (Kolattukudy 1997), si el comparem amb el 5% d'altres grampositius i el 10% en gramnegatius.

I.2.1 Membrana plasmàtica

Estudis recents han demostrat que es tracta d'una bicapa lipídica simètrica amb gruix i densitat similars a les trobades a d'altres bacteris (Zuber, 2008). Malgrat això, en estudis anteriors s'havia descrit la membrana plasmàtica dels micobacteris com una bicapa asimètrica, amb la capa externa més gruixuda que la interna (Paul, 1992). La raó

d'aquesta assimetria era deguda, molt probablement, a la introducció d'artefactes en la tècnica utilitzada en el processament de la mostra per a la seva visualització per microscopia electrònica (Bleck, 2010).

En la composició de la membrana plasmàtica trobem lípids polars, fonamentalment fosfolípids, que s'associen en forma de bicapa. Els àcids grassos més comuns que formen part d'aquests lípids polars són el palmític (C_{16:0}), l'octadecenoic (C_{18:1}) i el 10-metiloctadecanoic (C_{19r}) també conegut com a tuberculoesteàric (TBS). Els fosfolípids més comuns són el fosfatidilglicerol, el difosfatidilglicerol, la cardiolipina, la fosfatidiletanolamina i el fosfatidilinositol (Brennan, 1995). A nivell lipídic no s'han trobat diferències de composició entre membranes de micobacteris de creixement ràpid i de creixement lent (Minnikin, 1982).

Altres components que trobem associats a la membrana plasmàtica són els carotenoïds, compostos basats en politerpens, lligats a la fotoprotecció i responsables del característic color ataronjat de certs micobacteris com *Mycobacterium goodnae* i *M. kansasii*. També hi trobem les menaquinones (MKs), involucrades en el transport d'electrons (Brennan, 1988).

1.2.2 Paret cel·lular

1.2.2.1 Organització

La paret cel·lular dels micobacteris està estructurada al voltant d'un esquelet bàsic format per la unió covalent del peptidoglicà, l'arabinogalactà (AG) i els àcids micòlics, l'anomenat *cell wall skeleton* (CWS). D'altres compostos, lípids, glicolípid, proteïnes i sucres s'associen a aquest esquelet d'una forma no covalent. En el cas de les proteïnes, les trobem tant formant-ne part permanentment de la paret cel·lular com de pas cap a l'exterior. En concret en el cas del *M. tuberculosis* un estudi sobre el proteoma de la paret cel·lular va trobar que n'estava format per 528 proteïnes, d'entre elles n'hi havia 87 amb senyal d'exportació i 294 lipoproteïnes (Wolfe, 2010).

La paret cel·lular és una estructura molt complexa on es coneixen bé els components que la formen però no tan bé la manera com s'organitzen. Minnikin (1982) basant-se principalment en els resultats obtinguts per estudis de criofractura (Nguyen, 1979; Barksdale, 1977) i tenint en compte les estructures químiques dels principals components, va proposar un model d'envolta cel·lular que fins ara ha estat el més acceptat (figura 1). Aquest model proposava l'existència d'una bicapa lipídica externa asimètrica anàlega a la membrana externa dels gramnegatius. Aquesta bicapa estaria formada en la seva part més interna pels àcids micòlics, en part units covalentment a l'arabinogalactà (AG), alineats paral·lelament i en una direcció perpendicular a la superfície de la cèl·lula, en una estructura quàsi-cristal·lina que li conferiria una molt baixa fluïdesa. La part externa es trobaria formada per diferents tipus de lípids i glicolípid lliures i presentaria una major fluïdesa. Aquests components s'acomodarien a l'assimetria de les dues cadenes que formen els àcids micòlics. La presència de porines en la paret cel·lular (Siroy, 2008; Trias, 1992) assegurava el trànsit de petites molècules. Estudis posteriors confirmaren i completaren el model de Minnikin (Minnikin, 2002; Puech, 2001; Liu, 1995; Nikaido, 1993; Rastogi, 1991).

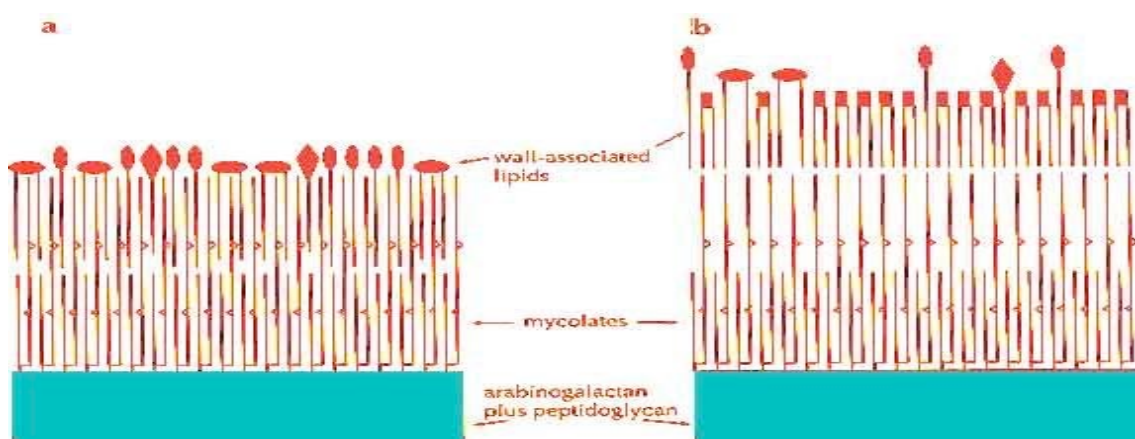


Figura 1: esquema del model de paret cel·lular proposat per Minnikin en el cas de: a: micobacteris i b: corinebacteris.

En contraposició amb aquests treballs, els estudis de microscopia electrònica amb tècniques convencionals, (tècniques que el·liminaven l'aigua del teixit per tal de poder-lo visualitzar a temperatura ambient) no van corroborar el model proposat per Minnikin (Daffé, 1998; Paul, 1994; 1992). Els resultats d'aquests estudis varen descriure una envolta cel·lular formada per una membrana plasmàtica asimètrica, amb la meitat externa més gruixuda que la interna. Per sobre d'aquesta membrana plasmàtica es trobaria una estructura gruixuda i densa als electrons, correspondria al peptidoglicà-AG, anomenada EDL d'*electron dense layer*. Per sobre d'aquesta EDL seguiria una capa poc densa als electrons, denominada ETL d'*electron transparent layer* i encara per sobre una capa externa de densitat i gruix variables coneguda com a OL d'*outer layer* (figura 2). La capa ETL es va assumir que contenia els àcids micòlics per la seva baixa densitat als electrons i pel fet que estudis publicats anteriorment demostraven que després d'un tractament d'hidròlisi alcalina (aquest tractament n'el·limina els lípids) l'estructura desapareixia (Draper, 1971). El principal inconvenient d'aquest model era el gruix total de l'envolta cel·lular (com posteriorment va quedar palès quan es va descriure la porina del *M. smegmatis*). El gruix de l'envolta cel·lular era considerablement superior al de la porina, el que certament posava en certes dificultats el model (Mahfoud, 2006; Faller, 2004; Engelhardt, 2002).

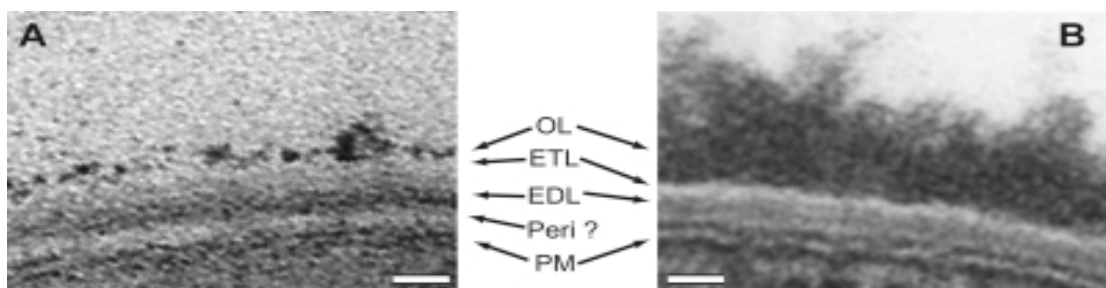


Figura 2: Fotografies de microscopia electrònica de transmissió usant tècniques convencionals de fixació (Zuber, 2008). A. *M. smegmatis* mc²155. B. *C. glutamicum*. OL: *outer layer*. ETL: *electron transparent layer*. EDL: *electron dense layer*. Peri?: possible espai periplàsmic. PM: membrana plasmàtica.

L'aplicació de tècniques més modernes de microscopia electrònica com la CET (tomografia crio-electrònica) o la CEMOVIS (microscopia crio-electrònica de seccions vitrificades) a l'estudi de les parets cel·lulars ha permès obtenir-ne imatges sense necessitat d'un tractament químic i per tant en un estat nadiu, lliure dels artefactes químics produïts en les tècniques convencionals a causa de la deshidratació de la mostra, a la vegada ha permès reformular i completar el model de Minnikin (Hoffmann, 2008; Zuber, 2008; 2006; Matias, 2005). En el treball de Zuber (2008), també en el de Hoffmann però amb algunes variacions, es descrivia una envolta cel·lular composta per una membrana plasmàtica simètrica, seguida d'una estructura de baixa densitat als electrons anomenada *inner wall zone* (IWZ) que a la vegada contenia una capa granular situada just per sobre de la membrana plasmàtica. Totes dues estructures serien similars a la capa granular i a la IWZ descrita en bacteris grampositius (Zuber, 2006). Per sobre de la IWZ es trobaria una zona de densitat intermitja als electrons coneguda com a *medium wall zone* (MWZ) i per sobre d'ella una estructura d'alta densitat als electrons coneguda com a *outer membrane* (OM) (figura 3).

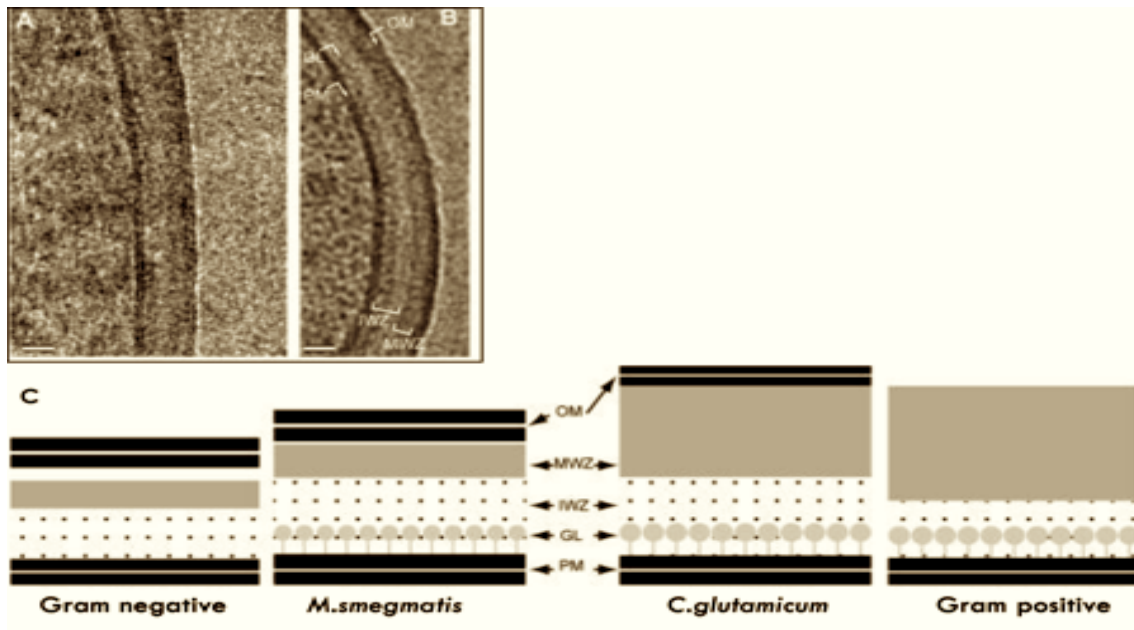


Figura 3: A-B: imatges de microscopia electrònica de l'envolta cel·lular del *M. smegmatis* (tècnica CEMOVIS) (Zuber, 2008). C: Esquematització de la microscopia electrònica (CEMOVIS) on es comparen les estructures entre les parets cel·lulars de gramnegatius, micobacteris, corinebacteris i grampositius, segons Zuber (2008).

La MWZ correspondria a la capa de peptidoglicà-AG i la IWZ correspondria a l'espai periplàsmic, el que donaria un espai on tindrien lloc les reaccions enzimàtiques necessàries pel manteniment de la paret. L'OM seria una estructura anàlega a la membrana externa dels gramnegatius, amb un gruix similar i en forma de bicapa amb una composició majoritària de lípids. En el mateix treball de Zuber (2008) es demostrava, utilitzant una soca de *Corynebacterium glutamicum* defectiva en la síntesi d'àcids micòlics, que la manca d'àcids micòlics produïa una desestructuració d'aquesta OM, el que demostraria que aquesta bicapa estaria formada, al menys en part, per àcids micòlics. En el mateix estudi no es va trobar cap estructura com la ETL que descriuen els estudis amb tècniques convencionals de microscopia electrònica. La presència d'aquesta estructura en el *Corynebacterium amycolatum* (Puech, 2001), una corinebacteria que no posseix àcids micòlics, suposaria que l'ETL seria el resultat d'un artefacte de les tècniques convencionals o si més no, no estaria formada per àcids micòlics com així es creia.

En algunes espècies de micobacteris també trobaríem un material

addicional, l'anomenada càpsula, que estaria formada fonamentalment per polisacàrids (D-glucà, D-arabinomanà i D-manà) i proteïnes (Lemassu, 1996; Ortalo-Magné, 1995). Aquesta estructura va ser descrita per Chapman (1959) i Hanks (1961) com un espai que envoltava micobacteris patògens. Aquest espai capsular es podria correspondre a la zona que s'observava al voltant de micobacteris patògens fagocitats i que mancava en espècies no patògenes (Schwebach, 2002; Frehel, 1986). Les seves funcions estarien relacionades amb la immunomodulació, com per exemple la unió sense opsonització al receptor CR3 que afavoreix la supervivència del bacil tuberculós després de la fagocitosi (Cywes, 1997).

1.2.2.2 Implicacions de la paret cel·lular en les característiques del gènere *Mycobacterium*

Els micobacteris són relativament resistents a la majoria d'antibiòtics d'ampli espectre amb les excepcions de l'estreptomicina i la rifampicina (Wayne, 1986). També són relativament resistents a la dessecació, als àlcalis i a molts desinfectants (Recht, 2000; Brennan, 1995). Aquesta resistència es troba en estreta relació amb l'estructura inusual de la seva paret cel·lular, responsable de la seva resistència a la decoloració àcid-alcohòlica (Beveridge, 2002; Barksdale, 1977) i que té com a qualitat principal una baixa permeabilitat, tant per a substàncies hidrofíliques com per a les lipofíliques (Brennan, 1995; Jarlier, 1990). Malgrat això, estudis més recents indicarien que en la resistència als agents terapèutics, s'haurien de tenir en compte altres consideracions com la possible formació de biofilms a l'interior de l'hoste (Yamazaki, 2006). En el cas del *M. tuberculosis* gran part de l'interés actual per entendre l'estructura de la seva paret es basa en la necessitat de buscar noves dianes terapèutiques per lluitar contra les soques multiresistents.

La paret cel·lular contribuiria de dues maneres en la patogènia de certs micobacteris; passivament, protegint-los dels sistemes microbicides del

macròfag, i activament, modulant la resposta immunitària de l'hoste (Daffé, 1998). En termes generals, el conjunt de compostos que formen part de la paret cel·lular i que no es troben units covalentment a ella, lípids, glicolípidis i proteïnes, serien les molècules efectores en processos patogènics, en canvi l'esquelet bàsic de peptidoglicà-AG-àcids micòlics seria el cos essencial per a la viabilitat de la cèl·lula.

La importància de la paret es posa de manifest en el fet que agents terapèutics contra la TB com la isoniazida i l'etambutol, afecten la síntesi de components importants de la paret cel·lular com els àcids micòlics i l'AG respectivament (Mdluli, 1998; Belanger, 1996; Mikusová, 1995; Banerjee, 1994).

1.2.2.3 Components de la paret: estructura, funcions i distribució

L'esquelet bàsic de la paret cel·lular està format pel complex peptidoglicà-AG-àcids micòlics. Es tracta de l'estructura fonamental de la paret cel·lular dels micobacteris. És una carcassa covalentment unida, on el peptidoglicà es troba unit a l'AG per un enllaç fosfodièster i l'AG es troba esterificat en la seva porció arabinosa per una varietat d'àcids grassos anomenats àcids micòlics. En la biosíntesi d'aquest complex de tres molècules participa el lípid transportador decaprenilfosfat (Dec-P). Aquesta molècula seria la responsable de la síntesi del peptidoglicà, també de la síntesi del pont d'unió entre el peptidoglicà i l'AG i de la posterior incorporació de galactosa i arabinosa per formar l'AG. Aquest lípid poliisoprenoïde també seria el responsable de la unió dels àcids micòlics a la paret cel·lular. La biosíntesi d'aquest poliisoprenoïde vital ha estat estudiada per Crick (2001; 2000).

1.2.2.3.1 Peptidoglicà

El peptidoglicà forma una estructura rígida que determina la forma de la cèl·lula i proporciona la força per resistir la pressió osmòtica.

És un polímer format per unitats repetides d'*N*-acetilglucosamina (GlcNAc) i àcid muràmic: $[(4)\text{-}\beta\text{-D-GlcNAc}\text{-}(1,4)\text{-}\beta\text{-D-Mur}(1)]_n$ interconnectats per tetrapèptids: L-alanilil-D-isoglutaminil-meso-diaminopimelil-D-alanina (L-Ala-D-Glu-A₂pm-D-Ala) amb alguns dels residus D-Glu i A₂pm amidats (Adam, 1969). Aquestes cadenes peptídiques es troben fortament unides entre si amb dos tipus d'unions interpeptídiques; entre dues molècules de A₂pm (unió L-D), i entre el A₂pm i la D-alanina (unió D-D) (Wietzerbin, 1974). L'àcid muràmic modificat està format per alguns residus *N*-glicosilats a més dels residus comuns *N*-acetilats que trobem normalment en el peptidoglicà (Mahapatra, 2005a; Adam, 1969). El fet que l'àcid muràmic estigui *N*-glicosilat ofereix l'oportunitat d'establir ponts d'hidrogen addicionals fent encara més rígida l'estructura (Brennan, 1995).

La síntesi del peptidoglicà en micobacteris és poc coneguda. Es creu que és similar a la que trobem en altres bacteris amb algunes diferències com la utilització del Dec-P com a transportador lipídic en comptes de l'undecaprenil-P (Mahapatra, 2005b; 2000).

La singularitat de la paret dels micobacteris arriba fins al punt de no estar prou clara l'orientació que pren el peptidoglicà per alguns autors. En la majoria de models on es representa la paret d'un micobacteri el trobem en una orientació tradicional, paral·lela a la membrana plasmàtica (McNeil, 1991b), en canvi d'altres estudis indicarien la possibilitat que el peptidoglicà i l'AG s'organitzessin en fibres enrotllades perpendiculars al pla de la membrana plasmàtica (Dmitriev, 2000; 1999). Aquesta hipòtesi ha guanyat suports en base a uns estudis fets amb fragments sintètics de paret mitjançant RMN (Meroueh, 2006).

1.2.2.3.2 Arabinogalactà (AG)

Aquest polímer es troba unit al peptidoglicà mitjançant un pont d'unió format per l'enllaç fosfodièster entre el carboni 6 (C6) d'alguns residus (10-12%) d'àcid muràmic i el C₁ de la GlcNAc que a la vegada es troba unida per un enllaç glucosídic $\alpha 1\rightarrow 3$ a un residu de ramnosa (L-Rhap-

(1→3)-D-GlcNAc-(1P) (McNeil, 1991).

L'AG és una molècula ramificada, formada per un homopolímer lineal de galactofuranoses (Galf) amb les ramificacions laterals formades per cadenes d'arabinofuranoses (Araf). A diferència però d'altres polímers bacterians l'AG no està format per unitats repetides d'una mateixa estructura.

Els polímers d'arabinoses s'uneixen a través del C5 d'alguns residus de 6-Galf (Daffé, 1990), amb les arabinoses formant el terminal no reductor. L'homopolímer d'arabinosa, de 31 residus en el cas del *M. tuberculosis*, està compost d' α -D-Araf unides pel C5 i posseeix ramificacions introduïdes per residus 3,5- α -D-Araf. Els terminals no reductors es troben formats per una estructura ramificada de 6 arabinoses amb estructura $[\beta$ -D-Araf-(1→2)- α -D-Araf]₂-3,5- α -D-Araf-(1→5)- α -D-Araf (McNeil, 1994; Daffé, 1990). Els àcids micòlics es trobarien esterificant, amb variacions segons l'espècie i en grups de quatre, a 2/3 de les ramificacions terminals d'arabinoses (Bhamidi, 2008; McNeil, 1991a). També es trobarien residus de succinil i glucosaminosil substituïnt cadascun a 1/3 de les ramificacions d'arabinoses (Bhamidi, 2008). La presència d'un alt nombre de residus i la flexibilitat dels enllaços Araf-(1→5)-Araf facilitaria el moviment lateral dels àcids micòlics afavorint un empaquetament tancat (Hong, 2004; Brennan, 1995).

L'estructura de l'homopolímer de galactosa no és totalment coneguda. Es troba format per uns 30 residus amb conformació β -D-Galf-(1→5)- β -D-Galf-(1→6) (Bhamidi, 2008; Daffé, 1990). Tres cadenes d'homopolímer d'Araf s'unirien a cadascun dels homopolímers de Galf (Bhamidi, 2008; Alderwick, 2005). L'existència de llargs trams lineals de galactoses farien pensar que les cadenes d'arabinosa es trobarien unides a prop del termini reductor del polímer de galactosa. D'altres interpretacions sostenen la possibilitat que alguns homopolímers de galactosa no es trobessin arabinosilats produint polímers de galactosa no ramificats (Crick, 2001).

La biosíntesi de l'AG comença amb la formació del pont d'unió amb el peptidoglicà, on intervé el Dec-P, seguit d'una extensió concomitant dels polímers de galactosa i arabinosa (Mikusovà, 2000). Els residus de Galf són afegits des d'unitats d'UDP-Galf (Weston, 1997) i els residus d'arabinosa s'on afegits des d'un precursor Dec-P-Araf. Es coneixen algunes glicosil-transferases involucrades com EmbA, EmbB (Khasnobis, 2006) i EmbC (Berg, 2005). Malgrat això, gran part de la ruta biosintètica encara es desconeix com per exemple la localització exacta de la membrana plasmàtica on es produeix la polimerització de l'AG.

L'AG és el polisacàrid més important de la paret dels micobacteris (Brennan, 1995). La seva importància es reflexa en que l'etambutol, un dels antituberculosos més usats, té com a efecte primari el bloqueig de la polimerització d'arabinoses per formar l'AG. (Mikusovà, 1995).

1.2.2.3.3 Àcids micòlics

Aïllats per primer cop per Anderson el 1939 després d'una perllongada saponificació, varen ser descrits al *M. tuberculosis* per (Asselineau, 1950). Són àcids grassos d'alt pes molecular i de cadena molt llarga, α -ramificats i β -hidroxilats (figura 4). Estan considerats com el component més abundant de la paret cel·lular dels micobacteris, 40% en pes, majoritàriament units a l'esquelet de peptidoglicà-AG (CWS). També formen part d'alguns compostos de la paret no units covalentment al CWS, extraïbles amb solvents orgànics, com el CF (dimicolat de trealosa, CF o TDM) i el monomicolat de trealosa (TMM).

Els àcids micòlics no són components exclusius dels micobacteris, gèneres afins com *Corynebacterium*, *Nocardia* o *Rhodococcus*, a més d'altres, també en posseeixen. Existeixen, però, característiques que fan que els àcids micòlics dels micobacteris siguin únics, com: una major longitud de cadena, entre 60 carbonis (C_{60}) i C_{90} ; una cadena α més extensa, d'entre C_{20} i C_{26} i la presència d'insaturacions, ciclopropans, funcions oxigenades addicionals i grups metil a la cadena principal (Brennan, 1995). Són uns components clau en els micobacteris, la seva

variabilitat de composició és un paràmetre que afectaria fenòmens tan importants com la virulència, la resistència als antibiòtics, la taxa de creixement, la morfologia colonial i la permeabilitat de l'envolta cel·lular (Barkan, 2009; Dubnau, 2000; Glickman, 2000; Yuan, 1998b; Liu, 1996). Actualment se'n coneixen 46 gens que participen en la síntesi dels àcids micòlics (Banerjee, 2011).

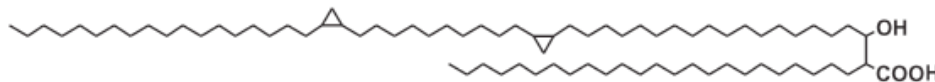


Figura 4: esquema d'un àcid micòlic de tipus α amb dos grups ciclopropà (representats com a triangles).

Estructuralment els àcids micòlics dels micobacteris els podem dividir en dues parts. Una cadena principal, l'anomenat meromicòlic, que inclouria la part entre el carboni ω (distal) i el carboni β (grup hidroxil) d'uns C_{60} i la cadena α , amb el grup carboxil, d'entre C_{22} i C_{26} . La cadena α és totalment saturada i, d'entre els gèneres posseïdors d'àcids micòlics, és la part més conservada de la molècula.

El meromicòlic es pot dividir en tres parts, separades per dos grups que prenen forma d'insaturacions, ciclopropans i funcions oxigenades. La posició d'aquests grups serà proximal o distal prenent com a referència el grup carboxil. En l'anterior dècada es van descriure micòlics amb una longitud perllongada en 6-8 carbonis i amb tres grups separadors en el meromicòlic (Watanabe, 2001). Atenent als tipus d'insaturacions i ciclopropans presents, en el treball de Watanabe (2001) van dividir els àcids micòlics en tres tipus: de tipus I: només amb ciclopropans; de tipus II: amb una insaturació en *trans*, i els de tipus III amb una insaturació en *cis*.

Atenent fonamentalment a la presència o absència de funcions oxigenades addicionals diferenciem set tipus d'àcids micòlics dins el gènere *Mycobacterium* (taula 1).

Tipus	Funció oxigenada	Nº de carbonis	Estructura del meromicòlic
α -micòlic	cap	65-90	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-A-(CH}_2\text{)}_n\text{-B-(CH}_2\text{)}_m$
α' -micòlic	cap	58-64	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_m$
metoxi-micòlic	grup metoxi	65-90	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{OCH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH-CH-(CH}_2\text{)}_m\text{-B-(CH}_2\text{)}_o \end{array}$
ceto-micòlic	grup cetona	65-90	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH-C-(CH}_2\text{)}_m\text{-B-(CH}_2\text{)}_o \end{array}$
epoxi-micòlic	grup epoxi	67-85	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{O} \\ \quad / \quad \backslash \\ \text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH-CH-CH-(CH}_2\text{)}_m\text{-B-(CH}_2\text{)}_o \end{array}$
wax- èster micòlic	grup carboxi	65-80	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH-O-C-CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{-B-(CH}_2\text{)}_o \end{array}$
ω -1 micòlic	grup metoxi	69-81	$\begin{array}{c} \text{OCH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{-CH-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_m\text{-CH=CH-} \\ \text{-(CH}_2\text{)}_o \end{array}$

Taulla 1: els 7 àcids micòlics coneguts dintre del gènere *Mycobacterium*. A/B: doble enllaç o grup ciclopropà, n, m i o: nº variable de grups CH₂.

La fluïdesa de la paret segueix un gradient de dins a fora, de menys a més fluïdesa. Els àcids micòlics col·laboren en l'existència d'aquest gradient. L'estructura saturada de la cadena α i la llargada excepcional del meromicòlic afavoreixen un empaquetament paral·lel i una major rigidesa. A més, la secció propera al grup carboxil no conté estructures com insaturacions i ciclopropans i, les estructures com ciclopropans i insaturacions proximals acostumen a tenir una configuració en *trans*, que genera menys desordre que les configuracions en *cis* (Brennan, 1995). Aquestes característiques són fonamentals per a dotar la paret dels micobacteris d'una molt baixa permeabilitat a tota mena de substàncies. En contrast, a les zones més distals, hi trobem les funcions oxigenades addicionals o estructures en *cis* que augmentarien la fluïdesa.

Amb els estudis realitzats fins ara es postulen dues hipòtesis per explicar

la síntesi d'aquests compostos, la hipòtesi de l'elongació i la hipòtesi de la condensació. La hipòtesi de l'elongació, recolzada per una majoria d'estudis, es resumiria en tres passos:

1. Síntesi i elongació d'àcids grassos per obtenir precursors del meromicòlic i la cadena α .
2. Elongació de precursors i introducció de modificacions funcionals al meromicòlic
3. Condensació de les dues parts, la cadena α i el meroaldehid, seguida d'una reducció.

L'unitat d'elongació és la molècula de malonil-CoA que es forma a partir de la carboxilació d'acetil-CoA amb el grup carboxil aportat per la biotina. Aquesta reacció està catalitzada pels enzims acetil-CoA carboxilases, Acc, dels que ja es coneixen diversos gens. Aquests enzims són essencials per a la viabilitat del micobacteri (Portevin, 2005).

La síntesi és iniciada per l'enzim FAS I (*fatty acyl synthase I*) catalitzant la síntesi *de novo* d'acils-CoA de cadena llarga utilitzant malonil-CoA com a unitat d'elongació. El resultat és una síntesi bimodal, obtenint compostos de C₁₆-C₁₈ i de C₂₄-C₂₆ (Fernandes, 1996). L'enzim FAS I és un enzim multifuncional, amb set dominis, codificat en un sol gen i que trobem fonamentalment en eucariotes. Els productes d'acil-CoA de C₁₆-C₁₈ serviren com a precursors d'elongació del sistema multienzimàtic FAS II per obtenir posteriorment el meromicòlic així com per a la obtenció dels fosfolípids de la membrana plasmàtica (Qureshi, 1984). Els productes d'acil-CoA de C₂₄-C₂₆ formarien la cadena prèvia carboxilació (Takayama, 2005; Kikuchi, 1992). La droga antituberculosa pirazinamida inhibeix l'activitat de FAS I (Zimhony, 2000).

El sistema FAS II, que trobem en bacteris i plantes, està compost per enzims monofuncionals, *acyl carrier protein* (ACP) depenents i incapaçs de produir àcids grassos *de novo* a partir d'acetil-CoA. L'unitat d'elongació del sistema FAS II és el malonil-ACP. L'elongació es produeix en diversos cicles iteratius per part d'enzims units covalentment a acil-ACP i on cadascun dels cicles comprèn 4 passes (Bloch, 1977). La

droga antituberculosa isoniazida inhibeix una de les quatre passes del cicle d'elongació impedit així la síntesi d'àcids micòlics (Mdluli, 1998; Banerjee, 1994). La proteïna ACP és semblant a la seva homòloga d'*Escherichia coli* però amb un afegit a C-terminal que probablement juga un paper molt important en la transferència d'àcids grassos de cadena llarga al llarg de tot el procés (Schaeffer, 2001a).

Malgrat que s'ha demostrat en estudis *in vitro* l'obtenció d'àcids grassos de C₄₀ a C₅₄ per part d'enzims que formen part del FAS II (Slayden, 2002; Schaeffer, 2001b), la formació per part de FAS II de cadenes acilades d'entre C₅₀ i C₆₀ a partir de precursors de C₁₈-C₃₀ encara no s'ha demostrat formalment.

El funcionament del sistema FAS II és tan important que una disminució mínima en la longitud de la cadena dels àcids micòlics incrementa radicalment la permeabilitat cel·lular (Gao, 2003).

La segona hipòtesi aporta una visió radicalment diferent i basa la formació dels àcids micòlics en la condensació de quatre àcids grassos. La síntesi del meromicòlic es produiria per la condensació de tres àcids grassos. La posició de les insaturacions o dels grups oxigenats es controlaria amb la longitud dels precursors o amb metilacions. La diferent longitud d'aquests precursors seria la responsable de l'existència dels diferents tipus d'àcids micòlics essent els precursors més llargs els que donarien lloc als àcids micòlics oxigenats (Asselineau, 2002).

Un cop sintetitzat el meromicòlic, aquest es condensaria amb la cadena α mitjançant una condensació tipus Claisen, punt on ambdues hipòtesis estarien d'acord. Els responsables principals d'aquesta reacció serien dos enzims Pks13 i FadD32, que es troben adjacents al genoma del *M. tuberculosis*. FadD32 seria el responsable de l'activació de la cadena acilada unint-la a AMP (Trivedi, 2004). L'enzim Pks13 (policètid sintasa) és el responsable de la condensació entre el meromicòlic i la cadena α . Aquest enzim uniria covalentment i per separat els dos substractes, prèviament activats, i posteriorment els condensaria alliberant CO₂ i produint en l'àcid micòlic un grup 3-oxo que seria reduït per formar

l'alcohol secundari.

Malgrat que les síntesis dels diferents tipus d'àcids micòlics comparteixen la majoria d'enzims, el treball de Takayama (2005) proposa que la síntesi de cada tipus no es trobaria interconnectada.

L'etapa final del procés de síntesi és el transport de l'àcid micòlic al seu lloc definitiu de la paret. Aquesta etapa ens és desconeguda en la major part, a excepció de les funcions transportadores de l'antigen 85 (Puech, 2002; 2000; Belisle, 1997) i de la regulació parcial d'aquest procés per part d'una proteïna tipus *histone-like* (Katsube, 2007). L'estudi de Takayama (2005) proposa que l'àcid micòlic és transferit des de l'enzim Pks13 fins a un transportador poliprenol (6-O-micolil-β-D-Manp-1-fosfoheptaprenol) i posteriorment a una molècula de trealosa-6-P per formar la TMM-6-P. La TMM-6-P és defosforilada produint TMM que, a la vegada, es transportaria a l'exterior de la membrana plasmàtica mitjançant un conjunt de tres enzims, l'antigen 85, que actuarien com a micoliltransferases. Un cop fóra, la TMM s'utilitzaria per sintetitzar el CF i per formar els àcids micòlics que trobem units al complex de peptidoglicà-AG.

Del catabolisme dels àcids micòlics se'n sap bastant menys que de la seva síntesi. Malgrat això un estudi recent, aquest treball en comparteix una part, ha revelat un dels mecanismes involucrats. Es tracta d'un mecanisme de degradació per incorporació d'una molècula d'O₂ entre els carbonis C3 i C4, en el que es coneix com una reacció tipus Baeyer-Villiger. Aquesta reacció donaria lloc a uns compostos que s'han anomenat àcids micobactèrics/micoceròsics, amb unes longituds de cadena d'entre C₃₅ a C₅₄, que es trobarien lliures o en forma de triacilglicerols (Rafidinarivo, 2009).

Malgrat que la funció més important dels àcids micòlics és la formació d'una barrera hidrofòbica envoltant tot el micobacteri amb una funció de protecció, s'ha demostrat que els àcids micòlics generen reaccions immunitàries molt semblants a les provocades per la TB. En concret, la interacció dels àcids micòlics de *M. tuberculosis* amb macròfags murins

indueix un morfotip de macròfag similar als que s'observen en els granulomes tuberculosos (Korf, 2005). El mateix estudi conclou que el paper dels àcids micòlics seria ambivalent, provocant tant respostes que afavoririen la progressió de la malaltia com respostes protectores enfront la TB. Un estudi realitzat amb mutants del *M. tuberculosis* ha arribat a la conclusió que són els àcids micòlics amb ciclopropans, formant part del CF, els components necessaris per a la formació de cordes i per a la persistència del bacil tuberculós a llarg termini en el ratolí (Glickman, 2000). Altres estudis han descrit una nova forma de presentació d'àcids micòlics anomenada micolil-diacil-glicerol al *M. smegmatis* i que es trobarien involucrats en la morfologia colonial i en la formació de biofilms (Chen, 2006).

I.2.2.3.3.1 Valor taxonòmic dels àcids micòlics

El valor taxonòmic dels àcids micòlics va ser ràpidament reconegut ja fa molts anys per investigadors pioners (Alshamaony, 1976; Etémadi, 1967). Nombrosos estudis han descrit el contingut en àcids micòlics com un caràcter fenotípicament estable amb distribució discontinua i potencial quimiotaxonòmic (Minnikin, 1984a,b; 1980; Davidson, 1982). Degut a que es troben en taxons relacionats i no àmpliament distribuïts a la natura són compostos ideals per a estudis discriminatius (Minnikin, 1984a,b; 1980). La determinació de patrons d'àcids micòlics ha estat i es important en la classificació i identificació dels micobacteris (Minnikin, 1985b;1984a,b; 1980). A la taula 2 hi trobem els patrons d'àcids micòlics de les espècies més rellevants. Les tècniques amb que s'han estudiat els patrons d'àcids micòlics, bàsicament tècniques cromatogràfiques han estat i encara són tècniques molt útils en l'estudi d'aquests compostos.

introducció

Espècie	tipus d'àcid micòlic							espècies amb un patró idèntic
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
<i>M. abscessus</i>	+	+	-	-	-	-	-	<i>M. chelonae</i>
<i>M. alvei</i>	+	-	-	-	-	-	+	cap
<i>M. bohemicum</i>	+	-	+	+	-	+	-	<i>M. komossense</i>
<i>M. branderi</i>	+	-	-	+	-	+	-	molt comú
<i>M. brumae</i>	+	-	-	-	-	-	-	<i>M. fallax, M. triviale</i>
<i>M. canarasiense</i>	+	+	-	-	-	-	-	<i>M. abscessus, M. chelonae</i>
<i>M. chlorophenolicum</i>	+	-	-	+	-	+	-	molt comú
<i>M. confluentis</i>	+	-	-	+	-	-	-	<i>M. bovis BCG, M. leprae</i>
<i>M. conspicuum</i>	+	-	-	+	-	+	-	molt comú
<i>M. cookii</i>	+	+	-	-	-	+	-	cap
<i>M. doricum</i>	+	-	+	-	-	+	-	cap
<i>M. elephantis</i>	+	-	-	+	-	+	-	molt comú
<i>M. florentinum</i>	+	-	+	+	-	-	-	comú incloent <i>M. tuberculosis</i> complex i
<i>M. genavense</i>	+	+	-	+	-	-	-	<i>M. gordonae</i>
<i>M. hassiacum</i>	+	-	-	-	-	+	-	<i>M. heidelbergense, M. intermedium</i>
<i>M. heckeshornense</i>	+	-	-	+	-	+	-	<i>M. lentiflavum, M. malmoense, M. simiae</i>
<i>M. hiberniae</i>	+	-	-	+	-	+	-	<i>M. mucogenicum</i>
<i>M. hodleri</i>	+	-	-	+	-	+	-	molt comú
<i>M. holsaticum</i>	+	-	+	+	-	-	-	molt comú
<i>M. interjectum</i>	+	-	-	+	+	+	-	comú incloent <i>M. tuberculosis</i> complex i
<i>M. kubicae</i>	+	-	+	+	-	-	-	<i>M. gordonae</i>

Taula 2: mostra de patrons d'àcids micòlics d'algunes espècies de micobacteris. Modificada de Tortoli (2003).

introducció

Espècie	tipus d'àcid micòlic							espècies amb un patró idèntic
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
<i>M. madagascariense</i>	+	-	-	+	-	+	-	molt comú
<i>M. mageritense</i>	+	+	-	-	+	-	-	<i>M. chitae</i> , <i>M. farcinogenes</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. porcinum</i> <i>M. senegalense</i> , <i>M. smegmatis</i>
<i>M. mucogenicum</i>	+	-	-	-	-	+	-	<i>M. hassiacum</i>
<i>M. murale</i>	+	-	-	+	-	+	-	molt comú
<i>M. novocastrense</i>	+	-	-	+	-	+	-	molt comú
<i>M. parmense</i>	+	-	-	+	-	+	-	molt comú
<i>M. peregrinum</i>	+	+	-	-	+	-	-	<i>M. chitae</i> , <i>M. farcinogenes</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. porcinum</i> , <i>M. senegalense</i> , <i>M. smegmatis</i>
<i>M. psychrotolerans</i>	+	-	-	+	-	+	-	molt comú
<i>M. pyrenivorans</i>	+	-	-	-	+	+	-	cap
<i>M. tusciae</i>	+	-	-	+	-	+	-	molt comú

Taula 2 (continua): mostra de patrons d'àcids micòlics d'algunes espècies de micobacteris. Modificada de Tortoli (2003).

I.2.2.3.3.1.1 Anàlisi dels àcids micòlics per cromatografia de capa fina (CCF)

La cromatografia és un conjunt de tècniques de separació selectiva de molècules on els components d'una mescla complexa poden ser identificats i/o purificats. Totes les tècniques cromatogràfiques comparteixen dos elements: una fase estacionària o adsorbent i una fase mòbil formada per un o més solvents. En general la fase estacionària serà més polar que la fase mòbil. Els components d'una mescla complexa són separats en ser arrossegats per la fase mòbil a través de la fase estacionària segons les diferències en el coeficient de partició dels components que formen part de la mostra. El coeficient de partició és un paràmetre definit com la solubilitat diferencial d'un component entre dos solvents diferents, en aquest cas l'adsorbent i la fase mòbil. La CCF és un sistema que utilitza un suport de plàstic, alumini o vidre on es deposita una capa d'entre 0,1 i 2 mm d'un sòlid finament dividit, el que serà la fase estacionària. La mostra a analitzar es col·loca en un punt de la fase estacionària proper a la base del suport i serà arrossegada pel solvent o fase mòbil que pujarà per capil·laritat a través de la fase estacionària. Per tal que la fase mòbil pugi a través de l'adsorbent la placa de CCF es col·loca en una cambra tancada i saturada amb el solvent (figura 5). En el nostre cas varem utilitzar com a fase estacionària la sílica-gel. Es tracta d'una forma polimèrica de l'àcid silícic de pH lleugerament àcid on els grups -OH actuen com a donadors o acceptors de ponts d'hidrogen. Un cop el solvent ha pujat per la fase estacionària fins el límit desitjat, els diferents components de la mostra es visualitzen mitjançant tractament físic (llum UV) o químic (reveladors específics).



Figura 5: detall de la cambra d'elució i de la placa de CCF amb l'adsorbent, de color blanc, enganxat a la superfície.

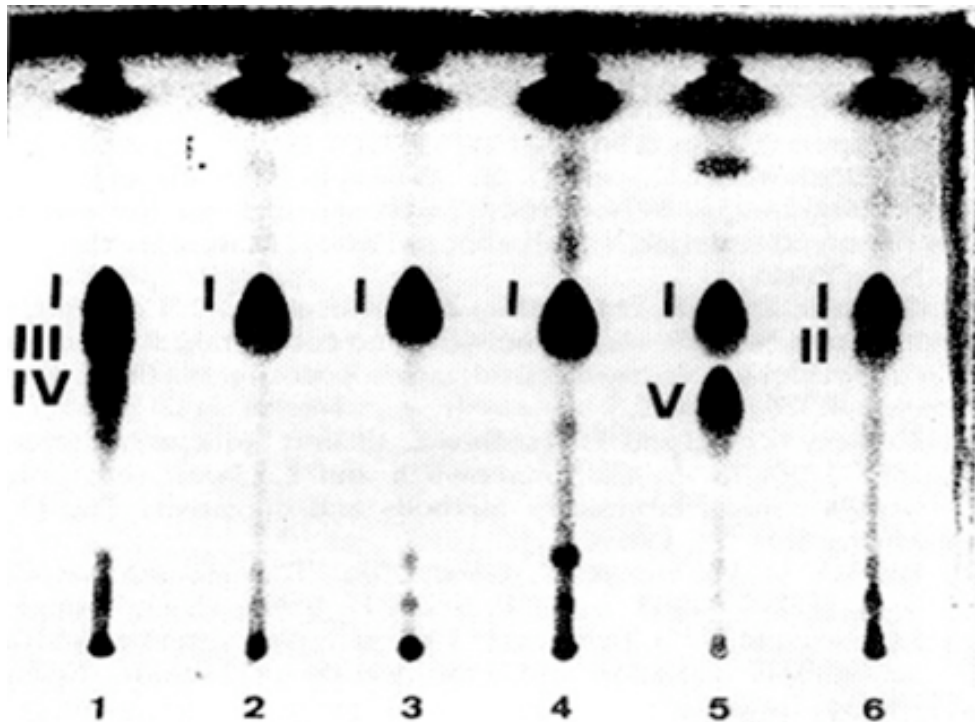


Figura 6: placa de CCF amb una fase estacionària de sílica-gel on s'han eluït els èsters metílics de diferents àcids micòlics. En números romans: I: α -micolat; II: α' -micolats; III: metoxi-micolats; IV: ceto-micolats; V: epoxi-micolats. La numeració correspon a 1: *M. tuberculosis* 2: *M. fallax* 3: *M. triviale* 4: *M. brumae* 5: *M. fortuitum* 6: *M. chelonae*. Sistema d'elució: éter de petroli/éter etílic 85/15 (x3).

En el cas dels àcids micòlics el primer pas per estudiar-los és poder-los aïllar i per tant s'han de trencar els enllaços covalents que majoritàriament els mantenen units a la paret cel·lular per a posteriorment derivatitzar-los per a fer-los prou polars per l'anàlisi. Existeixen diferents tècniques per aconseguir-ho com la metanòlisi àcida, la metanòlisi alcalina i també la saponificació seguida de derivatització amb diazometà. En el nostre cas es va optar per la saponificació perquè, a diferència de la metanòlisi àcida, permet conservar millor els anells de ciclopropà dels àcids micòlics (Minnikin, 1984b). En una CCF l'èster metílic de l'àcid micòlic és separat segons la seva polaritat i longitud de la cadena, propietats que afecten el coeficient de partició i el faran més o menys soluble en un determinat sistema de solvent/s (figura 6). Com a limitació la tècnica de la saponificació produeix isòmers formats per razemització del carboni

quiral C2 (Minnikin, 1966).

Aprofitant el fet que el patró d'àcids micòlics és un paràmetre qualitativament estable s'han publicat un gran nombre d'estudis que han utilitzat eines com la cromatografia de capa fina mono- i bidimensional (1D/2D-CCF) tant per discriminar d'entre els gèneres posseïdors d'àcids micòlics com per estudiar els diferents patrons d'àcids micòlics al gènere *Mycobacterium* (Barry, 1997; ; Dobson, 1985; Minnikin, 1983; 1980; Daffé, 1983a; Etémadi, 1967). També s'han desenvolupat tècniques de CCF que permeten resoldre la complexitat existent en una mescla natural d'àcids micòlics, com per exemple amb l'aplicació de sistemes de solvents diferents, cas del diclorometà, que permet separar el metoxi-micolat del ceto-micolat, cosa que no es pot aconseguir amb un sistema estàndard d'éter de petroli i éter etílic. Els èsters d'àcids micòlics que no es poden diferenciar per CCF-1D es poden visualitzar per tècniques en 2D aplicant sistemes de solvents de diferent polaritat. L'anàlisi dels èsters d'àcids micòlics de 50 espècies de micobacteris per 2D-CCF va revelar que aquests micobacteris es podien separar en 11 grups estructurals segons el seu patró d'àcids micòlics. Fins i tot es va suggerir una aplicació clínica d'aquesta anàlisi com a eina d'identificació ràpida (Minnikin, 1980). Altres estudis demostraren que els èsters d'àcids micòlics que són homogenis per CCF-1D/2D convencional poden ser fraccionats i aïllats mitjançant la CCF argèntica que permet discriminar mescles homòlogues de compostos que es diferencien en el nombre i estereoquímica dels seus dobles enllaços (Minnikin, 1980; 1974).

I.2.2.3.3.1.2 Anàlisi dels àcids micòlics per cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC)

El patró d'àcids micòlics es pot analitzar de manera directa de dues maneres: mitjançant CCF i mitjançant HPLC. L'HPLC és una forma de cromatografia líquida que permet separar components que es troben dissolts en una solució. L'aparell consta d'un reservori on s'emmagatzemen els diferents solvents, una bomba per a moure

aquests solvents, un injector per on s'introduirà la mostra, una columna de separació on es troba la fase estacionària i un detector (figura 7).

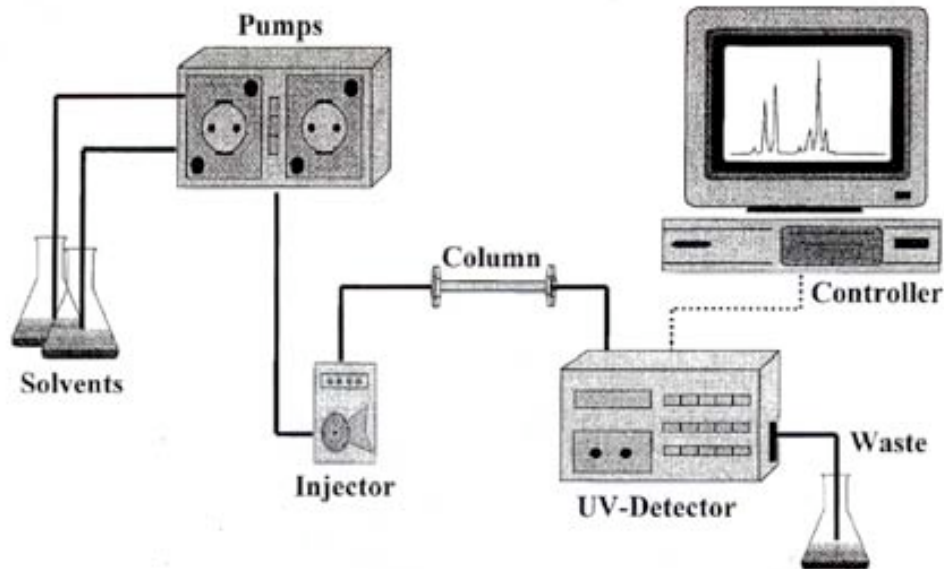


Figura 7: esquema dels components que formen part d'un instrument d'HPLC.

En el nostre cas vàrem utilitzar com a fase estacionària una fase reversa formada per silicats amb un hidrocarbur fusionat (silanitzat). Deu el seu nom que, a diferència de la resta de fases estacionàries, una fase reversa és més apolar que la fase mòbil i per tant els compostos que són més retinguts per la fase estacionària són els compostos més apolars. La polaritat de la fase estacionària variarà segons la longitud de l'hidrocarbur fusionat, a més longitud més apolar serà la fase estacionària. Els àcids micòlics són separats per HPLC en base a la seva polaritat, grup funcional, longitud de la cadena i nombre d'insaturacions. En una fase reversa els àcids micòlics més curts i més polars són els que elueixen en primer lloc. En contrast amb la CCF la identificació dels compostos eluits no és important sinó l'arrangament dels pics principals, la seva posició en base al temps de retenció i l'alçada comparada entre els pics. Tal i com s'observa a la figura 8, per obtenir un cromatograma d'HPLC els àcids micòlics són alliberats de les cèl·lules per saponificació i extrets amb cloroform. Llavors són

derivaritzats en *p*-bromofenacil èsters. Aquest extracte és injectat a la columna on serà eluït per la fase mòbil, que consisteix en un gradient de metanol i de metanol amb concentracions creixents de cloroform. Aquests èsters poden ser detectats en quantitats de picograms per espectrometria d'UV en la franja de longitud d'ona de 254-260 nm.



Figura 8: esquema de la derivatització estandaritzada d'àcids micòlics per a la seva posterior identificació pel sistema de UV-HPLC segons Butler (2001).

Ja fa alguns anys que s'ha augmentat la sensibilitat de la tècnica emprant un sistema de detecció per absorció de fluorescència. Aquest

fet ha propiciat el canvi al sistema de derivatització emprant compostos fluorescents (cumarínics) però en tot cas els cromatogrames obtinguts per les dues tècniques són totalment equiparables.

Ja fa alguns anys que l'anàlisi del patró d'àcids micòlics per HPLC permet la identificació de micobacteris de manera ràpida i fiable (Butler, 2001). La fiabilitat comparada de l'HPLC amb d'altres tècniques d'identificació com els tests bioquímics estàndard i les sondes d'ADN es va estudiar i els resultats van arribar a concordances del 97,2% i 98,9% respectivament (Guthertz, 1993; Thibert, 1993).

Dintre de la gran varietat de cromatogrames d'HPLC es poden observar patrons similars, és a dir, podem observar cromatogrames amb un únic grup de pics d'elució tardana (figura 9 a,b), que a la vegada es poden subdividir en simples i complexes. Tenim cromatogrames amb dos grups de pics més o menys separats entre si (figura c,d) i també patrons amb tres grups de pics (figura 9 e,f).

Malgrat tota estandarització, la variació en el patró d'HPLC és un fet demostrat quan s'analitzen un nombre important de soques d'una mateixa espècie. Normalment aquestes variacions són petites diferències en l'alçada dels pics i no afecten la forma general del patró d'HPLC (Butler, 1988). Hi han ocasions on els canvis en el patró d'HPLC són molt més importants, canviant radicalment la forma del cromatograma de forma que grups de pics característics queden molt reduïts o desapareixen (Butler, 1999) o en d'altres casos on apareix un nou pic o grup de pics, és el cas del *M. gordonae* (Cage, 1992; Butler, 1991) i del *M. brumae* respectivament (segons les conclusions d'aquest treball).

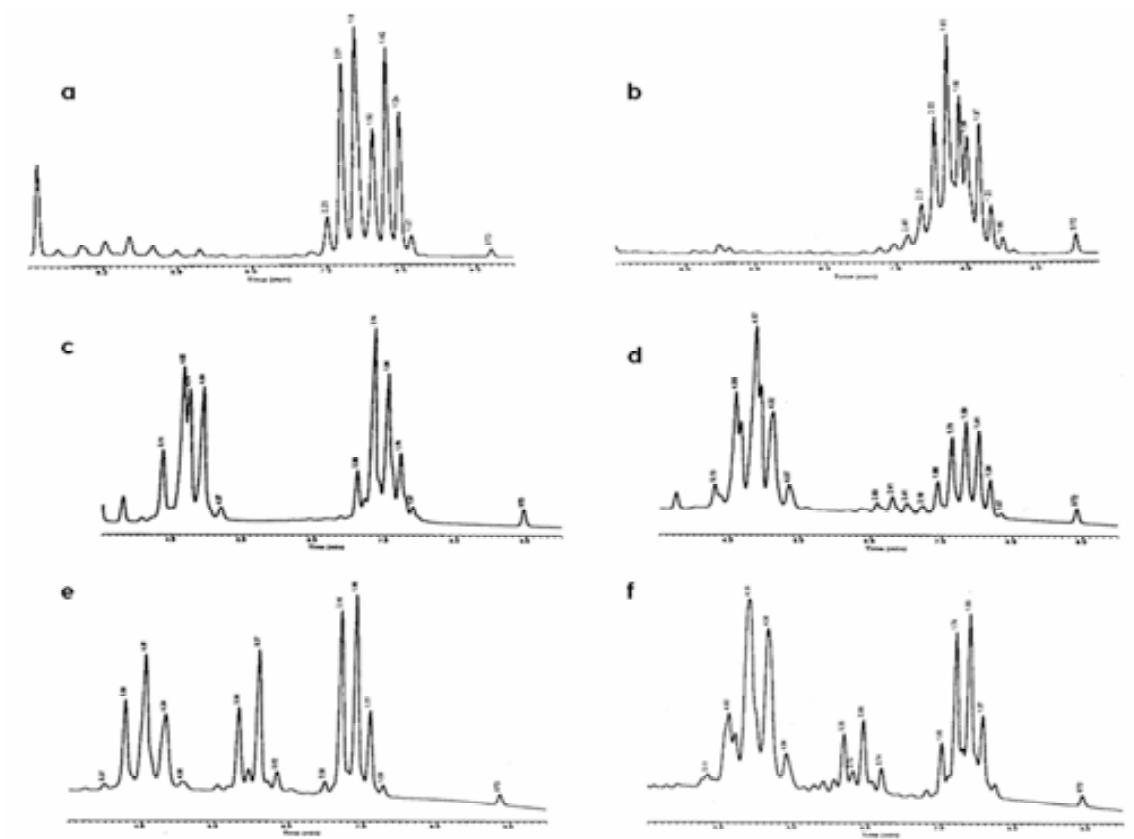


Figura 9: detall d'alguns tipus diferents de cromatogrames d'UV-HPLC: a-b) amb un sol grup de de pics d'elució tardana. c-d) amb dos grups de pics on el primer grup elueix abans del minut 4. e-f) amb tres grups de pics.

I.2.2.3.4 Lípids i glicolípids associats a la paret (lliures)

Aquests components de la paret cel·lular es poden extreure amb solvents orgànics perquè no es troben units covalentment a cap estructura. Molts d'aquests components són els efectors de les activitats biològiques que provoquen molts micobacteris i el seu coneixement és vital per entendre en profunditat els efectes que tenen en el sistema immunològic dels malalts afectats de TB i lepra.

I.2.2.3.4.1 Lipoglicans

Dintre d'aquesta denominació hi trobem el lipoarabinomanà (LAM), el lipomanà (LM) i els fosfatidil-inositol-manòsids (PIMs) (figura 10), distribuïts ubícuament en tot el gènere *Mycobacterium* (Briken, 2004). Tots ells comparteixen l'ancoratge de fosfatidil-*myo*-inositol (PIM₂, el nombre fa referència als residus de manosa), es troben relacionats biosintèticament i podem considerar-los com a formes procariòtiques de molècules ancorades amb fosfatidilinositol. Els lipoglicans es trobarien ancorats mitjançant la porció fosfatidil-inositol tant a la membrana plasmàtica com també a la bicapa externa de la paret cel·lular (Pitarque 2008)

L'estudi d'aquestes molècules es remunta als anys 60 amb els treballs de Ballou sobre la caracterització dels dos primers passos de la glicosilació dels PIMs (Brennan, 1967; Hill, 1966; Lee, 1964).

Juguen un paper molt important tant en la fisiologia del micobacteri (Kordulakovà, 2002) com en la modulació de la resposta immune en la TB i la lepra (Chatterjee, 1998). En concret el LAM és una molècula clau en la interacció del *M. tuberculosis* amb cèl·lules dendrítiques i macròfags (Maeda, 2003).

La biogènesi dels lipoglicans s'originaria amb la transferència d'un residu de α -D-manopiranososa (Manp) des de la GDP-Manp a la posició 2 de l'anell de *myo*-inositol per formar el PIM₁ (Kordulakovà, 2002). Aquest PIM₁ podria ser acilat o rebre una segona manosa a la posició 6 del

myo-inositol per formar el PIM₂ (Schaeffer, 1999; Brennan, 1967). Posteriorment es creu que el PIM₂ passaria per diversos passos de glicosilació cap a PIM₃-PIM₆ i cap als lipoglicans més complexos LM i LAM (Besra, 1997).

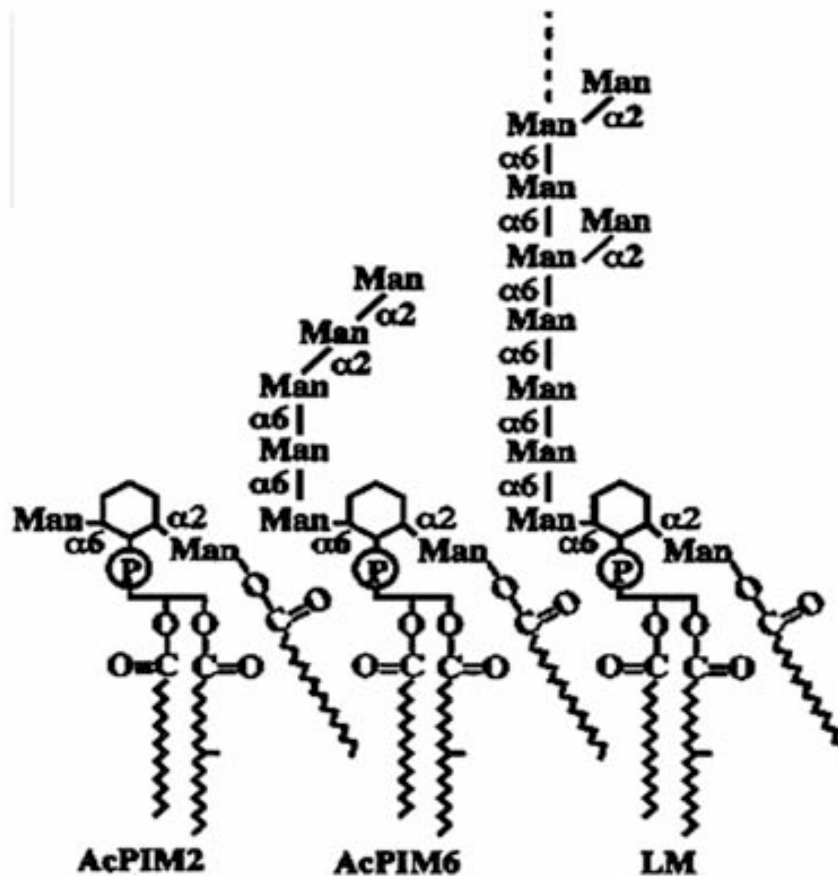


Figura 10: estructura esquemàtica d'alguns dels lipoglicans al gènere *Mycobacterium*. AcPIM2 i AcPIM6: ancoratges de fosfatidil-myoinositol amb 2 i 6 manoses, respectivament. LM: lipomanà

1.2.2.3.4.1.1 Fosfatidilinositol manòsids (PIMs)

Ja al 1939 va ser aïllat al *M. tuberculosis* un fosfolípid que contenia una porció amb manosa i inositol. Més tard, Lee i Ballou (1964) van determinar l'estructura del PIM₂. Es basa en l'*sn*-glicero-3-fosfo-1-D-myoinositol, amb el glicerolfosfat unit a la posició 1 de l'anell de myoinositol i amb dues α-D-Manp unides als carbonis 2 i 6 del myoinositol. De mitjana trobem tres àcids grassos esterificant l'ancoratge, que s'unirien als C1 i C2 del glicerol i al C6 de la Manp (figura 10). També podem trobar un quart àcid gras esterificant el C3 de l'inositol. Els àcids grassos més

freqüentment aïllats són el palmíic i el tuberculoesteàric (TBS) (Hunter, 1990).

Aquest grup de compostos no són exclusius del gènere *Mycobacterium*, també els trobem a gèneres afins com *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* i *Nocardia*. Al gènere *Mycobacterium*, si atenem al nombre de manoses, s'han descrit fins al PIM₆ (Lee, 1965; Ballou, 1963). PIM₂ i PIM₆ són les formes més abundants a *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG i *M. smegmatis* (Gilleron, 2003).

Els PIMs són una part molt important dels fosfolípids que es troben a la paret cel·lular i a la membrana plasmàtica i han estat considerats com a components estructurals importants que actuarien com a ciment pel CWS (Goren, 1984). S'ha demostrat que la quantitat de PIM₂ de l'envolta cel·lular del *M. smegmatis* determina la sensibilitat del micobacteri enfront d'antibiòtics hidrofòbics i hidrofílics (Kordulakovà, 2002; Parish, 1997). També s'ha proposat que els diferents tipus de PIMs podrien tenir un paper en la regulació del septe que es forma durant la divisió cel·lular i en el manteniment de la integritat de la membrana plasmàtica (Morita, 2006; 2005). Els estudis fets sobre les activitats immunomoduladores dels PIMs han obtingut resultats contradictoris. Alguns treballs no detecten inducció d'activitat proinflamatòria si comparem amb altres lipoglicans (Guérardel, 2003; 2002). D'altres, en canvi, detecten una modesta inducció d'activitat proinflamatòria (Gilleron, 2003). Sigui com sigui, no sembla que el paper principal dels PIMs sigui el d'induir una resposta immunològica en l'hoste. Malgrat això, la importància d'aquests compostos queda demostrada en el fet que les alteracions de la seva biosíntesi afecten de manera greu l'estructura de l'envolta cel·lular i fins i tot serien indispensables pel creixement cel·lular (Kordulakovà, 2003; 2002).

1.2.2.3.4.1.2 Liporabinomanà i Lipomanà

L'existència d'un polisacàrid d'arabinosa i manosa serològicament actiu a la paret dels micobacteris va ser observada ja en els anys 30 i 40

(Seibert i Watson, 1941; Menzel i Heidelberger, 1939; Chargaff i Schaeffer, 1935), revisat per Chatterjee (1998). Tant el LAM, en les seves varietats, com el LM, exhibeixen un ampli ventall d'activitats immunomoduladores que comprenen la inhibició de respostes cel·lulars, la inhibició de mediadors intracel·lulars i la inducció d'activitat inflamatòria.

El LAM és un component preeminent de l'envolta cel·lular dels micobacteris (Chatterjee, 1998). La molècula està formada per tres dominis; el peu d'ancoratge, el nucli polisacàrid i els extrems terminals. És una molècula de mida variable, de 17 fins a 30 kDa, degut a l'heterogeneïtat en el patró de ramificacions, en les fosforilacions i en les acilacions de l'ancoratge (Venisse, 1993; Hunter, 1986).

L'estructura de l'ancoratge és idèntica a la del PIM₂ (Lee, 1964). Al carboni 6 del *myo*-inositol s'uneix el domini homomanà (Hunter, 1990).

El nucli polisacàrid està format per un nucli homomanà (D-manà) amb cadenes laterals d'arabinosa (D-arabinà).

El D-manà és un esquelet lineal de Manp amb enllaç α -1 \rightarrow 6 i ramificat en el C2, C3 en el cas de *Mycobacterium chelonae* (Guérardel, 2002), per una unitat Manp. El nombre d'unitats que formen l'esquelet i el grau de ramificació varien segons l'espècie (Khoo, 1995; Venisse, 1995).

El D-arabinà és un esquelet d'arabinofuranoses (Araf) unides per enllaços α 1 \rightarrow 5 amb ramificacions d' α -D-Araf unides per enllaços O-3,5.

Les ramificacions presenten dues estructures (Vercellone, 1998): una estructura lineal de quatre arabinoses: β -Araf-(1 \rightarrow 2)- α -D-Araf-(α 1 \rightarrow 5)- α -D-Araf-(α 1 \rightarrow 5)- α -D-Araf-(α 1 \rightarrow 5). Una estructura, en dues branques, de sis arabinoses: [β -Araf-(1 \rightarrow 2)- α -D-Araf-(1-)]₂ \rightarrow 3 i \rightarrow 5)- α -D-Araf-(α -1 \rightarrow 5)- α -D-Araf1 \rightarrow .

En ambdós casos el terminal no-reductor està compost per β -Araf-(1 \rightarrow 2)- α -D-Araf.

La manera en com s'uneixen els dos homopolisacàrids no es coneix.

L'estructura del LM, que exerciria de precursor biosintètic del LAM, correspondria a una molècula lineal formada pel peu d'ancoratge i per

l'homopolímer de Manp amb enllaços $\alpha 1 \rightarrow 2$, excepte en el del *M. chelonae* que s'uniria amb enllaços $\alpha 1 \rightarrow 3$ (Guérardel, 2002) i sense les ramificacions terminals (figura 10).

Els extrems terminals del LAM, l'anomenat *capping*, els trobem units, en un percentatge o fracció variable, a les ramificacions de quatre i sis Araf. Les variants en la composició d'aquestes terminacions donen lloc a les tres formes de LAM conegudes fins ara. i) El ManLAM, que el trobaríem a les espècies de creixement lent com *M. tuberculosis* i *Mycobacterium bovis* BCG amb un *capping* format per una estructura que varia d'una a tres α -D-Manp, (α -D-Manp1 \rightarrow [2 α -D-Manp]_{0,1,2}), unides al C₅ del residu β -D-Araf (Chatterjee, 1993; 1992). ii) Els PILAM, trobats a micobacteris de creixement ràpid com *M. smegmatis* i *Mycobacterium fortuitum*, que tenen fosfatidil-inositol a les ramificacions terminals. La seva estructura va ser establerta com (myo-inositol-1)-fosfat-(5- β -D-Araf) (Gilleron, 1997). iii) Els denominats CheLAM trobats a *M. chelonae* i que no posseeixen cap afegit al seu terminal d'Araf (Guérardel, 2002).

Les activitats immunomoduladores del LAM, (inhibicions de respostes cel·lulars i de mediadors intracel·lulars, bloqueig de la maduració del fagosoma o inducció d'activitat inflamatòria), ha estat tractada i revisada en nombrosos treballs (Briken, 2004; Nigou, 2003; 2002).

Estudis recents han descobert el rol potencial que exerciria la molècula de LM en la resposta de l'hoste. S'ha demostrat que el LM, independentment si té l'origen en una espècie virulenta o no, indueix la secreció de citokines proinflamatòries, apoptosi i activació del macròfag (Dao, 2004; Quesniaux, 2004; Vignal, 2003). Sembla ser que el ratio LAM/LM seria un paràmetre important en la virulència dels micobacteris i que els micobacteris virulents minimitzarien la quantitat de LM per tal disminuir els seus efectes proinflamatoris. Anàlisis del ratio LAM/LM en les parets cel·lulars de micobacteris virulents, patògens facultatius i sapròfits avalarien aquesta hipòtesi (Briken, 2004).

I.2.2.3.4.2 Trealoses acilades

De glicolípidis basats en la molècula de trealosa en trobem una gran varietat de formes tant a micobacteris com a gèneres afins. Aquesta classe de glicolípidis tenen en comú el tenir una molècula de trealosa, α -D-Glcp- α' -D-Glcp, esterificada amb diferents tipus d'àcids grassos (figura 11). En la majoria de casos les trealoses acilades es diferencien en el nombre i naturalesa d'aquests àcids grassos. La molècula de trealosa demostra la seva importància en la dependència absoluta que els micobacteris en tenen, probablement pel seu paper a la síntesi d'àcids micòlics (Woodruff, 2004).

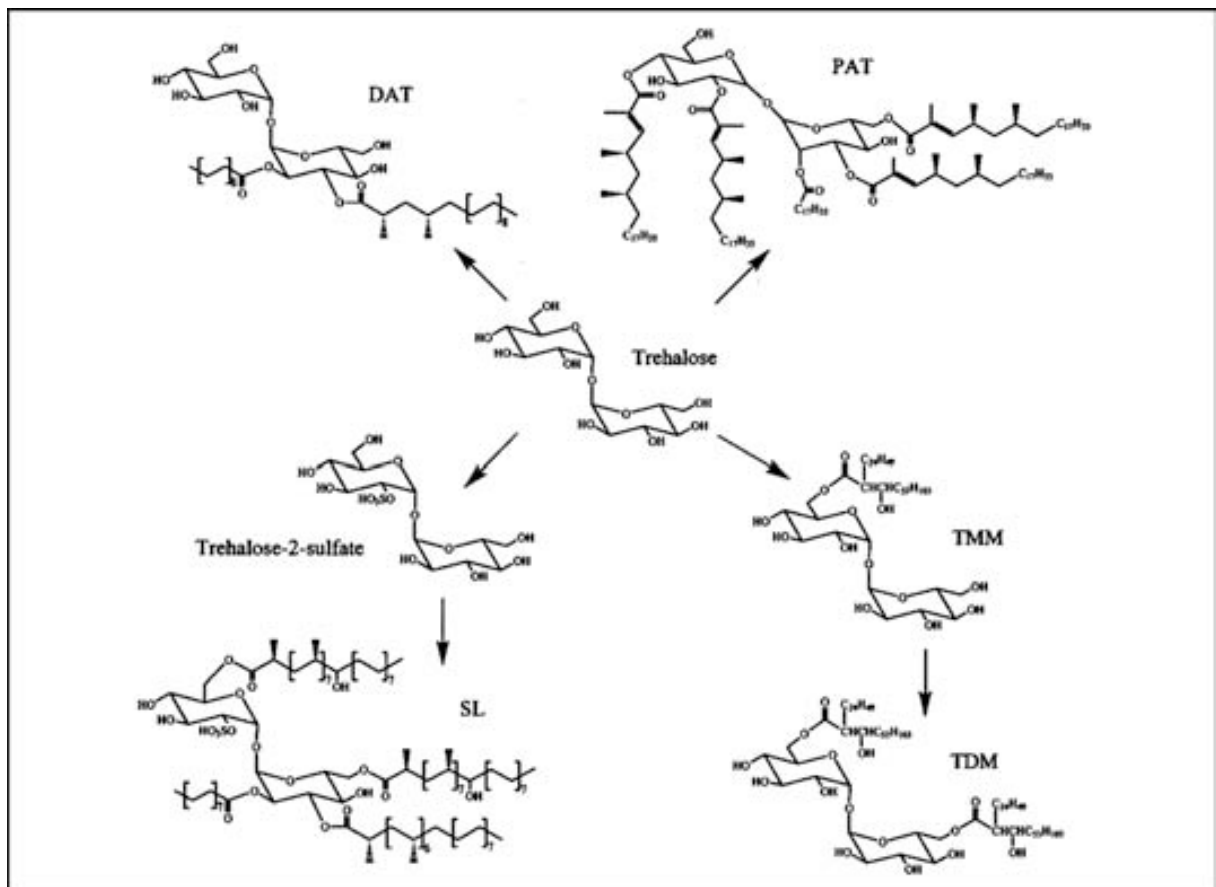


Figura 11: esquema d'alguns dels glicolípidis basats en la trealosa segons Asensio (2006).

I.2.2.3.4.2.1 Trealosa dimicolat

El seu nom complet és trealosa-6,6'-dimicolat. És ubiqua a tot el gènere *Mycobacterium*, excepte a *M. leprae*. També s'han trobat versions a gèneres afins com *Rhodococcus* i *Nocardia*. Altrament també rep el nom de *cord factor* (CF), terme que li deu a Bloch (1950) degut a que li assignaven el paper de la formació de cordes típica de soques virulentes del *M. tuberculosis*, fet que no s'ha pogut confirmar fefaentment. Malgrat que aquesta propietat ha estat descrita com a pròpia de micobacteris patògens (Hall-Stoodley, 2006; Glickman, 2000), estudis més recents han mostrat la formació de cordes en micobacteris no patògens com *Mycobacterium vaccae* (Rodríguez-Güell, 2006).

El CF es presenta com una mescla de compostos que difereixen en el tipus d'àcids micòlics que hi trobem. La separació d'aquests compostos es va fer utilitzant la CCF dels trimetil-silil éter derivats (Promé, 1976).

La localització del CF a la superfície del micobacteri era quelcom d'assumit, doncs si no era així, no era possible d'explicar la formació d'agregats i cordes. Altres estudis però la col·loquen no en zones superficials sinó en zones més internes de la paret cel·lular (Ortalo-Magné, 1996).

Les activitats biològiques del CF es troben relacionades amb la seva capacitat d'alteració de membranes lipídiques. És així com actuaria sobre les membranes mitocondrials provocant alteracions en la cadena respiratòria i en la fosforilació oxidativa (Kato, 1970). D'entre les funcions del CF cal fer un esment, per la seva complexitat, de la regulació de la virulència i de la resposta inflamatòria en ratolí que exerceixen els àcids micòlics amb *trans-/cis*-ciclopropanans del CF del *M. tuberculosis* (Rao, 2006; 2005).

La seva biosíntesi no es coneix amb certesa. L'estudi de Murphy (2005) va trobar un conjunt de gens responsables de la síntesi de trealosa. També se sap que el pas previ seria la síntesi de TMM-6P i posteriorment TMM, molècula que actuaria com a magatzem d'àcids micòlics. El responsable del seu transport fins a la paret cel·lular seria l'antigen 85

(Takayama, 2005).

I.2.2.3.4.2.2 Sulfolípid (SLs)

Formada per cinc membres, aquesta família de glicolípid es caracteritza per presentar un grup sulfat a la posició 2' de la trealosa. Els seus membres es diferencien uns d'altres en el nombre i tipus d'àcids grassos que esterifiquen la molècula de trealosa i també en la posició de les esterificacions.

Els sulfàtids varen ser descrits per Middlebrook el 1959 durant la cerca dels compostos responsables de l'absorció del colorant catiònic roig neutre per part del *M. tuberculosis*.

Són una família de compostos exclusius del *M. tuberculosis*, malgrat que la seva presència no és ubíqua a tota l'espècie. El component majoritari de la família és el SL-I: 2,3,6,6'-tetraacil- α,α' -D-trealosa-2'-sulfat (figura 12). Els residus acilats comprenen a més d'àcids esteàric/palmític, uns àcids grassos poc comuns anomenats pthiocerànics amb un nombre de carbonis entre C₃₇ (2,4,6,8,10,12,14,16-octametil-triacontà) i C₄₀ (2,4,6,8,10,12,14,16-octametil-hidroxitriacontà) (Goren, 1976a).

La seva biosíntesi ha estat estudiada identificant-se dos gens essencials en el procés (Converse, 2003; Sirakova, 2001). La mutació en aquests gens ha demostrat que el SL-I *per se* no és indispensable per al creixement *in vivo* del bacil tuberculós (Rousseau, 2003).

Malgrat ser un component específic del *M. tuberculosis* no ha estat molt estudiat com a eina serodiagnòstica. En un estudi al nostre laboratori, Julià (2002) varen obtenir amb el SL-I els millors resultats d'entre els glicolípid estudiats.

Entre les funcions biològiques que indueix, es troben:

- I. Promoció de la supervivència del bacil tuberculós inhibint l'activació del fagosoma (Goren, 1987;1976b).
- II. Inhibició de l'activació del macròfag (Pabst, 1988). Malgrat que altres estudis però no ho corroboren (Zhang, 1988).
- III. Producció d'una resposta humoral (Julià, 2004; 2002).

IV. Sinèrgia de la toxicitat del CF *in vivo* (Goren, 1990).

V. Contribució a la virulència en el bacil tuberculós (Okamoto, 2006).

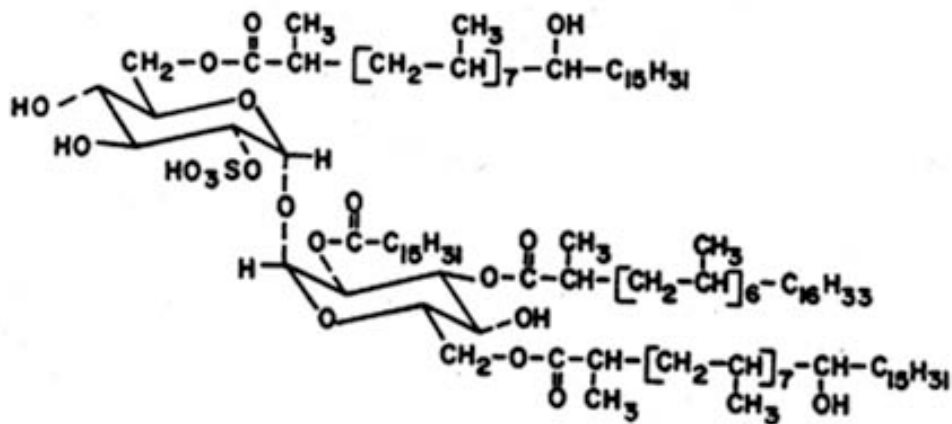


Figura 12: esquema de la molècula del sulfolipid-I del *M. tuberculosis*.

1.2.2.3.4.2.3 Lipooligosacàrids (LOS)

És una família de glicolípidis amb una estructura formada per una molècula de trealosa esterificada amb diversos àcids grassos, tant lineals com metilramificats. Fins i tot s'ha trobat cetopiruvat, fet que li donaria un caràcter aniònic (Hunter, 1988). Així mateix, la trealosa porta unit un oligosacàrid al carboni 3, 4 ó 6 que té entre 2 i 6 residus, alguns dels quals són sucres fins ara desconeguts i que són específics d'espècie (Muñoz, 1998; Gilleron, 1994; Hunter, 1984).

Dintre d'una mateixa espècie, els LOS es presenten generalment com una mescla de compostos que difereixen tant en la composició de l'oligosacàrid com en el nombre d'àcids grassos que esterifiquen la trealosa.

Els LOS eren probablement els antígens de superfície àlcali-làbils descrits per Schaefer el 1962 (Asselineau, 1998).

Les funcions que en coneixem són escasses però estarien relacionades amb la seva ubicació externa a la paret, com el fet de ser immunogènics (Asselineau, 1998; Muñoz, 1998) i receptors de micobacteriòfags (Besra, 1994).

I.2.2.3.4.2.4 Altres trealoses acilades

En aquest apartat tractarem de les diacil (DATs) i triacil-trealoses (TATs), les poliftenoïl trealoses (PPTs) i els fleats de trealosa.

Les PPTs estan formades per una molècula de trealosa esterificada amb cinc àcids grassos. La variant majoritària és la 2,2',3',4,6'-pentaacil-trealosa. Els residus acilats majoritaris són uns àcids grassos atípics que reben el nom de phthioenoics (àcid 2,4,6-trimetil-tetracos-2-enoic, C₂₇) i homòlegs. També trobem altres àcids grassos, minoritaris, com el palmític i l'esteàric (Daffé, 1988a).

Les PPT són compostos molt apolars que només s'han trobat a soques virulentes de *M. tuberculosis* i *M. bovis* (Daffé, 1988a). Degut a la seva estructura ramificada se'ls atribuí un paper passiu de protecció enfront la degradació enzimàtica per part del sistema immunitari de l'hoste (Daffé, 1988a). Estudis sobre la localització de components de la paret cel·lular els situaria en una posició externa (Ortalo-Magné, 1996).

La recerca de mètodes de detecció ràpida d'infeccions per *M. tuberculosis* va portar al descobriment de les DATs. La nomenclatura d'aquests compostos seria la 2,3-diacil-trealosa. Estudis sobre la seva localització situarien les DATs a la part més externa de l'envolta cel·lular (Ortalo-Magné, 1996). Els tipus de residus acilats que es troben esterificant la trealosa són variables: àcids grassos saturats i lineals, àcids grassos amb insaturacions i també metilramificats (Gautier, 1992; Vilkas, 1968; 1964).

Es tracta d'un dels glicolípid més estudiats per al serodiagnòstic de la TB ja que es troba a la majoria d'aïllats clínics del bacil tuberculós. Els resultats obtinguts pels estudis serodiagnòstics han estat contradictoris (Julià, 2002; Vera-Cabrera, 1994; Muñoz, 1997a).

Les TATs disposen d'una estructura on la trealosa estaria esterificada amb tres àcids grassos. De la mateixa manera que les DATs, també s'han utilitzat en estudis de serodiagnosi de la TB (Julià, 2004; 2002; Muñoz, 1997a; Escamilla, 1996). Estudis, duts a terme al nostre laboratori, provant la utilitat d'aquest antígen en la serodiagnosi de la TB, han

donat millors resultats que les de tests comercials però no han assolit els criteris de discriminació suficients per a ser utilitzats com a eina serodiagnòstica (Julià, 2004; 2002).

Els fleats de trealosa deuen el nom al microorganisme on varen ser aïllats per primera vegada, *M. phlei*, malgrat que també han estat trobats a *M. smegmatis* (Asselineau, 1972; 1969). L'estructura d'aquests compostos és la d'una molècula de α,α' -D-trealosa esterificada amb àcids grassos poliinsaturats, anomenats àcids fleics. El principal àcid gras d'aquesta família és l'àcid hexatriacontà-4,8,12,16,20-pentinoic (Asselineau, 1972; 1969). Aquests compostos se'ls ha relacionat amb l'estat d'agregació dels bacteris (Asselineau, 1969).

1.2.2.3.4.3 Dimicocerosats de phthiocerol (DIMs)

Descrits ja als anys 40 per Anderson i Yale, els DIMs i homòlegs són una família de lípids formats per un nucli β -diol (phthiocerol, phthiodolona o phthiotriol, segons tinguin de grup funcional un metoxi, una cetona o un tercer alcohol, respectivament) que té esterificant els dos hidroxils dos àcids grassos multi-metil-ramificats de C_{26} a C_{34} . Aquests àcids grassos, depenent de la seva estereoquímica, reben el nom d'àcids micoceròcics o phthiocerànics (Daffé, 1988b). Un estudi recent d'aquests compostos al *M. tuberculosis* va mostrar que el phthiocerol posseïa una longitud de cadena d'entre C_{34} i C_{36} i de C_{33-35} per a la molècula de phthiodolona (Camacho, 2001).

Els DIMs es troben descrits en vuit espècies de micobacteris, set d'elles patògens estrictes o oportunistes (Camacho, 2001; Cox, 1999). Juntament amb les MKs són els lípids més abundants de la paret dels micobacteris.

Treballs recents demostren que la manca d'aquest lípid a la paret del *M. tuberculosis* s'associaria a una manca de virulència del bacil tuberculós en ratolí (Camacho, 2001; 1999; Cox, 1999). A la vegada, la seva absència, modifica aspectes com la morfologia colonial i la sensibilitat a detergents com l'SDS (*sodium dodecyl sulphate*). Malgrat això, la seva

manca no fa al bacil tuberculós més sensible als agents terapèutics més comuns del que ho és la soca salvatge (Camacho, 2001). El mateix estudi trobava que els DIMs per si mateixos no contribuirien a la resistència del *M. tuberculosis* enfront els radicals lliures de nitrogen que sintetitza el macròfag. Malgrat que en un estudi anterior (Asselineau, 1984) arribaven a la conclusió que la seva estructura ramificada els faria compostos resistents a la degradació oxidativa i enzimàtica.

La seva ubicació a la paret cel·lular i la seva estructura ramificada fan pensar que juguen un paper important en l'arquitectura de la paret i en la seva baixa permeabilitat. Seria mitjançant aquest mecanisme que els DIMs contribuirien a la virulència del *M. tuberculosis* (Camacho, 2001). Un estudi recent ha demostrat la relació entre la presència d'una variant dels DIM i la hipervirulència de les soques *Beijing* del *M. tuberculosis* (Huet, 2009). En un altre estudi es demostra que els DIMs participen de forma decisiva en la invasió dels macròfags provocant un pH al lisosoma que afavoriria la supervivència del bacil tuberculós (Astarie-Dequeker, 2009).

En l'estudi de la seva biogènesi s'ha descrit l'enzim responsable de l'elongació des de l'àcid *p*-hidroxibenzoic (*p*-HBA) fins a l'àcid *p*-hidroxifenilalcanoic (Constant, 2002). L'àcid *p*-hidroxifenilalcanoic i un àcid gras de C₂₂₋₂₄ serien utilitzats com a precursors per un grup de cinc enzims, els PpsA-E, per a sintetitzar el nucli lipídic, β -diol. Aquesta via biosintètica seria comuna per a DIMs i PGLs (Azad, 1997). Amb anterioritat ja s'havien descrit els gens i enzims responsables de la síntesi dels àcids multi-metil-ramificats que esterifiquen el nucli lipídic (Azad, 1996). Posteriorment també s'han descrit alguns dels enzims responsables de la formació i modificació de la part glucosídica dels PGLs i dels derivats del *p*-HBA (Pérez, 2004a,b).

1.2.2.3.4.4 Glicolípidis fenòlics (PGLs)

Pertanyents a l'antiga categoria dels micòsids, aquests compostos tenen una estructura basada en els DIMs i els seus derivats. En els PGLs,

el β -diol porta unit un grup fenol, provinent de la tirosina, que a la vegada porta unit una porció sacàrida (figura 13).

Les diferències estructurals entre PGLs les trobem bàsicament a la porció sacàrida que té un nombre variable de residus, entre 1 i 4. Els sucres, bàsicament deoxisucres, poden estar O-metilats en un grau variable. Aquesta és la part de la molècula que ha demostrat ser antigènica (Watanabe, 1995). Com en el cas dels DIMs, la seva distribució és restringida dins el gènere *Mycobacterium*, on els trobem a espècies de creixement lent, patògenes estrictes o oportunistes amb l'excepció de *M. gastri*.

Són compostos específics d'espècie (Watanabe, 1995; Papa, 1989; Daffé, 1989; 1988b,c) i, a més, són immunogènics, fet pel que han estat utilitzats en la detecció de la infecció i/o malaltia per part de *M. tuberculosis* i *M. leprae* (Watanabe, 1995; Hunter, 1982). Els resultats en el cas de la TB han estat contradictoris (Watanabe, 1995; Cho, 1992; Martin-Casabona, 1989) degut probablement a la distribució irregular d'aquest antigen en les soques salvatges del bacil tuberculós (Muñoz, 1997b; Chaicumpar, 1997; Watanabe, 1994; Cho, 1992; Papa, 1989). En el cas del bacil de la lepra el seu paper es coneix millor i s'ha demostrat que el PGL-I determina el tropisme neural del bacil de la lepra (Ng, 2000). La quantitat de PGL-I també és molt important constituint el 2% de la massa del bacil i formant part de manera majoritària de la càpsula que rodeja *in vivo* el *M. leprae* (Hunter, 1981). Se'ls localitzaria en capes externes de la paret cel·lular (Ortalo-Magné, 1996).

Recentment però s'ha demostrat que la diferent virulència en aïllats clínics del *M. tuberculosis* és atribuïble, en part, a la producció de PGLs. Aquests compostos esvaïrien l'activació protectora del sistema immune de l'hoste (Tsenova, 2005).

En els últims anys s'han descobert a *M. tuberculosis* i *M. bovis* BCG uns compostos molt semblants als PGL denominats derivats de l'àcid *p*-hidroxibenzoic (*p*-HBAD). Són petits glicoconjugats que contenen la mateixa porció fenolglucosídica del PGL de *M. tuberculosis* (Constant,

2002). Són compostos molt interessants des del punt de vista de patogènia perquè mantenen la part de la molècula clau per a la interacció amb l'hoste, són excretats al medi de cultiu i a diferència dels PGLs, es troben en totes les soques testades malgrat que aquestes no posseeixin PGLs (Constant, 2002).

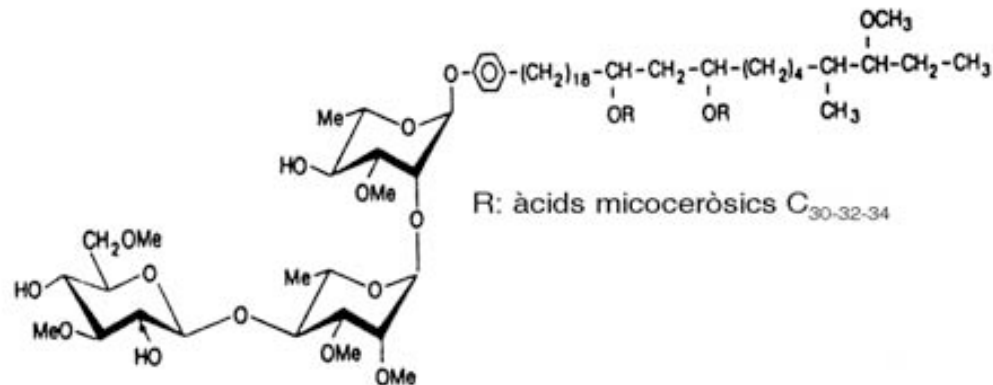


Figura 13: esquema de la molècula del glicolípid fenòlic PGL-I del *M. leprae*.

1.2.2.3.4.5 Glicopeptidolípid (GPLs)

Definits com a micòsids C el 1960, la paraula micòsid feia referència a glicolípid específics d'espècie d'origen micobacterià (Smith, 1960). Els GPLs són una família de compostos que es classifiquen en àlcali-estables i àlcali-làbils. Els més estudiats han estat els GPLs àlcali-estables que estan formats per un petit pèptid, D-Phe-D-*allo*-Thr-D-Ala-L-alaninol, amb l'alaninol substituït per un residu de 3,4-di-O-metil-L-Rha (Vilkas, 1968). Unit a l'extrem *N*-terminal lliure (Phe) tenen un àcid gras de cadena llarga, de C₂₆ a C₃₄ el qual porta un grup β-hidroxil o metoxi (Daffé, 1983b). A més, el residu d'*allo*-Thr porta unit un monosacàrid o un oligosacàrid, fet que divideix els GPLs àlcali-estables en apolars i polars. Els GPLs apolars porten un residu de 6-deoxi-L-talosa (Lanéelle, 1968) i les variants polars porten un disacàrid comú format en la part proximal per α-L-Rha-(1→2)-6-deoxi-L-talosa, a més d'un oligosacàrid variable que li dóna al GPLs especificitat antigènica. També s'han descrit altres GPLs àlcali-estables que difereixen en la localització i naturalesa dels residus

sacàrids, com és en el cas del *M. fortuitum* biovariant *fortuitum* (López-Marín, 1991).

Els GPLs polars varen servir de base per a la definició dels diferents serotips del grup *MAIS* (*M. avium-intracellulare-scrofulaceum*) (Brennan, 1977) dels que s'han descrit fins ara 31 serotips (Denner, 1992). Aquesta especificitat és deguda a la variabilitat en els residus de l'oligosacàrid (Brennan, 1981; 1979). Aquests compostos es corresponien als antígens d'Schaefer (Brennan, 1979).

Els GPLs àlcali-làbils, trobats a *M. xenopi*, tenen un nucli lipopèptid diferent i contenen residus de serina (figura 14) (Besra, 1993b; Rivière, 1992; 1991).

Darrerament, els GPLs han estat estudiats pel seu paper en la morfologia colonial i en la motilitat de les espècies *M. avium* i *M. smegmatis* (Recht, 2000; Martínez, 1999).

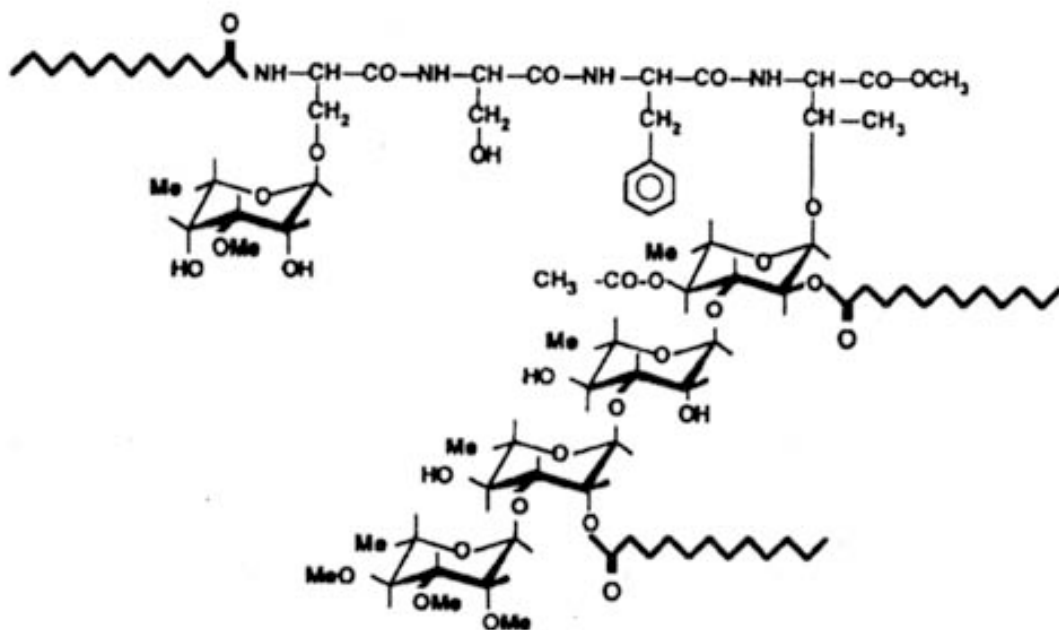


Figura 14: esquema de la molècula del glicopeptidolípid del *M. xenopi*.

I.3 *Mycobacterium gordonae*: trets característics

El *M. gordonae* és una espècie de creixement lent, escotocromògena i àmpliament distribuïda en aigües naturals i sòls (Wayne, 1986). Té un creixement eugònic i un color ataronjat. Creix entre els 25° i 42°C tot i que el seu òptim es troba als 37°C. Va ser descrita per Bojalil (1962) i la soca tipus és el *M. gordonae* ATCC 14470^T. Els seu patró d'àcids micòlics està format pels α -, metoxi- i ceto-micolats. El seu cromatograma d'HPLC (figura 15) presenta majoritàriament un sol grup de pics d'elució tardana malgrat que també s'han descrit soques amb un segon grup de pics d'elució ràpida (Butler, 2001; Cage, 1992; Butler, 1991). A més dels hàbitats naturals característics, és una espècie que s'ha trobat en aigües envasades (Papapetropoulou, 1997) i és el micobacteri més freqüentment aïllat en piscines (Leoni, 1999), probablement degut a la seva resistència a la desinfecció amb clor (Le Dantec, 2002). El fet que tingui un hàbitat aquàtic ha fet que ocasionés contaminacions nosocomials degudes a la colonització de la xarxa d'aigua sanitària (Galassi, 2003; Fujita, 2002; Lalande, 2001; Vogiatzakis, 1998). Malgrat que no és considerada com una espècie patògena ni tan sols oportunista, s'han descrit infeccions en pacients immunocompromesos (Pinho, 2009; Brener, 2009; Rusconi, 1997; Bernard, 1992; London, 1988; Clague, 1985) i també en pacients sans (Foti, 2009).

Els glicolípidis que caracteritzen la paret cel·lular del *M. gordonae* són els LOS, sent el tipus LOS-I el majoritari, malgrat que també trobem dels tipus II, III i IV (Besra, 1993a). Són compostos antigènics que es localitzarien a la part més externa de l'envolta cel·lular (Ortalo-Magné, 1996).

La heterogeneïtat del *M. gordonae* ha estat descrita en diferents estudis i per diferents tècniques. La identificació de micobacteris per mètodes moleculars ha revelat en el *M. gordonae* una variabilitat en una zona de l'ADNr 16S, que en la majoria d'espècies es troba molt conservada (Kirschner, 1992). També s'ha trobat variabilitat quan s'usen d'altres

mètodes d'identificació molecular com el Gen-probe (Walton, 1991), els PRA (PCR-*restriction length polymorphism analysis*) (Telenti, 1993; Plikaytis, 1992) i també amb el patró d'HPLC (Cage, 1992; Butler, 1991). Cage (1992) va detectar en 14 de 63 soques del *M. gordonae* una variant bifàsica del patró d'HPLC, amb dos grups de pics al patró, absolutament diferenciada del patró característic del *M. gordonae* amb un sol grup de pics. El nostre treball ha pogut correlacionar aquest patró bifàsic amb diferències en el patró d'àcids micòlics així com identificar el compost responsable d'aquesta variant en el patró cromatogràfic.

introducció

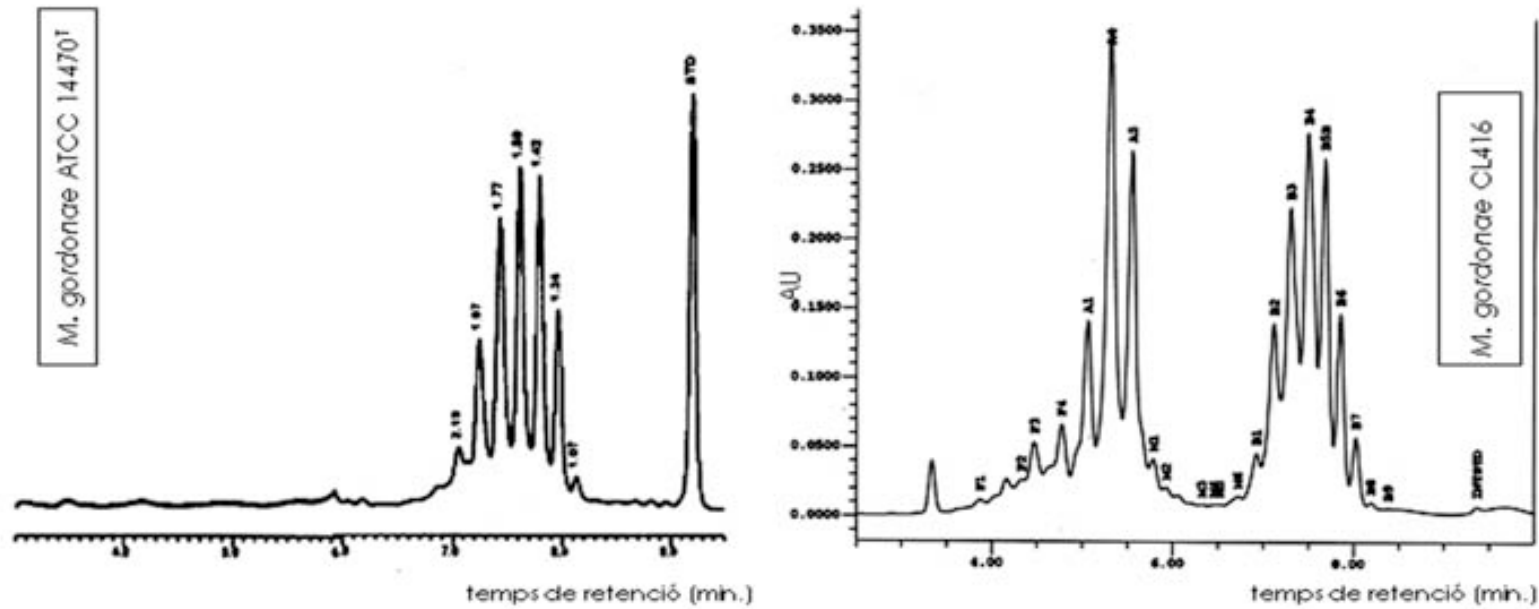


Figura 15: cromatogrames d'HPLC del *M. gordonae* ATCC 14470^T (*single cluster*, segons Butler, 2001) i la soca *double cluster* del nostre laboratori *M. gordonae* CL-416.

I.4 *Mycobacterium brumae*: trets característics

El *M. brumae* és un micobacteri ambiental, no cromogen i creixedor ràpid. El seu nom prové de l'època de l'any, l'hivern, en que van ser aïllats els primers espècimens. Van ser aïllats principalment en aigües de riu, però també s'han trobat en sòls, en esput i a catèters (Jiménez, 2011; Lee, 2004; Luquin, 1993). També s'ha descrit com una espècie immunoestimuladora en el càncer de bufeta (Yuksel, 2011). Creix a 25, 30 i 37°C però no a 45°C. El seu òptim es troba als 30°C. La seva morfologia colonial és rugosa. Morfològicament és semblant al *Mycobacterium fallax* i com aquesta espècie, el seu patró d'àcids micòlics només conté α -micolats (Luquin, 1993). Tots dos són creixedors ràpids i es poden diferenciar pels seus productes de piròlisi en la cromatografia de gasos (GLC). *M. brumae* només produeix docosanoats (C₂₂) i en canvi *M. fallax* produeix docosanoats i tetracosanoats (C₂₄). L'anàlisi del perfil lipídic per GLC manifesta la presència d'hexadecanoat, octadecenoat i tuberculoestearat com a èsters d'àcids grassos majoritaris. L'estudi estructural més acurat dels seus àcids micòlics determinà la presència únicament de dues insaturacions i una longitud de cadena de C₆₈ a C₇₆. Segons el tipus d'insaturacions van poder diferenciar-se tres α -micolats: amb dues insaturacions en *trans*, *trans-cis* i dues insaturacions en *cis* (Luquin, 1993). La comparació amb altres espècies manifesta graus de similitud del 80% amb *Mycobacterium alvei*, del 75,8% amb *M. fallax* i del 75% amb *Mycobacterium moriokaense* (Luquin, 1993). La soca tipus és el *M. brumae* CIP 103465^T. El *M. brumae* comparteix amb *M. fallax* i *Mycobacterium triviale* un mateix patró d'àcids micòlics, únicament α -micolats. Segons el treball de revisió de Butler (2001), el patró d'HPLC del *M. brumae* es un patró amb un únic grup de pics que elueixen tard, després del minut 6 (figura 16 A). El patró del *M. brumae* es diferencia dels de *M. triviale* i *M. fallax* en que té un únic pic principal de molta més

intensitat que la resta de pics secundaris, que en els cromatogrames dels *M. fallax* i *M. triviale* són més intensos. A diferència del patró cromatogràfic del *M. brumae* publicat per Butler (2001) (figura 16 A), al nostre laboratori vàrem detectar a les tres soques del *M. brumae*, inclosa la soca tipus, una variació molt important en el patró cromatogràfic conegut degut a la presència d'un pic aïllat que eluïa molt d'hora, abans del minut 4 i que no s'havia vist abans en cap patró d'HPLC d'altres micobacteris i el que era encara més important, diferia de manera molt important del patró publicat per Butler (2001) (figura 16 B). Es tractava doncs d'un compost o compostos desconeguts fins aleshores perquè, malgrat existeixen micobacteris amb patrons d'HPLC amb grups de pics d'elució ràpida, abans del minut 5 (Butler, 2001), fins aquell moment no s'havia descrit un patró d'HPLC amb un pic tan important que sortís abans del minut 4.

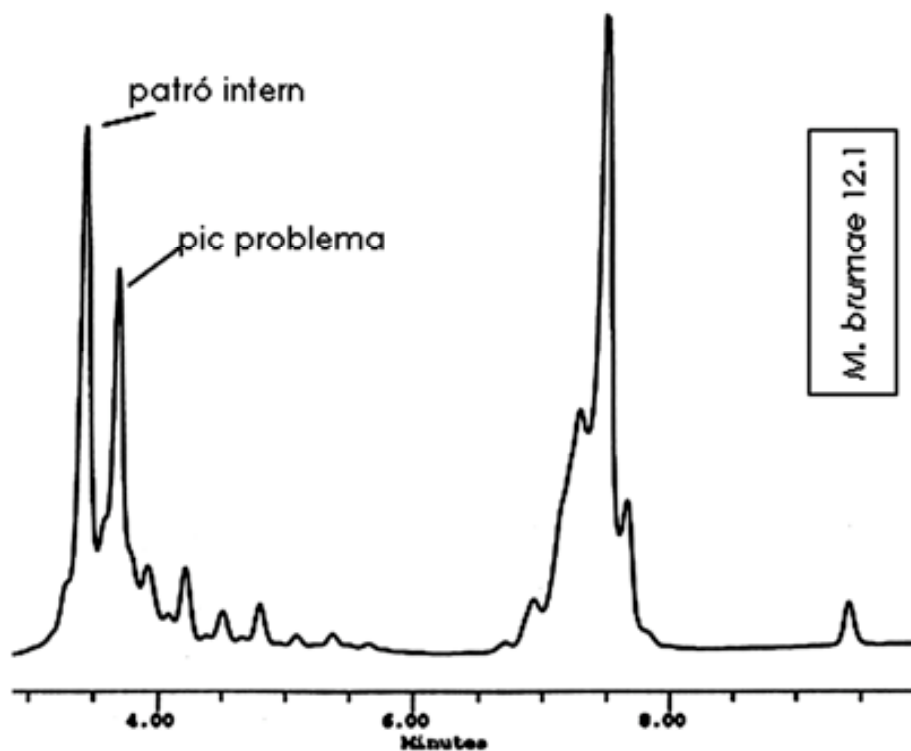
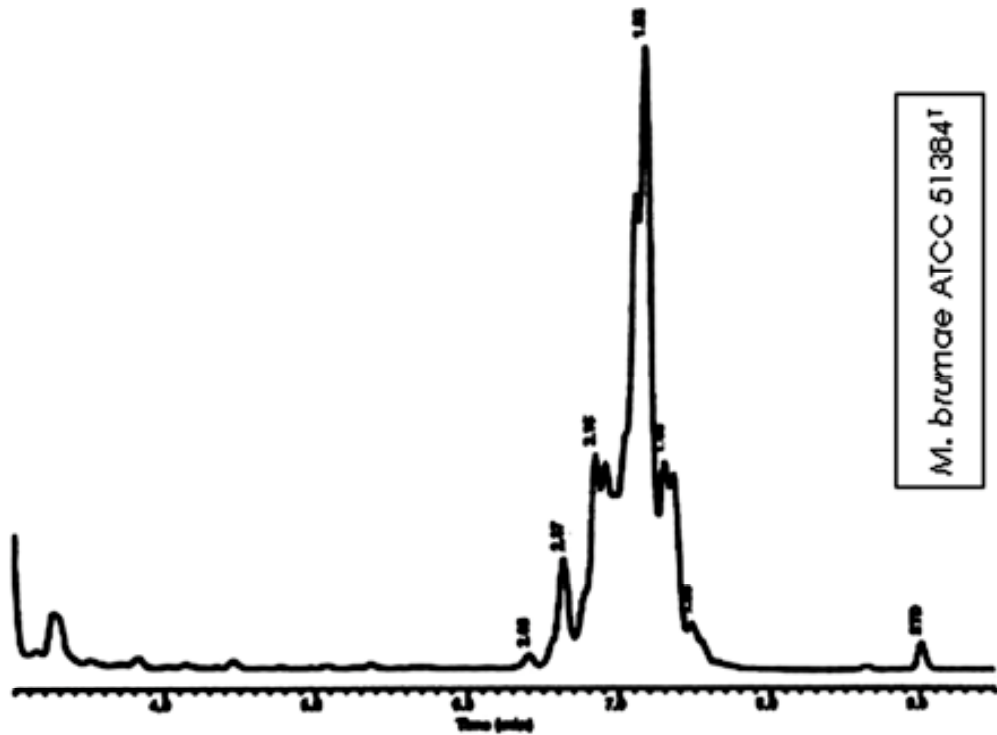


Figura 16: cromatogrames d'HPLC de les soques tipus del *M. brumae* ATCC 51384^T (CIP 103465^T). A) segons Butler (2001). B) soca 12.1/CR-270 (referències internes de la soca tipus CIP 103465^T al laboratori de Micobacteriologia de la UAB).

Objectius

Objectius

Els objectius principals d'aquest treball han estat bàsicament dos:

- I. Identificar estructuralment el o els compostos responsables del segon grup de pics presents al patró d'HPLC detectats en algunes soques del *M. gordonae*.
- II. Identificar estructuralment el o els compostos responsables del pic addicional observat en els cromatogrames d'HPLC de les soques del *M. brumae*.

Com a objectius secundaris es van establir:

- Realitzar un estudi estructural comparatiu entre els àcids micòlics que formen el patró característic, α -, metoxi- i ceto-micolats, de les soques estudiades del *M. gordonae*.
- Estudiar el possible origen del/s compost/os responsables del pic addicional observat al patró d'HPLC del *M. brumae*.

Materials i mètodes

Materials i mètodes

M.1 Cultiu de les soques

En l'estudi del *M. gordonae* es van incloure cinc soques designades com CR-178, CL-333, CL-361, CL-416 i CL-554 conservades al socari del Laboratori de Micobacteriologia (UAB). Totes elles eren d'origen clínic (tres esputs -CR-178, CL-333, CL-361-, una neteja alveolar -CL-416- i un broncoaspirat -CL-554-). També s'estudiaren les soques de col·lecció *M. gordonae* ATCC 14470^T i *M. gordonae* ATCC 35759. Totes elles van créixer en medi de Sauton a 32°C durant 6 setmanes. La identificació de les soques es va dur a terme mitjançant proves bioquímiques d'acord amb els mètodes estàndard (Tsukamura, 1967) i les identificacions amb tècniques genètiques es van fer amb el *Gen-Probe Rapid Diagnostic System* seguint les instruccions del fabricant (Biomèrieux).

En l'estudi del *M. brumae* es varen utilitzar tres soques, CR-103 (12.3), CR-142 (12.2) i la soca tipus *Collection Institut Pasteur* (CIP) 103465^T (CR-270/12.1). Totes elles es conservaven al socari del Laboratori de Micobacteriologia (UAB). Les soques van créixer en medi de Sauton a 37°C durant tres setmanes.

Medi de Sauton

A 1 litre d'aigua destil·lada se li afegeixen els següents reactius:

L-Asparragina	4 g
Àcid cítric	2 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
Citrat de ferro i amoni	0,05 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,4 g
Glicerol	38,7 ml

Una vegada dissolts mitjançant agitació s'ajusta a pH 7,2-7,3 amb una solució aquosa al 25% de NH_4OH . Després d'ajustar el pH s'afegeix 20 g d'agar i s'autoclava a una temperatura de 121°C durant 20 min. Finalment es reparteix en plaques de Petri a raó d'aproximadament 20 ml per placa

Medi de criopreservació

A 100 ml d'aigua destil·lada s'afegeix 20 g de llet desnatada en pols. Es dissolt mitjançant agitació i s'autoclava a 115°C durant 15 min. Una vegada autoclavat es dispensa en vials de 1,5 ml a raó de 1 ml per vial i s'emmagatzema a 4°C fins a la seva utilització.

Conservació de les soques

Totes les soques utilitzades en ambdós estudis es conservaven en el socari del laboratori de Micobacteriologia de la UAB a una temperatura de -40°C en vials amb 1 ml de medi de criopreservació.

M.2 Obtenció i derivatització dels extractes lipídics

M.2.1 Obtenció dels extractes lipídics

En l'estudi del *M. gordonae* les cèl·lules es recolliren de la superfície del medi de cultiu i després es procedí a alliberar els àcids grassos, àcids micòlics i alcohols mitjançant saponificació segons el mètode descrit per Daffé (1983a). Amb aquest mètode les cèl·lules (uns 50 mg) es posaven en contacte amb una solució del 5% de KOH en metanol/benzè 8/2 (v/v) a una temperatura de 80°C durant 7 h sota reflux. Posteriorment, la mescla s'acidificava amb HCl 2N fins a pH 2 i els compostos saponificats s'extreien amb éter etílic, es rentaven amb aigua fins a pH neutre i la fase etèrea es separava en un matrau de vidre per posteriorment evaporar-la en un rotavapor (Büchi). Un cop saponificades, les mostres

s'emmagatzemaven a 4°C en atmosfera de N₂ per posteriorment derivatitzar-les per a la realització de les tècniques analítiques de CCF, GLC, HPLC i MS.

En l'estudi del *M. brumae* els extractes lipídics es van obtenir segons el mètode basat en el treball de Mederos (1998). Amb aquest mètode després de recollir les cèl·lules de la superfície del medi de cultiu, els lípids s'extreien successivament durant 12 h mitjançant mescles de cloroform/metanol; 1/1 i 2/1 (v/v) a temperatura ambient. El volum dels solvents utilitzats era tres vegades el volum que ocupaven les cèl·lules. Els extractes obtinguts s'unien i s'evaporaven a sequedat sota un corrent de N₂. Posteriorment, els extractes es dissolien en el mínim volum possible de cloroform i es sotmetien a una partició en una mescla de cloroform/metanol/aigua; 8/4/3 (v/v/v). L'extracte es quedava decantant en aquesta mescla durant 12 h després de les quals es recollia la fase inferior o fase clorofòrmica en un matrau tarat prèviament, i s'evaporava a sequedat en un rotavapor. Un cop decantat, l'extracte lipídic s'emmagatzemava a 4°C en atmosfera de N₂ fins a la seva utilització.

M.2.2 Derivatització dels productes saponificats a èsters metílics amb diazometà

Els extractes lipídics obtinguts en la saponificació es derivatitzaven a èsters metílics posant-los en contacte amb una solució etèrea de diazometà. El diazometà s'obtingué prèviament a partir del tractament de la *N*-nitroso-*N*-metilurea amb una solució concentrada d'hidròxid de potassi. En la preparació es formaven dues fases, la fase aquosa i la fase orgànica amb l'éter etílic on el diazometà es dissolia a mesura que s'anava formant. Les proporcions de la reacció eren d'1 g d'*N*-nitroso-*N*-metilurea per 15 ml d'éter etílic i 3 ml d'hidròxid de potassi al 40% en aigua. Aquesta mescla es preparava i s'emmagatzemava a -20°C preservada de la llum unes hores abans de la seva utilització. Per a la

reacció de metilació les proporcions utilitzades eren (aproximadament) de 2 ml de solució etèrea contenint el diazometà per cada 10 mg d'extracte lipídic saponificat i la reacció es deixava durant un espai de 10 min. Un cop transcorreguts els 10 min, la solució etèrea s'evaporava a sequedat sota un corrent de N₂ i l'extracte lipídic ja metilat s'emmagatzemava a 4°C fins a la seva anàlisi.

M.2.3 Derivatització dels productes saponificats a *p*-bromofenacil-èsters

Per a realitzar l'estudi per HPLC, els àcids micòlics foren derivatitzats a *p*-bromofenacil-èsters tal i com s'havia descrit anteriorment (Butler, 1988; Durst, 1975). Breument, en un tub de 5 ml amb tap de tefló es va ressuspendre una al·líquota de l'extracte lipídic en 0,5 ml de cloroform i se li va afegir 2 mg de carbonat de potassi, 25 µl de bromur de *p*-bromofenacil en acetonitril i 25 µl del catalitzador dicitclohexil-18-corona-6-éter en acetonitril. Aquesta mescla es va escalfar a una temperatura de 85°C durant 45 min i en constant agitació. Després de la derivatització, els èsters de *p*-bromofenacil d'àcids micòlics van ser filtrats a través d'un filtre amb una membrana de niló i un tamany de porus de 0,45 µm i evaporats a sequedat.

M.2.4 Trencament oxidatiu dels dobles enllaços

Els lípids van ser oxidats mitjançant la tècnica del permanganat-periodat (Rafidinarivo, 1985; Von Rudloff, 1956). Els lípids (uns 20 mg) van ser dissolts en 0,6 ml de benzè i es va afegir una mescla composta de *t*-butanol (8 ml) bicarbonat sòdic 200 mM (2,4 ml), aigua destil·lada (1,2 ml) i periodat permanganat (5,4 ml). Aquesta darrera solució estava formada per una solució acuosa de 100 mM de periodat de sodi i 250 mM de permanganat de potassi. L'oxidació es va dur a terme durant dos dies a una temperatura de 30°C i en constant agitació. La reacció es va aturar afegint metabisulfit de sodi fins a la decoloració. La

solució va ser acidificada amb àcid sulfúric al 20% i els productes resultants de l'oxidació van ser extrets amb éter etílic i el solvent es va evaporar. Els productes resultants de l'oxidació van ser metilats amb diazometà, purificats per cromatografia de capa fina preparativa i identificats per GC-MS segons els seus temps de retenció i els patrons de trencament.

M.2.5 Derivatització dels productes saponificats a derivats pirròlids

Els èsters metílics d'àcids grassos (1 mg) van ser dissolts en 1 ml d'una preparació fresca de pirrolidina destil·lada (Aldrich) amb 0,1 ml d'àcid acètic. La mescla es va escalfar a 100°C durant 30 min per després ser refredada fins a temperatura ambient. Els productes amidats formats van ser extrets amb cloroform i la fase orgànica va ser rentada amb HCl 1M i aigua (Andersson, 1974). La fase orgànica ja rentada va ser evaporada a sequetat i la puresa dels derivats de pirròlids es va comprovar per CCF.

M.3 Purificació dels extractes lipídics

M.3.1 Precipitació en acetona freda

En l'estudi de *M. brumae* un cop obtingut l'extracte lipídic es va procedir a fer successives precipitacions en acetona freda (-20°C, 16 h). Es va ressuspèndre l'extracte lipídic en la mínima quantitat possible de cloroform i es va repartir en tubs de centrífuga on se li afegia acetona fins enrassar els tubs. Un cop enrassats es van refrigerar a -20°C durant 16 h per després centrifugar-los (1500g, 4°C, 30 min) separant l'extracte soluble en acetona freda de l'insoluble. L'extracte soluble en acetona freda es va tornar a reprecipitar successivament en metanol fred tal i com es descriu a la secció M.3.2. Els sobrenadants i els precipitats, de color blanquinós, es van guardar a 4°C en atmosfera de N₂ per a la seva

posterior anàlisi per cromatografia líquida (apartat M.3.3). Una al·líquota de cadascuna de les precipitacions i d'ambdós extractes, soluble i insoluble, es va saponificar i metil·lar amb diazometà (apartats M.2.1 i M.2.2) i es va analitzar tant per CCF (apartat M.4.1) com mitjançant GLC-MS (apartat M.4.3).

M.3.2 Precipitació en metanol fred

Per a la precipitació en metanol, els extractes lipídics es van resuspendre en la mínima quantitat possible de cloroform i es van repartir en tubs de centrífuga amb taps de tefló on se li afegia metanol fins enrassar els tubs. Un cop enrassats els tubs es refrigeraven a -20°C durant 16 h. Posteriorment els tubs es van centrifugar (1500g, 4°C , 30 min), i es van separar els sobrenadants dels precipitats. Un cop separats, tant els precipitats com els sobrenadants es van pesar i guardar a 4°C en una atmosfera de N_2 per a posteriors anàlisis.

M.3.3 Cromatografia líquida

Per a la cromatografia líquida es va preparar una mescla en forma de gel amb la fase estacionària de sílica-gel 60 (tamany de partícula 0.063-0.200 mm; Merck). El solvent de càrrega es va variar segons l'estudi. En el cas del *M. gordonae* el solvent de càrrega va ser éter de petroli (punt d'ebullició, bp, $60-80^{\circ}\text{C}$) i en el del *M. brumae* va ser cloroform. Un cop preparat, el gel s'abocava a una columna de vidre d'alçada suficient. En aquest pas era clau el·liminar les bombolles que es formaven a l'interior de la fase estacionària. La quantitat de fase estacionària utilitzada era d'aproximadament 100 vegades el pes de la mostra. Per tal d'empaquetar correctament la fase estacionària en la columna es van passar a través d'ella 3 volums del mateix solvent amb què es va s'empaquetar la columna (cadascun dels volums era l'equivalent al volum que ocupava la fase estacionària a la columna) que es descartaven. La columna tenia una clau de tefló en el seu extrem

inferior per on s'eluirien els diferents compostos de la mostra. Un cop muntada la columna, la mostra a separar es va dissoldre en la mínima quantitat possible del mateix solvent de càrrega utilitzat per empaquetar la columna. En l'estudi del *M. gordonae* els precipitats es van dissoldre en la quantitat més petita possible d'éter de petroli, (bp 60-80°C) i s'aplicaven a la columna. Es feren elucions successives, de 3 a 5 volums per elució, començant amb éter de petroli 100% i seguint amb increments successius d'éter etílic en éter de petroli (5%, 10%, 20% i 100%). Les elucions es controlaren per CCF tal i com es descriu a l'apartat M.4 del material i mètodes. En l'estudi del *M. brumae* els compostos presents en l'extracte lipídic es van eluir utilitzant en primer lloc una fase estacionària de sílica-gel 60 (tamany de partícula 0,063-0,200 mm) i una fase mòbil consistent en concentracions creixents de metanol en cloroform (5%, 13%, 50% i 100%) amb 3-5 volums per elució. En un segon estadi de la purificació es van utilitzar com a fase estacionària sílica-gel 60 amb un tamany de partícula més petit (0,040-0,063 mm) i com a fase mòbil concentracions creixents d'éter etílic en éter de petroli. En ambdós estudis el resultat de la cromatografia líquida es va monitoritzar per CCF tal i com abans s'ha descrit.

M.3.4 Cromatografia líquida de fase reversa

En la cromatografia líquida de fase reversa el muntatge de la columna és molt similar al vist a l'apartat anterior. La fase estacionària utilitzada va ser una sílica C₁₈ LiChroprep amb un tamany de partícula de 0,020 mm (Merck). De la mateixa manera que en l'apartat anterior el muntatge de la columna es va realitzar formant un gel amb la fase estacionària i el solvent de càrrega, en aquest cas una mescla de metanol/cloroform en proporció 95/5. La particularitat d'aquesta tècnica es troba en el moment de l'elució de la mostra perquè el menor tamany de la partícula i el seu empaquetament més compacte fa necessari aplicar una font de buit per portar a terme l'elució dels

compostos que formen part de la mostra. El gradient utilitzat per la fase mòbil era metanol/cloroform 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 75/25, 70/30, 65/35, 60/40, 55/45 i finalment 50/50. De cadacun dels gradients es passaven 2 volums d'elució.

M.3.5 Cromatografia de capa fina preparativa (CCFp)

Amb aquesta tècnica, les plaques utilitzades en CCF es van revelar utilitzant una cambra de separació de vidre saturada de vapors de iode. Els vapors de iode es dissolen en els compostos orgànics que es revelen com a taques de colors que van del groc al marró. L'aplicació de les mostres en aquesta tècnica difereix de la utilitzada per CCF en que en el cas de la CCFp l'aplicació es fa de manera continua, formant una franja i no en punts individuals. Un cop identificades i assenyalades les posicions dels compostos a purificar, la placa de CCF es deixa fora de la cambra d'elució fins que el iode s'evapora i desapareix el senyal. Un cop identificat el compost a la placa de CCF i evaporat el iode, aproximadament 24 h, es va rascar la porció de sílica corresponent al compost a purificar, es va dissoldre en metanol i es va filtrar a través d'un paper porós en un tub de vidre. Aquest procés es va repetir fins a tres vegades. Posteriorment el volum de metanol es va evaporar a sequedat sota un corrent de N₂. Un cop alliberat de la sílica, el compost problema es va purificar per cromatografia líquida fent-lo passar per una mini-columna de vidre (muntada en una pipeta Pasteur) amb sílica-gel i passant tres volums de cloroform per extreure els compostos orgànics utilitzats per unir la sílica al vidre de la placa de CCF i tres volums de metanol per obtenir el compost que volíem purificar. Finalment la seva puresa es va verificar per CCF com posteriorment es descriu (M.4.1).

En l'estudi del *M. brumae*, alternativament al sistema de detecció per iode, es va utilitzar el sistema de detecció per llum UV, mitjançant plaques de CCF de sílica-gel G-60 (gruix 0,25 mm, Merck). Les plaques

de CCF es van eluir amb diclorometà o amb una combinació de éter de petroli/éter etílic. Els compostos eluits es van detectar aplicant una solució en esprai de Rhodamine B (0,01% en dihidrogenfosfat de sodi 0,25M) i visualitzant la placa de CCF sota llum UV.

M.3.6 CCF argèntica

Els èsters metílics d'àcids grassos van ser fraccionats segons el seu contingut en dobles enllaços en plaques de CCF de sílica-gel impregnades amb una solució de nitrat d'argent. Les plaques es van eluir en una cambra saturada de diclorometà i posteriorment es van revelar aplicant en forma d'esprai una solució etanòlica del 0,2% de diclorofluoresceïna. Un cop detectats els diferents compostos es van rascar de la placa de CCF i es van recuperar eluint-los amb éter etílic.

M.4 Tècniques analítiques i instrumentació

M.4.1 Cromatografia de capa fina (CCF)

L'anàlisi per CCF es va fer utilitzant plaques comercials de vidre de 20x20 cm i 0,25 mm de gruix amb fase estacionària de sílica-gel 60 (Merck). Les mostres diluïdes convenientment en cloroform es van aplicar amb un tub capil·lar cal·librat de vidre de 10µl a la part inferior de les plaques, aproximadament a 2 cm de la base, separades entre si per entre 1 i 2 cm segons el nombre de mostres analitzades i es van deixar assecar a temperatura ambient. Posteriorment, les plaques carregades amb les mostres es va eluir col·locant-les en cambres de separació de vidre saturades amb un o més solvents orgànics, depenent de l'estudi i dels compostos a separar. En l'estudi del *M. gordonae* es va tractar d'una mescla d'*N*-hexà/éter etílic, 85/15 (v/v) (x3) o també de diclorometà (x1). En canvi en l'estudi del *M. brumae* el sistema d'elució va ser cloroform/metanol, 90/15 (v/v) (x2) o diclorometà. Per revelar les plaques de CCF, es van col·locar les plaques sobre un sistema extractor

d'aire i es va aplicar una solució en esprai sobre la placa contenint un reactiu, diferent segons el tipus de component que es volgués detectar. Posteriorment es va revelar la placa col·locant-la sobre una planxa calorífica a 120°C durant 5 min (excepte en el cas del reactiu de Dittmer on el revelat és a temperatura ambient). Per a la detecció de compostos lipídics es va utilitzar una solució d'àcid molibdofosfòric, per a la detecció de fosfolípids es va utilitzar reactiu de Dittmer i una solució àcida d'antrona per a la detecció de compostos que contenissin sucres. Els èsters metílics dels àcids micòlics així com els compostos problema es van identificar comparant-ne els coeficients de retenció (R_f ; *Ratio of front*) amb patrons reals o bibliogràfics. El valor R_f no és res més que una manera d'expressar la posició del compost sobre una placa de CCF com a fracció decimal i es calcula dividint la distància recorreguda pel compost a la placa per la distància que ha recorregut el front del solvent.

M.4.1.1 Reveladors específics utilitzats en CCF

Reactiu d'àcid molibdofosfòric: es prepara dissolent l'àcid molibdofosfòric al 10% en etanol. L'àcid molibdofosfòric és un compost de color groc-verd, soluble en solvents polars com l'aigua i l'etanol que tenyeix compostos fenòlics, ceres, alcaloids i esteroids. Els compostos insaturats redueixen l'àcid a blau de molibdè i el seu color blavós s'intensifica amb el nombre d'insaturacions del compost.

Reactiu de Dittmer: En CCF el reactiu de Dittmer reacciona a temperatura ambient amb els compostos que continguin fòsfor produint taques de color blau sobre un fons blanc. En els nostres estudis s'utilitzava un reactiu de Dittmer comercial (Fluka). En el cas de no utilitzar el reactiu comercial, la seva preparació s'aconsegueix mesclant dues solucions. En la primera solució es dissol mitjançant escalfor 4 g de MoO_3 en 100 ml de d'àcid sulfúric. En la segona solució es dissol, també

amb l'ajuda de calor, 0,18 g de molibdè metàl·lic en 50 ml de la primera solució. La solució d'estoc es prepararia mesclant 50 ml de cadascuna de les solucions. La solució de treball s'aconseguia mesclant 2,5 ml de la solució d'estoc amb 5 ml d'aigua i 7,5 ml d'etanol.

Reactiu d'antrona: Els compostos que contenen sucres reaccionen amb l'antrona sota condicions d'acidesa per donar taques de colors groc-verd. L'antrona es va preparar mesclant 5 g d'antrona (Merck) en 100 ml d'àcid sulfúric concentrat.

M.4.2 Espectrometria d'infraroig (IR)

Els espectres d'infraroig es van realitzar en una aparell Perkin-Elmer model FTIR 1600. Les mostres es van analitzar formant una pel·lícula entre dos discos de NaCl.

M.4.3 Anàlisi dels compostos lipídics per cromatografia gas-líquid (GLC) i cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS)

Els èsters metàl·lics d'àcids grassos, i els productes de trencament d'èsters metàl·lics d'àcids micòlics i alcohols es van analitzar per cromatografia gas-líquid (GLC) segons les condicions fixades anteriorment per Luquin (1991). Es va utilitzar un aparell Hewlett-Packard model 5890A equipat amb una columna capil·lar de sílica fosa de 15 m de longitud i 0,25 mm de diàmetre amb una fase estacionària SPB-1 de dimetil-siloxà (Supelco) i una fase mòbil (gas portador) d'heli amb un fluxe de 1ml/min. El cromatògraf estava equipat amb un detector d'ionització de flama (FID). L'aparell va ser programat per passar d'una temperatura de 175 a 300°C amb una rampa de 8°C/min i es va mantenir a 300°C durant 15 min. Les temperatures de l'injector i del detector eren de 275°C i 315°C, respectivament. La relació de partició (*split*) era de 1:50. Els pics es van identificar comparant-los amb el temps de retenció d'un patró

comercial d'èsters metílics d'àcids grassos i alcohols (Supelco).

En el cas de l'estudi del *M. brumae* aquesta tècnica es va realitzar en el Servei d'Anàlisi Química de la UAB amb un aparell de GLC HP5890 acoblat a un espectròmetre de masses HP5989. L'aparell de GLC estava equipat amb una columna capil·lar HP-5 (5% fenil en metil-silicona) de 30 m de longitud i 0,25 mm de diàmetre. Es tracta d'una columna amb una fase estacionària de poca interacció i que separaria els compostos pel nombre de carbonis i no per la seva polaritat. L'aparell va ser programat per passar d'una temperatura de 175 a 310°C amb una rampa de 8°C/min i es va quedar a 310°C durant més de 90 min. La temperatura del forn era de 310°C amb un split de 1:25. L'espectròmetre de masses HP5989 posseïa un rang d'ús de 4-2000 m/z i una font per impacte electrònic (EI) o ionització química (CI). La tècnica utilitzada va ser EI amb una energia de 70eV.

M.4.4 Anàlisi del contingut d'àcids micòlics per HPLC

Per a dur a terme l'anàlisi per HPLC, tant en l'estudi del *M. gordonae* com en l'estudi del *M. brumae*, les mostres es van resuspendre en 100 µl de cloroform. Els *p*-bromofenacil èsters d'àcids micòlics van ser separats en un sistema d'HPLC (Waters) equipat amb una bomba quaternària (Waters model 600) i un detector d'UV/visible (Waters model 486). Es va utilitzar com a fase estacionària una columna de fase reversa C₁₈ (NovaPack) i els èsters d'àcids micòlics s'elüïren usant un gradient lineal de metanol/cloroform (des de 98/2, v/v fins 30/70 v/v). Per assistir a la identificació dels pics es va utilitzar com a estàndard intern un patró d'alt pes molecular (Ribi ImmunoChem Research) i en alguns casos també un patró de baix pes molecular (Ribi ImmunoChem Research). Per al reconeixement de patrons cromatogràfics s'utilitzà el software Pirouette (Infometrix) juntament amb una llibreria de cromatogrames dels micobacteris i espècies relacionades més rellevants (Butler, 2001). La designació dels pics obtinguts en HPLC es va fer seguint la

nomenclatura arbitrària utilitzada per alguns autors (Glickman, 1994; Butler, 1991).

M.4.5 Ressonància magnètica nuclear (RMN)

En l'estudi del *M. gordonae* tots els èsters metílics d'àcids micòlics de les soques ATCC 14470^T, ATCC 35759 i CL-416 van ser analitzats per ¹H-RMN. Els compostos problema dels *M. gordonae* ATCC 35759 i *M. gordonae* CL-416 es van estudiar per ¹H-RMN i també per ¹³C-RMN. En tots aquests casos es va fer servir un aparell Varian 300 spectrometer a una freqüència de 300 Mhz per ¹H i els espectres es van dur a terme en deuterochloroform a una concentració de 10 mg/ml i a una temperatura de 25°C. Els valors dels desplaçaments químics tenien com a referència interna la senyal del tetrametilsilà (0,0 ppm). Els experiments amb 2D es van fer en condicions estàndard: HMBC i 2D-COSY ¹H-¹H en mode magnitud, 2D ¹H-¹³C HSQC en mode sensible a la fase.

Per l'estudi del *M. brumae*, el compost problema FA-1 es va analitzar per ¹H-RMN en una i dues dimensions i també per ¹³C-RMN utilitzant un aparell Bruker AM-500 a una freqüència de 500,13 Mhz per ¹H i de 125 Mhz per ¹³C. Les mostres es van dissoldre en deuterochloroform a una concentració de 10 mg/ml i es van analitzar a una temperatura de 25°C. Els valors dels desplaçaments químics tenien com a referència interna la senyal del cloroform (7,27 ppm).

M.4.6 Espectrometria de masses (MS)

Els èsters metílics d'àcids micòlics es van analitzar utilitzant les tècniques d'MS per impacte electrònic (EI-MS) i de MS per bombardejament amb àtoms ràpids (FAB-MS). Totes dues tècniques es van portar a terme en un aparell VG AutoSpec (Fison). La tècnica d'EI-MS es va portar a terme amb una energia de 70eV i la de FAB-MS amb 8eV. L'espectrometria FAB es va portar a terme en mode positiu emprant *m*-nitrobenzil alcohol

com a matriu. L'ús de la tècnica FAB-MS produeix ions pseudomoleculars $(M+Na)^+/z$ i es va optar per dopar la matriu amb NaCl en alguns anàlisis. Els compostos problema del *M. gordonae* CL-416 varen ser analitzats per FAB-MS en mode negatiu i també per MS per ionització química (CI-MS) en mode negatiu emprant com a gas ionitzant el metà i una temperatura d'ionització de 180°C. En aquest cas es va fer servir un aparell Thermoquest-Trace *mass spectrometer* (Thermo) amb un rang de temperatura de 60 a 300°C.

M.4.7 Rotació òptica

La mesura de la rotació òptica es va realitzar en un polarímetre Perkin-Elmer model 141. Les mostres es van dissoldre en cloroform a una concentració de 5 mg/ml.

M.4.8 Espectrometria de masses amb analitzador de temps de vol i desorpció de làser assistida per matriu (MALDI-TOF)

L'espectrometria de masses per la tècnica de MALDI-TOF es va dur a terme en un aparell Applied Biosystems 4700 equipat amb un làser Nd:YAG (longitud d'ona de 355 nm) operant amb pulsos de 500 picosegons amb una freqüència de 200 Hz. En mode positiu es van acumular 250 pulsos. Les mostres de lípids analitzades es van dissoldre en cloroform a una concentració de 1 mM i es col·locaven en forma de gotes de 0,5 µl, seguidament se li afegeix àcid 2-5-dihidroxibenzoic (10 mg/ml) en cloroform/metanol (1/1, v/v) (Laval, 2008). Les mostres es deixaren cristallitzar a temperatura ambient.

M.4.9 Piròlisi dels èsters metílics d'àcids grassos

La reacció pirolítica va tenir lloc a una temperatura de 300°C i en condicions de buit. L'oxidació dels meroaldehids produïts es va realitzar com es va descriure prèviament (Yuan, 1998a). Els àcids meromicòlics resultants es van purificar per CCF preparativa com s'ha descrit

anteriorment (M.3.5).

M.4.10 Hidrogenació catalítica de dobles enllaços en alcohols de cadena llarga

Al voltant de 5 mg de lípids es van dissoldre en 1 ml d'hexà en presència de 2 mg d'òxid de platí. La hidrogenació va tenir lloc durant 2 h a temperatura ambient i en agitació constant. La mostra es va filtrar per eliminar el catalitzador i el solvent es va evaporar amb buit. L'anàlisi per EI/MS va demostrar que sota aquestes condicions la hidrogenació va ser completa.

Resultats

Resultats

R.1 Estudi del *M. gordonae*

R.1.1 Anàlisi del contingut en àcids micòlics per HPLC

Els patrons cromatogràfics obtinguts per HPLC dels *p*-bromofenacil-èsters d'àcids micòlics (apartat M.2.2) de les soques clíniques i de la soca ATCC 35759 presentaven dos grups de pics (*double cluster pattern*; Cage, 1992). El segon grup de pics, nomenats de B2 a B8, corresponien als àcids micòlics que componen el patró cromatogràfic més comú del *M. gordonae*: α -, metoxi- i ceto-micolats (figura 17). El primer grup estava format pels pics A1, A4 i A5 i corresponien al compost problema. La soca tipus, *M. gordonae* ATCC 14470^T, presentava únicament el segon grup de pics B2-B8 (*simple cluster pattern*; Cage, 1992) (figura 18).

resultats

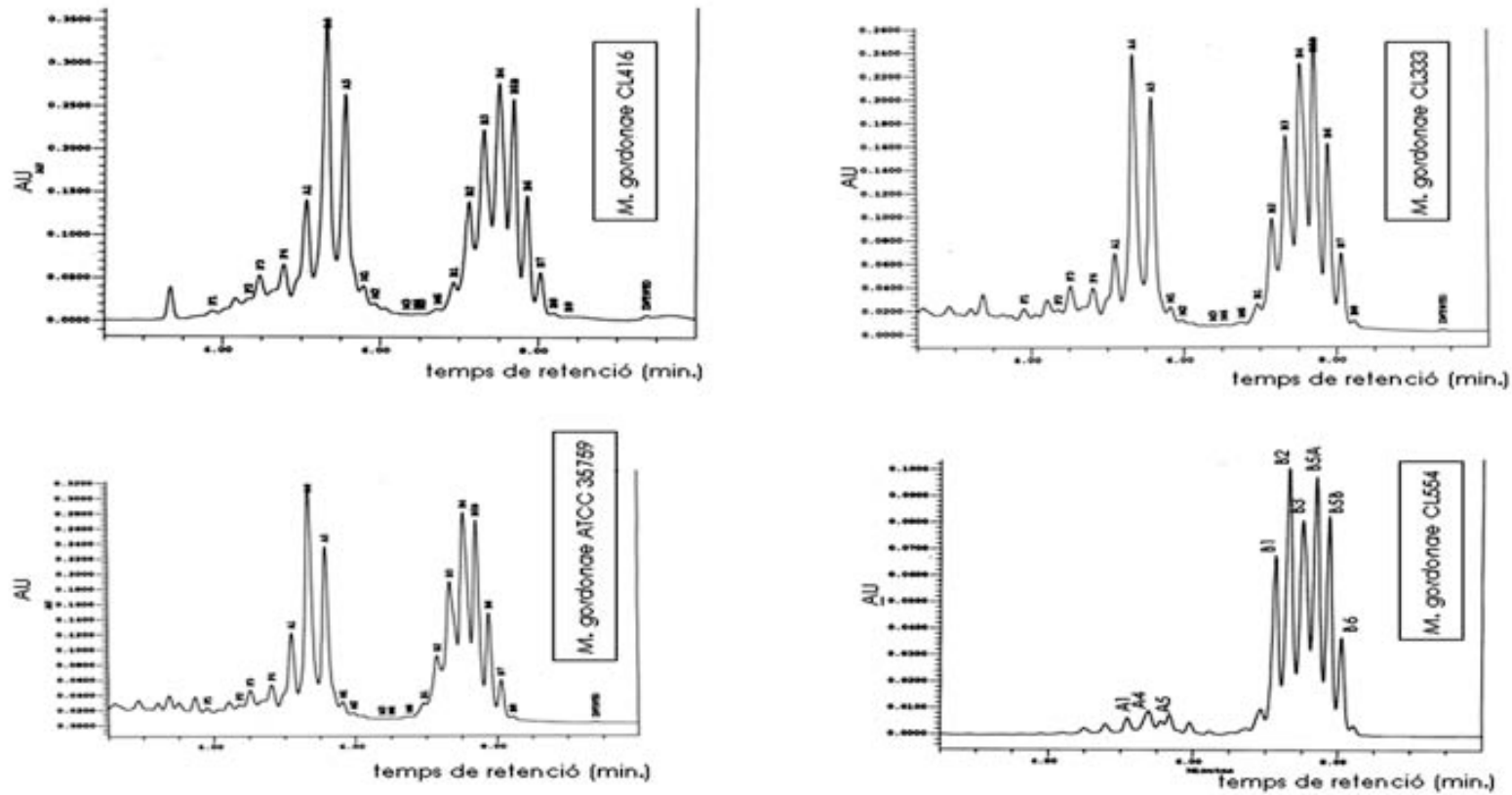


Figura 17: conjunt de cromatogrames d'UV-HPLC de les soques del *M. gordonae* amb un patró doble de pics.

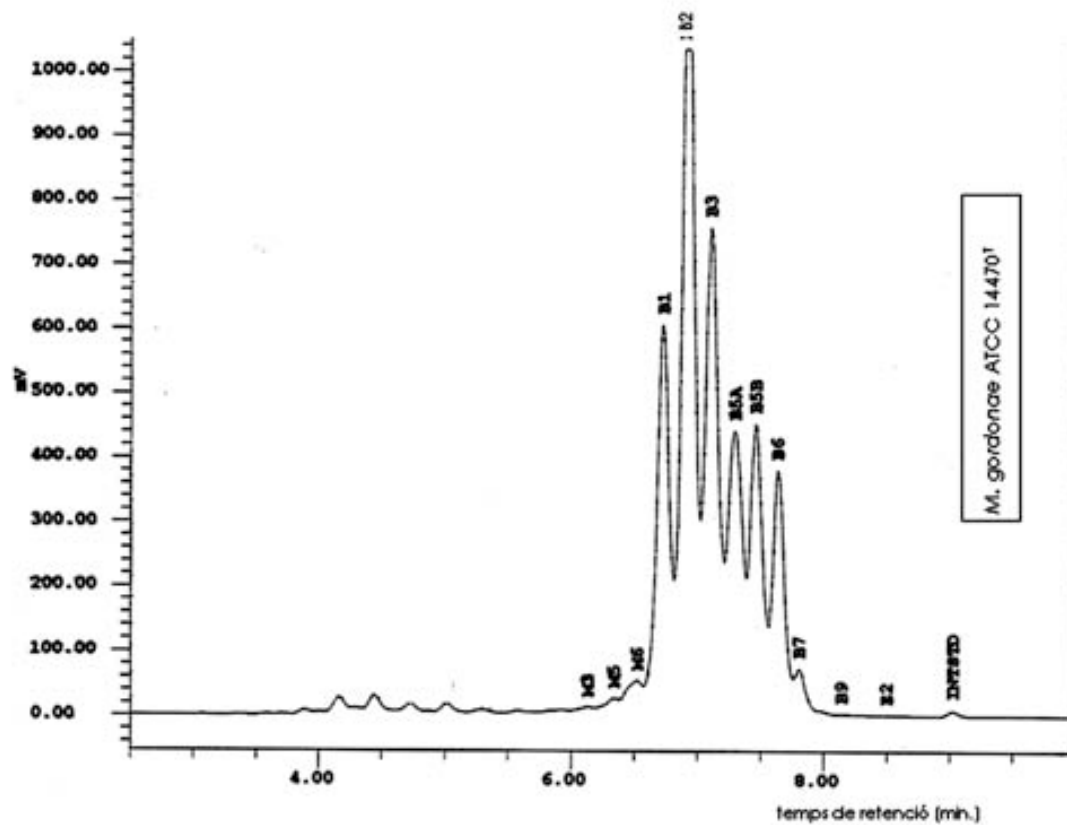


Figura 18: cromatograma d'HPLC (fluorescència) de la soca tipus *M. gordonae* ATCC 14470^T mostrant un sol grup de pics (INTSTD: patró intern d'alt pes molecular).

R.1.2 Anàlisi dels àcids micòlics per CCF

L'anàlisi dels esters metílics d'àcids micòlics per CCF (apartat M.4.1) de les soques estudiades va mostrar dos patrons cromatogràfics. La soca tipus *M. gordonae* ATCC 14470^T presenta un patró típic amb tres taques que corresponen als àcids micòlics α -, metoxi- i ceto- (figura 19, punt 4). En canvi les soques clíniques i la soca ATCC 35759 presentaven dues taques addicionals respecte el patró de la soca tipus a l'alçada del que serien els dicarboxi-micolats i alcohols secundaris (figura 19, punts 1,2,3 i 5). Ambdós components provendrien del trencament de l'àcid micòlic wax-èster que dona com a resultat un àcid micòlic amb dos grups carboxi (dicarboxi-micolat) i alcohols secundaris en forma d'eicosanol i octadecanol (C₂₀OH i C₁₈OH).

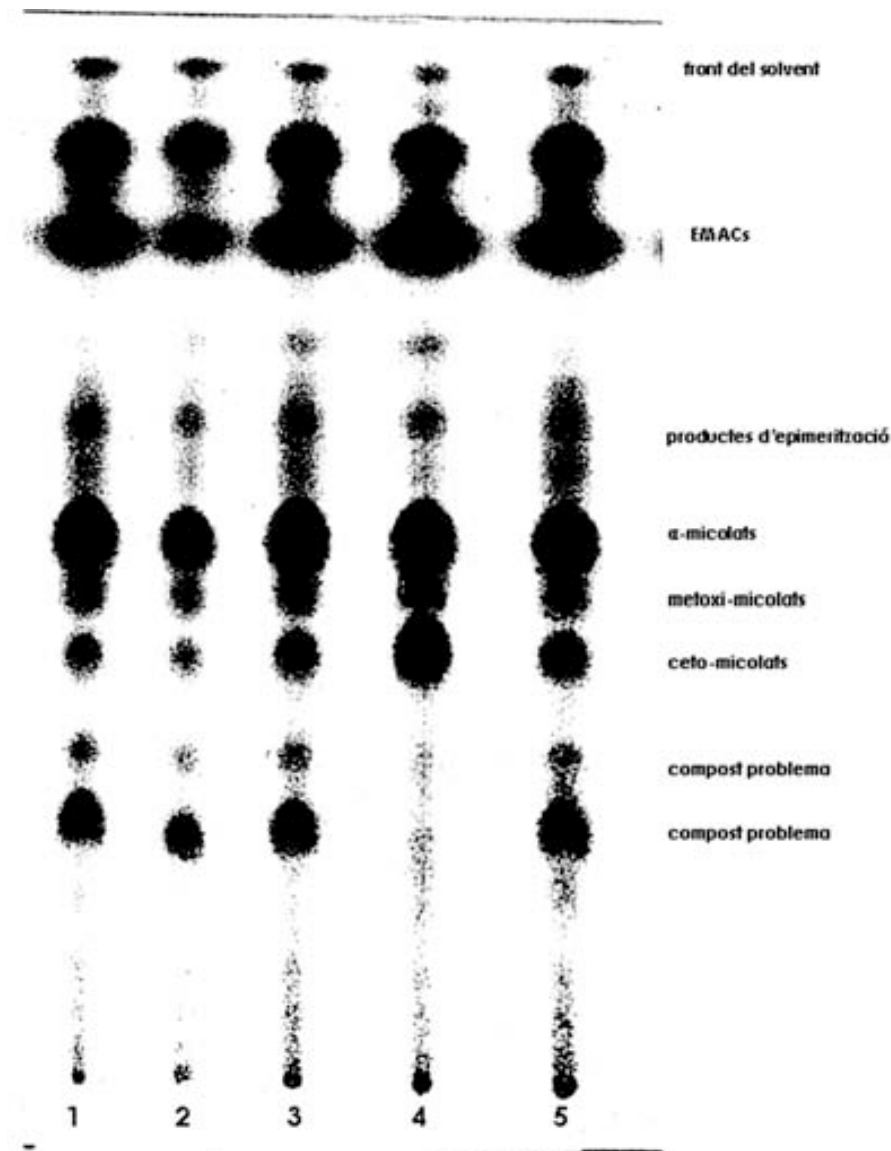


Figura 19: CCF mostrant el patró d'àcids micòlics (èster metílics) de diferents soques del *M. gordonae*. Punt 1: CR-178, 2: CL-416, 3: CL-554, 4: ATCC14470^T, 5: CL-333. EMACs: èsters metílics d'àcids grassos de cadena curta. Sistema d'elució: éter de petroli / éter etílic (85/15, v/v) X 3.

R.1.3 Anàlisi dels àcids grassos, alcohols i productes de piròlisi d'àcids micòlics per GLC.

Els anàlisis per GLC de les soques del *M. gordonae* mostraven la presència d'àcids grassos de $C_{12:0}$ a $C_{24:0}$, dels quals, l'hexadecanoat, $C_{16:0}$ i l'octadecenoat, $C_{18:1}$ eren majoritaris (figures 20 i 21). També s'observaven d'altres components minoritaris, com l'àcid 2-metil-tetradecanoic, mentre que el TBS (àcid 10-metil-octadecanoic) no es va detectar a cap de les soques analitzades. Els components que es van

detectar com a derivats de la piròlisi dels èsters metílics d'àcids micòlics van ser el docosanoat i el tetracosanoat ($C_{22:0}$ i $C_{24:0}$) en quantitats variables. La presència d'alcohols secundaris en forma de 2-octadecanol (C_{18OH}) i 2-eicosanol (C_{20OH}) es va detectar només en les soques que mostraven un patró d'HPLC amb dos grups de pics i que per CCF mostraven un patró d'àcids micòlics diferent al convencional de la soca tipus (punts 1, 2, 3, i 5 de la figura 19).

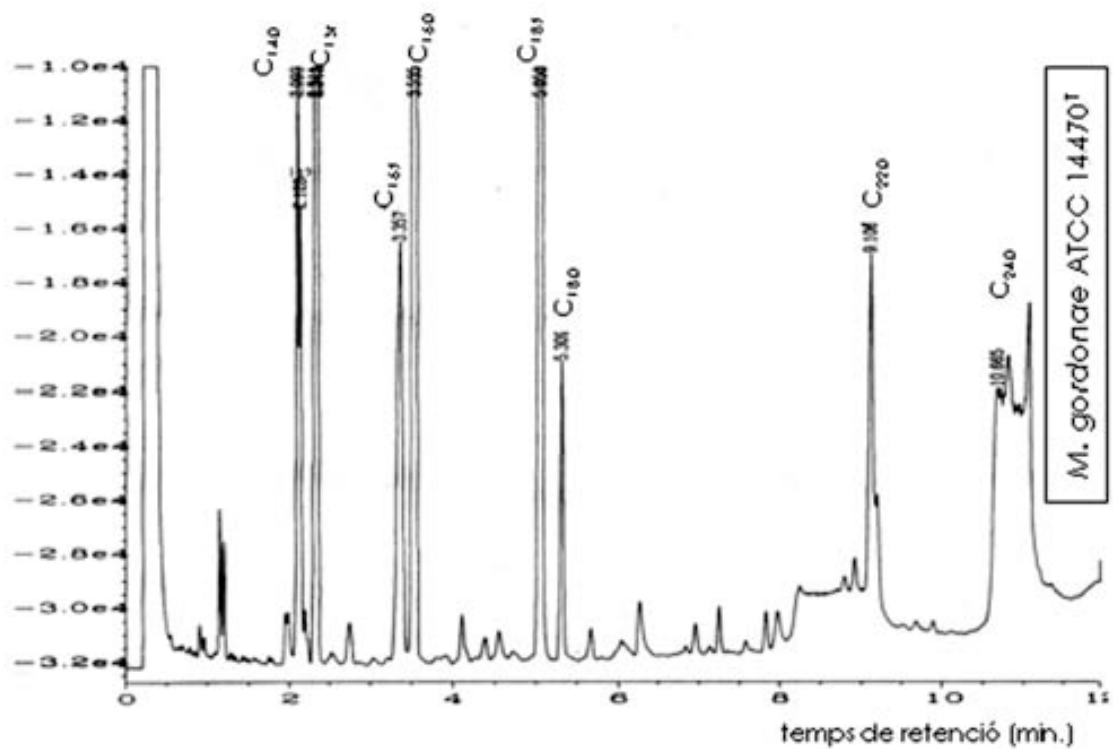


Figura 20: cromatograma de gasos (GLC) del *M. gordonae* ATCC 14470T.

resultats

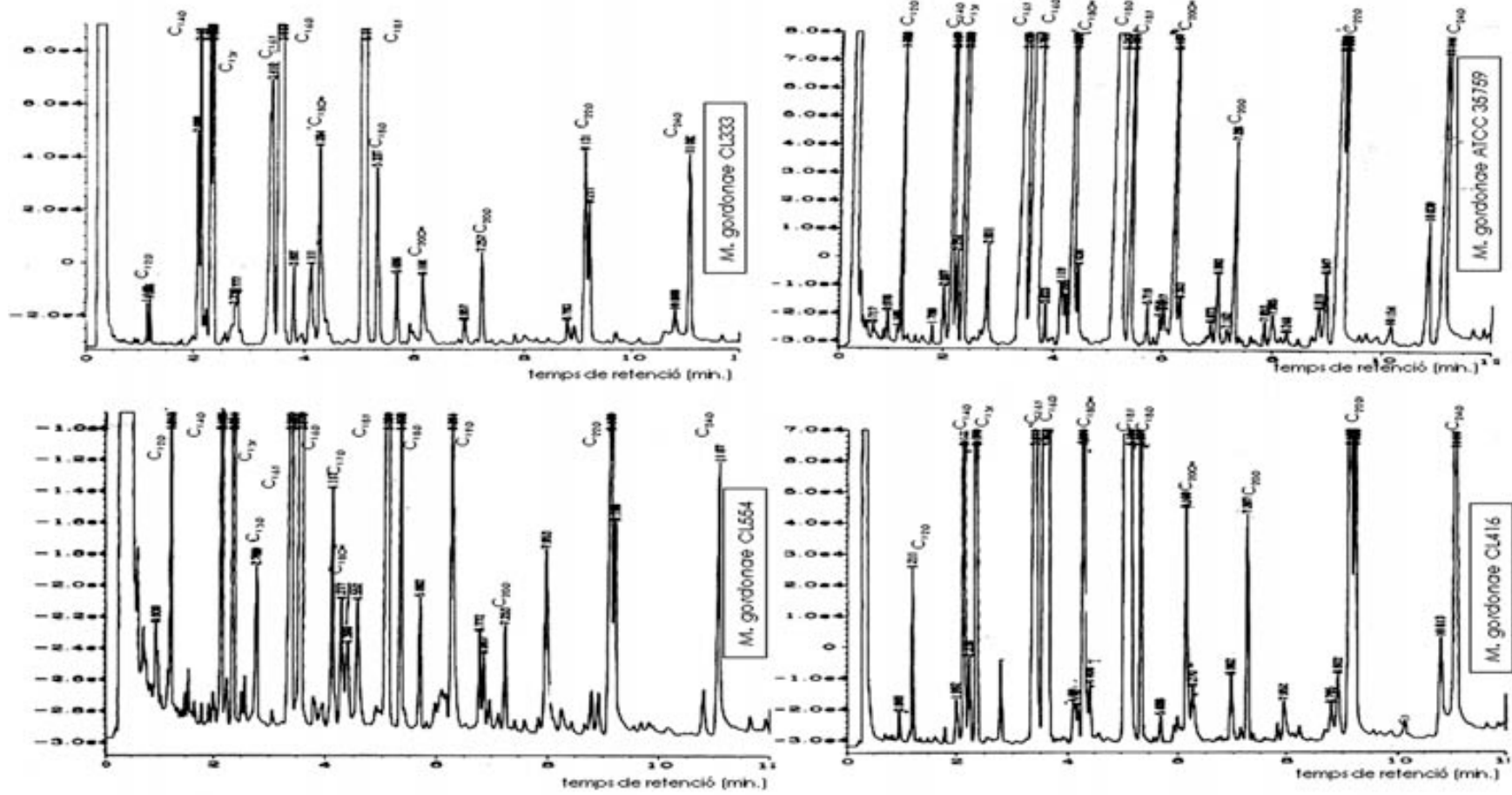


Figura 21: cromatograma de gasos (GLC) de les soques del *M. gordonae* que presentaven dos grups de pics per HPLC.

R.1.4 Purificació dels àcids micòlics per cromatografia líquida

La purificació dels àcids micòlics mitjançant aquesta tècnica es va dur a terme a partir de les soques CL-416 i ATCC 35759, soques amb patró d'HPLC tipus *double cluster* i la soca tipus ATCC 14470^T com a representant d'un patró d'HPLC *simple cluster*. Després de sis setmanes de creixement en medi Sauton, les cèl·lules es van recollir directament de la superfície del medi sòlid i es van sotmetre a una saponificació (apartat M.2.1). Posteriorment els extractes orgànics obtinguts es van metilar amb diazometà (apartat M.2.2) i els esters metílics dels àcids micòlics (micolats) es van separar d'altres àcids grassos per precipitació en metanol fred (apartat M.3.2). Els precipitats de les tres soques estudiades, que contenien els micolats es van eluir en una columna de sílica-gel per fer un primer fraccionament (apartat M.3.3) (figura 22). A partir d'aquesta columna el compost problema, que migrava com els dicarboxi-micolats, es va obtenir pràcticament pur i només va caldre una precipitació en metanol fred per tal de tenir-lo a punt per a l'estudi estructural. En l'anàlisi per CCF de la columna de purificació el sistema d'elució emprat va ser amb éter de petroli/éter etílic que permet diferenciar els ceto-micolats dels metoxi-micolats, fet que no es produeix quan fem el diclorometà com a sistema d'elució.

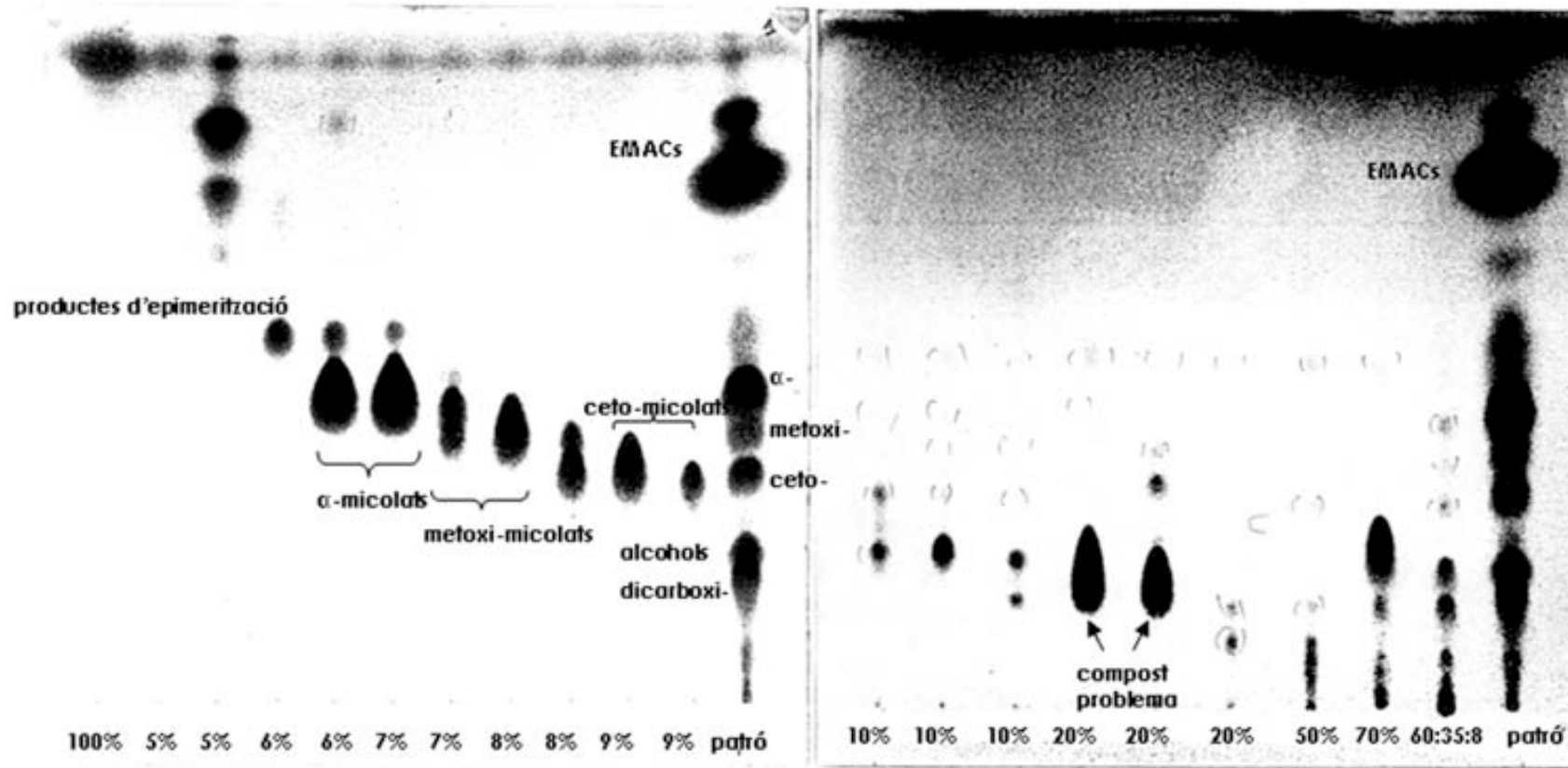


Figura 22: CCF de la primera columna de purificació dels micolats de la soca CL-416. El gradient d'elució de la columna comença amb 100% d'èter de petroli i segueix amb increments en % de dietil éter en éter de petroli. Les corxeres indiquen les fraccions emprades en la purificació del micolat respectiu. Sistema d'elució: éter de petroli/éter etílic (85/15, v/v) X 3.

L' α - i el ceto-micolat es van purificar recromatografiant les fraccions obtingudes en la primera columna (figura 22) en una segona columna de les mateixes característiques (figura 23). En aquesta segona columna s'observa com s'obtenien en la fracció del 6% els α -micolats purificats. Els ceto-micolats s'obtingueren en les fraccions del 8-9%, es trobaven pràcticament purs i s'acabaren de purificar amb una precipitació en metanol fred.

El metoxi-micolat no es va poder purificar per cromatografia líquida i es va optar per fer-ho mitjançant cromatografies preparatives (apartat M.4.2) on el metoxi-micolat s'identificava per comparació amb un patró. El metoxi-micolat s'obtenia purificat definitivament després d'una precipitació en metanol fred (figura 24).

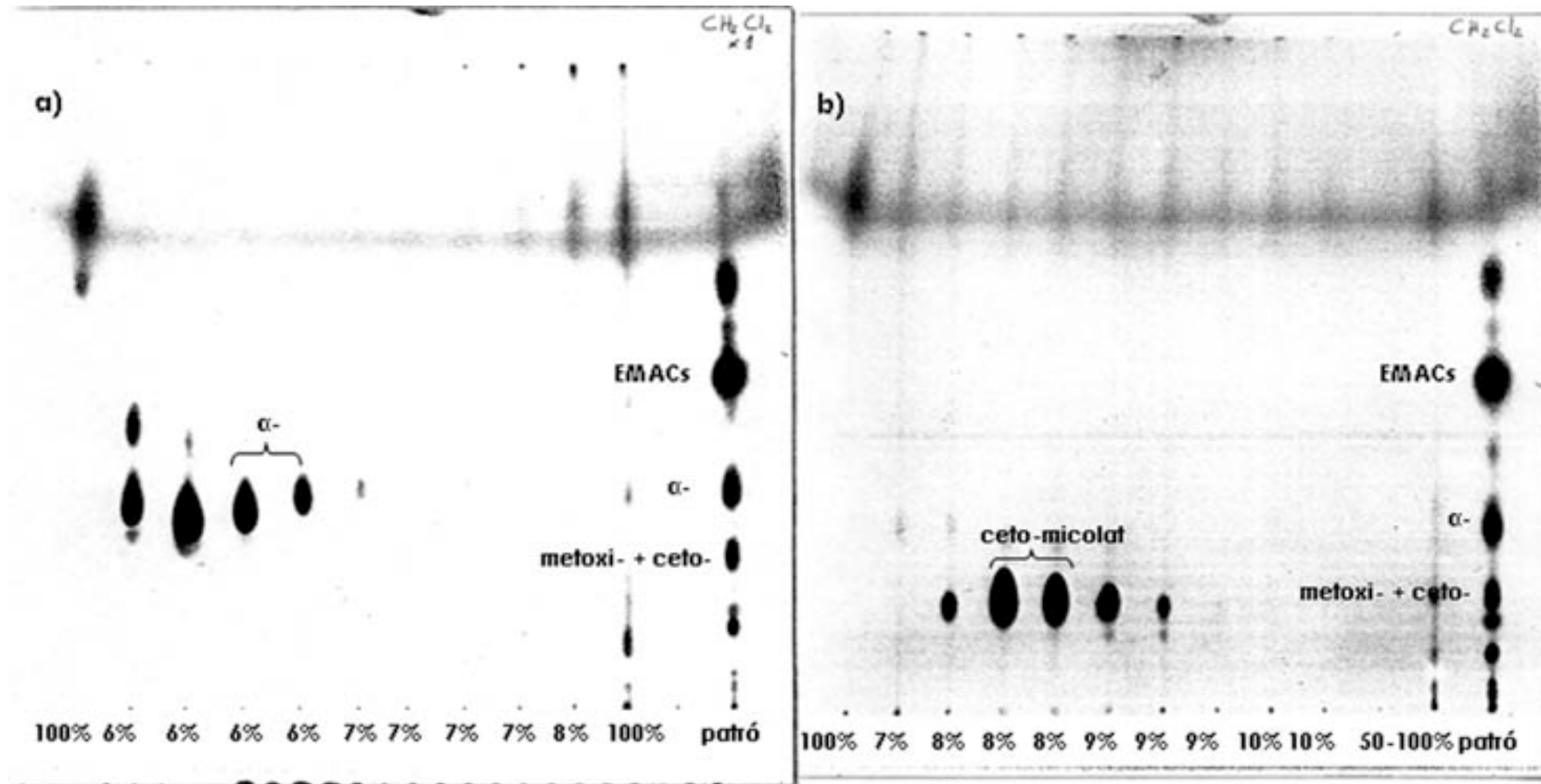


Figura 23: CCF de les columnes de purificació dels α -micolats a) i ceto-micolats b). Sistema d'elució: diclorometà.

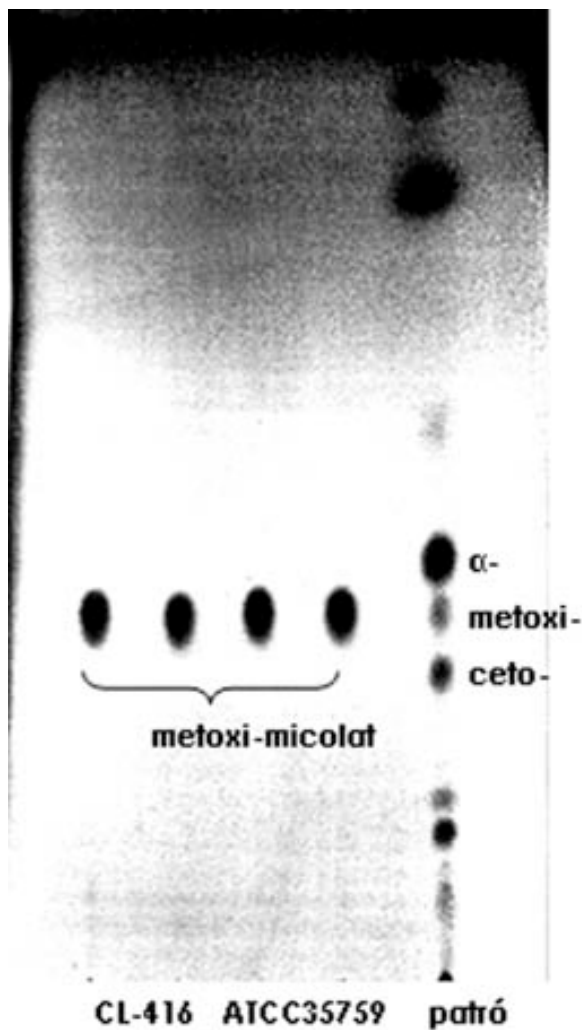


Figura 24: CCF de la purificació final del metoxi-micolat.

R.1.5 Estudi estructural del compost problema del *M.*

gordonae

L' ^1H -RMN del compost problema de les soques ATCC 35759 i CL-416 (figura 25) detectà ressonàncies entre -0,3 i 3,7 parts per milió (ppm):

Dues senyals, centrades a 0,15 ppm, de tres protons (^3H) i a 0,47 ppm (^1H) corresponien a un anell ciclopropà en *trans* (Watanabe, 1999).

La senyal a 0,67 ppm, ^1H , s'assignà a una estructura CH-CH₃ adjacent a un anell ciclopropà en *trans* (Watanabe, 1999).

El doblet a 0,90 ppm corresponia a una ramificació de metil, -CH₃. Aquesta senyal es sobreposava amb la del -CH₃ terminal (ω -CH₃) a 0,88

ppm. Cadascuna de les dues senyals eren de ^3H (Draper, 1982).

Els protons metílics $(\text{CH}_2)_n$ de la cadena hidrocarbonada ressonaven entre 1,2 i 1,6 ppm. La senyal a 2,42 ppm corresponia al protó del carboni α .

Els singulets a 3,66 i 3,70 ppm es van assignar com les senyals de dos grups carbo-metoxi, $-\text{OCH}_3$ i el triplet a 2,29 ppm corresponia al CH_2 adjacent al grup carbonil.

Les dues senyals minoritàries a -0,3 i 0,73 ppm es van assignar a un anell ciclopropà en cis (Watanabe, 1999).

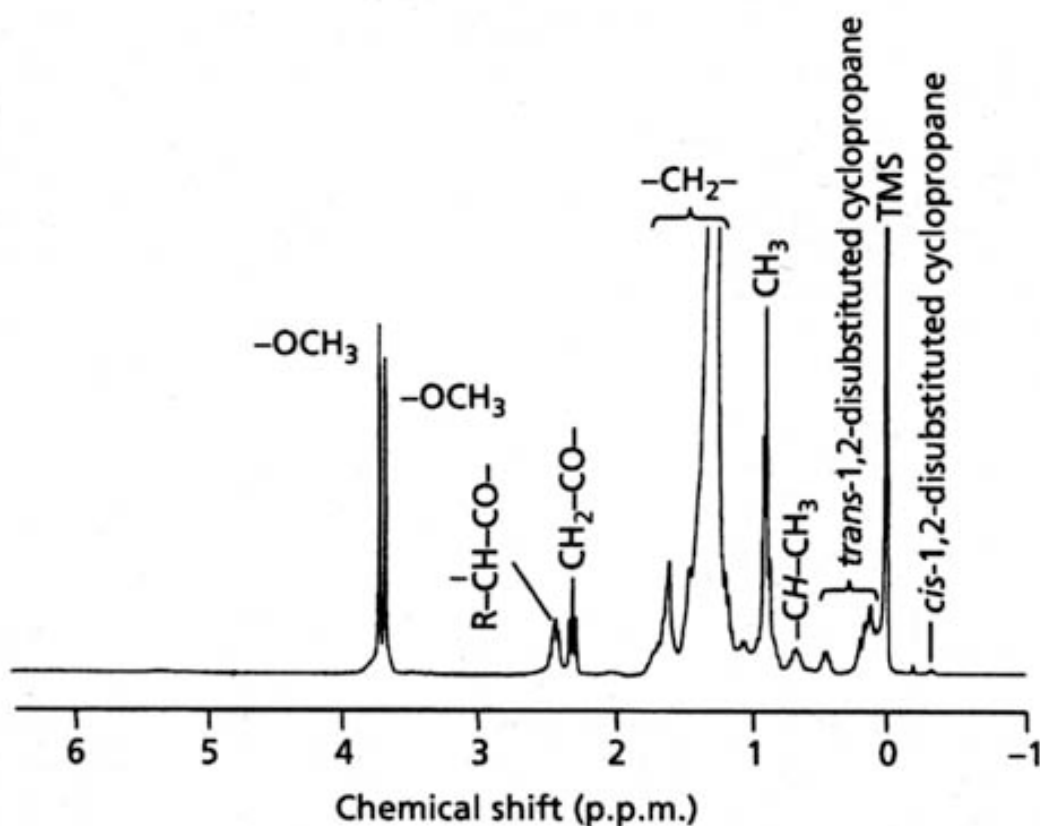


Figura 25: ^1H -RMN del compost problema purificat de la soca *M. gordonae* CL-416.

L'anàlisi per EI-MS de l'èster del compost problema va mostrar un patró general de trencament com el dels èsters metílics d'àcids micòlics. Aquest patró, amb un trencament entre els carbonis C2 i C3, produeix una zona de meroaldehids i una zona d'èsters metílics de cadena curta (Draper, 1982; figura 26b). També es detectà una zona d'ions pseudomoleculars (M^+-50/z). L'estudi del compost per MS mostrava:

En la regió dels èsters metílics, aquests apareixien amb m/z 382, $C_{24:0}$, i m/z 354, $C_{22:0}$. També es detectà una senyal molt intensa amb m/z 292 que no es corresponia amb cap estructura d'èster metílic (figura 26).

Els fragments d'ions pseudomoleculars M^+-50/z (pèrdua d'aigua i metanol) es detectaren amb m/z 908, 936 (majoritari) i 964, i pronosticaven ions moleculars amb M^+/z 958, 986 i 1014, respectivament (figura 26). Aquests resultats es van confirmar per FAB-MS en modes positiu i negatiu. En mode positiu, amb la presència d'ions pseudomoleculars $(M+Na)^+/z$ apareixent amb 982, 1010/1011 i 1039 (figura 27).

En la regió dels meroaldehids (figura 26), un component majoritari amb m/z 601 es trobava acompanyat d'un altre amb m/z 632 i d'altres fragments de menor intensitat. Mitjançant l'espectrometria de masses per ionització química (CI-MS), es detectà un fragment amb m/z 631, 90% d'abundància, que va permetre proposar, amb alta probabilitat, la senyal amb m/z 632, i no la senyal amb m/z 601, com a senyal del meroaldehyd majoritari del compost problema. De manera similar, el fragment amb m/z 573 provindria d'un meroaldehyd amb senyal m/z 604.

Les senyals del FAB-MS de la soca CL-416 amb m/z 906 i 934 no es van poder identificar amb cap estructura de les proposades (figura 27).

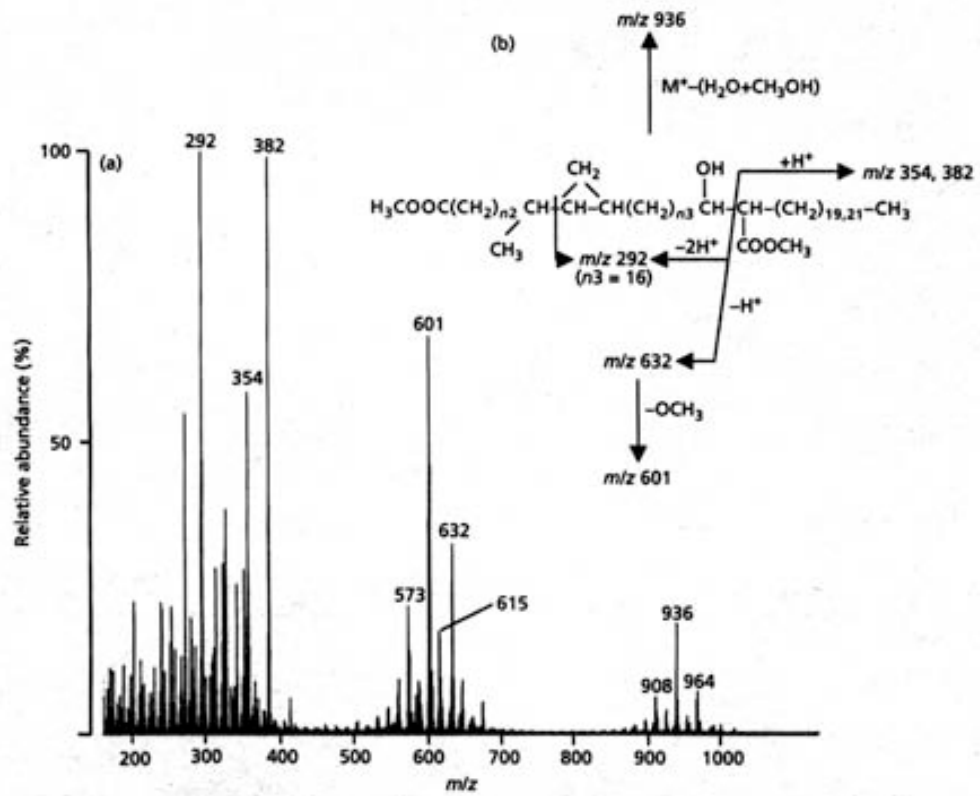


Figura 26: a) EI-MS del compost problema purificat de la soca *M. gordonae* CL-416. b) patró de trencament d'un àcid micòlic dicarboximolat per EI-MS.

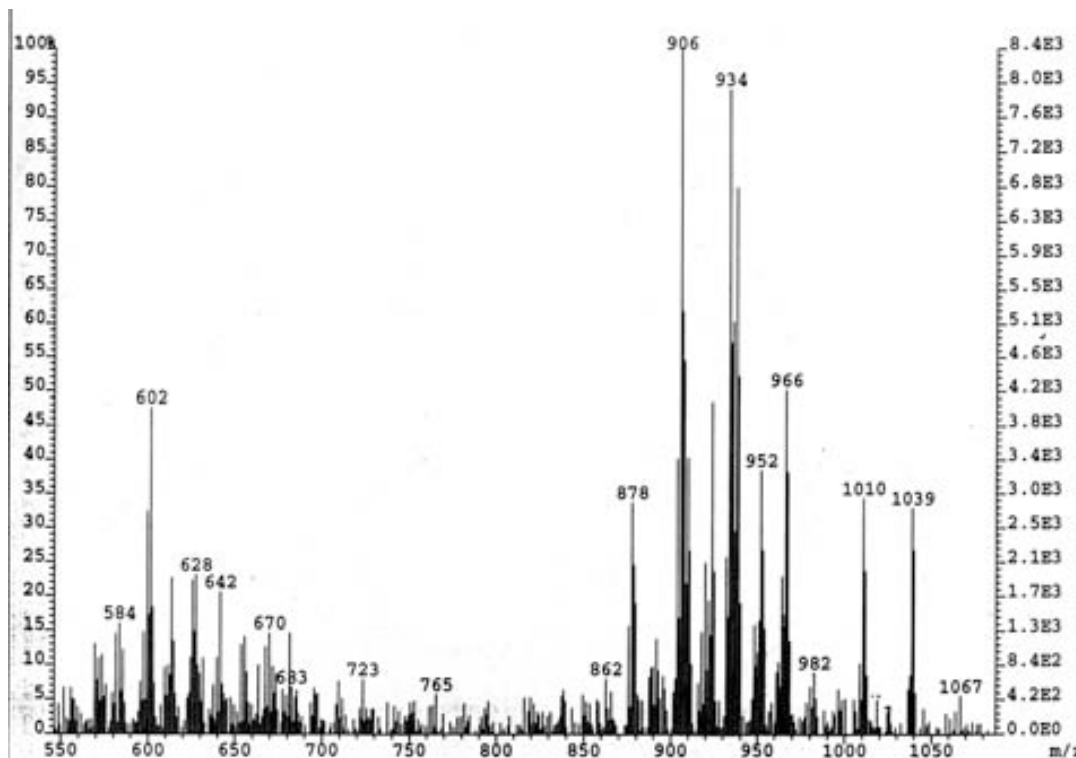


Figura 27: FAB-MS dels compostos problema aïllats de la soca *M. gordonae* CL-416.

R.1.6 Estructura de la resta d'àcids micòlics: α - metoxi- i ceto-micolats

L'estudi de l'estructura dels α -, metoxi- i ceto-micolats de les soques CL-416, ATCC 35759 i ATCC 14470^T es va dur a terme mitjançant ¹H-RMN, EI-MS i FAB-MS en mode positiu. Els resultats s'han descrit a la taula 3 per a fer-los més entenedors.

L'¹H-RMN dels α -micolats va detectar ressonàncies entre -0,4 i 5,3 ppm.

En el cas de les soques CL-416 i ATCC 35759 es van observar tres importants senyals a -0,40, 0,59 i 0,64 ppm que corresponien a dos anells ciclopropà en *cis* (figura 28). També es van detectar senyals en forma de triplet a 5,34 ppm que es van assignar a una insaturació en *cis*. En el cas de la soca ATCC 14470^T l'¹H-RMN presentava únicament els senyals d'anells ciclopropà en *cis* (figura 28). En l'anàlisi per EI-MS (figura 29) es detectaren a la zona dels meroaldehids senyals amb *m/z* 740, 769 i 796, amb els seus fragments minoritaris, i a la zona d'èsters metílics fragments amb *m/z* 354 i 382. Amb aquestes dades i les obtingudes per FAB-MS

amb senyals majoritàries amb $(M+Na^+)/z$ 1091 (C_{72}), 1105 (C_{73}) i 1147 (C_{76}) (figura 30) es van formular les estructures de la taula 3 pels α -micolats de totes tres soques. S'ha de remarcar que el FAB-MS corresponent a la soca ATCC 14770^T no era de la màxima qualitat. La relació entre els protons pertanyents a insaturacions, CH=CH, respecte dels protons pertanyents a anells ciclopropà (àrea sota la senyal respectiva per 1H -RMN) es va calcular i es va establir per les soques CL-416 i ATCC 35759 en 22,7 i 21%, respectivament.

resultats

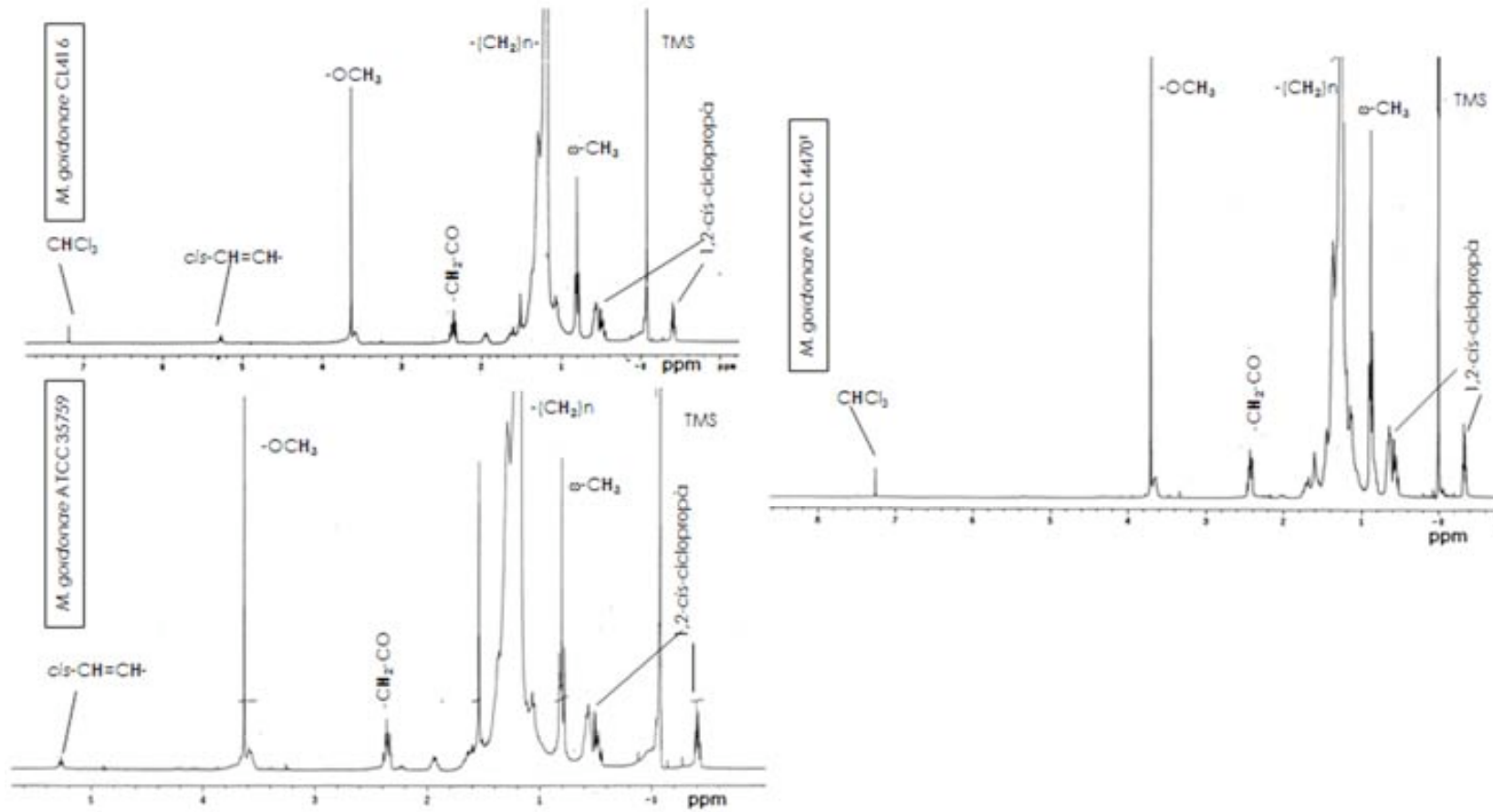


Figura 28: ¹H-RMNs de l' α-micolat de les soques *M. goodii* CL-416, ATCC 35759 i la soca tipus ATCC 14470T.

resultats

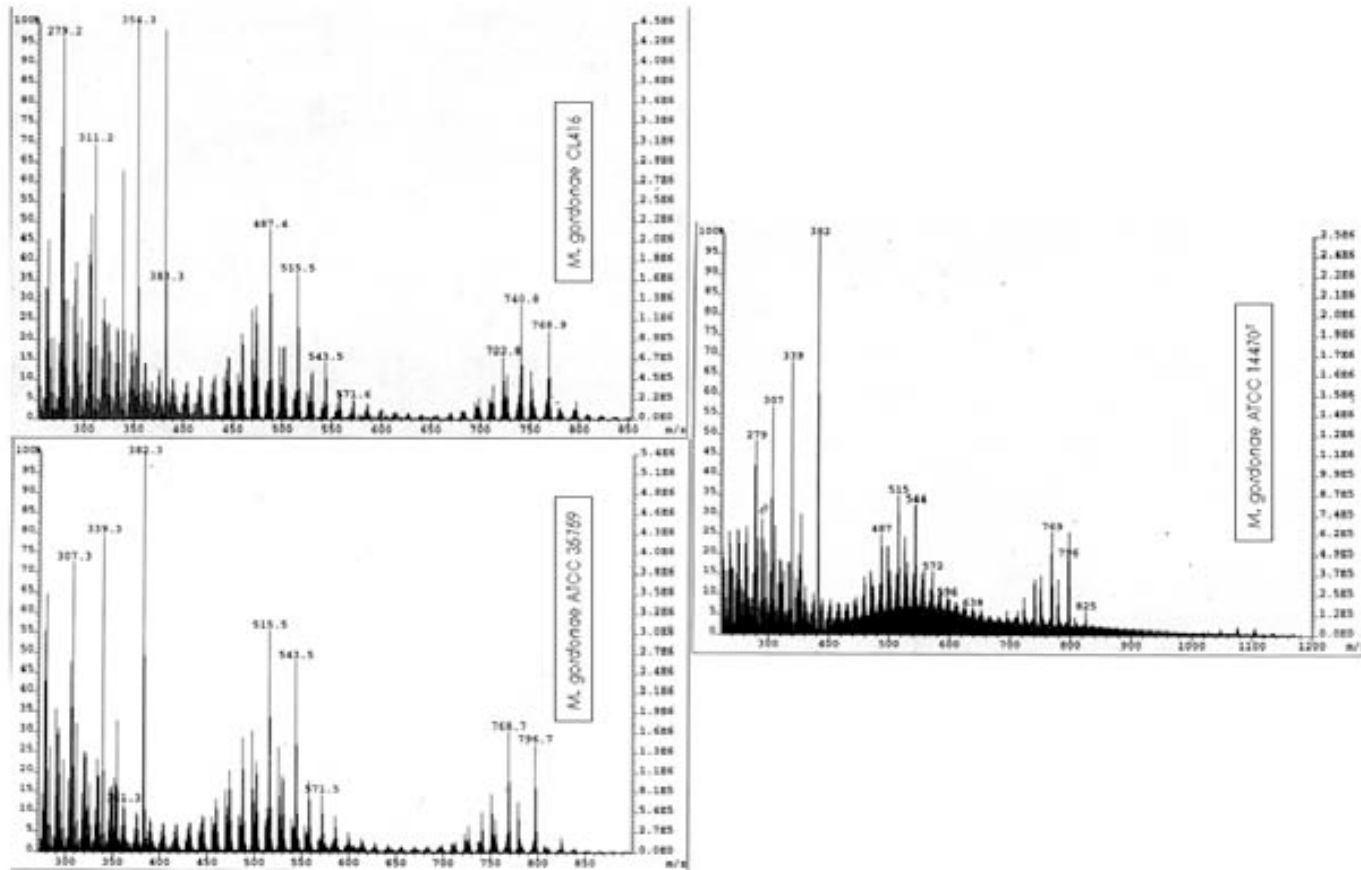


Figura 29: El-MS de l' α -micolat de les soques *M. gordonae* CL-416, ATCC 35759 i la soca tipus ATCC 14470^T.

resultats

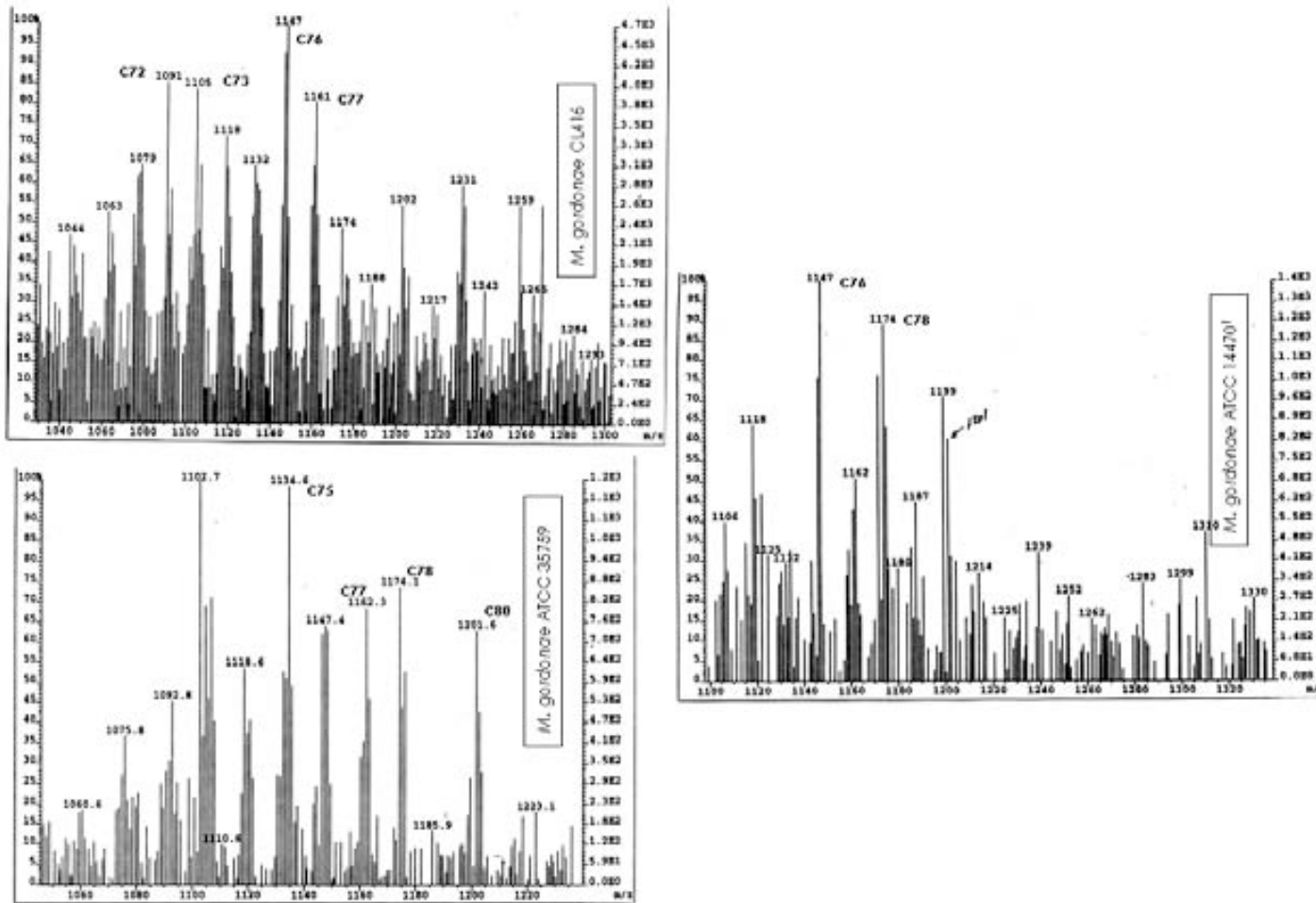


Figura 30: FAB-MS de l'α-micolat de les soques *M. gordonae* CL-416, ATCC 35759 i la soca tipus ATCC 14470. En negreta el nombre de carbonis dels components majoritaris.

Per $^1\text{H-RMN}$ aquests compostos es caracteritzaven pels protons dels grups metoxi; a 3,75 ppm i a 3,33 ppm (-CH-OCH₃); els protons adjacents al grup metoxi a 2,95 ppm (-CH-OCH₃) i per tres senyals sobreposades a 0,85, 0,88 i 0,90 ppm que corresponien al grup metil adjacent al grup metoxi del meromicòlic, al metil ω -terminal i al grup metil adjacent a un anell ciclopropà en *trans*, respectivament (figura 31). També eren molt importants les senyals d'anells ciclopropà en *cis* (-0,32, 0,59 i 0,64 ppm) i en *trans* (0,15 i 0,47 ppm). La relació entre *cis/trans* era d'aproximadament 1:1.

L'anàlisi dels metoxi-micolats per EI-MS no va detectar meroaldehyds degut probablement a la pèrdua del grup metoxi (31 uma). Aquest fet donava com a resultat sèries d'ions entre m/z 769 i 867 separats per intervals de 14 uma. Si tinguéssim en compte el grup metoxi, esperaríem els meroaldehyds entre m/z 800-898. Altres fragments relacionats amb trencaments a la zona dels meroaldehyds donaven pics amb m/z de 297 (intensitat 72%) i 325 (55%) a la zona d'èsters metílics. Les senyals amb m/z 354 i 382 corresponien als èsters metílics (figura 32). Per FAB-MS, els pics majoritaris van ser molt semblants per les tres soques estudiades. El pic majoritari sortia amb m/z 1233 i corresponia a un metoxi-micolat de C₈₁. Li seguien en abundància m/z 1247 (C₈₂), m/z 1274 (C₈₄) i 1208 (C₇₉) (figura 33). Amb aquesta informació es va proposar l'estructura de la taula 3 per els metoxi-micolats.

resultats

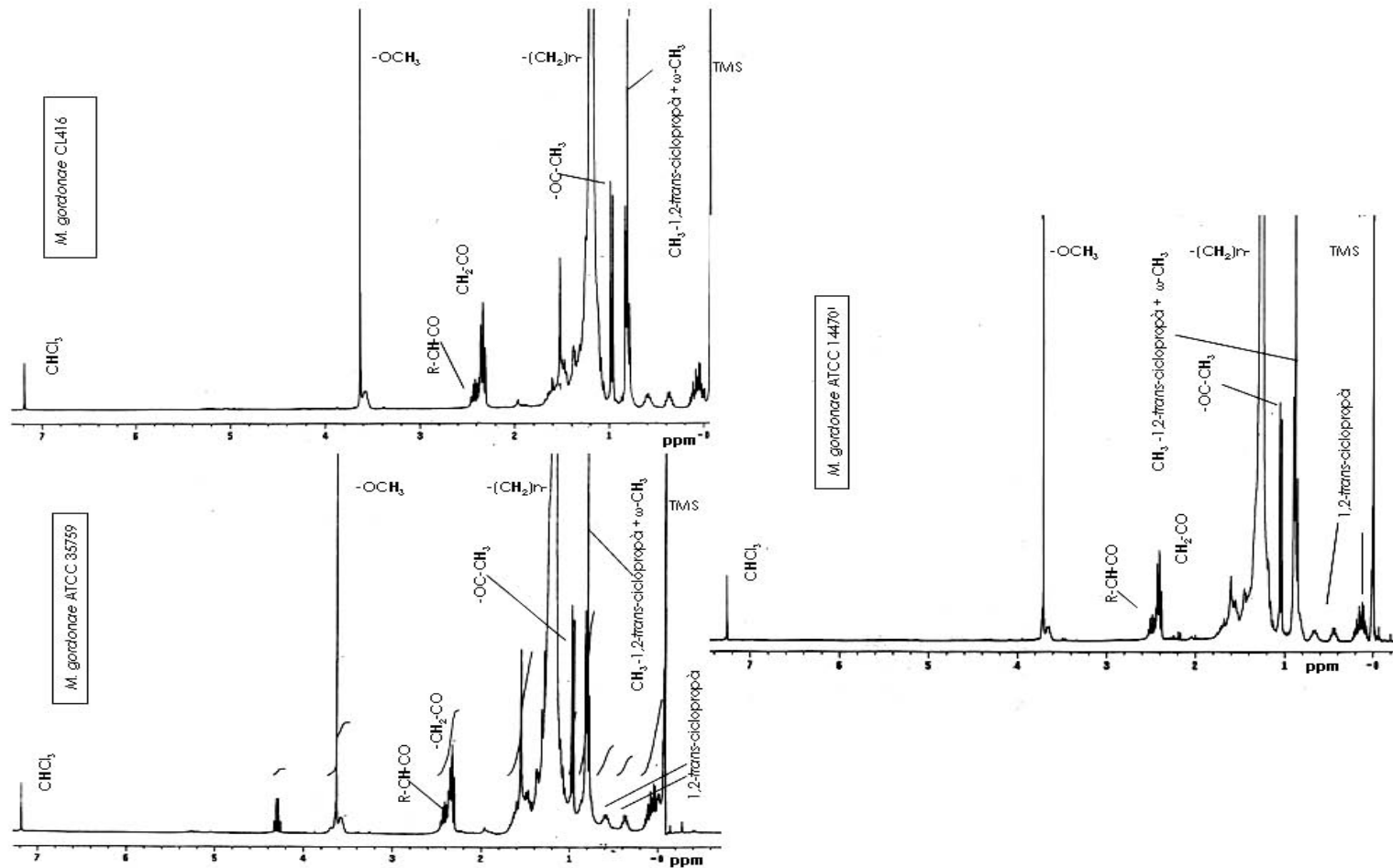


Figura 31: ¹H-RMN dels metoxi-micolats de les soques CL-416, ATCC 35759 i ATCC 14470[†].

resultats

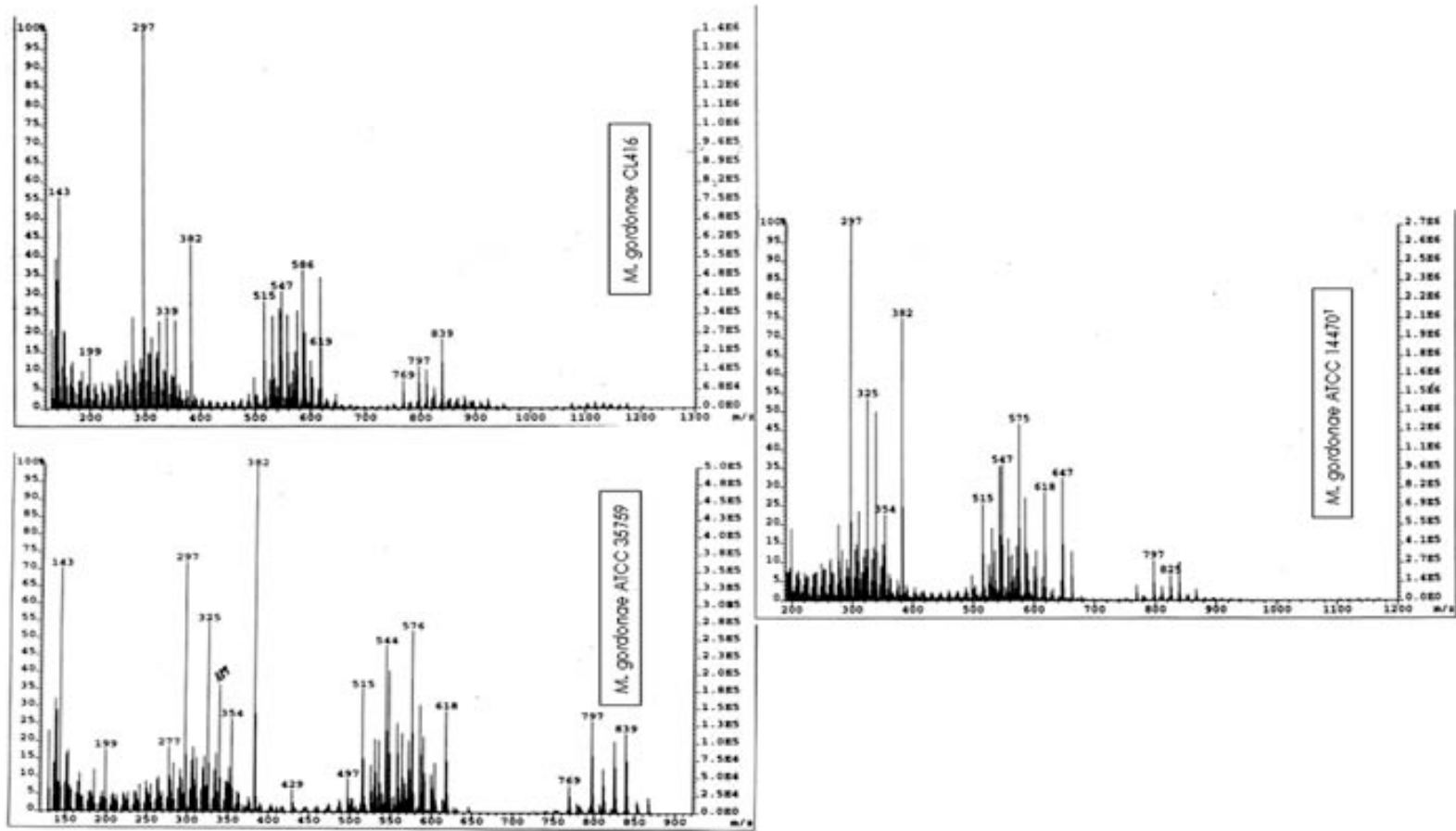


Figura 32: El-MS dels metoxi-micolats corresponents a les soques CL-416, ATCC 35759 i ATCC 14470^T

resultats

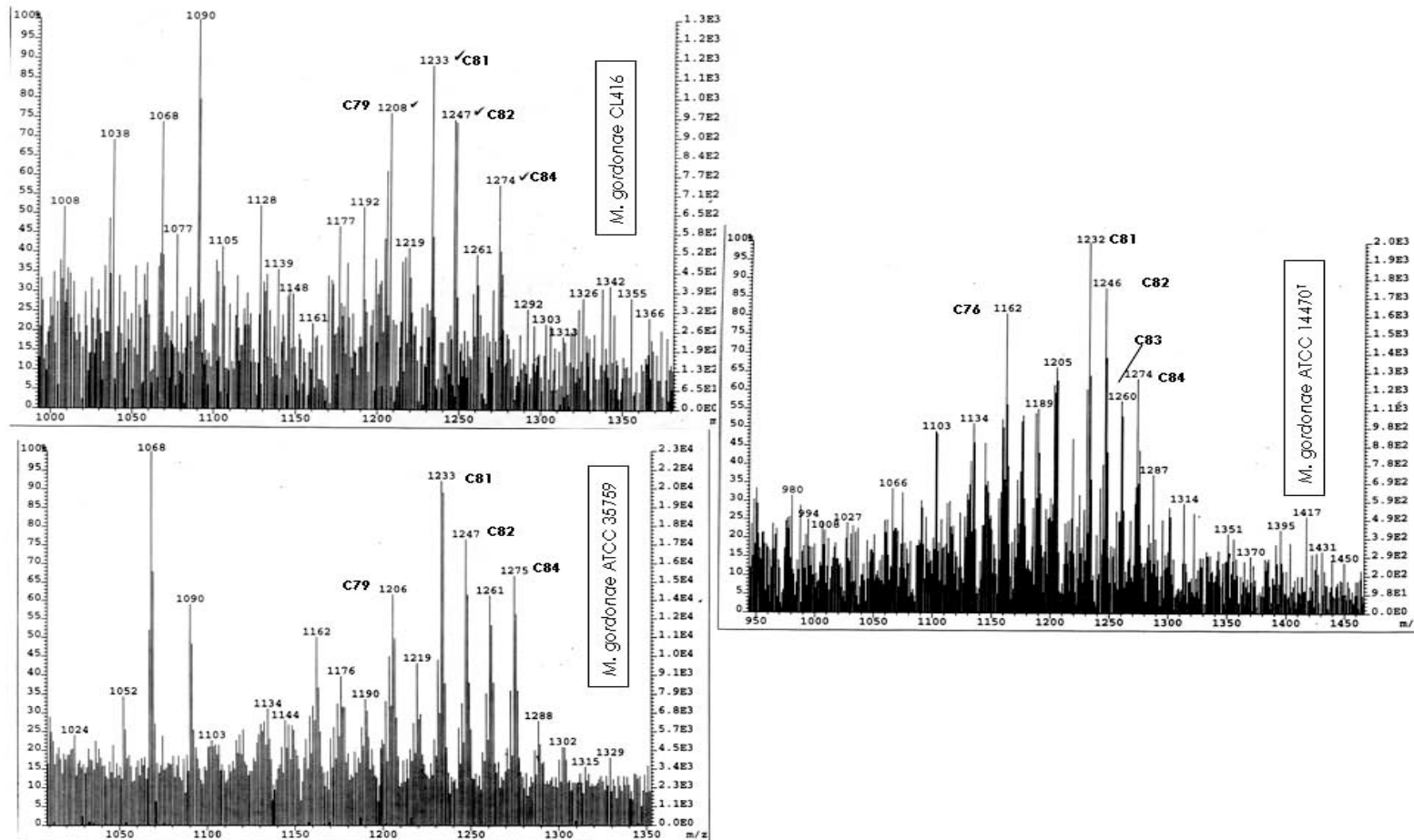


Figura 33: FAB-MS dels metoxi-micolats corresponents a les soques CL-416, ATCC 35759 i ATCC 14470^T.

L'¹H-RMN dels ceto-micolats va detectar ressonàncies entre 0,1 i 3,7 ppm (figura 34). Les senyals que caracteritzaven el compost les trobàvem a 0,15 i 0,47 ppm (anell ciclopropà en *trans*), 0,90 ppm (grup metil adjacent a un ciclopropà en *trans*), a 1,05 ppm (grup metil adjacent al grup ceto) i a 2,32 ppm (metilè adjacent al grup ceto). Cal assenyalar que semblaven existir, molt dèbilment, senyals d'un anell ciclopropà en *cis* (senyal a 0,60 ppm). En l'anàlisi per EI-MS (figura 35) s'observaven l'existència d'importants fragments pertanyents a meroaldehids amb m/z 293, 491, 547, 855 que unit als fragments amb m/z 354 (C₂₀) i 382 (C₂₂) de la zona d'èsters metílics (pertenents a les cadenes laterals o cadenes α dels àcids micòlics) composaven les estructures proposades a la taula 3. Les senyals majoritàries per FAB-MS pertanyien a sèries amb un nombre imparell de carbonis i anell ciclopropà en *trans*, amb m/z 1231 (C₇₉) i m/z 1259 (C₈₁) (figura 36). L'anàlisi per FAB-MS també pressuposava l'existència de sèries minoritàries, amb nombre parell de carbonis, i amb $(M+Na^+)/z$ 1204 i 1217, i longituds de C₇₈ i C₈₀ a les tres soques estudiades, probablement amb un anell ciclopropà en *cis*, tal i com ho es podia intuir per ¹H-RMN.

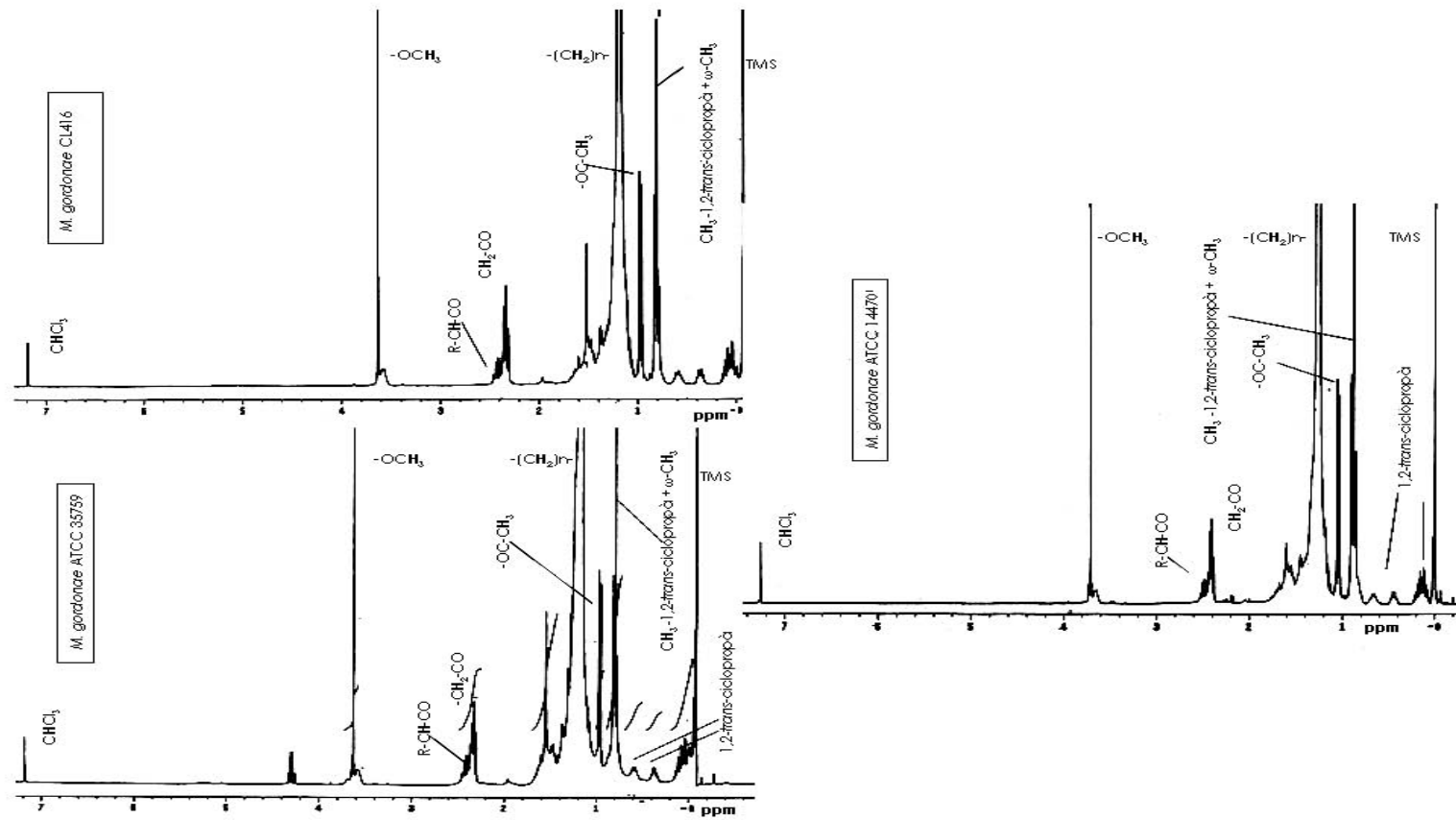


Figura 34: ¹H-RMN del ceto-micolat de les soques CL-416, ATCC 35759 i ATCC 14470[†].

resultats

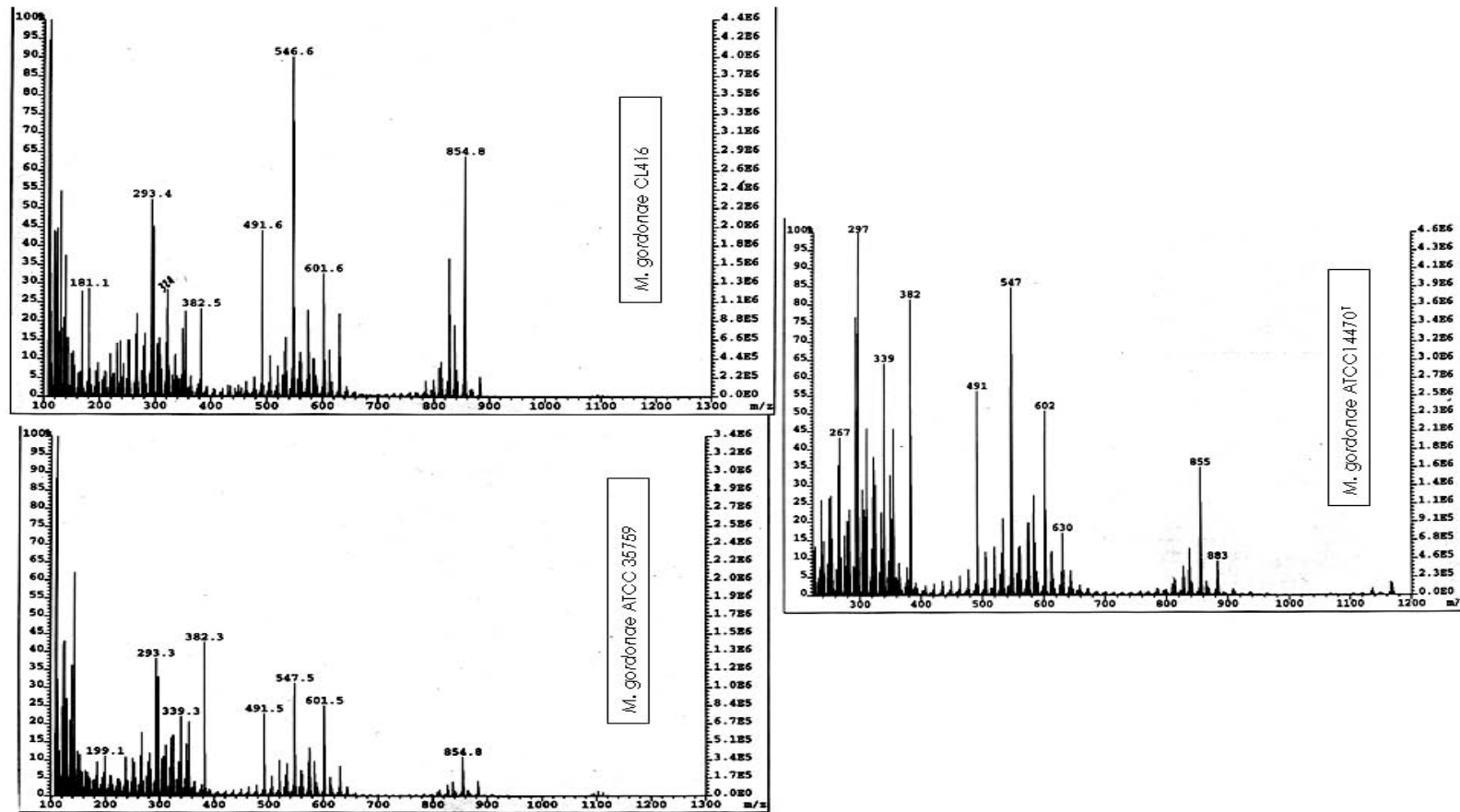


Figura 35: EI-MS dels ceto-micolats de les soques CL-416, ATCC 35759 i ATCC 14470T.

resultats

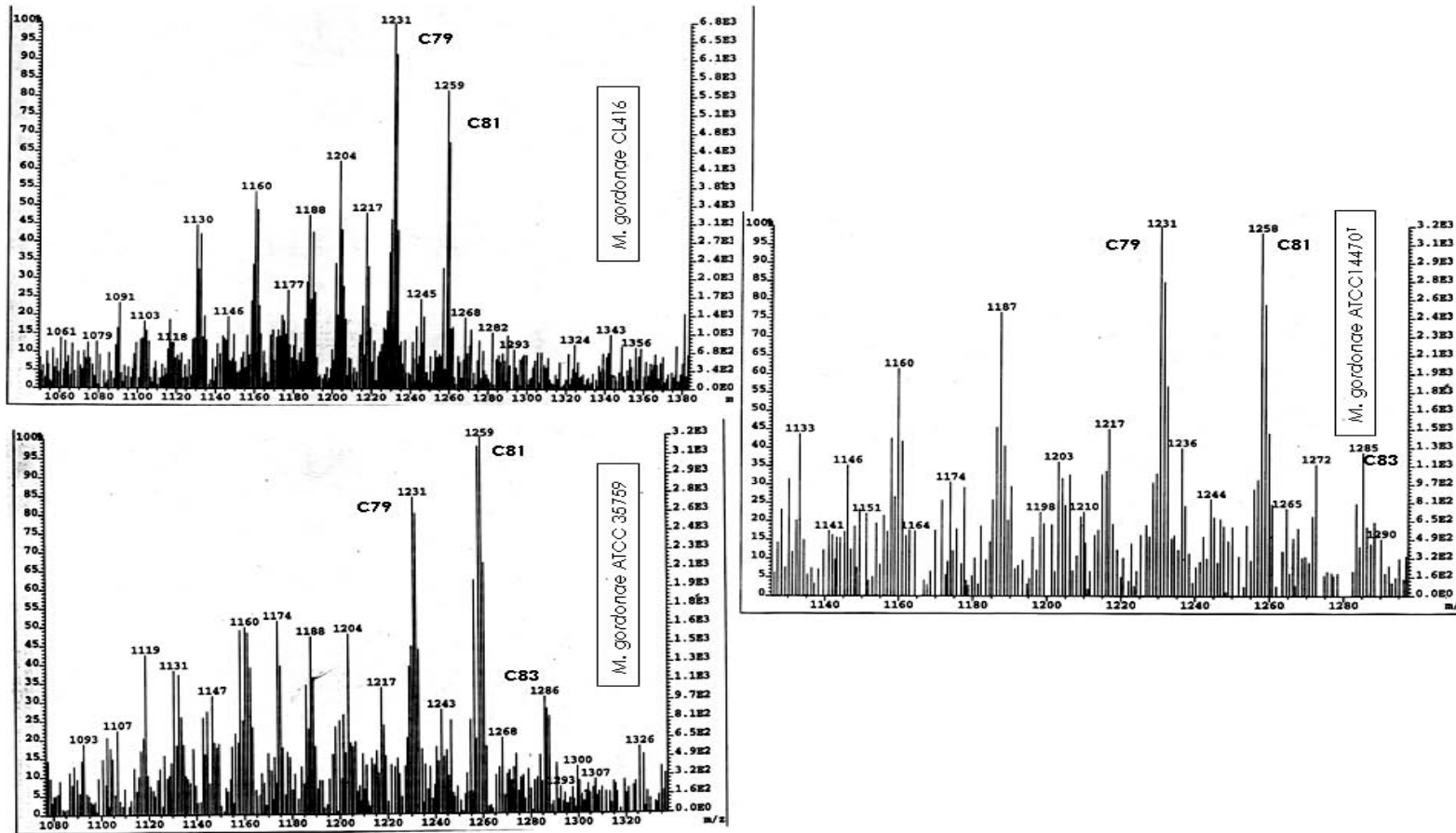


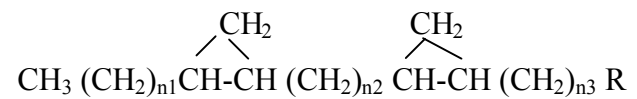
Figura 36: FAB-MS dels ceto-micolats de les soques CL-416, ATCC 35759 i ATCC 14470.

resultats

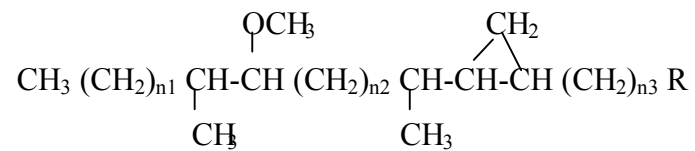
Soca	tipus àcid micòlic*	longitud	Anell ciclopropà			component majoritari	
			cis	trans	cis-insaturació	longitud	n1/n2/n3
ATCC 35759	α 1	C72-C80	+	-	-	C78	17/12/17
	α 2	C73-C75	+	-	+	C73	n.d.
	metoxi1	C73-C85	+	-	-	C81	15/16/17
	metoxi2	C74-C84	-	+	-	C82	15/16/18
	ceto	C79-C85	-	+	-	C81	17/16/16
CL-416	α 1	C72-C80	+	-	-	C78	17/12/17
	α 2	C73-C75	+	-	+	C73	n.d.
	metoxi1	C73-C85	+	-	-	C81	15/16/17
	metoxi2	C74-C84	-	+	-	C82	15/16/18
	ceto	C79-C85	-	+	-	C81	17/16/16
ATCC 14470	α 1	C72-C80	+	-	-	C78	17/12/17
	metoxi1	C73-C85	+	-	-	C81	15/16/17
	metoxi2	C74-C85	-	+	-	C82	15/16/18
	ceto	C79-C85	-	+	-	C81	17/16/16

Taula 3: característiques estructurals dels àcids micòlics (α -, metoxi- i ceto-micolats) aïllats de les soques del *M. gordonae* estudiades.

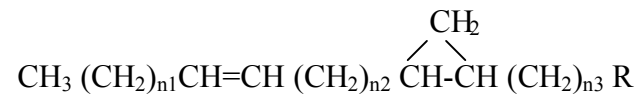
* $\alpha 1$ (di-*cis*-1,2-substituted cyclopropane)



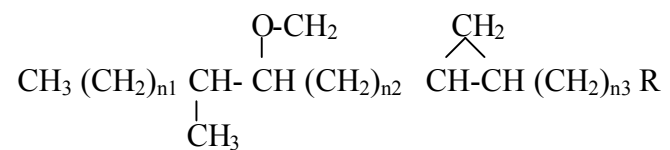
metoxi2 (*trans*-1,2-substituted cyclopropane)



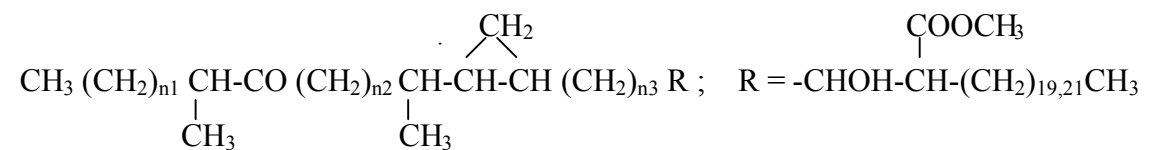
$\alpha 2$ (*cis*-double bond + *cis*-1,2-disubstituted cyclopropane)



metoxi1 (*cis*-1,2-substituted cyclopropane)



ceto-micolats (*trans*-1,2-disubstituted cyclopropane)



Taula 3 (continua): característiques estructurals dels àcids micòlics (α -, metoxi- i ceto-micolats) aïllats de les soques del *M. gordonae* estudiades.

R.2 Estudi del *M. brumae*

R.2.1 Anàlisi del contingut en àcids micòlics per HPLC

Els patrons cromatogràfics obtinguts per HPLC dels *p*-bromofenacil-èsters d'àcids micòlics de les tres soques estudiades del *M. brumae*, CR-103 (12.3), CR-142 (12.2) i CR-270 (12.1), presentaven el grup de pics d'elució tardana característic d'aquesta espècie format pels pics B1, B2, B3, B4 i B5b i que es corresponien a l'àcid micòlic tipus α , l'únic àcid micòlic que poseeix el *M. brumae* (Luquin, 1993). Aquests patrons d'HPLC també presentaven un pic important, que eluia al minut 3,6, just després del marcador de baix pes molecular, i que pel temps d'elució no podia correspondre a cap àcid micòlic conegut (figura 37). De fet, el software encarregat d'identificar cadascun dels pics d'elució assignant-li una lletra no li n'assignava cap. En repetir l'anàlisi del perfil d'àcids micòlics per HPLC però en aquest cas amb el material cel·lular prèviament deslipidat, el resultat va ser que el pic desconegut va desaparèixer del cromatograma (figura 38) i que per tant el o els compostos responsables d'aquest pic no es trobarien covalentment units a la paret cel·lular del micobacteri.

resultats

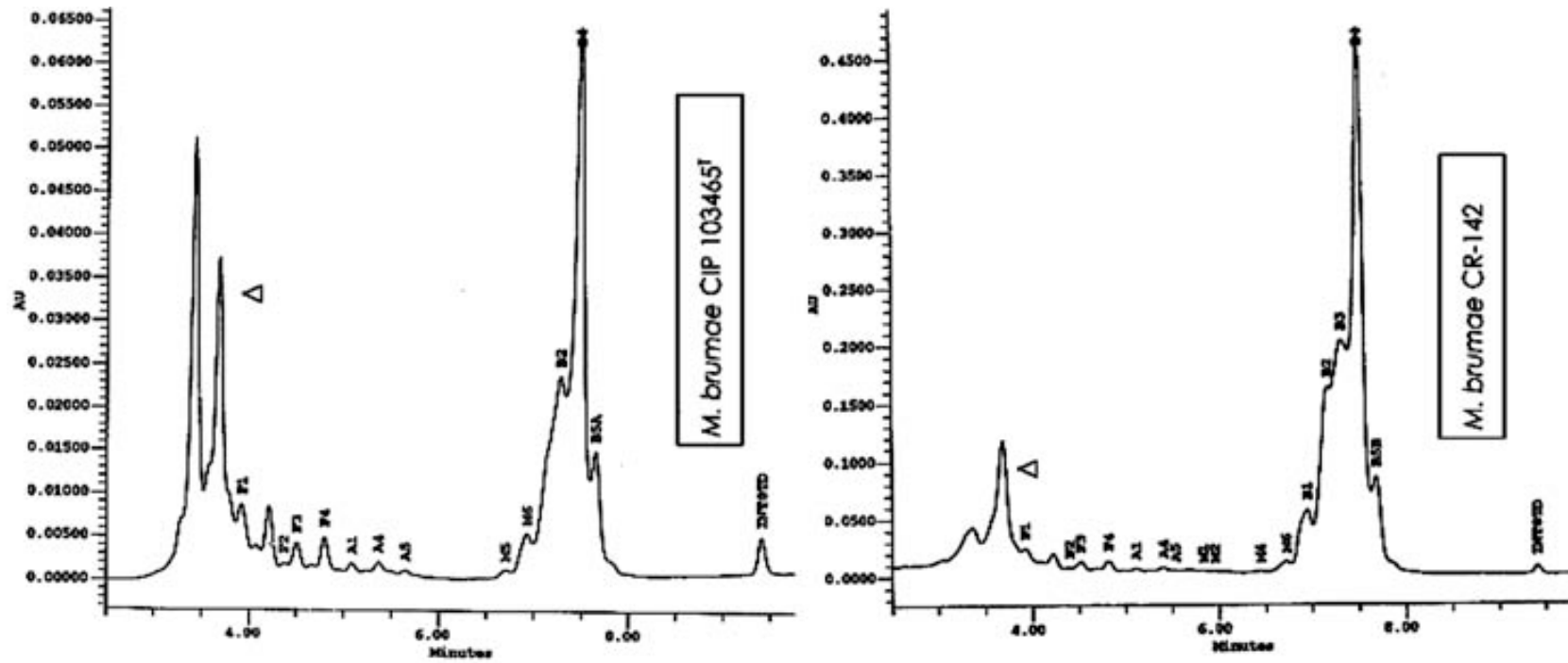


Figura 37: cromatograma d'HPLC de les soques CIP 103465^T (CR-270/12.1) i CR-142 (12.2) del *M. brumae* mostrant el pic desconegut (fletxa) i el clúster tardà de pics que caracteritza l'espècie.

resultats

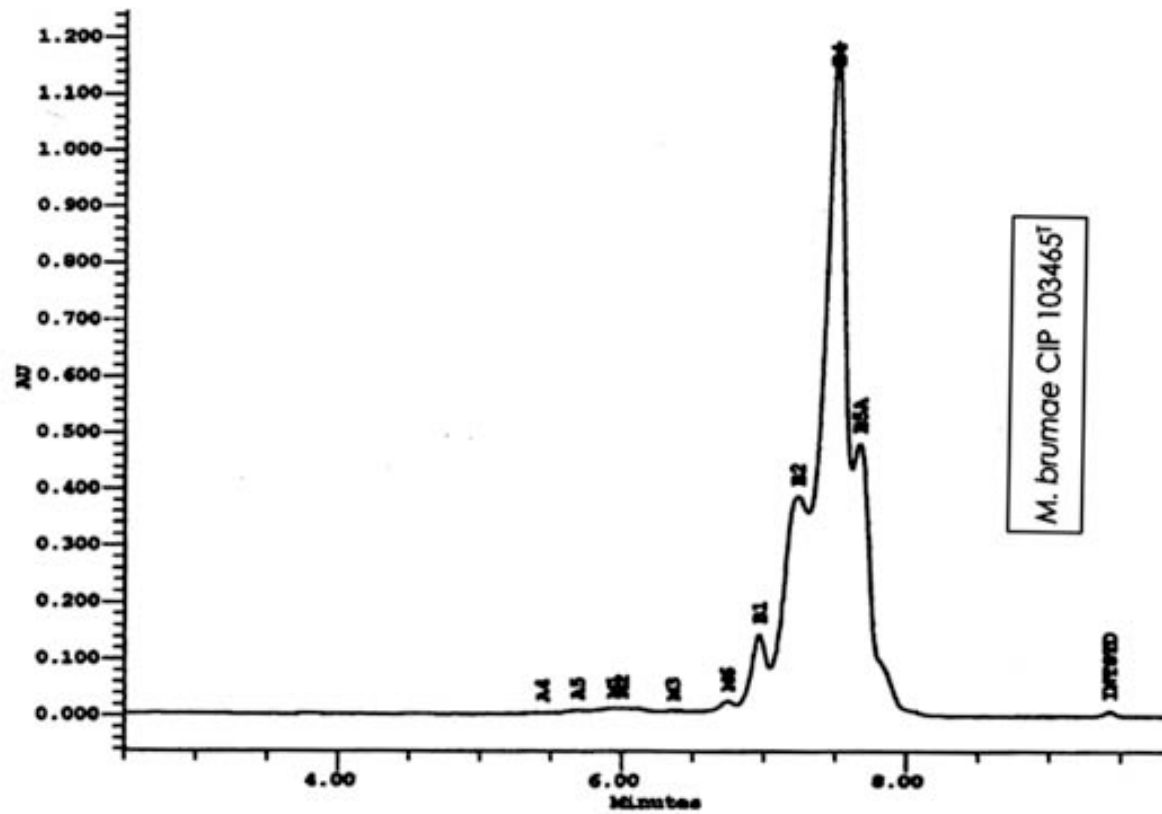


Figura 38: cromatograma d'HPLC de cèl·lules deslipidades del *M. brumae* CIP 103465^T (CR-270/12.1). S'observa com el pic desconegut que elueix al minut 3,6 ha desaparegut.

R.2.2 Purificació i estudi estructural del pic desconegut

La purificació del pic problema es va dur a terme amb la soca *M. brumae* CIP 103465^T. Després de tres setmanes de creixement en medi Sauton (apartat M.1), les cèl·lules es van recollir directament de la superfície del medi sòlid i es van sotmetre a particions en cloroform/metanol i cloroform/metanol/aigua (apartat M.2.1). Posteriorment, l'extracte lipídic definitiu es va sotmetre a successives precipitacions en acetona freda, descartant el precipitat, format principalment per fosfolípids i PIMs. Els sobrenadants resultants es van tornar a precipitar, aquest cop en metanol fred. Dels sobrenadants obtinguts es va fer un primer fraccionament per cromatografia líquida en sílica-gel emprant un sistema de cloroform amb concentracions creixents de metanol (apartat M.3.3). Per tal de localitzar en quines fraccions podríem trobar el compost desconegut, de cadascuna de les precipitacions en acetona i metanol i de les fraccions obtingudes per cromatografia líquida es va separar una part al·líquota, es va saponificar i es va metilar amb diazometà per tal d'analitzar-les per GC/MS en la forma d'èsters metílics. L'objectiu era la localització d'un compost amb un n^o de carbonis prou important per ser detectat en un cromatograma d'HPLC, és per aquesta raó que el mètode emprat en la cromatografia gasosa va ser llarg, més de 95 min (apartat M.4.3).

Tal i com s'observa al GC corresponent a la fracció 100%-1%-5% de la cromatografia líquida del sobrenadant (figura 39) es detectaren èsters metílics que eluïen tard entre els minuts 22,9 i el 52,9. També es detectaren aquesta mena de compostos en la fracció del precipitat en metanol. En aquest cas, es detectaren compostos més llargs que eluïen fins al min 88. En ambdós casos el pic majoritari era el que eluïa al min 27. En la taula 4 s'hi troben les relacions entre el temps d'elució i el n^o de carbonis segons els resultats del GC-MS. Tots aquests compostos eren desconeguts per a la llibreria de l'espectròmetre de masses. L'anàlisi per

El-MS d'aquests compostos donava un patró de trencament amb característiques dels èsters metílics d'àcids grassos insaturats (figura 40). El pic base es movia entre m/z 55, majoritari, i m/z 69. En la part baixa dels espectres dominaven els ions que responien a la fórmula de $[C_nH_{2n-1}]^+$ i $[C_nH_{2n-3}]^+$, i a la part alta de l'espectre es detectaren fragments d'ions pseudomoleculars M^+-31/z (pèrdua d'un grup metoxi) i també l'ió molecular que indicava que el nostre compost problema (de fet una família de compostos homòlegs) contenia dues insaturacions ja que posseïa quatre unitats menys de massa que el seu equivalent saturat.

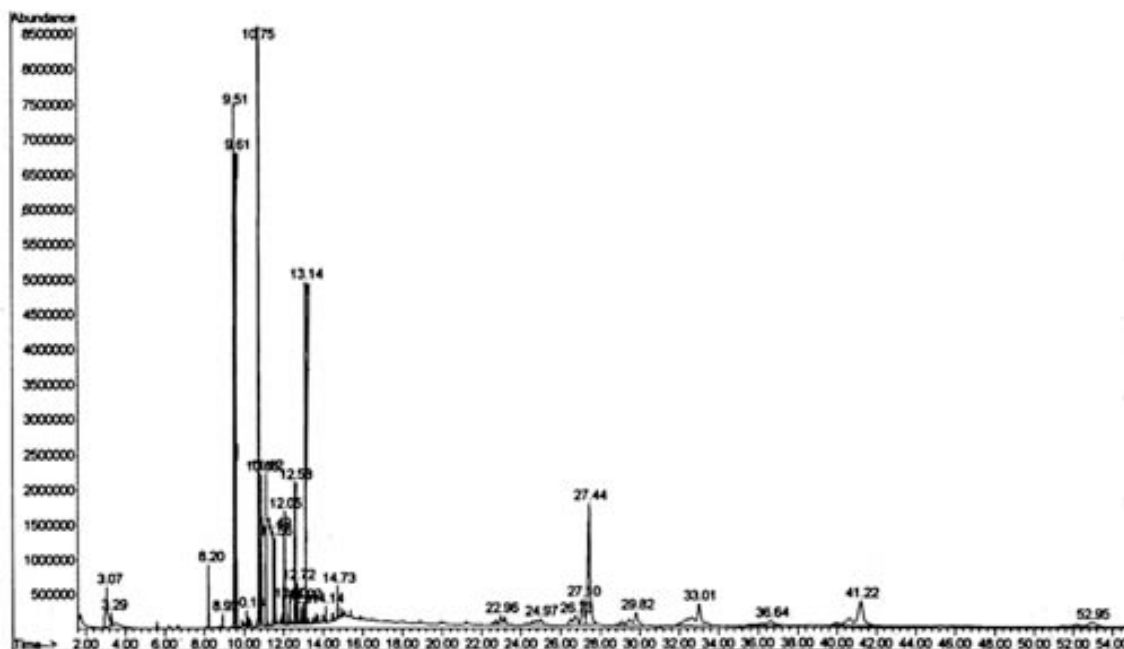


Figura 39: cromatograma de gasos de la mostra corresponent a les fraccions unides del 100% cloroform, 1% i 5% de metanol en cloroform de la cromatografia líquida del sobrenadant.

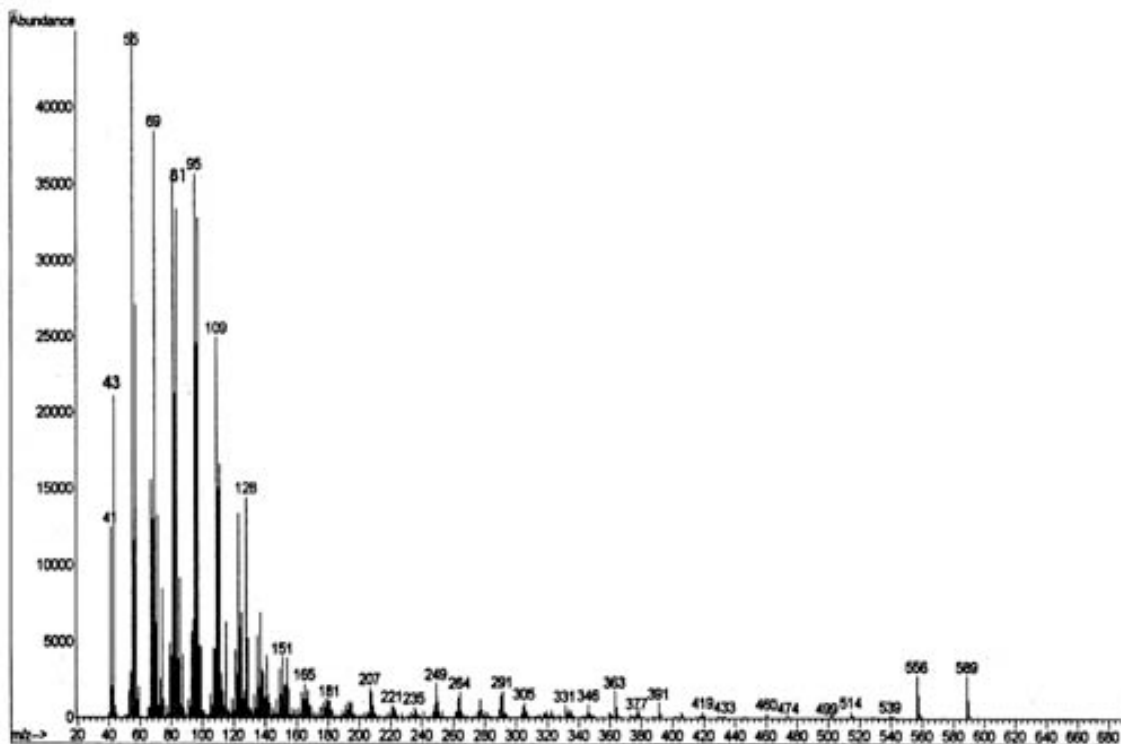


Figura 40: espectre de masses (EI/MS) del component majoritari (elució als 27,4 min) de les fraccions del 100% cloroform, 1% i 5% de metanol en cloroform de la cromatografia líquida del sobrenadant.

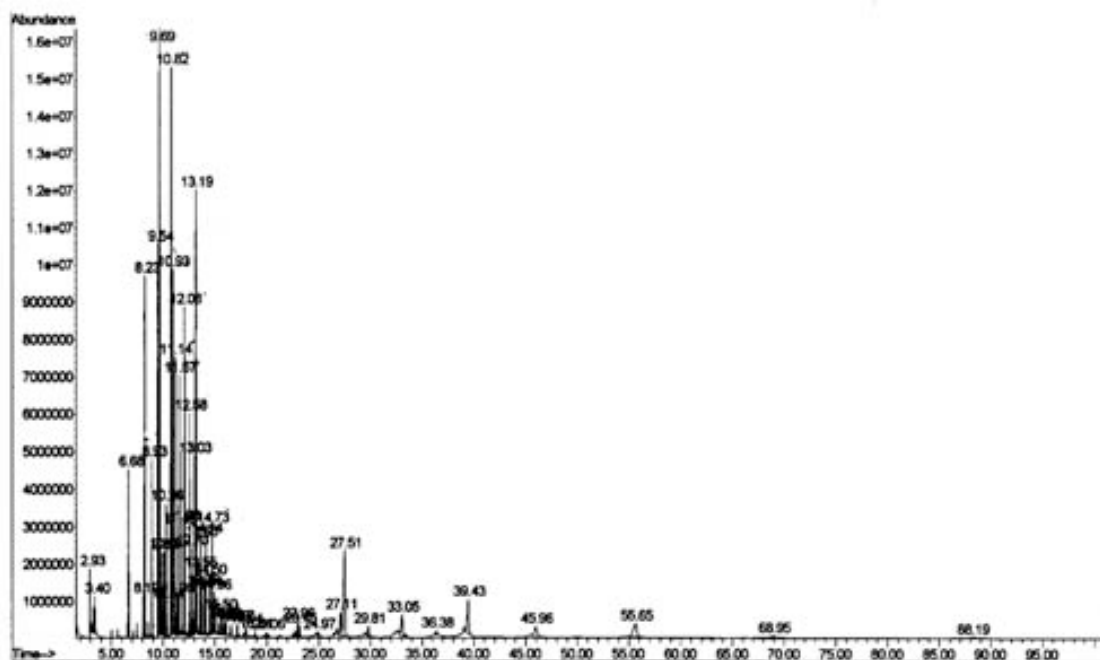


Figura 41: cromatograma de gasos de la mostra corresponent a la fracció corresponent al precipitat en metanol fred.

GLC (min)	23,1	24,9	27,4	29,8	33	36,6	41,2	45,8	52,9	55,3	68,7	88
Nº carbonis	37	38	39	40	41	42	43	45	47	47	49	51

Taula 4: relació entre el temps d'elució del GLC i el nº de carbonis del compost al que corresponen segons l'espectre de masses. En negreta es troben els valors que únicament es van trobar en la fracció del precipitat en metanol.

Un cop identificades les fraccions on trobaríem aquesta família de compostos, es va procedir a la seva purificació per cromatografia líquida, tant pel precipitat en metanol com pel sobrenadant. A diferència de la primera purificació per cromatografia líquida, es va emprar un tamany de sílica més petit i com a fase mòbil un sistema d'elució amb concentracions creixents d'èter etílic en éter de petroli per tal d'eliminar al màxim la presència d'àcids grassos de cadena curta i d'altres impureses (figura 42).

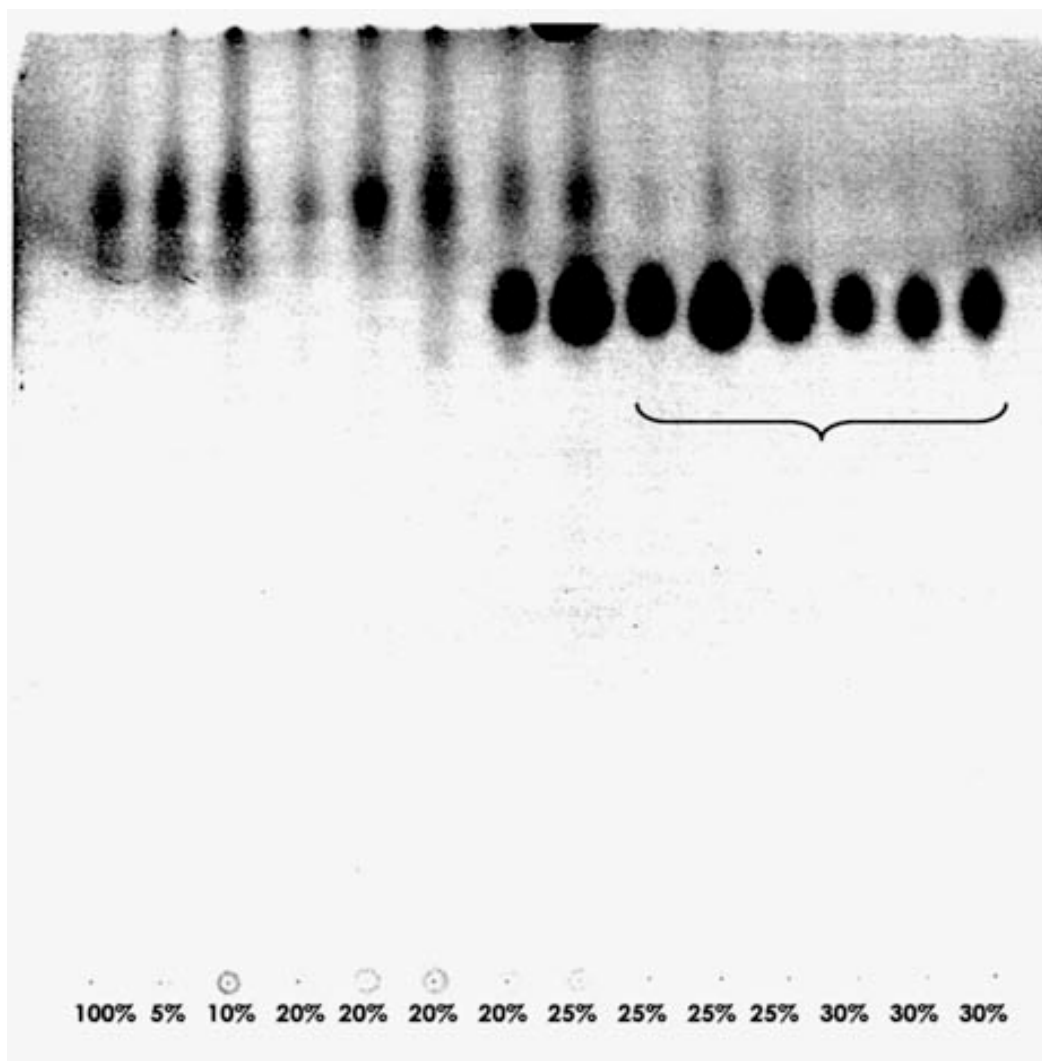


Figura 42: CCF de la columna de cromatografia líquida per a la purificació final del compost problema. Revelador: àcid molibdofosfòric. Eluent: cloroform/metanol; 90/15. Les fraccions recollides en la clau es van unir per a l'estudi estructural posterior.

Un cop obtingudes les fraccions on, suposadament, es trobava purificat el compost problema, (només era una possibilitat perquè no teníem la certesa al no posseir un patró), es van analitzar per espectroscopia d'infraroig (IR) (apartat M.4.2). L'anàlisi mostrava les bandes característiques dels èsters metílics d'àcids grassos no hidroxilats: cadena hidrocarbonada; 722 cm^{-1} , grup èster carboxílic; 1745 cm^{-1} , parafina (C-H *stretching*); 2921 i 2845 cm^{-1} i una banda intensa a 965 cm^{-1} que suggeria la presència de dobles enllaços en *trans*. En analitzar el valor de la rotació òptica (apartat M.4.7) del compost es va obtenir un valor negatiu $[M]_D = -42^\circ$, com en el cas dels àcids micòlics (Daffé, 1991), el que indicava la presència de centres quirals com els que formen les

ramificacions de metil adjacents als dobles enllaços en *trans*. Un cop conegut el resultat de l'IR i la rotació, es va voler fer una anàlisi per HPLC per tal d'assegurar que el compost coincidia amb el pic que en un primer moment vàrem detectar també per HPLC. Es va agafar una petita al·líquota de la fracció purificada, es va derivatitzar a èsters de *p*-bromofenacil i es va analitzar per HPLC. El resultat va ser satisfactori tal i com s'observa a la figura 43. Posteriorment es va procedir a analitzar el compost problema per d'¹H-¹³C-NMR. Els resultats d'aquestes ressonàncies es troben a la taula 5 i a les figures 44 i 45 i confirmen l'estructura del compost com la d'un àcid gras metil-ramificat amb insaturacions en *trans*. També es realitzaren experiments de 2D-NMR, homonuclear (protó-protó) i heteronuclear (protó-carboni) per tal de lligar els resultats que donaven les ressonàncies de protó amb els que donaven les ressonàncies de carboni i obtenir una visió més completa de l'estructura d'aquests compostos (figures 46 i 47). En l'espectre de 2D-RMN homonuclear (protó-protó) cal ressaltar dues interconnexions importants entre les ressonàncies a 5,30/2,04 ppm i entre 2,04/0,99 ppm que van permetre assignar la posició α de la ramificació de metil adjacent al doble enllaç en *trans*.

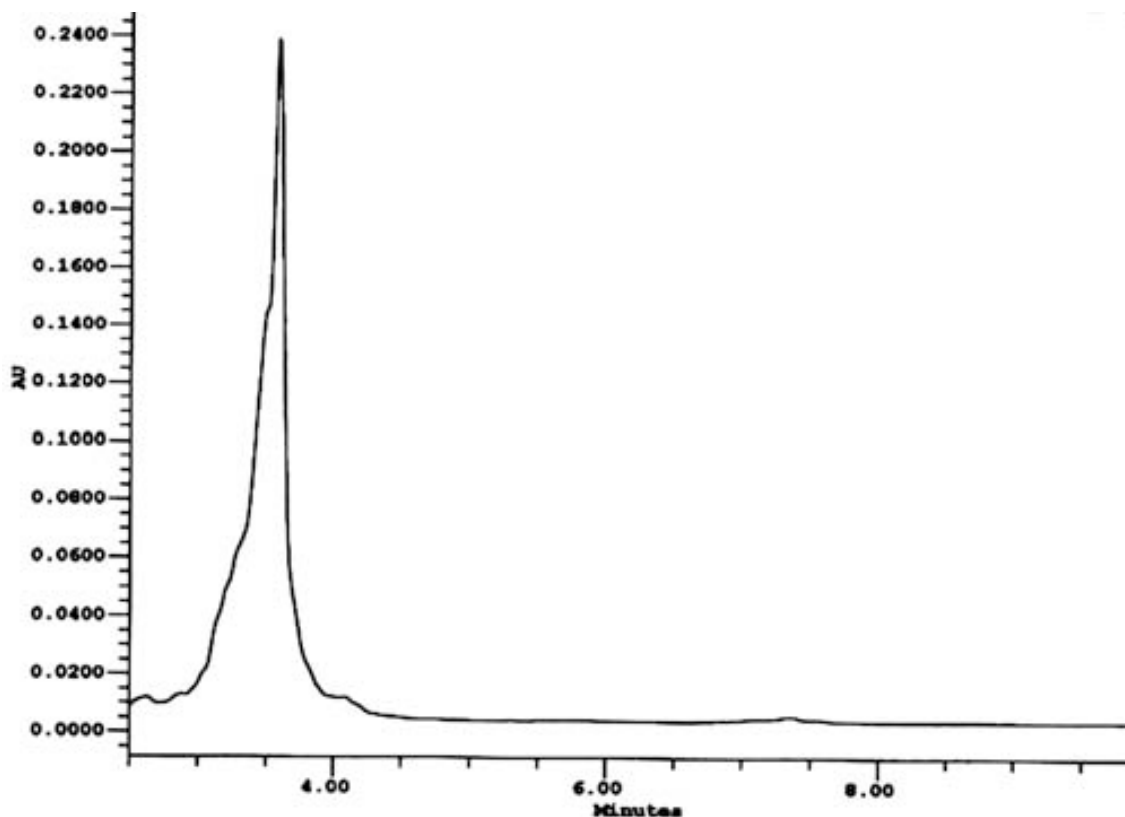


Figura 43: cromatograma d'HPLC que mostra com el compost purificat per cromatografia líquida coincideix plenament amb el pic desconegut observat en les soques de *M. brumae*.

	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	14.11	0.89*
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	22.68-24.67	1.28*
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	29.06-29.77	1.28
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH=CH-CH}(\text{CH}_3)\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	20.90-22.60	0.96*
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH=CH-CH}(\text{CH}_3)\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	36.69-37.23	2.04*
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH=CH-CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_n\text{-}$		1.28
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH=CH-CH}_2\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	31.92-32.58	1.99*
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH=CH-CH}(\text{CH}_3)\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	29.06-29.77	1.28
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_n\text{-}$		1.35*
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH=CH-CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	136.45	5.25*-5.35*
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH=CH-CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	128.41-130.19	5.25*-5.35*
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	37.23	2.38*
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	22.68-24.67	1.65*
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	29.06-29.77	1.28*
$(\text{CH}_2)_n\text{-CH=CH-CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-COOH}$	20.90-22.60	0.99*

Taula 5: relació entre les senyals detectades per d ^1H - ^{13}C -NMR i l'estructura a la qual correspondrien. Les resonàncies que tenen adherit l'asterisc són amb les que es va observar interconnexió en l'espectre homonuclear (protó-protó) de 2D-NMR.

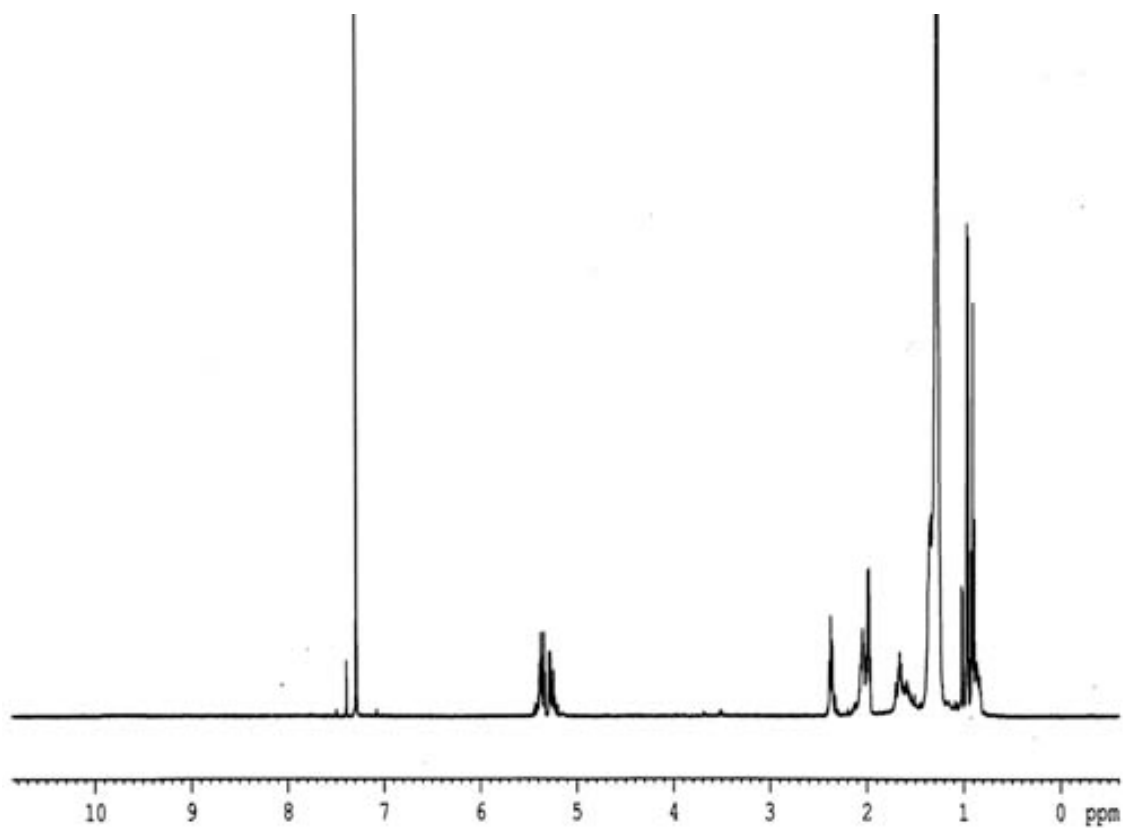


Figura 44: $^1\text{H-NMR}$ del compost problema. S'observa el sistema de dos multiplets entre 5,25 i 5,40 ppm que caracteritza les insaturacions en *trans*. La senyal de referència és la del deuterocloroform (7,25 ppm).

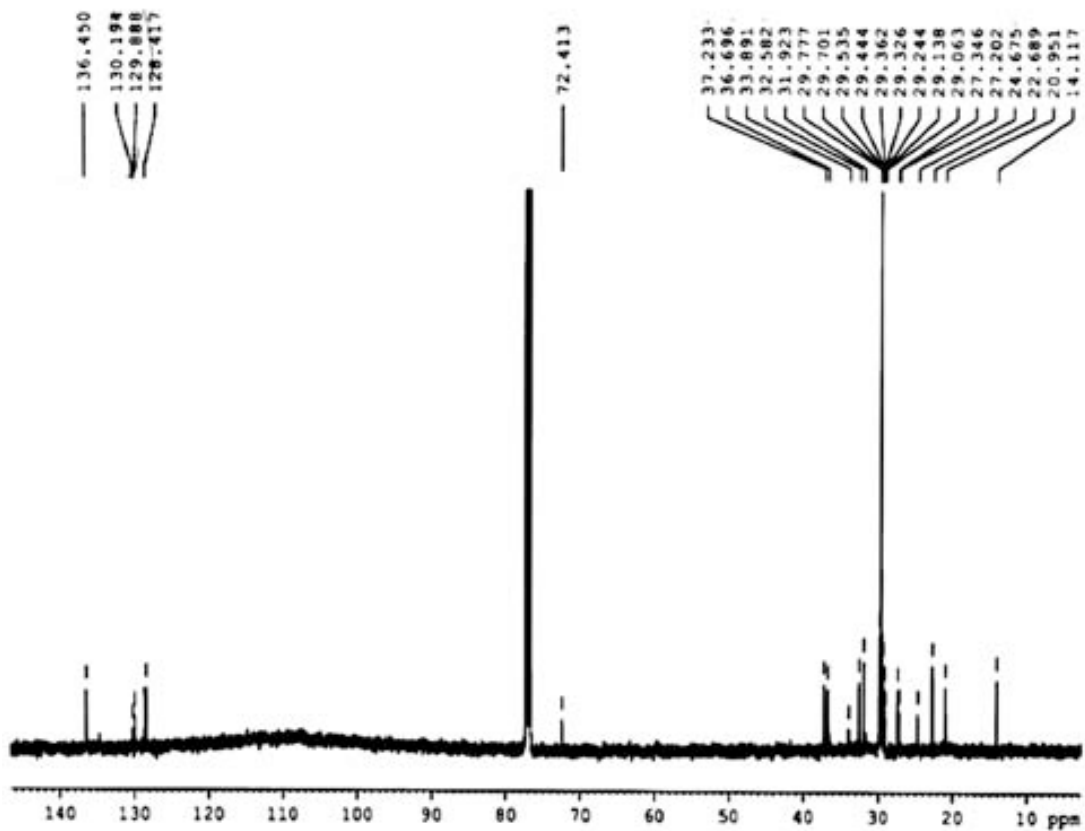


Figura 45: detall del ^{13}C -NMR. Les correspondències estructurals de cadascuna de les senyals les trobem a la taula 5. La senyal a 77 ppm correspon al deuterocloroform amb que es va diluir la mostra.

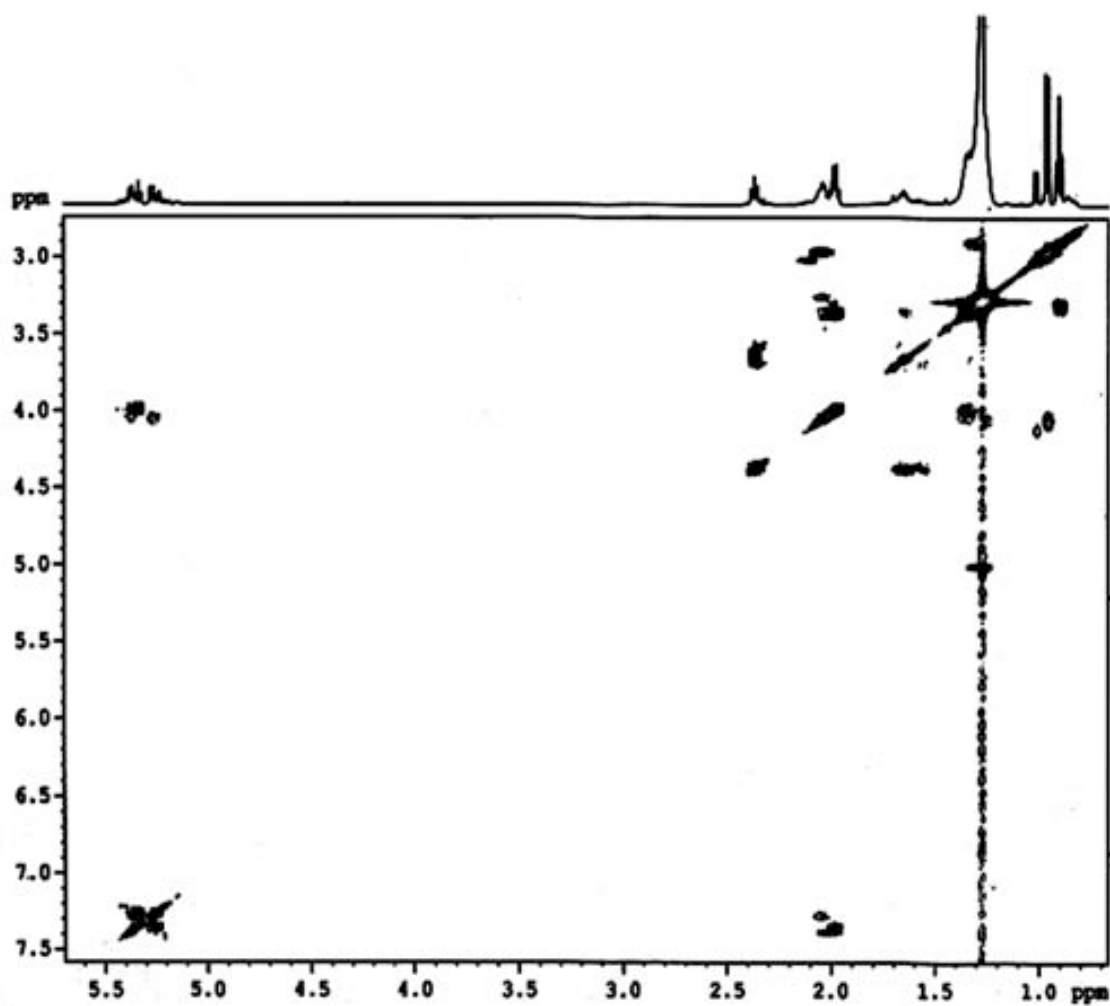


Figura 46: 2D-NMR homonuclear (protó-protó): S'aprecien les relacions entre les senyals de carboni i de protó que es detallen a la taula 5.

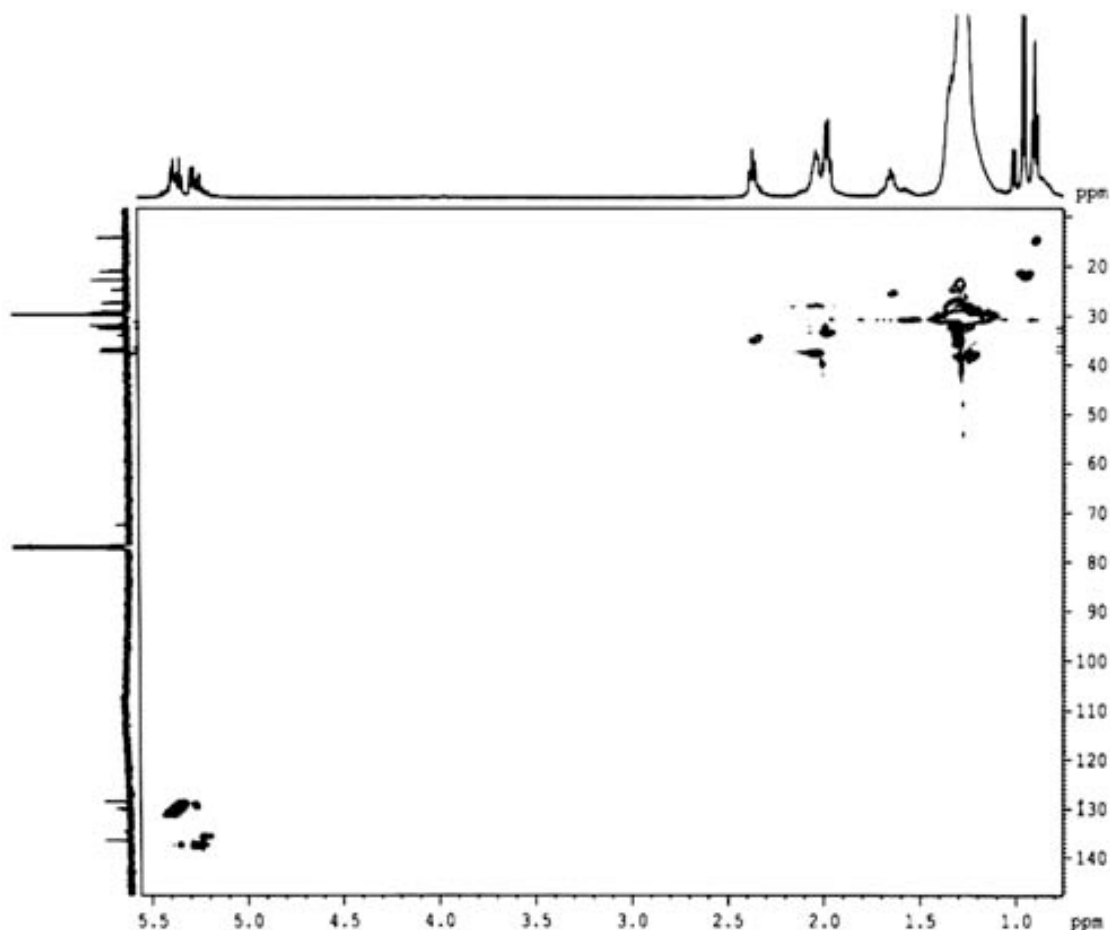


Figura 47: 2D-NMR heteronuclear mostrant les interconnexions protó-carboni. Les interconnexions es mostren a la taula 5.

Els resultats obtinguts fins ara ens permetien afirmar que la família de compostos que havíem detectat per HPLC estava formada per àcids grassos de cadena llarga, àcids micobactèrics, amb dues insaturacions en *trans*, i amb un nombre variable de carbonis d'entre 37 i 51. En tot cas, cap de les tècniques realitzades no ens permetia d'anar més enllà, localitzant exactament en quin carboni es trobaven els dobles enllaços. Per a fer-ho, la mescla de compostos purificada en forma d'èster metílic va ser sotmesa a un trencament oxidatiu dels dobles enllaços (apartat M.2.4) i els fragments obtinguts, àcids mono- i dicarboxílics, van ser metilats, purificats per CCF preparativa i analitzats per GC/MS. El monoèster majoritari va ser un 2-metil-nonadecanoat (pic base amb m/z 88 i ió molecular amb m/z 312) a més d'altres homòlegs minoritaris lineals i també amb ramificacions. Aquest resultat permetia localitzar un

dels dobles enllaços en la posició ω -18 tal i com es troben descrits els àcids micòlics del *M. brumae* (Luquin, 1993). Malgrat això seguia sent extremadament difícil intepretar els resultats del trencament oxidatiu dels dobles enllaços perquè el conjunt de dièsters formats en la reacció presentava dificultats d'interpretació en no saber si procedien de la part proximal o de la part distal del compost. Per tal de superar aquest problema, la mescla purificada d'homòlegs en forma d'èsters metílics va ser tractada per aconseguir derivats de pirrolidina (apartat M.2.5) i analitzada per EI-MS (Andersson, 1975). Aquesta tècnica permetria obtenir informació tant de l'ió molecular com de la posició dels dobles enllaços. La posició de les insaturacions vindria indicada per intervals de 12 uma dintre de la sèrie d'intervals de 14 uma. En l'espectre de masses es detectaren compostos (amides) homòlegs essent el majoritari el corresponent al derivat pirrolidínic amb C_{39} i m/z 627. El pic base s'obtenia amb m/z 113 originat per una reagrupament de McLafferty que contenia la pirrolidina. En la part alta de l'espectre de masses, un pic intens amb m/z 402 assenyalava la posició de la ramificació de metil que acompanyen les insaturacions en *trans*. Per tal de simplificar la seva interpretació, degut a la presència de diferents homòlegs, es va optar per separar els derivats pirrolidínics per CCF argèntica. La separació va donar un total de sis components, que després es van analitzar per EI/MS, el component majoritari mostrava el pic base amb m/z 113, i l'intensió molecular amb m/z 627 ($C_{39:2}$). El trencament oxidatiu d'aquest component, seguit de metilació i anàlisi per GC/MS (figura 46) va permetre la identificació d'un fragment pirrolidínic de 6 carbonis amb un pes molecular de M^+/z 213, un pic base amb m/z 113 i pics addicionals amb m/z 182 ($M-31$) i m/z 154 (trencament contenint la ramificació de metil) que permetien fixar un doble enllaç en el C5. Tenint en compte aquests resultats podíem formular el compost majoritari com l'àcid 4,21-dimetil-5,19-di-(*trans*)-enoil-heptatriacontanoïc. A més, d'entre els sis compostos derivats de pirrolidines que es van separar per CCF argèntica també n'hi havia amb

dues insaturacions en *cis* (amb C_{38} i C_{40}) i d'altres que posseïen una insaturació en *cis* i una en *trans* (C_{39}). Tots ells compostos minoritaris.

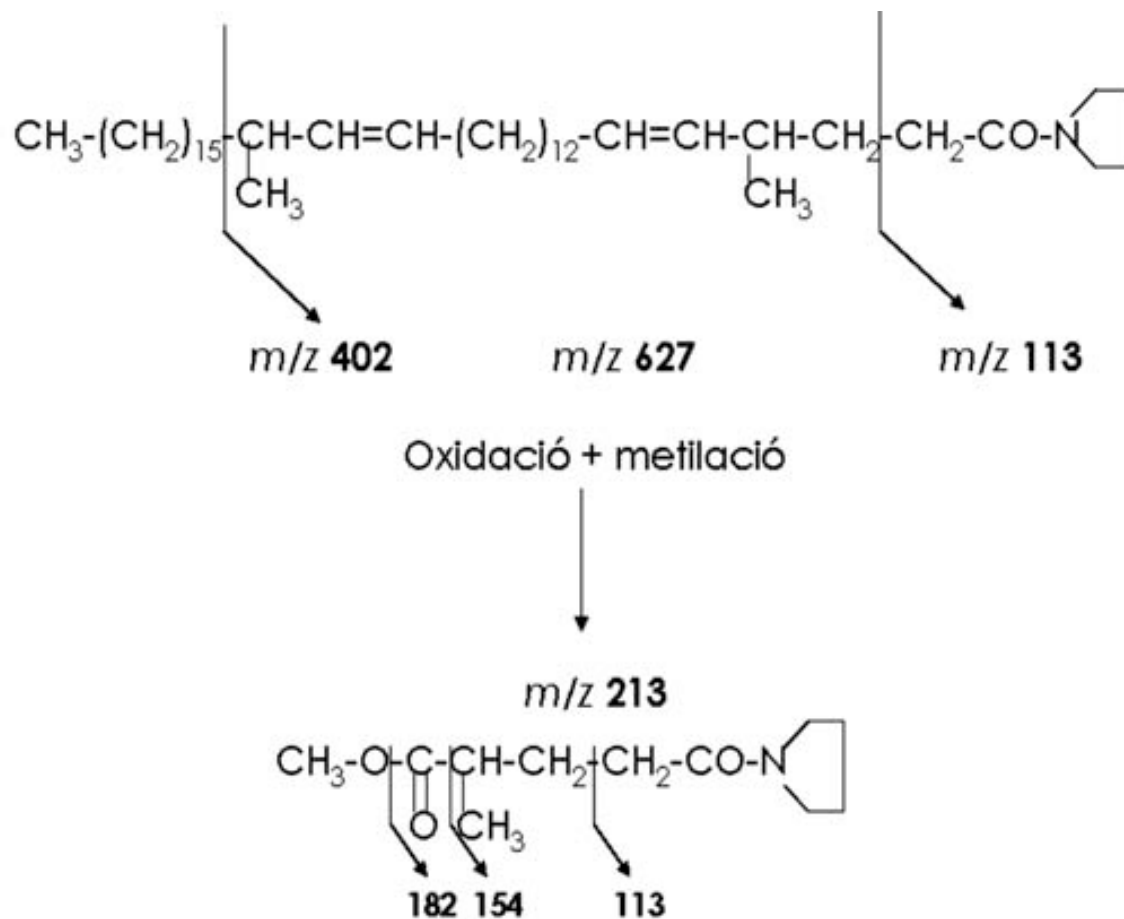


Figura 48: esquema de l'estratègia seguida en la localització de dobles enllaços en l'homòleg majoritari dels àcids micobactèrics del *M. brumae* segons Rafidinarivo (2009).

Discussió

Discussió

L'anàlisi d'àcids micòlics és una tècnica ben establerta en la taxonomia micobacteriana. Està totalment assumit que els àcids micòlics són caràcters fenotípicament estables (Garza-González, 1998). Aquest fet unit a les seves distribució discontinua i variabilitat estructural els han permès tenir importants implicacions quimiotaxonòmiques (Minnikin, 1985a,b; 1984a,b; 1980). Des dels anys 50 del passat segle, la GLC i la CCF han estat les tècniques cromatogràfiques més àmpliament emprades per analitzar els àcids micòlics en forma d'èsters metílics (Luquin, 1991; Minnikin, 1984b; Daffé, 1983a). A finals dels 80 i principis dels 90 la derivatització dels àcids micòlics en forma d'èsters de *p*-bromofenacil es va utilitzar per a separar-los per HPLC i detectar-los mitjançant llum UV (Butler, 1991; 1988). La identificació de micobacteris per HPLC ha donat bons resultats, amb una concordança respecte les tècniques bioquímiques del 97% i del 98 % en el cas de mètodes basats en sondes d'ADN. Aquests resultats fan que l'HPLC pugui ser emprada amb garanties per a la identificació de la majoria de micobacteris (Viader-Salvadó, 2007; Butler, 2001; Thibert, 1993).

L'estudi estructural dels àcids micòlics ha fet servir tota una sèrie de tècniques, essent les més usades l'EI-MS i l'RMN. Tècniques més recents, com el FAB-MS (Barry, 1998), el MALDI/TOF-MS (Rafidinarivo, 2009; Laval, 2001; Watanabe, 2001) s'han aplicat per a la resolució completa de les estructures dels àcids micòlics. En aquest estudi les dades amb FAB-/EI-MS s'han complementat permetent obtenir més informació a més del pes molecular dels àcids micòlics presents al *M. goodnae*. La utilització d'ambdues tècniques és important perquè, utilitzant només la tècnica d'EI-MS existeix una tendència al sobretrencament en la zona dels meromicòlics, degut a la pèrdua d'un grup metoxi, en determinats tipus d'àcids micòlics com el metoxi- i el dicarboxi-micolat i els espectres

resultants són de molt complexa interpretació.

Butler (1991) i Cage (1992), usant l'HPLC, van demostrar l'existència de dos patrons d'àcids micòlics al *M. gordonae*. Un d'ells, majoritari, amb un sol grup de pics i un altre amb dos grups de pics. En el present estudi, hem demostrat que el wax-èster micolat era el responsable del segon grup de pics. Aquest compost conté essencialment un anell ciclopropà en *trans* i també sèries minoritàries amb *cis* ciclopropans. Com ja s'havia descrit anteriorment (Lanéelle, 1970), els dicarboxi-micolats i els alcohols secundaris es combinen per formar *in vivo* l'anomenat wax-èster micolat. Aquests tipus de compostos es troben àmpliament distribuïts en els micobacteris, on els podem trobar formant part de l'esquelet estructural de la paret cel·lular, el CWS, i també en forma de mono- i triglicèrids i del CF (Okazaki, 2009; Barry, 1998; Luquin, 1991; Lanéelle, 1989; Minnikin, 1985b; 1984b). Malgrat això, s'han realitzat pocs estudis estructurals sobre ells. Els dicarboximicolats del *M. phlei* es van caracteritzar com a mescles homòlogues amb insaturacions i ciclopropans (Minnikin, 1982). En contraposició, els resultats d'aquest treball únicament detecten dicarboximicolats amb anells ciclopropà.

Tenint en compte els alcohols secundaris, 2-eicosanol i 2-octadecanol, en les soques del *M. gordonae* que contenien dicarboxi-micolats la longitud de cadena dels wax-èster es trobaria entre C₈₁ i C₈₅ pels components majoritaris, xifres molt semblants a les trobades als ceto-micolats de les soques estudiades. També es van trobar entre ells més similituds estructurals com la presència únicament d'anells ciclopropà en *trans*. Aquests fets reforçarien els postulats que els relacionarien biosintèticament i que sostindrien que a partir dels ceto-micolats s'originarien els wax-èster (Barry, 1998; Lacave, 1989; Minnikin, 1982). Fins fa relativament poc, un argument que reforçava aquesta hipòtesi eren els patrons d'àcids micòlics coneguts perquè totes les espècies posseïdores del wax-èster també posseïen ceto-micolats (Asselineau, 2002). Posteriorment però, s'han descrit micobacteris amb el wax-èster micolat i sense ceto-micolats (Tortoli, 2003). Aquest fet posaria en dubte

el requisit pel qual la presència dels wax-èster estaria lligada invariablement a la dels ceto-micolats.

Les estructures parcials dels α -, ceto- i metoxi-micolats del *M. gordonae* ja havien estat estudiades (Minnikin, 1985a; Daffé, 1981) però en aquest treball s'han estudiat amb més profunditat, caracteritzant també els compostos minoritaris i establint la naturalesa d'insaturacions i ciclopropans.

Els α -micolats que hem trobat en aquest estudi pertanyien en la seva majoria al tipus I, només amb ciclopropans, majoritàriament amb una configuració *cis* (Watanabe, 2001). La majoria de micobacteris de creixement lent analitzats en estudis anteriors (Watanabe, 2001; Minnikin, 1982) contenien també l' α -micolat de tipus I, majoritàriament amb una configuració *cis*, malgrat que, en l'estudi de Watanabe (2001) també detectaren sèries minoritàries amb ciclopropans en *trans* als *M. kansasii* i *M. avium* complex, als que afegirem també el *M. gordonae* descrit en aquest treball. També s'han descrit α -micolats del tipus III, (amb un ciclopropà i una insaturació, ambdós en *cis*), trobats a espècies del *M. tuberculosis* complex i el *M. avium* (Watanabe, 2001) i detectat en aquest estudi únicament a les soques del *M. gordonae* productores del wax-èster micolat, CL-416 i ATCC 35759.

Els metoxi-micolats de tipus I eren els majoritaris a les espècies del *M. tuberculosis* complex, *M. avium* (Watanabe, 2001) i *M. leprae* (Draper, 1982) i, a la vista dels nostres resultats, també al *M. gordonae*. Igual que en els α -micolats, els metoxi-micolats del *M. gordonae* no sembla que posseixin insaturacions en *trans* ni ciclopropans addicionals en el meroaldehid i, al contrari d'altres espècies (Watanabe, 2001), no s'han trobat metoxi-micolats amb insaturacions en *cis*.

Entre els ceto-micolats del *M. gordonae* només es varen detectar del tipus I, majoritàriament amb un anell ciclopropà en *trans*. Aquests tipus de compostos s'assemblarien als que posseeixen espècies com el *M. kansasii* i el *M. avium* i es diferenciarien dels que trobem a espècies com el *M. tuberculosis* complex, on la relació *cis/trans* es trobaria més

equilibrada (Watanabe, 2001).

D'acord amb els nostres resultats, les soques del *M. gordonae* estudiades tindrien un alt percentatge de ciclopropans en *trans* però, com passa a d'altres micobacteris (Watanabe, 2001; Barry, 1998; Minnikin, 1982), el *M. gordonae* mantindria la configuració en *cis* als ciclopropans dels α -micolats. El fet que en l'àcid micòlic α , el més abundant de tots, hi hagués únicament estructures en *cis* i no en *trans* ha estat relacionat amb una major susceptibilitat d'alguns micobacteris a determinats inhibidors lipofílics (Brennan, 1995), malgrat que ara com ara no s'ha pogut demostrar, d'una manera clara i general, que la proporció entre les configuracions *cis/trans*, tant de ciclopropans com d'insaturacions, pugui tenir en la paret cel·lular una significació fisiològica (Barry, 1998). Malgrat això, en molts micobacteris de creixement lent, entre ells moltes espècies patògenes, i també en cultius envellits de creixedors ràpids les insaturacions són substituïdes per ciclopropans (Asselineau, 2002). La substitució d'una estructura (la insaturació) per una altra (el ciclopropà) podria estar relacionada amb la protecció del micobacteri *versus* l'ambient on viu (Asselineau, 2002). Les coses però, no són tan òbvies quan es fa la pregunta sobre la utilitat de la introducció d'un metil adjacent a una insaturació en *cis* per transformar-la en *trans*. Malgrat la manca, en general, de proves concloents, alguns treballs han demostrat que l'existència de ciclopropans en els àcids micòlics del *M. tuberculosis* contribuirien a la integritat estructural de la cèl·lula i a la protecció envers l'estrès oxidatiu (Banerjee, 2011; Dubnau, 2000; Glickman, 2000). Encara que un factor més determinant que la relació *cis/trans* en un determinat àcid micòlic seria la relació quantitativa entre els àcids micòlics oxigenats del *M. tuberculosis*, on la relació entre els ceto-micolats i els metoxi-micolats afectaria a paràmetres tan importants com la sensibilitat a certs antibiòtics, el creixement a baixes temperatures i també la supervivència del bacil tuberculós a l'interior del macròfag (Yuan, 1998).

El nou patró d'àcids micòlics que s'ha descrit en aquest estudi per al *M.*

gordonae no és un patró gaire corrent a la natura ja que només s'ha vist en dues espècies més de micobacteris; el *Mycobacterium komossense* (Minnikin, 1985b) i el *Mycobacterium bohemicum* (Torkko, 2001), malgrat aquest fet, és important tenir en compte la variabilitat del patró d'àcids micòlics del *M. gordonae*, ja que pot portar a una identificació errònia del micobacteri si la llibreria de patrons amb la que es treballa l'HPLC no es troba degudament actualitzada, fenomen que ja ha estat descrit (Butler, 2001).

Podem concloure que la variabilitat en el patró d'àcids micòlics del *M. gordonae* detectada tant per CCF com per HPLC és deguda a la presència del wax-èster-micolat en algunes soques d'aquesta espècie. Aquesta troballa ve a reforçar l'heterogeneïtat del *M. gordonae* que d'altres autors ja havien descrit amb tècniques molt diferents (Telenti, 1993; Plikaytis, 1992; Kirschner, 1992; Walton, 1991).

En el nostre treball amb el *M. brumae* la primera pregunta que ens feiem era el per què de la diferència detectada amb els cromatogrames d'HPLC de la soca tipus del *M. brumae* entre el nostre treball i el treball de Butler (2001), on el compost problema ni tan sols s'endevina en el cromatograma (figura 14). Només és una hipòtesi, però una de les possibles causes seria diferències en el protocol de creixement de la mostra, ja que les soques analitzades en el treball de Butler (2001) havien crescut en medi de Löwenstein-Jensen, sense especificar ni la temperatura de creixement ni la seva durada (probablement a 30°C durant una setmana) i les nostres en medi de Sauton durant tres setmanes a 37°C. De fet hi han treballs a la literatura que podrien avalar aquesta hipòtesi, on es descriuen com els canvis en la temperatura de creixement o la presència de cultius envellits afectarien el perfil dels àcids micòlics existents (Alibaud, 2010; Asselineau, 2002; Kremer, 2002b). Malgrat que la família d'àcids grassos insaturats de cadena llarga descrits en aquest treball al *M. brumae* no són àcids micòlics, sí que tenen una estructura comuna que comparteixen, en concret una part

de la fracció meromicòlic i és possible que amb la variació dels paràmetres de creixement (temps d'incubació, temperatura i medi de cultiu) aquests compostos s'acumulessin fins a fer-se detectables. Per tal de sortir de dubtes s'hauria d'haver dissenyat un experiment cultivant les soques del *M. brumae* sota diferents condicions dels paràmetres de creixement.

La presència d'àcids grassos de cadena llarga relacionats estructuralment amb àcids micòlics és un fet que ja fa temps va ser descrit (Sathyamoorthy, 1985; Qureshi, 1984; Qureshi, 1980; Takayama, 1978; Promé, 1966) i on es van trobar dos rangs diferents en quant a la llargada d'aquests compostos. Un primer grup de compostos amb longituds de cadena entre aproximadament C₄₀ fins a C₄₇, contenint ciclopropans, insaturacions o funcions oxigenades i pels quals es va proposar el nom d'àcids micobactèrics (Promé, 1966). Un segon rang de compostos amb una major longitud de cadena, des de C₅₀ fins a C₅₆, amb una estructura propera a la de la fracció meromicòlic dels àcids micòlics i que va prendre el nom d'àcids meromicòlics (Qureshi, 1980). Aquesta mena d'àcids, micobactèrics i meromicòlics, s'han descrit en forma lliure i també formant part d'una molècula de glicerol, el que es coneix com a forma complexa, unit a una molècula de diacil-glicerol, esterificant la posició 3 del glicerol al *M. kansasii* (Kremer, 2005). Analitzant alguns dels estudis on es descriuen els àcids micobactèrics/meromicòlics trobem variabilitat tant en la seva longitud com en la seva complexitat. És el cas d'una mescla d'àcids grassos monoinsaturats d'entre C₂₄ i C₃₂ i que, degut a la seva estructura, van ser descrits com un conjunt de compostos precursors dels àcids micòlics (Takayama, 1978). Al *M. tuberculosis* també s'han descrit àcids grassos de cadena llarga, d'entre C₃₀ a C₄₀ i amb dues insaturacions que es trobarien estructuralment relacionats amb els àcids micòlics (Promé, 1966). En un altre estudi es van descriure dues sèries de compostos estructuralment relacionats amb els àcids micòlics. Una primera sèrie de compostos homòlegs d'entre C₃₀ i C₄₀ que posseïen una estructura, la posició de

l'anell ciclopropà i la funció oxigenada, molt semblant a la part distal dels àcids micòlics i dels denominats àcids micobactèrics. La segona sèrie de compostos posseïa una longitud de cadena més llarga, d'entre C₄₃ i C₅₆ amb dos anells ciclopropà en *cis* i una estructura molt propera als àcids meromicòlics (Qureshi, 1980). També s'han descrit uns compostos semblants al *M. aurum*, amb el nom d'àcids dicarboxílics, d'entre C₂₅ fins a C₃₅ i mono-insaturats amb una estructura semblant a la del wax-èster micolat (Lanéelle, 1988).

En el nostre treball amb el *M. brumae* hem descrit i resolt estructuralment una família de compostos homòlegs formada per àcids grassos insaturats amb longituds de cadena que van des de C₃₇ fins a C₅₁ i que per la seva estructura es trobaven relacionats amb els àcids micobactèrics. Aquesta família de compostos que hem descrit comparteixen els mateixos motius estructurals, nombre i posició de les insaturacions, que els àcids micòlics descrits per aquesta espècie (Luquin, 1993), com ho demostra el fet que el component majoritari d'aquesta família d'àcids grassos insaturats de cadena llarga contingui en la seva estructura dos dobles enllaços en *trans* en la mateixa posició com es troben en un dels tres subtipus de l'àcid micòlic α del *M. brumae* (Luquin, 1993).

Aquesta família d'àcids grassos insaturats, micobactèrics i meromicòlics, s'han descrit en una àmplia sèrie de micobacteris, creixedors ràpids i lents, com *M. brumae*, *M. aurum*, *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG o *M. thermoresistibile* (Rafidinarivo, 2009; Kremer, 2005; Lanéelle, 1988). És clar que amb aquesta distribució, lluny de ser aïllada, ens hem de formular la pregunta biològica sobre el seu paper. En el cas de les formes complexes, s'ha proposat que el seu rol podria ser d'emmagatzematge, un paper que *in vivo*, seria avantatjós pel micobacteri permetent-li de sobreviure en un estat no-replicatiu (Kremer, 2005). Aquesta hipòtesi s'ha vist reforçada per un estudi anterior on es troba evidència d'una regulació positiva de les diacil-glicerol transferases, enzims involucrats en la biosíntesi dels TAG, en un

cultiu en fase estacionària del *M. tuberculosis*, on es va provar que els TAG s'acumulaven en cultius en fase dorment (Daniel, 2004). També s'ha demostrat que el *M. kansasii* acumula TAG i MMDAG (monomerimicoloil diacil-glicerol) durant la fase exponencial tardana del cultiu, suggerint que ambdues molècules podrien tenir un rol com a font de meromicòlics per a la biosíntesi d'àcids micòlics (Kremer, 2005). Malgrat aquestes evidències, la pregunta biològica sobre el paper tant d'àcids micobactèrics com d'àcids meromicòlics, ja sigui en forma lliure o units al glicerol, roman encara sense resoldre's d'una manera clara. El paper de font de meromicolats per la biosíntesi d'àcids micòlics és atractiu però no coincideix amb el resultat dels estudis sobre rutes biosintètiques dels àcids micòlics en cap de les dues hipòtesis amb les que es treballa, elongació i condensació, (Banerjee, 2011; Takayama, 2005; Asselineau, 2002). Tenint en compte els estudis sobre la hipòtesi majoritària, la d'elongació, es proposaria un procés de síntesi del meromicolat a partir de l'elongació de palmitoil-CoA amb unitats de dos carbonis provinents de malonil-ACP per donar un acil-ACP que serà allargat mitjançant dos enzims, KasA i KasB, que formen part del complex FAS II (Takayama, 2005; Kremer, 2002a; Slayden, 2002). Ara bé, els àcids micobactèrics/meromicòlics dels TAG descrits fins ara contenen cadenes tant amb nombres parells com senars, el que es contradiria amb els estudis biosintètics ja que aquests estudis es sostenen en un sistema amb incorporació d'unitats d'acetat com a elongació, el que produiria compostos amb nombres parells de carbonis únicament (ja que partim d'un precursor amb nombre parell). A aquest argument cal sumar-li el fet que, tant en el cas dels àcids micobactèrics com en el dels àcids meromicòlics, la longitud de la cadena hidrocarbonada era menor que la longitud de la fracció meromicòlic dels àcids micòlics, C₅₁ en vers C₅₄-C₅₆. També és important ressaltar que en tots els casos on s'han descrit aquests compostos han estat en forma de sèries homòlogues tant amb nombre de carbonis parells com senars, en contraposició amb la longitud dels àcids micòlics de les espècies

descrites, que en termes generals tenien un nombre parell de carbonis. Com a conseqüència d'aquesta manca d'emmotllament a la via anabòlica s'ha buscat una relació amb la via catabòlica dels àcids micòlics, de la qual el nostre coneixement encara és menor que el de les vies anabòliques. L'estudi de Rafidinarivo (2009), del qual aquesta tesi en comparteix una part, proposa una relació dels àcids micobactèrics/meromicòlics amb les vies catabòliques. En concret, començant per un procés degradatiu que tindria l'origen en l'escissió de la unitat de l'àcid micòlic entre els carbonis 2 i 3, mitjançant un procés anàleg a una oxidació del tipus Baeyer-Villiger que donaria pas a la formació d'una cera, un wax-èster, que a la vegada seria hidrolitzat per un estearasa o per saponificació donant com a resultat la formació d'alcohols de cadena llarga i d'alquilmalonat (Rafidinarivo, 2009). La caracterització d'un C₂₂ alquilmalonat en el perfil d'èsters d'àcids grassos al *M. brumae* és un punt a favor d'aquesta hipòtesi ja que s'emmotllaria a l'existència de compostos amb nombres imparells de carbonis després de successives β -oxidacions. Aquest procés és coneix força bé per a la degradació de llargues cadenes hidrocarbonades i també s'han descrit aquest tipus d'enzims al gènere *Mycobacterium*. En els darrers anys s'han descrit set gens que posseïrien motius de les Baeyer-Villiger monooxigenases al *M. tuberculosis* (Fraaije, 2002) i un mecanisme molt semblant s'havia descrit anteriorment per a la síntesi del wax-èster micolat (Etémadi, 1965). Aquests tipus d'enzims no s'han trobat fins ara en plantes ni animals, inclosos els humans i per aquesta raó són interessants des d'un punt de vista de recerca de dianes terapèutiques. Sigui quina sigui la seva relació amb vies catabòliques o anabòliques, compostos com els àcids micobactèrics que hem descrit en el nostre treball no fan més que confirmar l'extensa varietat de compostos lipídics que es troben en el gènere *Mycobacterium*.

Conclusions

Conclusions

1. En el present estudi, hem demostrat que el wax-èster micolat era el responsable del segon grup de pics observat en algunes soques del *M. gordonae* (soques amb *double cluster pattern*).
2. En contraposició amb els dicarboximicolats del *M. phlei*, caracteritzats com a mescles homòlogues amb insaturacions i ciclopropans, en el *M. gordonae* únicament s'han detectat dicarboximicolats amb anells ciclopropà.
3. Els postulats que sostindrien que a partir dels ceto-micolats s'originarien els wax-èster es veurien reforçats amb els resultats d'aquest treball ja que ambdós comparteixen una longitud similar (entre C₈₁ i C₈₅), i també la presència únicament d'anells ciclopropà en *trans*.
4. Els α -micolats del tipus 3, (amb un ciclopropà i una insaturació, ambdós en *cis*), trobats a les espècies *M. tuberculosis* complex i *M. avium* s'han detectat en aquest estudi únicament a les soques del *M. gordonae* productores del wax-èster micolat.

5. Podem afirmar que el pic que es va detectar per HPLC en les tres soques estudiades del *M. brumae* és degut a la presència d'una família d'àcids grassos insaturats amb longituds de cadena que oscil·larien entre els 35 i els 51 carbonis.
6. El component majoritari d'aquesta família és un àcid gras de 39 carbonis i dues insaturacions en *trans* en les posicions 5 i 19. El seu nom és àcid 4,21-dimetil-5,19-di-(*trans*)-enoil-heptatriacontanoïc.
7. Aquesta família d'àcids grassos insaturats tenen una estructura que els relacionaria amb els àcids micobactèrics i comparteixen els mateixos motius estructurals, nombre i posició de les insaturacions, que els àcids micòlics descrits anteriorment per aquesta espècie.

Bibliografia

Bibliografia

Adam A, Petit JF, Wietzerbin-Falszpan J, Sinay P, Thomas DW, Lederer E (1969) *FEBS Lett* **4**: 87-92

Alderwick LJ, Radmacher E, Seidel M, Gande R, Hitchen PG, Morris HR, Dell A, Sahn H, Eggeling L, Besra GS (2005) Deletion of Cg-emb in corynebacteriaceae leads to a novel truncated cell wall arabinogalactan, whereas inactivation of Cg-ubiA results in an arabinan-deficient mutant with a cell wall galactan core. *J Biol Chem* **280**: 32362-32371

Alibaud L, Alahari A, Trivelli X, Ojha AK, Hatfull GF, Guerardel Y, Kremer L (2010) Temperature-dependent regulation of mycolic acid cyclopropanation saprophytic mycobacteria: role of the *Mycobacterium smegmatis* 1351 gene (MSMEG_1351) in cis-cyclopropanation of α -mycolates. *J Biol Chem* **285**: 21698-21707

Alshamaony L, Goodfellow M, Minnikin DE, Mordarska H (1976) Free mycolic acids as criteria in the classification of Gordona and the 'rhodochrous' complex. *J Gen Microbiol* **92**: 183-187

Amorim A, Macedo R, Lopes A, Rodrigues I, Pereira E (2010) Non-tuberculous mycobacteria in HIV-negative patients with pulmonary disease in Lisbon, Portugal. *Scand J Infect Dis* **42**: 626-628

Andersson BA, Holman RT. (1974) Pyrrolidides for mass spectrometric determination of the position of the double bond in monounsaturated fatty acids *Lipids* **9**: 185–190.

Andersson BA, Holman RT. (1975) Mass spectrometric localization of methyl branching in fatty acids using acylpyrrolidines *Lipids* **10**: 716-718

Asselineau C, Asselineau J, Lanéelle G, Lanéelle MA (2002) The biosynthesis of mycolic acids by Mycobacteria: current and alternative hypotheses. *Prog Lipid Res* **41**: 501-523

Asselineau C, Daff  M, David HL, Lanéelle MA, Rastogi N (1984) Lipids as taxonomic markers for bacteria derived from leprosy infections. *Acta Leprol* **2**: 121-127

Asselineau C, Montrozier H, Prom  JC (1969) [Presence of polyunsaturated acids in bacteria: isolation of hexatriacontapentaene-4,8,12,16,20-oic acid and acid analogs from *Mycobacterium phlei* lipids]. *Eur J Biochem* **10**: 580-584

- Asselineau CP, Montrozier HL, Promé JC, Savagnac AM, Welby M (1972) [Polyunsaturated glycolipids synthesized by *Mycobacterium phlei*]. *Eur J Biochem* **28**: 102-109
- Asselineau J, Lanéelle G (1998) Mycobacterial lipids: a historical perspective. *Front Biosci* **3**: e164-174
- Asensio JG, Maia C, Ferrer, NL, Barilone, N, Laval, F, Soto, CY, Winter, N, Daffé, M, Gicquel, B, Martín, C, Jackson, M (2006) The virulence-associated two component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **281**:1313-1316.
- Assi MA, Berg JC, Marshall WF, Wengenack NL, Patel R (2007) *Mycobacterium gordonae* pulmonary disease associated with a continuous positive airway pressure device. *Transpl Infect Dis* **9**: 249-252
- Astarie-Dequeker C, Le Guyader L, Malaga W, Seaphanh FK, Chalut C, López A, Guilhot C (2009) Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog* Feb;**5**(2):e1000289
- Azad AK, Sirakova TD, Fernandes ND, Kolattukudy PE (1997) Gene knockout reveals a novel gene cluster for the synthesis of a class of cell wall lipids unique to pathogenic mycobacteria. *J Biol Chem* **272**: 16741-16745
- Azad AK, Sirakova TD, Rogers LM, Kolattukudy PE (1996) Targeted replacement of the mycocerosic acid synthase gene in *Mycobacterium bovis* BCG produces a mutant that lacks mycosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4787-4792
- Ballou CE, Vilkas E, Lederer E (1963) Structural studies on the myo-inositol phospholipids of *Mycobacterium tuberculosis* (var. *bovis*, strain BCG). *J Biol Chem* **238**: 69-76
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR, Jr. (1994) *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263**: 227-230
- Banerjee R, Vats P, Dahale S, Kasibhatla SM, Joshi R (2011) Comparative Genomics of Cell Envelope Components in Mycobacteria. *PLoS One* **6**: e19280
- Barkan D, Liu Z, Sacchettini JC, Glickman MS (2009) Mycolic acid cyclopropanation is essential for viability, drug resistance and cell wall integrity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol* **16**(5): 499-509
- Barksdale L, Kim KS (1977) *Mycobacterium*. *Bacteriol Rev* **41**: 217-372
- Barrera L (2007) The basis of clinical bacteriology chapter 3 Tuberculosis In *From basic science to patient care* Palomino JC, Cardueso S, Ritacco V Eds

Barry CE 3rd (1997) New horizons in the treatment of tuberculosis
Biochem Pharmacol **54**:1165-72

Barry CE 3rd, Lee RE, Mdluli K, Sampson AE, Schroeder BG, Slayden RA, Yuan Y (1998) Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res* **37**:143-79.

Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikusová K, Belisle JT, Brennan PJ, Inamine JM (1996) The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11919-11924

Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS (1997) Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**: 1420-1422

Berg S, Starbuck J, Torrelles JB, Vissa VD, Crick DC, Chatterjee D, Brennan PJ (2005) Roles of conserved proline and glycosyltransferase motifs of EmbC in biosynthesis of lipoarabinomannan. *J Biol Chem* **280**: 5651-5663

Bernard E, Michiels JF, Pinier Y, Bourdet JF, Dellamonica P (1992) Disseminated infection as a result of *Mycobacterium gordonae* in an AIDS patient. *AIDS* **6**: 1217-1218

Besra GS, Khoo KH, Belisle JT, McNeil MR, Morris HR, Dell A, Brennan PJ (1994) New pyruvylated, glycosylated acyltrehaloses from *Mycobacterium smegmatis* strains, and their implications for phage resistance in mycobacteria. *Carbohydr Res* **251**: 99-114

Besra GS, McNeil MR, Khoo KH, Dell A, Morris HR, Brennan PJ (1993a) Trehalose-containing lipooligosaccharides of *Mycobacterium gordonae*: presence of a mono-O-methyltetra-O-acyltrehalose "core" and branching in the oligosaccharide backbone. *Biochemistry* **32**: 12705-12714

Besra GS, McNeil MR, Rivoire B, Khoo KH, Morris HR, Dell A, Brennan PJ (1993b) Further structural definition of a new family of glycopeptidolipids from *Mycobacterium xenopi*. *Biochemistry* **32**: 347-355

Besra GS, Morehouse CB, Rittner CM, Waechter CJ, Brennan PJ (1997) Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan. *J Biol Chem* **272**: 18460-18466

Beveridge TJ (2002) The expanding interdisciplinary nature of environmental microbiology *Environ Microbiol* **4**: 3-4.

- Bhamidi S, Scherman MS, Rithner CD, Prenni JE, Chatterjee D, Khoo K-H, McNeil MR (2008) The identification and location of succinyl residues and the characterization of the interior arabinan region allows for a model of the complete primary structure of Mycobacterium tuberculosis mycolyl arabinogalactan. *J Biol Chem* **283**:12992–13000
- Bleck CK, Merz A, Gutierrez MG, Walther P, Dubochet J, Zuber B, Griffiths G (2010) Comparison of different methods for thin section EM analysis of Mycobacterium smegmatis. *J Microsc* **237**: 23-38
- Bloch H (1950) Studies on the virulence of tubercle bacilli; isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. *J Exp Med* **91**: 197-218
- Bloch K (1977) Control mechanisms for fatty acid synthesis in Mycobacterium smegmatis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **45**: 1-84
- Bojalil LF, Cerbon J, Trujillo A (1962) Adansonian classification of mycobacteria. *J Gen Microbiol* **28**: 333-346
- Brener ZZ, Zhuravenko I, Bergman M (2009) Acute kidney injury in a patient with nontuberculous mycobacterial infections: a case report. *Cases J* **2**: 83
- Brennan PJ (1988) Mycobacteria and other actinomycetes In *Microbial Lipids* vol 1
- Brennan P, Ballou CE (1967) Biosynthesis of mannophosphoinositides by Mycobacterium phlei. The family of dimannophosphoinositides. *J Biol Chem* **242**: 3046-3056
- Brennan PJ, Aspinall GO, Shin JE (1981) Structure of the specific oligosaccharides from the glycopeptidolipid antigens of serovars in the Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum complex. *J Biol Chem* **256**: 6817-6822
- Brennan PJ, Goren MB (1979) Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the mycobacterium avium. Mycobacterium intracellulare. Mycobacterium scrofulaceum serocomplex. Mycobacterium intracellulare serotype 9. *J Biol Chem* **254**: 4205-4211
- Brennan PJ, Goren MB (1977) Mycobacterial glycolipids as bacterial antigens. *Biochem Soc Trans* **5**: 1687-1693
- Brennan PJ, Nikaido H (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* **64**: 29-63
- Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L (2004) Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol* **53**: 391-403

Butler WR, Floyd MM, Silcox V, Cage G, Desmond E, Duffey PS, Guthertz LS, Gross WM, Jost KC Jr, Ramos LS, Thibert L, Warren N. (1999) Mycolic acid pattern standards for HPLC identification of mycobacteria. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.

Butler WR, Guthertz LS (2001) Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of Mycobacterium species. *Clin Microbiol Rev* **14**: 704-726, table of contents

Butler WR, Jost KC, Jr., Kilburn JO (1991) Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* **29**: 2468-2472

Butler WR, Kilburn JO (1988) Identification of major slowly growing pathogenic mycobacteria and Mycobacterium gordonae by high-performance liquid chromatography of their mycolic acids. *J Clin Microbiol* **26**: 50-53

Cage GD (1992) High-performance liquid chromatography patterns of Mycobacterium gordonae mycolic acids. *J Clin Microbiol* **30**: 2402-2407

Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Lanéelle MA, Triccas JA, Gicquel B, Daff  M, Guilhot C (2001) Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of Mycobacterium tuberculosis. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J Biol Chem* **276**: 19845-19854

Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Lanéelle MA, Triccas JA, Gicquel B, Daff  M, Guilhot C (2001) Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of Mycobacterium tuberculosis. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J Biol Chem* **276**: 19845-19854

Camacho LR, Ensergueix D, Pérez E, Gicquel B, Guilhot C (1999) Identification of a virulence gene cluster of Mycobacterium tuberculosis by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* **34**: 257-267

Chaicumpar K, Fujiwara N, Nishimura O, Hotta H, Pan JW, Takahashi M, Abe C, Yano I (1997) Studies of polymorphic DNA fingerprinting and lipid pattern of Mycobacterium tuberculosis patient isolates in Japan. *Microbiol Immunol* **41**: 107-119

Chapman GB, Hanks JH, Wallace JH (1959) An electron microscope study of the disposition and fine structure of Mycobacterium lepraemurium in mouse spleen. *J Bacteriol* **77**: 205-211

Chatterjee D, Khoo KH (1998) Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology* **8**: 113-120

Chatterjee D, Khoo KH, McNeil MR, Dell A, Morris HR, Brennan PJ (1993) Structural definition of the non-reducing termini of mannose-capped LAM from Mycobacterium tuberculosis through selective enzymatic degradation and fast atom bombardment-mass spectrometry. *Glycobiology* **3**: 497-506

- Chatterjee D, Lowell K, Rivoire B, McNeil MR, Brennan PJ (1992) Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. *J Biol Chem* **267**: 6234-6239
- Chauhan A, Madiraju MV, Fol M, Lofton H, Maloney E, Reynolds R, Rajagopalan M (2006) *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. *J Bacteriol* **188**: 1856-1865
- Chen JM, German GJ, Alexander DC, Ren H, Tan T, Liu J (2006) Roles of Lsr2 in colony morphology and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **188**: 633-641
- Cho SN, Shin JS, Daffé M, Chong Y, Kim SK, Kim JD (1992) Production of monoclonal antibody to a phenolic glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis* and its use in detection of the antigen in clinical isolates. *J Clin Microbiol* **30**: 3065-3069
- Clague H, Hopkins CA, Roberts C, Jenkins PA (1985) Pulmonary infection with *Mycobacterium gordonae* in the presence of bronchial carcinoma. *Tubercle* **66**: 61-63
- Constant P, Pérez E, Malaga W, Lanéelle MA, Saurel O, Daffé M, Guilhot C (2002) Role of the pks15/1 gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the pks15/1 gene. *J Biol Chem* **277**: 38148-38158
- Converse SE, Mougous JD, Leavell MD, Leary JA, Bertozzi CR, Cox JS (2003) MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6121-6126
- Cox JS, Chen B, McNeil M, Jacobs WR, Jr. (1999) Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* **402**: 79-83
- Crick DC, Schulbach MC, Zink EE, Macchia M, Barontini S, Besra GS, Brennan PJ. (2000) Polyprenylphosphate biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **182**:5771–5778
- Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ (2001) Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* **11**: 107R-118R
- Cywes C, Hoppe HC, Daffé M, Ehlers MR (1997) Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect Immun* **65**:4258-66
- Daffé M, Brennan PJ, McNeil M (1990) Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by ¹H and ¹³C NMR analyses. *J Biol Chem* **265**: 6734-6743

- Daffé M, Draper P (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **39**: 131-203
- Daffé M, Lacave C, Lanéelle MA, Gillois M, Lanéelle G (1988a) Polyphthienoyl trehalose, glycolipids specific for virulent strains of the tubercle bacillus. *Eur J Biochem* **172**: 579-584
- Daffé M, Lanéelle MA (1988b) Distribution of phthiocerol diester, phenolic mycosides and related compounds in mycobacteria. *J Gen Microbiol* **134**: 2049-2055
- Daffé M, Lanéelle MA, Asselineau C, Levy-Frebault V, David H (1983a) [Taxonomic value of mycobacterial fatty acids: proposal for a method of analysis]. *Ann Microbiol (Paris)* **134B**: 241-256
- Daffé M, Lanéelle MA, Lacave C (1991) Structure and stereochemistry of mycolic acids of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. *Res Microbiol* **142**: 397-403
- Daffé M, Lanéelle MA, Lacave C, Lanéelle G (1988c) Monoglycosyldiacylphenolphthiocerol of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Biochim Biophys Acta* **958**: 443-449
- Daffé M, Lanéelle MA, Promé D, Asselineau C (1981) [Studies on the lipids of "*Mycobacterium gordonae*" in comparison with those of "*M. leprae*" and of some other scotochromogenic mycobacteria (author's transl)]. *Ann Microbiol (Paris)* **132B**: 3-12
- Daffé M, Lanéelle MA, Puzo G (1983b) Structural elucidation by field desorption and electron-impact mass spectrometry of the C-mycosides isolated from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochim Biophys Acta* **751**: 439-443
- Daffé M, Papa F, Laszlo A, David HL (1989) Glycolipids of recent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: chemical characterization and immunoreactivity. *J Gen Microbiol* **135**: 2759-2766
- Daniel J, Deb C, Dubey VS, Sirakova TD, Abomoelak B, Morbidoni HR, Kolattukudy PE (2004) Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. *J Bacteriol* **186**: 5017-5030
- Dao DN, Kremer L, Guérardel Y, Molano A, Jacobs WR, Jr., Porcellì SA, Briken V (2004) *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun* **72**: 2067-2074
- Davidson LA, Draper P, Minnikin DE (1982) Studies on the mycolic acids from the walls of *Mycobacterium microti*. *J Gen Microbiol* **128**: 823-828

- Denner JC, Tsang AY, Chatterjee D, Brennan PJ (1992) Comprehensive approach to identification of serovars of *Mycobacterium avium* complex. *J Clin Microbiol* **30**: 473-478
- Dmitriev BA, Ehlers S, Rietschel ET (1999) Layered murein revisited: a fundamentally new concept of bacterial cell wall structure, biogenesis and function. *Med Microbiol Immunol* **187**: 173-181
- Dmitriev BA, Ehlers S, Rietschel ET, Brennan PJ (2000) Molecular mechanics of the mycobacterial cell wall: from horizontal layers to vertical scaffolds. *Int J Med Microbiol* **290**: 251-258
- Dobson G, Minnikin, DE, Minnikin SM, Parlett JP, Goodfellow M, Ridell M, Magnusson M (1985) *Chemical methods in bacterial Systematics* (Goodfellow M, Minnikin, DE Eds) Academic Press London. 237-265.
- Dodiuk-Gad R, Dyachenko P, Ziv M, Shani-Adir A, Oren Y, Mendelovici S, Shafer J, Chazan B, Raz R, Keness Y, Rozenman D (2007) Nontuberculous mycobacterial infections of the skin: A retrospective study of 25 cases. *J Am Acad Dermatol* **57**: 413-420
- Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167-193
- Draper P (1971) The walls of *Mycobacterium lepraemurium*: chemistry and ultrastructure. *J Gen Microbiol* **69**: 313-324
- Draper P, Dobson G, Minnikin DE, Minnikin SM (1982) The mycolic acids of *Mycobacterium leprae* harvested from experimentally infected nine-banded armadillos. *Ann Microbiol (Paris)* **133**: 39-47
- Dubnau E, Chan J, Raynaud C, Mohan VP, Lanéelle MA, Yu K, Quemard A, Smith I, Daffé M (2000) Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol Microbiol* **36**: 630-637
- Durst HD, Milano M, Kikta EJ, Jr., Connelly SA, Grushka E (1975) Phenacyl esters of fatty acids via crown ether catalysts for enhanced ultraviolet detection in liquid chromatography. *Anal Chem* **47**: 1797-1801
- Engelhardt H, Heinz C, Niederweis M (2002) A tetrameric porin limits the cell wall permeability of *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* **277**: 37567-37572
- Escamilla L, Mancilla R, Glender W, López-marín LM (1996) *Mycobacterium fortuitum* glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **154**: 1864-1867
- Etémadi AH (1967) [Mycolic acids. Structure, biogenesis and phylogenetic value]. *Expos Annu Biochim Med* **28**: 77-109

- Etémadi AH, Gasche J (1965) [On the biogenetic origin of 2-eicosanol and 2-octadecanol of *Mycobacterium avium*]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* **47**: 2095-2104
- Falkinham JO, 3rd (1996) Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **9**: 177-215
- Falkinham JO, 3rd (2002) Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med* **23**: 529-551
- Faller M, Niederweis M, Schulz GE (2004) The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science* **303**: 1189-1192
- Fernandes ND, Kolattukudy PE (1996) Cloning, sequencing and characterization of a fatty acid synthase-encoding gene from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. *Gene* **170**: 95-99
- Foti C, Sforza V, Rizzo C, De Pascale G, Bonamonte D, Conserva A, Tarantino A, Stella C, Cantore S, Grassi RF, Ballini A, De Vito D, Angelini G (2009) Cutaneous manifestations of *Mycobacterium gordonae* infection described for the first time in Italy: a case report. *Cases J* **2**: 6828
- Fraaije MW, Kamerbeek NM, van Berkel WJ, Janssen DB (2002) Identification of a Baeyer-Villiger monooxygenase sequence motif. *FEBS Lett* **518**: 43-47
- Frehel C, Ryter A, Rastogi N, David H (1986) The electron-transparent zone in phagocytized *Mycobacterium avium* and other mycobacteria: formation, persistence and role in bacterial survival. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **137B**: 239-257
- Fujita J, Nanki N, Negayama K, Tsutsui S, Taminato T, Ishida T (2002) Nosocomial contamination by *Mycobacterium gordonae* in hospital water supply and super-oxidized water. *J Hosp Infect* **51**: 65-68
- Galassi L, Donato R, Tortoli E, Burrini D, Santianni D, Dei R (2003) Nontuberculous mycobacteria in hospital water systems: application of HPLC for identification of environmental mycobacteria. *J Water Health* **1**: 133-139
- Gao LY, Laval F, Lawson EH, Groger RK, Woodruff A, Morisaki JH, Cox JS, Daffé M, Brown EJ (2003) Requirement for *kasB* in *Mycobacterium mycolic acid* biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol Microbiol* **49**: 1547-1563
- Garza-González E, Guerrero-Olazarán M, Tijerina-Menchaca R, Viader-Salvadó JM (1998) Identification of mycobacteria by mycolic acid pattern. *Arch Med Res* **29**: 303-306

Gautier N, López Marín LM, Lanéelle MA, Daffé M (1992) Structure of mycoside F, a family of trehalose-containing glycolipids of *Mycobacterium fortuitum*. *FEMS Microbiol Lett* **77**: 81-87

Gilleron M, Quesniaux VF, Puzo G (2003) Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its implication in Toll-like receptor response. *J Biol Chem* **278**: 29880-29889

Gilleron M, Vercauteren J, Puzo G (1994) Lipo-oligosaccharidic antigen from *Mycobacterium gastri*. Complete structure of a novel C4-branched 3,6-dideoxy-alpha-xylo-hexopyranose. *Biochemistry* **33**: 1930-1937

Glickman MS, Cox JS, Jacobs WR, Jr. (2000) A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell* **5**: 717-727

Glickman SE, Kilburn JO, Butler WR, Ramos LS (1994) Rapid identification of mycolic acid patterns of mycobacteria by high-performance liquid chromatography using pattern recognition software and a *Mycobacterium* library. *J Clin Microbiol* **32**: 740-745

Goren MB (1984) In *The Mycobacteria: A Sourcebook, Part A.*, Kubica GP, Wayne LG Eds. Marcell Dekker, Inc., New York and Basel, 379–415.

Goren MB, Brokl O, Das BC (1976a) Sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*: the structure of the principal sulfatide (SL-I). *Biochemistry* **15**: 2728-2735

Goren MB, D'Arcy Hart P, Young MR, Armstrong JA (1976b) Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 2510-2514

Goren MB, Mor N (1990) Influence of phagosomal contents on the apparent inhibition of phagosome-lysosome fusion mediated by polyanionic substances in mouse peritoneal macrophages. *Biochem Cell Biol* **68**: 24-32

Goren MB, Vatter AE, Fiscus J (1987) Polyanionic agents do not inhibit phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages. *J Leukoc Biol* **41**: 122-129

Grange JM (1996) The biology of the genus *Mycobacterium*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **25**: 1S-9S

Guérardel Y, Maes E, Briken V, Chirat F, Leroy Y, Locht C, Strecker G, Kremer L (2003) Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of *Mycobacterium kansasii*: novel structural features and apoptosis-inducing properties. *J Biol Chem* **278**: 36637-36651

- Guérardel Y, Maes E, Ellass E, Leroy Y, Timmerman P, Besra GS, Locht C, Strecker G, Kremer L (2002) Structural study of lipomannan and lipoarabinomannan from *Mycobacterium chelonae*. Presence of unusual components with alpha 1,3-mannopyranose side chains. *J Biol Chem* **277**: 30635-30648
- Guthertz LS, Lim SD, Jang Y, Duffey PS (1993) Curvilinear-gradient high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* **31**: 1876-1881
- Hall-Stoodley L, Brun OS, Polshyna G, Barker LP (2006) *Mycobacterium marinum* biofilm formation reveals cording morphology. *FEMS Microbiol Lett* **257**: 43-49
- Hanks JH (1961) Capsules in electron micrographs of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr* **29**: 84-87
- Hartmans S, De Bont JAM, Stackebrandt E (2006) The Genus *Mycobacterium*-non-Medical. *Prokaryotes* **3**:889-918.
- Hill DL, Ballou CE (1966) Biosynthesis of mannophospholipids by *Mycobacterium phlei*. *J Biol Chem* **241**: 895-902
- Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JM, Engelhardt H (2008) Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3963-3967
- Hong X, Hopfinger AJ (2004) Construction, molecular modeling, and simulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell walls. *Biomacromolecules* **5**: 1052-1065
- Huet G, Constant P, Malaga W, Lanéelle MA, Kremer K, van Soolingen D, Daffé M, Guilhot C (2009) A Lipid Profile Typifies the Beijing Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **284**: 27101–27113
- Hunter SW, Barr VL, McNeil M, Jardine I, Brennan PJ (1988) Trehalose-containing lipooligosaccharide antigens of *Mycobacterium* sp.: presence of a mono-O-methyltri-O-acetyl-trehalose "core". *Biochemistry* **27**: 1549-1556
- Hunter SW, Brennan PJ (1990) Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **265**: 9272-9279
- Hunter SW, Brennan PJ (1981) A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol* **147**: 728-735
- Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ (1982) Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem* **257**: 15072-15078

- Hunter SW, Fujiwara T, Murphy RC, Brennan PJ (1984) N-acylkansosamine. A novel N-acylamino sugar from the trehalose-containing lipooligosaccharide antigens of *Mycobacterium kansasii*. *J Biol Chem* **259**: 9729-9734
- Hunter SW, Gaylord H, Brennan PJ (1986) Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *J Biol Chem* **261**: 12345-12351
- Jarlier V, Nikaido H (1990) Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J Bacteriol* **172**: 1418-1423
- Jiménez MS, Julià E, Luquin M (2011) Misdiagnosis of *Mycobacterium brumae* infection. *J Clin Microbiol* **49**: 1190-1191; author reply 1191-1192
- Julià E, Matas L, Alcaide J, Luquin M (2004) Comparison of antibody responses to a potential combination of specific glycolipids and proteins for test sensitivity improvement in tuberculosis serodiagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**: 70-76
- Julià E, Matas L, Pérez A, Alcaide J, Lanéelle MA, Luquin M (2002) Serodiagnosis of tuberculosis: comparison of immunoglobulin A (IgA) response to sulfolipid I with IgG and IgM responses to 2,3-diacyltrehalose, 2,3,6-triacyltrehalose, and cord factor antigens. *J Clin Microbiol* **40**: 3782-3788
- Kato M (1970) Site II-specific inhibition of mitochondria oxidative phosphorylation by trehalose-6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Biochem Biophys* **140**: 379-390
- Katsube T, Matsumoto S, Takatsuka M, Okuyama M, Ozeki Y, Naito M, Nishiuchi Y, Fujiwara N, Yoshimura M, Tsuboi T, Torii M, Oshitani N, Arakawa T, Kobayashi K (2007) Control of Cell Wall Assembly by a Histone-Like Protein in *Mycobacteria*. *J Bacteriol* **189**: 8241–8249
- Khasnobis S, Zhang J, Angala SK, Amin AG, McNeil MR, Crick DC, Chatterjee D (2006) Characterization of a specific arabinosyltransferase activity involved in mycobacterial arabinan biosynthesis. *Chem Biol* **13**: 787-795
- Khoo KH, Dell A, Morris HR, Brennan PJ, Chatterjee D (1995) Inositol phosphate capping of the nonreducing termini of lipoarabinomannan from rapidly growing strains of *Mycobacterium*. *J Biol Chem* **270**: 12380-12389
- Kikuchi S, Rainwater DL, Kolattukudy PE (1992) Purification and characterization of an unusually large fatty acid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. *Arch Biochem Biophys* **295**: 318-326
- Kirschner P, Bottger EC (1992) Microheterogeneity within rRNA of *Mycobacterium gordonae*. *J Clin Microbiol* **30**: 1049-1050

- Kolattukudy PE, Fernandes ND, Azad AK, Fitzmaurice AM, Sirakova TD (1997) Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Mol Microbiol* **24**: 263-270
- Kordulakovà J, Gilleron M, Mikusová K, Puzo G, Brennan PJ, Gicquel B, Jackson M (2002) Definition of the first mannosylation step in phosphatidylinositol mannoside synthesis. PimA is essential for growth of mycobacteria. *J Biol Chem* **277**: 31335-31344
- Kordulakovà J, Gilleron M, Puzo G, Brennan PJ, Gicquel B, Mikusová K, Jackson M (2003) Identification of the required acyltransferase step in the biosynthesis of the phosphatidylinositol mannosides of mycobacterium species. *J Biol Chem* **278**: 36285-36295
- Korf J, Stoltz A, Verschoor J, De Baetselier P, Grooten J (2005) The Mycobacterium tuberculosis cell wall component mycolic acid elicits pathogen-associated host innate immune responses. *Eur J Immunol* **35**: 890-900
- Kremer L, de Chastellier C, Dobson G, Gibson KJ, Bifani P, Balor S, Gorvel JP, Locht C, Minnikin DE, Besra GS (2005) Identification and structural characterization of an unusual mycobacterial monomeromycolyl-diacylglycerol. *Mol Microbiol* **57**: 1113-1126
- Kremer L, Dover LG, Carrere S, Nampoothiri KM, Lesjean S, Brown AK, Brennan PJ, Minnikin DE, Locht C, Besra GS (2002a) Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the beta-ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from Mycobacterium tuberculosis. *Biochem J* **364**: 423-430
- Kremer L, Guerardel Y, Gurcha S, Locht C, Besra GS (2002b) Temperature-induced changes in the cell wall components of Mycobacterium thermoresistibile. *Microbiology* **148**: 3145-3154
- Lacave C, Lanéelle MA, Daffé M, Montrozier H, Lanéelle G (1989) Mycolic acid metabolic filiation and location in Mycobacterium aurum and Mycobacterium phlei. *Eur J Biochem* **181**: 459-466
- Lalande V, Barbut F, Varnerot A, Febvre M, Nesa D, Wadel S, Vincent V, Petit JC (2001) Pseudo-outbreak of Mycobacterium gordonae associated with water from refrigerated fountains. *J Hosp Infect* **48**: 76-79
- Lanéelle G (1989) Mycolic acid metabolism. *Acta Leprol* **7 Suppl 1**: 65-73
- Lanéelle G, Asselineau J (1968) [Structure of a peptidolipid glycoside isolated from a Mycobacterium]. *Eur J Biochem* **5**: 487-491
- Lanéelle MA, Lacave C, Daffé M, Lanéelle G (1988) Mycolic acids of Mycobacterium aurum. Structure and biogenetic implications. *Eur J Biochem* **177**: 631-635

- Lanéelle MA, Lanéelle G (1970) [Structure of mycolic acids and an intermediate in the biosynthesis of dicarboxylic mycolic acids]. *Eur J Biochem* **12**: 296-300
- Laval F, Haites R, Movahedzadeh F, Lemassu A, Wong CY, Stoker N, Billman-Jacobe H, Daffé M (2008) Investigating the function of the putative mycolic acid methyltransferase UmaA: divergence between the *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *J Biol Chem* **283**: 1419-1427
- Laval F, Lanéelle MA, Deon C, Monsarrat B, Daffé M (2001) Accurate molecular mass determination of mycolic acids by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* **73**: 4537-4544
- Lechevalier M, Lechevalier H (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bact* **10**: 435-443
- Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V (2002) Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1025-1032
- Lee SA, Raad, II, Adachi JA, Han XY (2004) Catheter-related bloodstream infection caused by *Mycobacterium brumae*. *J Clin Microbiol* **42**: 5429-5431
- Lee YC, Ballou CE (1965) Complete structures of the glycopospholipids of mycobacteria. *Biochemistry* **4**: 1395-1404
- Lee YC, Ballou CE (1964) Structural Studies on the Myo-Inositol Mannodides from the Glycolipids of *Mycobacterium Tuberculosis* and *Mycobacterium Phlei*. *J Biol Chem* **239**: 1316-1327
- Lemassu A, Ortalo-Magné A, Bardou F, Silve G, Lanéelle MA, Daffé M (1996) Extracellular and surface-exposed polysaccharides of non-tuberculous mycobacteria. *Microbiology* **142 (Pt 6)**: 1513-1520
- Leoni E, Legnani P, Mucci MT, Pirani R (1999) Prevalence of mycobacteria in a swimming pool environment. *J Appl Microbiol* **87**: 683-688
- Liu J, Rosenberg EY, Nikaido H (1995) Fluidity of the lipid domain of cell wall from *Mycobacterium chelonae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11254-11258
- Liu J, Barry III CE, Besra GS, Nikaido H (1996) Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem* **271**: 29545-29551
- Liu J, Nikaido H (1999) A mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids accumulates meromycolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4011-4016

- London RD, Damsker B, Neibart EP, Knorr B, Bottone EJ (1988) Mycobacterium gordonae: an unusual peritoneal pathogen in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Med* **85**: 703-704
- López Marín LM, Lanéelle MA, Promé D, Daffé M, Lanéelle G, Promé JC (1991) Glycopeptidolipids from Mycobacterium fortuitum: a variant in the structure of C-mycoside. *Biochemistry* **30**: 10536-10542
- Luquin M, Ausina V, López Calahorra F, Belda F, Garcia Barcelo M, Celma C, Prats G (1991) Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria. *J Clin Microbiol* **29**: 120-130
- Luquin M, Ausina V, Vincent-Lévy-Frébault, Lanéelle MA, Belda F, Garcia-Barcelo M, Prats G, Daffé M. (1993) *Mycobacterium brumae* sp. nov., a rapidly growing, non photochromogenic Mycobacterium. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 405–413.
- Maeda N, Nigou J, Herrmann JL, Jackson M, Amara A, Lagrange PH, Puzo G, Gicquel B, Neyrolles O (2003) The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between Mycobacterium species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J Biol Chem* **278**: 5513-5516
- Mahapatra S, Crick DC, Brennan PJ (2000) Comparison of the UDP-N-acetylmuramate:L-alanine ligase enzymes from Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium leprae. *J Bacteriol* **182**: 6827-6830
- Mahapatra S, Scherman H, Brennan PJ, Crick DC (2005a) N Glycolylation of the nucleotide precursors of peptidoglycan biosynthesis of Mycobacterium spp. is altered by drug treatment. *J Bacteriol* **187**: 2341-2347
- Mahapatra S, Yagi T, Belisle JT, Espinosa BJ, Hill PJ, McNeil MR, Brennan PJ, Crick DC (2005b) Mycobacterial lipid II is composed of a complex mixture of modified muramyl and peptide moieties linked to decaprenyl phosphate. *J Bacteriol* **187**: 2747-2757
- Mahfoud M, Sukumaran S, Hulsmann P, Grieger K, Niederweis M (2006) Topology of the porin MspA in the outer membrane of Mycobacterium smegmatis. *J Biol Chem* **281**: 5908-5915
- Martin Casabona N, González Fuente T, Arcalis Arce L, Otal Entraigas J, Vidal Pla R (1989) Evaluation of a phenolglycolipid antigen (PGL-Tb 1) from M. tuberculosis in the serodiagnosis of tuberculosis: comparison with PPD antigen. *Acta Leprol* **7 Suppl 1**: 89-93
- Martínez A, Torello S, Kolte R (1999) Sliding Motility in Mycobacteria. *J Bacteriol* **23**: 7331-7338

- Matias VR, Beveridge TJ (2005) Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space. *Mol Microbiol* **56**: 240-251
- McNeil M, Daffé M, Brennan PJ (1991a) Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J Biol Chem* **266**: 13217-13223
- McNeil MR, Brennan PJ (1991b) Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res Microbiol* **142**: 451-463
- McNeil MR, Robuck KG, Harter M, Brennan PJ (1994) Enzymatic evidence for the presence of a critical terminal hexa-arabinoide in the cell walls of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* **4**: 165-173
- Mdluli K, Slayden RA, Zhu Y, Ramaswamy S, Pan X, Mead D, Crane DD, Musser JM, Barry CE, 3rd (1998) Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science* **280**: 1607-1610
- Mederos LM, Valdivia JA, Sempere MA, Valero-Guillen PL (1998) Analysis of lipids reveals differences between '*Mycobacterium habana*' and *Mycobacterium simiae*. *Microbiology* **144**: 1181-1188
- Meroueh SO, Bencze KZ, Heseck D, Lee M, Fisher JF, Stemmler TL, Mobashery S (2006) Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4404-4409
- Mikusová K, Slayden RA, Besra GS, Brennan PJ (1995) Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2484-2489
- Mikusová K, Yagi T, Stern R, McNeil MR, Besra GS, Crick DC, Brennan PJ (2000) Biosynthesis of the galactan component of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem* **275**: 33890-33897
- Minnikin DE (1982) Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles,. In C. Ratledge and J. Stanford (Eds.), *The biology of the mycobacteria, Physiology, identification and classification* Academic Press, Inc., New York, NY 1: 95-184
- Minnikin DE, Abley P, McQuillin FJ (1974) Location of double bonds in long chain esters by methoxymercuration-demercuration followed by mass spectroscopy. *Lipids* **9**: 135-140
- Minnikin DE, Dobson G, Draper P (1984a) Characterization of *Mycobacterium leprae* by lipid analysis. *Acta Leprol* **2**: 113-120

- Minnikin DE, Dobson G, Goodfellow M, Draper P, Magnusson M (1985a) Quantitative comparison of the mycolic and fatty acid compositions of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium goodsonae*. *J Gen Microbiol* **131**: 2013-2021
- Minnikin DE, Goodfellow M (1980) Lipid composition in the classification and identification of acid-fast bacteria. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **8**: 189-256
- Minnikin DE, Kremer L, Dover LG, Besra GS (2002) The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol* **9**: 545-553
- Minnikin DE, Minnikin SM, Dobson G, Goodfellow M, Portaels F, van den Breen L, Sesardic D (1983) Mycolic acid patterns of four vaccine strains of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Gen Microbiol* **129**: 889-891
- Minnikin DE, Minnikin SM, Parlett JH, Goodfellow M (1985b) Mycolic acid patterns of some rapidly-growing species of *Mycobacterium*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* **259**: 446-460
- Minnikin DE, Minnikin SM, Parlett JH, Goodfellow M, Magnusson M (1984b) Mycolic acid patterns of some species of *Mycobacterium*. *Arch Microbiol* **139**:225-231
- Minnikin DE, Polgar N (1966) Studies on the mycolic acids from human tubercle bacilli. *Tetrahedron Lett* **23**: 2643-2647
- Morita YS, Sena CB, Waller RF, Kurokawa K, Sernee MF, Nakatani F, Haites RE, Billman-Jacobe H, McConville MJ, Maeda Y, Kinoshita T (2006) PimE is a polyprenol-phosphate-mannose-dependent mannosyltransferase that transfers the fifth mannose of phosphatidylinositol mannoside in mycobacteria. *J Biol Chem* **281**: 25143-25155
- Morita YS, Velasquez R, Taig E, Waller RF, Patterson JH, Tull D, Williams SJ, Billman-Jacobe H, McConville MJ (2005) Compartmentalization of lipid biosynthesis in mycobacteria. *J Biol Chem* **280**: 21645-21652
- Mosca A, Russo F, Miragliotta L, Iodice MA, Miragliotta G (2007) Utility of gas chromatography for rapid identification of mycobacterial species frequently encountered in clinical laboratory. *J Microbiol Methods* **68**: 392-395
- Muñoz M, Lanéelle MA, Luquin M, Torrelles J, Julià E, Ausina V, Daffé M (1997a) Occurrence of an antigenic triacyl trehalose in clinical isolates and reference strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* **157**: 251-259
- Muñoz M, Luquin M, Garcia-Barcelo M, Julià E, Ausina V, Lanéelle MA (1997b) Distribution of surface-exposed antigenic glycolipids in recent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* **148**: 405-412

- Muñoz M, Raynaud C, Lanéelle MA, Julián E, López Marín LM, Silve G, Ausina V, Daffé M, Luquin M (1998) Seroreactive species-specific lipooligosaccharides of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. (formerly *Mycobacterium chelonae*-like organisms): identification and chemical characterization. *Microbiology* **144** (Pt 1): 137-148
- Murphy HN, Stewart GR, Mischenko VV, Apt AS, Harris R, McAlister MS, Driscoll PC, Young DB, Robertson BD (2005) The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **280**: 14524-14529
- Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A (2000) Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell* **103**: 511-524
- Nguyen HT, Trach DD, Man NV, Ngoan TH, Dunia I, Ludosky-Diawara MA, Benedetti EL (1979) Comparative ultrastructure of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepraemurium* cell envelopes. *J Bacteriol* **138**: 552-558
- Nigou J, Gilleron M, Puzo G (2003) Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie* **85**: 153-166
- Nigou J, Gilleron M, Rojas M, Garcia LF, Thurnher M, Puzo G (2002) Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. *Microbes Infect* **4**: 945-953
- Nikaido H, Kim SH, Rosenberg EY (1993) Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. *Mol Microbiol* **8**: 1025-1030
- Okamoto Y, Fujita Y, Naka T, Hirai M, Tomiyasu I, Yano I (2006) Mycobacterial sulfolipid shows a virulence by inhibiting cord factor induced granuloma formation and TNF-alpha release. *Microb Pathog* **40**: 245-253
- Okazaki M, Ohkusu K, Hata H, Ohnishi H, Sugahara K, Kawamura C, Fujiwara N, Matsumoto S, Nishiuchi Y, Toyoda K, Saito H, Yonetani S, Fukugawa Y, Yamamoto M, Wada H, Sejimo A, Ebina A, Goto H, Ezaki T, Watanabe T (2009) *Mycobacterium kyorinense* sp. nov., a novel, slow-growing species, related to *Mycobacterium celatum*, isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 1336–1341
- Ortalo-Magné A, Dupont MA, Lemassu A, Andersen AB, Gounon P, Daffé M (1995) Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology* **141**: 1609-1620
- Ortalo-Magné A, Lemassu A, Lanéelle MA, Bardou F, Silve G, Gounon P, Marchal G, Daffé M (1996) Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species. *J Bacteriol* **178**: 456-461

- Pabst MJ, Gross JM, Brozna JP, Goren MB (1988) Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **140**: 634-640
- Papa F, Cruaud P, David HL (1989) Antigenicity and specificity of selected glycolipid fractions from *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* **140**: 569-578
- Papapetropoulou M, Tsintzou A, Vantarakis A (1997) Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece. *Can J Microbiol* **43**: 499-502
- Parish T, Liu J, Nikaido H, Stoker NG (1997) A *Mycobacterium smegmatis* mutant with a defective inositol monophosphate phosphatase gene homolog has altered cell envelope permeability. *J Bacteriol* **179**: 7827-7833
- Paul TR, Beveridge TJ (1994) Preservation of surface lipids and determination of ultrastructure of *Mycobacterium kansasii* by freeze-substitution. *Infect Immun* **62**: 1542-1550
- Paul TR, Beveridge TJ (1993) Ultrastructure of mycobacterial surfaces by freeze-substitution. *Zentralbl Bakteriol* **279**: 450-457
- Paul TR, Beveridge TJ (1992) Reevaluation of envelope profiles and cytoplasmic ultrastructure of mycobacteria processed by conventional embedding and freeze-substitution protocols. *J Bacteriol* **174**: 6508-6517
- Pérez E, Constant P, Laval F, Lemassu A, Lanéelle MA, Daffé M, Guilhot C (2004a) Molecular dissection of the role of two methyltransferases in the biosynthesis of phenolglycolipids and phthiocerol dimycoserolate in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Biol Chem* **279**: 42584-42592
- Pérez E, Constant P, Lemassu A, Laval F, Daffé M, Guilhot C (2004b) Characterization of three glycosyltransferases involved in the biosynthesis of the phenolic glycolipid antigens from the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Biol Chem* **279**: 42574-42583
- Pinho L, Santos J, Oliveira G, Pestana M (2009) *Mycobacterium gordonae* urinary infection in a renal transplant recipient. *Transpl Infect Dis* **11**: 253-256
- Pinto R, Saunders BM, Camacho LR, Britton WJ, Gicquel B, Triccas JA (2004) *Mycobacterium tuberculosis* defective in phthiocerol dimycoserolate translocation provides greater protective immunity against tuberculosis than the existing bacille Calmette-Guérin vaccine. *J Infect Dis* **189**: 105-112
- Pitarque S, Larrouy-Maumus G, Payré B, Jackson M, Puzo G, Nigou J (2008) The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface. *Tuberculosis (Edinb)* **88**: 560-5

Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakrus MA, Butler WR, Woodley CL, Silcox VA, Shinnick TM (1992) Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* **30**: 1815-1822

Portevin D, de Sousa-D'Auria C, Montrozier H, Houssin C, Stella A, Lanéelle MA, Bardou F, Guilhot C, Daff  M (2005) The acyl-AMP ligase FadD32 and AccD4-containing acyl-CoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth: identification of the carboxylation product and determination of the acyl-CoA carboxylase components. *J Biol Chem* **280**: 8862-8874

Prom  JC, Asselineau C, Asselineau J (1966) Acides mycobact riques, nouveaux acides isolés des lipids des mycobactéries *C R Acad Sci* **263**: 448-451

Prom  JC, Lacave C, Ahibo-Coffy A, Savagnac A (1976) [Separation of structural studies of the molecular species of monomycolates and dimycolates of alpha-D-trehalose present in *Mycobacterium phlei* (author's transl)]. *Eur J Biochem* **63**: 543-552

Puech V, Bayan N, Salim K, Leblon G, Daff  M (2000) Characterization of the in vivo acceptors of the mycoloyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85. *Mol Microbiol* **35**: 1026-1041

Puech V, Chami M, Lemassu A, Lanéelle MA, Schiffler B, Gounon P, Bayan N, Benz R, Daff  M (2001) Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* **147**: 1365-1382

Puech V, Guilhot C, Pérez E, Tropis M, Armitige LY, Gicquel B, Daff  M (2002) Evidence for a partial redundancy of the fibronectin-binding proteins for the transfer of mycoloyl residues onto the cell wall arabinogalactan termini of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **44**: 1109-1122

Quesniaux VJ, Nicolle DM, Torres D, Kremer L, Guérardel Y, Nigou J, Puzo G, Erard F, Ryffel B (2004) Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol* **172**: 4425-4434

Qureshi N, Sathyamoorthy N, Takayama K (1984) Biosynthesis of C30 to C56 fatty acids by an extract of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J Bacteriol* **157**: 46-52

Qureshi N, Takayama K, Jordi HC, Schnoes HK (1978) Characterization of the purified components of a new homologous series of alpha-mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J Biol Chem* **253**: 5411-5417

Qureshi N, Takayama K, Schnoes HK (1980) Purification of C30-56 fatty acids from *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J Biol Chem* **255**: 182-189

- Rafidinarivo E, Promé JC, Lévy-Frébault V (1985) New kinds of unsaturated mycolic acids from *Mycobacterium fallax* *Chem Phys Lipids* **36**: 215–228.
- Rafidinarivo E, Lanéelle MA, Montrozier H, Valero-Guillen P, Astola J, Luquin M, Promé JC, Daffé M (2009) Trafficking pathways of mycolic acids: structures, origin, mechanism of formation, and storage form of mycobacteric acids. *J Lipid Res* **50**: 477-490
- Rao V, Fujiwara N, Porcelli SA, Glickman MS (2005) Mycobacterium tuberculosis controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J Exp Med* **201**: 535-543
- Rao V, Gao F, Chen B, Jacobs WR, Jr., Glickman MS (2006) Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses Mycobacterium tuberculosis - induced inflammation and virulence. *J Clin Invest* **116**: 1660-1667
- Rastogi N (1991) Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance *Res Microbiol* **142**: 464-476.
- Recht J, Martínez A, Torello S, Kolter R (2000) Genetic analysis of sliding motility in Mycobacterium smegmatis. *J Bacteriol* **182**: 4348-4351
- Reyes-Ruvalcaba D, González-Cortés C, Rivero-Lezcano OM (2008) Human phagocytes lack the ability to kill Mycobacterium gordonae, a non-pathogenic mycobacteria. *Immunol Lett* **116**: 72-78
- Rho M, Bia F, Brewster UC (2007) Nontuberculous mycobacterial peritonitis in peritoneal dialysis patients. *Semin Dial* **20**: 271-276
- Riedel DD, Kaufmann SH (1997) Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with Mycobacterium tuberculosis and lipoarabinomannan. *Infect Immun* **65**: 4620-4623
- Rivière M, Puzo G (1992) Use of ¹H NMR ROESY for structural determination of O-glycosylated amino acids from a serine-containing glycopeptidolipid antigen. *Biochemistry* **31**: 3575-3580
- Rivière M, Puzo G (1991) A new type of serine-containing glycopeptidolipid from Mycobacterium xenopi. *J Biol Chem* **266**: 9057-9063
- Rodríguez-Guell E, Agustí G, Corominas M, Cardona PJ, Casals I, Parella T, Sempere MA, Luquin M, Julià E (2006) The production of a new extracellular putative long-chain saturated polyester by smooth variants of Mycobacterium vaccae interferes with Th1-cytokine production. *Antonie Van Leeuwenhoek* **90**: 93-108

- Rousseau C, Turner OC, Rush E, Bordat Y, Sirakova TD, Kolattukudy PE, Ritter S, Orme IM, Gicquel B, Jackson M (2003) Sulfolipid deficiency does not affect the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in mice and guinea pigs. *Infect Immun* **71**: 4684-4690
- Runyon EH (1970) Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. *Am J Clin Pathol* **54**: 578-586
- Runyon EH (1959) Source of scotochromogens. *Am Rev Respir Dis* **80**: 277-278
- Rusconi S, Gori A, Vago L, Marchetti G, Franzetti F (1997) Cutaneous infection caused by *Mycobacterium gordonae* in a human immunodeficiency virus-infected patient receiving antimycobacterial treatment. *Clin Infect Dis* **25**: 1490-1491
- Sánchez-Morgado JM, Gallagher A, Johnson LK (2009) *Mycobacterium gordonae* infection in a colony of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Lab Anim* **43**: 300-303
- Sathyamoorthy N, Qureshi N, Takayama K (1985) Purification and characterization of C28-55 fatty acids from *Mycobacterium smegmatis*. *Can J Microbiol* **31**: 214-219
- Saviola B, Bishal W, (2006) The Genus *Mycobacterium*-Medical. *Prokaryotes* **3**: 919-933.
- Schaeffer ML, Agnihotri G, Kallender H, Brennan PJ, Lonsdale JT (2001a) Expression, purification, and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* acyl carrier protein, AcpM. *Biochim Biophys Acta* **1532**: 67-78
- Schaeffer ML, Agnihotri G, Volker C, Kallender H, Brennan PJ, Lonsdale JT (2001b) Purification and biochemical characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases KasA and KasB. *J Biol Chem* **276**: 47029-47037
- Schaeffer ML, Khoo KH, Besra GS, Chatterjee D, Brennan PJ, Belisle JT, Inamine JM (1999) The *pimB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a mannosyltransferase involved in lipoarabinomannan biosynthesis. *J Biol Chem* **274**: 31625-31631
- Schwebach JR, Glatman-Freedman A, Gunther-Cummins L, Dai Z, Robbins JB, Schneerson R, Casadevall A (2002) Glucan is a component of the *Mycobacterium tuberculosis* surface that is expressed in vitro and in vivo. *Infect Immun* **70**: 2566-2575
- Schulze-Robbecke R, Janning B, Fischeder R (1992) Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tuber Lung Dis* **73**: 141-144
- Silva MT, Macedo PM (1984) Ultrastructural characterization of normal and damaged membranes of *Mycobacterium leprae* and of cultivable mycobacteria. *J Gen Microbiol* **130**: 369-380

- Sirakova TD, Thirumala AK, Dubey VS, Sprecher H, Kolattukudy PE (2001) The Mycobacterium tuberculosis pks2 gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis. *J Biol Chem* **276**: 16833-16839
- Siroy A, Mailaender C, Harder D, Koerber S, Wolschendorf F, Danilchanka O, Wang Y, Heinz C, Niederweis M. (2008) Rv1698 of Mycobacterium tuberculosis Represents a New Class of Channel-forming Outer Membrane Proteins. *J Biol Chem* **283**: 17827-17837.
- Slayden RA, Barry CE, 3rd (2002) The role of KasA and KasB in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **82**: 149-160
- Smith DW, Randall HM, Maclennan AP, Lederer E (1960) Mycosides: a new class of type-specific glycolipids of Mycobacteria. *Nature* **186**: 887-888
- Strobel S, Belpedio D, Sharrer E, Pepe L, McClellan S (2008) Unusual infection in the foot of a barefoot gardener. *J Am Podiatr Med Assoc* **98**: 311-313
- Takayama K, Qureshi N (1978) Isolation and characterization of the monounsaturated long chain fatty acids of Mycobacterium tuberculosis. *Lipids* **13**: 575-579
- Takayama K, Wang C, Besra GS (2005) Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev* **18**: 81-101
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T (1993) Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* **31**: 175-178
- Thibert L, Lapierre S (1993) Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* **31**: 1759-1763
- Torkko P, Suomalainen S, Iivanainen E, Suutari M, Paulin L, Rudback E, Tortoli E, Vincent V, Mattila R, Katila ML (2001) Characterization of Mycobacterium bohemicum isolated from human, veterinary, and environmental sources. *J Clin Microbiol* **39**: 207-211
- Tortoli E (2003) Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* **16**: 319-354
- Trias J, Jarlier V, Benz R (1992) Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science* **258**: 1479-1481
- Trivedi OA, Arora P, Sridharan V, Tickoo R, Mohanty D, Gokhale RS (2004) Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature* **428**: 441-445

Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, Moreira AL, Kurepina N, Reed MB, Mathema B, Barry CE, 3rd, Kaplan G (2005) Virulence of selected Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J Infect Dis* **192**: 98-106

Tsukamura M (1967) Identification of mycobacteria. *Tubercle* **48**: 311-338

Venisse A, Berjeaud JM, Chaurand P, Gilleron M, Puzo G (1993) Structural features of lipoarabinomannan from Mycobacterium bovis BCG. Determination of molecular mass by laser desorption mass spectrometry. *J Biol Chem* **268**: 12401-12411

Venisse A, Rivière M, Vercauteren J, Puzo G (1995) Structural analysis of the mannan region of lipoarabinomannan from Mycobacterium bovis BCG. Heterogeneity in phosphorylation state. *J Biol Chem* **270**: 15012-15021

Vera-Cabrera L, Handzel V, Laszlo A (1994) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) combined with a streptavidin-biotin and enzyme amplification method to detect anti-2,3-di-o-acyltrehalose (DAT) antibodies in patients with tuberculosis. *J Immunol Methods* **177**(1-2):69-77

Vercellone A, Nigou J, Puzo G (1998) Relationships between the structure and the roles of lipoarabinomannans and related glycoconjugates in tuberculosis pathogenesis. *Front Biosci* **3**: e149-163

Viader-Salvadó JM, Molina-Torres CA, Guerrero-Olazarán M (2007) Detection and identification of mycobacteria by mycolic acid analysis of sputum specimens and young cultures. *J Microbiol Methods* **70**: 479-483

Vignal C, Guérardel Y, Kremer L, Masson M, Legrand D, Mazurier J, Elaissari E (2003) Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from Mycobacterium chelonae and Mycobacterium kansasii induce TNF- α and IL-8 secretion by a CD14-toll-like receptor 2-dependent mechanism. *J Immunol* **171**: 2014-2023

Vilkas E, Adam A, Senn M (1968) [Isolation of a new type of trehalose diester from Mycobacterium fortuitum]. *Chem Phys Lipids* **2**: 11-16

Vilkas E, Delaumeny JM, Nacasch C (1968) [On the structure of the polysaccharide of wax D of a virulent human strain of Mycobacterium tuberculosis]. *Biochim Biophys Acta* **158**: 147-150

Vilkas E, Rojas A (1964) [on the Lipids of Mycobacterium Fortuitum]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* **46**: 689-701

Vogiatzakis E, Stefanou S, Skroubelou A, Anagnostou S, Marínis E, Matsiota-Bernard P (1998) Molecular markers for the investigation of Mycobacterium gordonae epidemics. *J Hosp Infect* **38**: 217-222

- Von Rudloff E. (1956) Periodate-permanganate oxidations V. Oxidation of lipids in media containing organic solvents *Can J Chem* **34**: 1413–1418.
- Walton DT, Valesco M (1991) Identification of *Mycobacterium gordonae* from culture by the Gen-Probe Rapid Diagnostic System: evaluation of 218 isolates and potential sources of false-negative results. *J Clin Microbiol* **29**: 1850-1854
- Watanabe M, Aoyagi Y, Ridell M, Minnikin DE (2001) Separation and characterization of individual mycolic acids in representative mycobacteria. *Microbiology* **147**: 1825-1837
- Watanabe M, Honda I, Kawajiri K, Niinuma S, Kudoh S, Minnikin DE (1995) Distribution of antibody titres against phenolic glycolipids from *Mycobacterium tuberculosis* in the sera from tuberculosis patients and healthy controls. *Res Microbiol* **146**: 791-797
- Watanabe M, Ohta A, Sasaki S, Minnikin DE (1999) Structure of a new glycolipid from the *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex. *J Bacteriol* **181**: 2293-2297
- Watanabe M, Yamada Y, Iguchi K, Minnikin DE (1994) Structural elucidation of new phenolic glycolipids from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta* **1210**: 174-180
- Wayne LG, Kubica GP (1986) The mycobacteria. In: Holt JG, Sneath PH, Mair NS, Sharpe ME (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Williams & Wilkins, Baltimore MD **2**:1435-1457
- Weston A, Stern RJ, Lee RE, Nassau PM, Monsey D, Martin SL, Scherman MS, Besra GS, Duncan K, McNeil MR (1997) Biosynthetic origin of mycobacterial cell wall galactofuranosyl residues. *Tuber Lung Dis* **78**: 123-131
- Wietzerbin J, Das BC, Petit JF, Lederer E, Leyh-Bouille M, Ghuysen JM (1974) Occurrence of D-alanyl-(D)-meso-diaminopimelic acid and meso-diaminopimelyl-meso-diaminopimelic acid interpeptide linkages in the peptidoglycan of *Mycobacteria*. *Biochemistry* **13**: 3471-3476
- Wolfe LM, Mahaffey SB, Kruh NA, Dobos KM (2010) Proteomic Definition of the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Prot Res* **9**: 5816–5826
- Woodruff PJ, Carlson BL, Siridechadilok B, Pratt MR, Senaratne RH, Mougous JD, Riley LW, Williams SJ, Bertozzi CR (2004) Trehalose is required for growth of *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* **279**: 28835-28843
- Yamazaki Y, Danelishvili L, Wu M, Hidaka E, Katsuyama T, Stang B, Petrofsky M, Bildfell R, Bermudez LE (2006) The ability to form biofilm influences *Mycobacterium avium* invasion and translocation of bronchial epithelial cells. *Cell Microbiol* **8**: 806-814

Yuan Y, Mead D, Schroeder BG, Zhu Y, Barry CE, 3rd (1998a) The biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. Enzymatic methyl(ene) transfer to acyl carrier protein bound meromycolic acid in vitro. *J Biol Chem* **273**: 21282-21290

Yuan Y, Zhu Y, Crane DD, Barry CE 3rd (1998b) The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **29**:1449-58

Yuksel ZS, Buber E, Kocagoz T, Alp A, Saribas Z, Acan NL (2011) Mycobacterial strains that stimulate the immune system most efficiently as candidates for the treatment of bladder cancer. *J Mol Microbiol Biotechnol* **20**: 24-28

Zhang L, Goren MB, Holzer TJ, Andersen BR (1988) Effect of *Mycobacterium tuberculosis*-derived sulfolipid I on human phagocytic cells. *Infect Immun* **56**: 2876-2883

Zimhony O, Cox JS, Welch JT, Vilcheze C, Jacobs WR, Jr. (2000) Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* **6**: 1043-1047

Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffé M (2008) Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol* **190**: 5672-5680

Zuber B, Haenni M, Ribeiro T, Minnig K, Lopes F, Moreillon P, Dubochet J (2006) Granular layer in the periplasmic space of gram-positive bacteria and fine structures of *Enterococcus gallinarum* and *Streptococcus gordonii* septa revealed by cryo-electron microscopy of vitreous sections. *J Bacteriol* **188**: 6652-6660

Articles

The HPLC-double-cluster pattern of some *Mycobacterium gordonae* strains is due to their dicarboxy-mycolate content

José Astola,¹ Manuel Muñoz,¹ Marco Sempere,² Pere Coll,^{1,3} Marina Luquin¹ and Pedro L. Valero-Guillén⁴

Author for correspondence: Pedro L. Valero-Guillén. Tel: +34 968 360953. Fax: +34 968 360950. e-mail: plvalero@um.es

¹ Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

² Hospital Costa del Sol, Marbella, Málaga, Spain

³ Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

⁴ Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Aptdo. 4012, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

The mycolic acids of several strains of *Mycobacterium gordonae* were examined by chromatographic and spectroscopic techniques. Both HPLC and TLC revealed two patterns of mycolates among the *M. gordonae* strains studied. As determined by TLC, one pattern was composed of α -, methoxy- and keto-mycolates; the other was composed of these mycolates plus an additional component, which was identified as dicarboxy-mycolates. The dicarboxy-mycolates were only found in those *M. gordonae* strains that displayed a so-called HPLC-double-cluster pattern. Detailed structural analyses of the dicarboxy-mycolates indicated that these compounds contained predominantly 61–65 carbon atoms (C_{63} was the major component) and a *trans*-1,2-disubstituted cyclopropane ring. Thus, the dicarboxy-mycolate content of strains of *M. gordonae* determines their HPLC pattern. In spite of the differences in their HPLC patterns, and although they belonged to different PCR-restriction length polymorphism clusters, all of the *M. gordonae* strains examined in this study were closely related on the basis of the structural features of their α -, keto- and methoxy-mycolates; the predominant α -mycolates contained two *cis*-1,2-disubstituted cyclopropane rings, the major keto-mycolates contained a *trans*-1,2-disubstituted cyclopropane ring and the methoxy-mycolates contained one *cis*- or one *trans*-1,2-disubstituted cyclopropane ring. It is noteworthy that the strains containing dicarboxy-mycolates also displayed significant amounts of α -mycolates that contained one *cis*-1,2-disubstituted cyclopropane ring and one *cis* double bond. The results obtained in this study demonstrate heterogeneity among *M. gordonae* strains.

Keywords: mycolic acids, high-performance liquid chromatography, *M. gordonae*

INTRODUCTION

Mycobacterium gordonae is a slow-growing scotochromogenic species of *Mycobacterium*, which is widely distributed in natural water sources and soils (Wayne & Kubica, 1986). It has been found in bottled table waters (Papapetropoulou *et al.*, 1997) and is the most common mycobacterial isolate from swimming-pool environments (Leoni *et al.*, 1999), probably due to its resistance to chlorine disinfection (Le Dantec *et al.*, 2002). Several

M. gordonae-associated infections have been observed in endoscopy patients; these are thought to have been due to the use of improperly cleaned or disinfected instruments (Vogiatzakis *et al.*, 1998). Although *M. gordonae* is considered to be non-pathogenic, there have been some well-documented cases of infections caused by this organism in patients with underlying conditions, e.g. AIDS or cancer (Bernard *et al.*, 1992; Clague *et al.*, 1985; London *et al.*, 1988; Rusconi *et al.*, 1997).

Molecular-based methodologies for the rapid identification of *M. gordonae* isolates have revealed genetic variability within this species. In contrast to other mycobacteria, which show conservation of rDNA sequences at the species level, *M. gordonae* strains exhibit

Abbreviations: EI-MS, electron-impact MS; FAB-MS, fast-atom bombardment MS; Gen-Probe, Gen-Probe Rapid Diagnostic System; PRA, PCR-restriction length polymorphism analysis.

variation within a region of their rDNA; this region is a common target for diagnostic species-specific probes (Kirschner & Böttger, 1992). The microheterogeneity observed among strains of *M. gordonae* could be the reason for the hybridization problems reported by Walton & Valesco (1991) when using the Gen-Probe Rapid Diagnostic System (Gen-Probe). Studies using other molecular-based identification methods, such as PCR-restriction length polymorphism analysis (PRA), have concluded that *M. gordonae* is the most heterogeneous member of the genus *Mycobacterium* studied to date, generating several closely related subclusters upon analysis of strain data (Plikaytis *et al.*, 1992; Telenti *et al.* 1993).

Mycolic acids are high-molecular-mass 3-hydroxy, 2-alkyl-branched fatty acids found in all *Mycobacterium* species. The different structural types of mycolic acids include the so-called α -mycolates and the mycolates which have other oxygen functions (i.e. the keto-, methoxy-, dicarboxy-, epoxy- and ω -1 methoxy-mycolates) in addition to the 3-hydroxy acid unit (Minnikin, 1982; Minnikin *et al.*, 1982; Luquin *et al.*, 1990). The use of TLC to analyse mycolic acid methyl esters allowed the different structural types of mycolic acids to be separated. The mycolate patterns obtained upon separation of mycolic acid methyl esters by TLC have been widely used in the classification and identification of mycobacteria (Daffé *et al.*, 1983; Minnikin *et al.*, 1984; Luquin *et al.*, 1991; Valero-Guillén *et al.*, 1985). *M. gordonae* exhibits a TLC mycolate pattern characterized by the presence of α -, methoxy- and keto-mycolates. Analysis of mycolic acids by HPLC has permitted a large proportion of mycobacterial species to be identified by their unique and reproducible chromatographic patterns (Butler & Guthertz, 2001). However, *M. gordonae* isolates have been shown to produce two different HPLC mycolic acid patterns – a single-cluster pattern, which is the most common pattern, and a double-cluster pattern (Cage, 1992; Butler *et al.*, 1991). To date, no studies have been done to correlate these patterns with differences in mycolate production between strains of *M. gordonae* or to identify the compounds responsible for the second cluster of peaks seen in the double-cluster pattern.

The aim of this work was to elucidate the lipidic compounds of *M. gordonae* that give rise to the HPLC-double-cluster pattern. We studied five clinical isolates of *M. gordonae* that produced the HPLC-double-cluster pattern; for comparative purposes, we also studied two reference strains of *M. gordonae*. The lipidic component responsible for the second peak in the double-cluster pattern was purified and identified by spectrometric methods as dicarboxy-mycolate, a mycolic acid that has not been described in *M. gordonae* until now.

METHODS

Strains, cultivation and identification. Five strains from clinical samples (CR-178, CL-333 and CL-361, from sputa; CL-416C, from an alveolar lavage; CL-554, from a broncho-

aspirate) were examined, together with *M. gordonae* strains ATCC 14470^T (HPLC-single-cluster pattern) and ATCC 35759 (HPLC-double-cluster pattern). All of the strains were grown on Sauton's medium at 32 °C for 6 weeks.

Identification of the strains was done by using standard biochemical methods (Tsukamura, 1967) and Gen-Probe for *M. gordonae* (used according to the manufacturer's instructions; Biomérieux). The strains were also typed by using PRA, as described by Telenti *et al.* (1993). Briefly, a region of DNA (439 bp) corresponding to the gene encoding Hsp65 was amplified by PCR and then digested with *Hae*III or *Bst*EIII; the fragments obtained were separated by agarose-gel electrophoresis and visualized under UV.

Extraction and analysis of fatty acids, mycolic acids and alcohols. Two to three loopfuls of bacteria (20–30 mg wet wt of each strain) were collected from the surface of the Sauton's agar plates. Fatty acids, mycolic acids and alcohols were liberated from each strain sample by saponification. These compounds were then extracted with diethyl ether. For each strain, an aliquot of the extract was treated with diazomethane to obtain the methyl esters of the fatty acids and mycolic acids (Daffé *et al.*, 1983); in another aliquot of the extract the mycolic acids were transformed to *p*-bromophenacyl derivatives (Butler *et al.*, 1991).

The *p*-bromophenacyl derivatives of the mycolic acids were separated in a HPLC system (Waters Associates) equipped with an UV/visible detector. A reverse-phase C18 column (Nova-Pack 60A, 4 μ m, 3.9 \times 75 mm; Waters Associates) was used in the system; the mycolic acids were eluted using a linear gradient of methanol/chloroform [from 98:2 (v/v) to 30:70 (v/v)]. A high-molecular-mass standard (Ribi; ImmunoChem Research) was used as an internal standard, to assist in the identification of the peaks. Pattern-recognition software (PIROUETTE; Infometrix) was employed to evaluate the similarity of the HPLC chromatograms obtained, and was used in conjunction with a library containing the chromatograms of the most relevant *Mycobacterium* species and related bacteria (Glickman *et al.*, 1994). Designation of HPLC peaks followed the arbitrary nomenclature used by several authors in the literature (Glickman *et al.*, 1994).

Mycolic acid methyl esters were studied by analytical one-dimensional TLC using silica gel 60 TLC plates (Merck). A triple development with a mixture of *n*-hexane/diethyl ether (85:15, v/v) was performed to separate the individual mycolates. The components separated by TLC were revealed as dark-blue spots by spraying the TLC plates with 10% (w/v) molybdophosphoric acid (Merck) in ethanol and heating them at 120 °C for 5 min. The methyl mycolates on the TLC plates were identified by comparing their positions on the plates with the mycolate patterns of reference strains (Luquin *et al.*, 1991).

Fatty acid methyl esters, alcohols and methyl mycolate cleavage products were determined by GLC and GLC-MS as described previously (Luquin *et al.*, 1991), employing a fused-silica capillary column (cross-linked methyl silicone, 15 m \times 0.25 mm, HP-1; Hewlett Packard) that was programmed from 175 to 300 °C at 8 °C min⁻¹ and maintained at 300 °C for 15 min.

Purification and structural analysis of mycolates. Crude methyl mycolates from *M. gordonae* strains ATCC 14470^T, ATCC 35759 and CL-416C were obtained by precipitating their lipidic extracts with cold methanol (–20 °C, overnight). The samples were then centrifuged at 1500 g for 30 min at 4 °C. Unless indicated otherwise, the boiling point of the petroleum ether used in the following procedures was 60–

80 °C. For purification of the methyl mycolates, the precipitates were recovered, dissolved in the smallest possible volume of petroleum ether and applied to a silica gel 60 (Merck; particle size 0.063–0.200 µm) column equilibrated in petroleum ether. Successive elutions, 3–5 bed-volumes each, were performed with petroleum ether followed by increasing concentrations of diethyl ether (5, 10, 20 and 100%) in petroleum ether. The eluates were separated by TLC, as described above. Dicarboxy-mycolates were obtained in the 20% (v/v) diethyl ether/petroleum ether fraction.

Purified mycolic acid methyl esters were identified by MS and NMR. Electron-impact MS (EI-MS) (70 eV) and fast-atom bombardment MS (FAB-MS) (8 eV) were performed in a VG AutoSpec (Fison) mass spectrometer. FAB-MS was carried out in the positive mode, employing *m*-nitrobenzyl alcohol as the matrix. Because FAB-MS seemed to produce $(M+Na)^+/\alpha$ pseudomolecular ions, we doped the matrix with NaCl in some analyses. Dicarboxy-mycolates from strain CL-416C were also analysed by FAB-MS in the negative mode and by chemical ionization (methane; temperature of ionization, 180 °C) in the negative mode. For the latter method of analysis, a Thermoquest-Trace mass spectrometer (Thermo) with a temperature range of 60–300 °C was used.

All methyl mycolates from strains ATCC 14470^T, ATCC 35759 and CL-416C were analysed by ¹H-NMR at 300 MHz in a Varian NMR spectrometer. Dicarboxy-mycolates from strains ATCC 35759 and CL-416C were also studied by ¹³C-NMR (75 MHz) in the same spectrometer. In all cases, the spectra were recorded in deuteriochloroform [10 mg (ml sample)⁻¹] at 25 °C.

RESULTS

Biochemical and genetic identification

The five strains of clinical origin used in this study were identified as *M. gordonae* by standard biochemical tests and by Gen-Probe. Upon PRA, four of the clinical strains (CR-178, CL-361, CL-416C and CL-554) exhibited PRA pattern V, as defined by Telenti *et al.* (1993); CL-333 exhibited PRA pattern III. *M. gordonae* ATCC 35759 exhibited pattern III and *M. gordonae* ATCC 14470^T exhibited pattern I.

Mycolate chromatographic patterns

Upon HPLC analysis of their mycolates, the five clinical strains of *M. gordonae* and strain ATCC 35759 showed an HPLC-double-cluster pattern (Cage, 1992) (Fig. 1a). TLC analysis of the mycolates revealed that the six strains contained α -, methoxy-, keto-mycolates and additional components, such as secondary alcohols and dicarboxy-mycolates (Fig. 1b). *M. gordonae* ATCC 14470^T showed the most common HPLC-single-cluster pattern (Cage, 1992) (data not shown); TLC revealed this strain to contain only α -, methoxy- and keto-mycolates in its cell wall (Fig. 1b; lane 4). HPLC of the *p*-bromophenacyl derivatives of the total mycolic acids from *M. gordonae* CL-416C are shown in Fig. 1(a). As further demonstrated by HPLC (data not shown), dicarboxy-mycolates purified from strains ATCC 35759 and CL-416C and transformed to their *p*-bromophenacyl derivatives eluted as three peaks, which

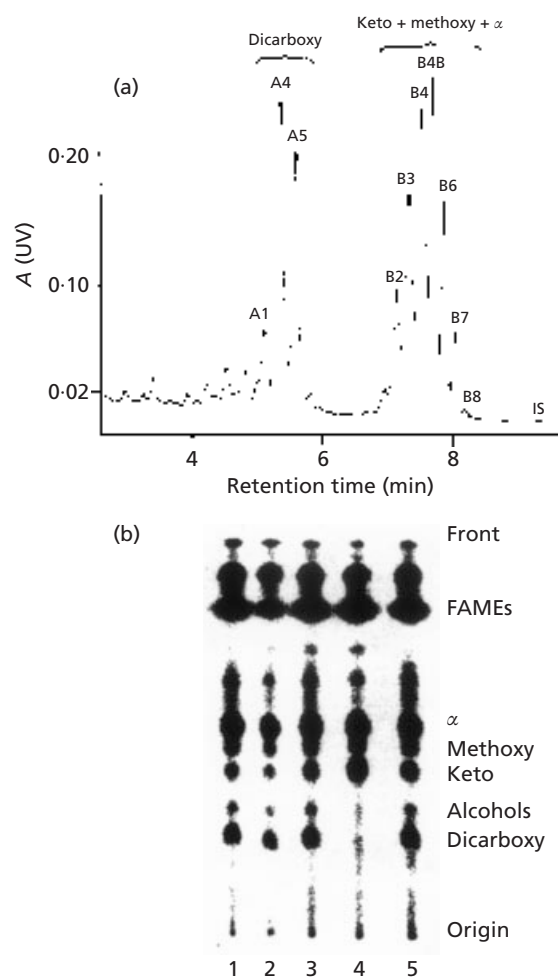


Fig. 1. (a) HPLC trace of mycolates from *M. gordonae* CL-416C, showing a double-cluster pattern. Nomenclature of the peaks is arbitrary but its correspondence to the different structural types of mycolates is given. IS, internal standard. (b) TLC of mycolic acids of different strains of *M. gordonae*. Lanes: 1, CR-178; 2, CL-416C; 3, CL-554; 4, ATCC 14470^T; 5, CL-333. Petroleum ether/diethyl ether (85:15, v/v) was used as the solvent, twice. The b.p. of the petroleum ether was 60–80 °C. The different structural types of mycolates (α , methoxy and keto) are indicated. Alcohols, secondary alcohols 2-octadecanol and 2-eicosanol; FAMES, fatty acid methyl esters. Compounds migrating above the α -mycolates probably correspond to epimerization products of the different mycolates.

corresponded exactly to peaks A1, A4 and A5 in Fig. 1(a). Other components detected in the chromatogram, peaks B2–B8 (Glickman *et al.*, 1994), corresponded to a mixture of keto-, methoxy- and α -mycolates (Fig. 1a).

Fatty acids and alcohols

GLC analysis (data not shown) of the fatty acids of the clinical strains and of strains ATCC 35759 and ATCC 14470^T indicated the presence of fatty acids with 14 to 24 carbon atoms in these strains, of which hexadecanoate and octadecanoate were the most prominent. Minor amounts of 2-methyl tetradecanoic acid were detected in

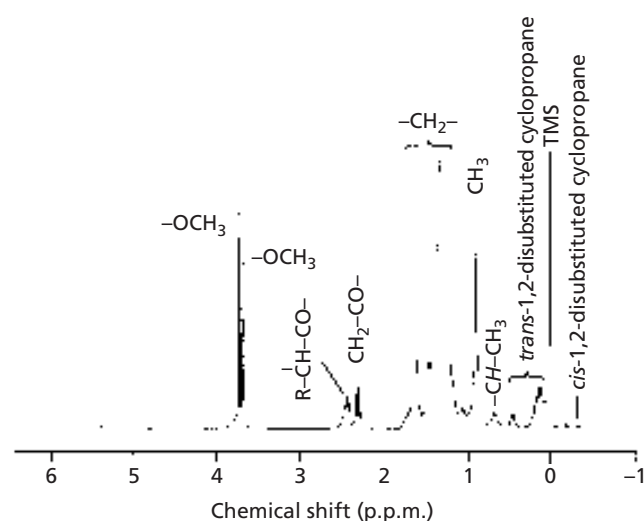


Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (300 MHz) of dicarboxy-mycolates from *M. gordonae* ATCC 35759 in deuteriochloroform. Resonances of the different protons are indicated. TMS, tetramethylsilane.

the strains, whereas tuberculostearic acid (10-methyl octadecanoic acid) was not present in any of the strains examined. Two secondary alcohols, 2-octadecanol and 2-eicosanol, were detected only in those strains showing the HPLC-double-cluster pattern. The methyl esters derived from thermal cleavage of the methyl mycolates (Luquin *et al.*, 1991) were docosanoate and tetracosanoate, which were present in varying amounts.

Structures of the dicarboxy-mycolates of *M. gordonae*

In the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of strain ATCC 35759 (Fig. 2), major resonances were detected between 0.1 and 3.7 p.p.m. A multiplet centred at 0.15 p.p.m. (3H) and another one at 0.47 p.p.m. (1H) were attributed to a *trans*-1,2-disubstituted cyclopropane ring (Draper *et al.*, 1982; Watanabe *et al.*, 1999). A signal at 0.67 p.p.m. (Fig. 2) was assigned to a $-\text{CH}-\text{CH}_3$ adjacent to the cyclopropane ring (Watanabe *et al.*, 1999); the protons of the methyl branch resonated as a doublet at 0.90 p.p.m., and overlapped a signal of a terminal methyl at 0.88 p.p.m. (6H in total) (Draper *et al.*, 1982). Singlets at 3.66 and 3.70 p.p.m. corresponded to two carbomethoxy groups, and the triplet at 2.29 p.p.m. was assigned to a $-\text{CH}_2-$ attached to a carbonyl group. The protons of other $-\text{CH}_2-$ groups resonated between 1.2 and 1.6 p.p.m. Finally, the signal at 2.42 p.p.m. was due to the proton of C-2 of the molecule. Minor resonances situated at -0.3 and 0.73 p.p.m. (Fig. 2) were due to the presence of low amounts of a compound with a *cis*-1,2-disubstituted cyclopropane ring (Watanabe *et al.*, 1999).

In the $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of strain ATCC 35759 (data not shown), two signals at 174.30 and 176.19 p.p.m. indicated the existence of two carbonyl groups in the molecule, which were complemented to the resonances

of two carbomethoxy groups at 50.98 and 51.46 p.p.m. Resonances at 10.50, 18.62 and 26.14 p.p.m. were assigned to a *trans*-1,2-disubstituted cyclopropane ring; the resonances situated at 19.70 and 38.13 p.p.m. were assigned to a methyl branch and to a methyne, respectively, which were both adjacent to the aforementioned ring (Watanabe *et al.*, 1999). The presence of a hydroxyl group at C-3 was justified by the resonance at 72.29 p.p.m.

These data indicate that the additional component detected by TLC and HPLC in the *M. gordonae* clinical strains and in strain ATCC 35759 can be identified as a dicarboxy-mycolate (dimethyl ester form) that contains predominantly a *trans*-1,2-disubstituted cyclopropane ring with a methyl branch adjacent to it (Fig. 3; Table 1).

EI-MS (Fig. 3) revealed fragments related to the general breakdown (between C-2 and C-3) pattern of mycolates, which produce meroaldehydes and methyl esters (Draper *et al.*, 1982). Methyl esters appeared at m/z 382 (tetracosanoate, $\text{C}_{24:0}$) and 354 (docosanoate, $\text{C}_{22:0}$). Fragments due to $M^+ - 50/z$ (water and methanol loss) were detected at m/z 908, 936 (the most predominant) and 964, which predicted molecular ions (M^+/z) at 958, 986 and 1014; these were further confirmed by positive-mode FAB-MS, because pseudomolecular ions, $(M + \text{Na})^+/z$, appeared at 981, 1009 and 1037 (data not shown).

In the region of the EI-MS trace attributed to meroaldehydes (Fig. 3), a major fragment at m/z 601 was accompanied by another one at m/z 632; other fragments were present at lower intensities. A formula for dicarboxy-mycolates was not satisfactory when m/z 601 was considered. However, negative-mode FAB-MS (data not shown) revealed very low intensities for pseudomolecular ions, $(M - H)^{-1}/z$, but important fragments at $(M - 15)/z$, which were tentatively assigned to the loss of $-\text{CH}_3$ from a carbomethoxy group. The elimination of a methyl group to give a negatively charged molecule (a carboxylate ion) could apparently take place in the meroaldehyde part of the structure, because intense fragments at m/z 381 and 353 (similar intensities) were clearly related to methyl esters derived from a breakdown between C-2 and C-3 of the molecule. Thus, an intense fragment at m/z 617 was detected by negative-mode FAB-MS and was considered to be related to a meroaldehyde at m/z 632 seen in the EI-MS analysis. Finally, by chemical ionization an important fragment (relative abundance 90%) was detected at m/z 631 (data not shown). Thus, it was concluded that the major meroaldehyde produced by the compound under study was actually m/z 632. Moreover, this fragment satisfied the formula given in Fig. 3, when an $n2 + n3$ value equal to 34 was considered. Then, the meroaldehyde at m/z 632 fragments to m/z 601 due to loss of $-\text{OCH}_3$ (Fig. 3a), because of the existence of the second ester group at the ω end. Similarly, an m/z 573 (Fig. 3a) was derived from a meroaldehyde at m/z 604 (very low intensity) ($n2 + n3$ equal to 32).

The value of $n3$ was deduced by taking into account the

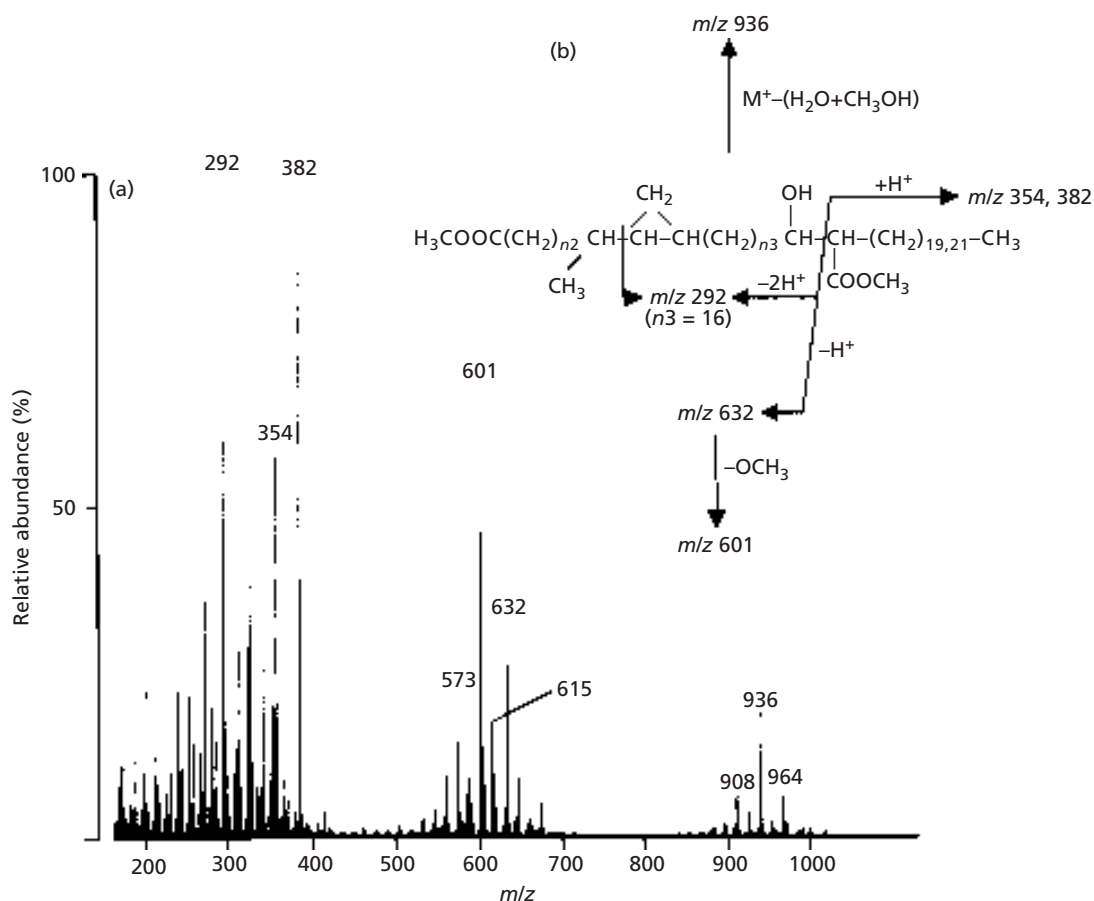


Fig. 3. (a) Partial EI-MS trace of dicarboxy-mycolates from *M. gordonae* ATCC 35759. (b) The structure and the general fragmentation pattern of the major component are included, showing the m/z ions corresponding to meroaldehydes (m/z 632, 601 and 292) methyl esters (m/z 354 and 382) and $M^+ - 50/z$ (m/z 936; loss of water and methanol).

presence of a very intense fragment at m/z 292 in the EI-MS analysis (Fig. 3a), which was derived from a breakdown between the cyclopropane ring and the carbon attached to the methyl branch and a further rearrangement. This fragment should indicate that for m/z 632, n_3 is equal to 16 and n_2 is equal to 18, and suggested that the major dicarboxy-mycolate from *M. gordonae* contains 63 carbon atoms, with an alkyl chain at C-2 of 20 carbon atoms (producing a $C_{22:0}$ methyl ester). For a meroaldehyde at m/z 604 ($n_2 = 16, n_3 = 16$), a compound with a molecular mass of 986 is also obtained assuming an alkyl chain of 22 carbon atoms at C-2 (producing a $C_{24:0}$ methyl ester), thus justifying a more intense peak at m/z 936 ($M^+ - 50$) (see above and Fig. 3) and at $(M + Na)^+ / z$ 1009 (data not shown).

The two remaining homologous compounds seen in the EI-MS analysis can also be formulated in a similar way. Thus, a C_{65} dicarboxy-mycolate with a molecular mass of 1014 is composed combining the m/z 632 meroaldehyde and the m/z 382 methyl ester; and a C_{61} dicarboxy-mycolate (molecular mass 958) is composed by combining m/z 604 (a meroaldehyde) and m/z 354 (a methyl ester).

Both $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 2) and MS [EI-MS (Fig. 3) and FAB-MS (data not shown)] predicted the presence of minor amounts of dicarboxy-mycolates with a *cis*-1,2-disubstituted-cyclopropane ring in the strains producing a HPLC-double-cluster pattern. The major meroaldehyde for this series was detected at m/z 646 (fragment at m/z 615; Fig. 3a), and the chain length varied between C_{60} and C_{64} according to the MS: pseudomolecular ions, $(M + Na)^+ / z$, were situated at 967 (C_{60}), 995 (C_{62} , probably the predominant pseudomolecular ion) and 1023 (C_{64}) (data not shown).

Structures of the other mycolates of *M. gordonae*

The structures of the remaining mycolates (α -, methoxy- and keto-mycolates) of strains ATCC 35759, CL-416C and ATCC 14470^T were established by $^1\text{H-NMR}$ and MS (EI-MS and positive-mode FAB-MS); the results of these analyses are presented in Table 1.

α -Mycolates from *M. gordonae* strains ATCC 35759 and CL-416C contained mainly two *cis*-1,2-disubstituted cyclopropane rings (their protons were located at $-0.32, 0.59$ and 0.64 p.p.m.), and even chain

Table 1. Structural characteristics of the major mycolates of strains of *M. gordonae*

Strain	Mycolate type	Chain length	Cyclopropane ring*		<i>cis</i> Double bond*	Major component	
			<i>cis</i>	<i>trans</i>		Chain length	<i>m/z</i> / <i>m/z</i> / <i>m/z</i>
ATCC 35759	Dicarboxy	C ₆₁ -C ₈₅	-	+	-	C ₈₀	-/18/16
	x	C ₇₄ -C ₈₄	+	-	-	C ₇₄ , C ₈₀	17/12/17†
	α	C ₇₄ , C ₈₀	+	-	+	C ₇₇	
	Methoxy	C ₇₂ -C ₈₅	+	-	-	C ₆₇	15/16/17†
	Methoxy	C ₇₄ -C ₈₄	-	+	-	C ₆₇	15/16/18†
	Keto	C ₇₆ -C ₈₅	-	+	-	C ₇₀ , C ₈₃	17/16/16†
CL-416C	Dicarboxy	C ₆₁ -C ₈₅	-	+	-	C ₈₀	-/18/16
	x	C ₇₂ -C ₈₄	+	-	-	C ₇₆ , C ₇₈	17/12/17†
	α	C ₇₆ -C ₇₈	+	-	+	C ₇₈	
	Methoxy	C ₇₂ -C ₈₅	+	-	-	C ₇₀ , C ₈₁	15/16/17†
	Methoxy	C ₇₄ , C ₈₄	-	+	-	C ₈₂	15/16/18†
	Keto	C ₇₆ -C ₈₅	-	+	-	C ₇₀ , C ₈₁	17/16/16†
ATCC 14470 ^T	x	C ₇₄ -C ₈₄	+	-	-	C ₇₄ , C ₇₈	17/12/17†
	Methoxy	C ₇₂ -C ₈₅	+	-	-	C ₆₇	15/16/17†
	Methoxy	C ₇₄ -C ₈₄	-	+	-	C ₆₇	15/16/18†
	Keto	C ₇₆ -C ₈₅	-	+	-	C ₆₇ , C ₈₃	17/16/16†

Dicarboxy-mycolates (<i>trans</i> -1,2-disubstituted cyclopropane)	α-Mycolates (di- <i>cis</i> -1,2-disubstituted cyclopropane)
$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H}_3\text{COOC}-(\text{CH}_2)_{n_1}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_{n_2}-\text{R} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \qquad \qquad \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n_1}-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_{n_2}-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_{n_3}-\text{R} \end{array}$
Methoxy-mycolates (<i>trans</i> -1,2-disubstituted cyclopropane)	α-Mycolates (<i>cis</i> double bond + <i>cis</i> -1,2-disubstituted cyclopropane)
$\begin{array}{c} \text{OCH}_3 \qquad \qquad \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n_1}-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_{n_2}-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_{n_3}-\text{R} \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n_1}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{n_2}-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_{n_3}-\text{R} \end{array}$
Methoxy-mycolates (<i>cis</i> -1,2-disubstituted cyclopropane)	Keto-mycolates (<i>trans</i> -1,2-disubstituted cyclopropane)
$\begin{array}{c} \text{OCH}_3 \qquad \qquad \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{n_1}-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_{n_2}-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_{n_3}-\text{R} \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n_1}-\text{CH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{n_2}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_{n_3}-\text{R} \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{CH}_3 \end{array}$
$\text{R} = \begin{array}{c} \text{C}(\text{HOH})-\text{CH}-(\text{CH}_2)_{n_4, n_5}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{COOCH}_3 \end{array}$	

* -, Absent; +, present.

† The given values are only tentative.

lengths of C₇₂-C₈₄ (major series at C₇₆ and C₇₈ for CL-416C, and at C₇₈ and C₈₀ for ATCC 35759). Major meroaldehyde ions (*m/z* 740, 768 and 796) and their fragments (*m/z* 279, 307, 487, 515 and 543), together with methyl ester fragments at *m/z* 354 and 382, permitted the tentative structures in Table 1 to be proposed (Draper *et al.*, 1982). Moreover, other compounds probably containing one *cis* double bond (resonance at 5.34 p.p.m.) and one *cis*-1,2-disubstituted

cyclopropane ring were also predicted in the two aforementioned strains; both EI-MS and FAB-MS signalled chain lengths of C₇₃-C₇₇. The ratio of -CH=CH- protons to 1,2-disubstituted cyclopropane ring protons was 21 and 22.7 for strains ATCC 35759 and CL-416C, respectively, implying that these compounds could represent approximately 20% of the total amount of α-mycolates present in these strains. Finally, *M. gordonae* ATCC 14470^T contained α-mycolates with only two *cis*-

1,2-disubstituted cyclopropane rings, which ranged from C₇₄ to C₈₀ (major compounds C₇₆ and C₇₈).

The methoxy-mycolates of strains ATCC 35759, CL-416C and ATCC 14470^T were identical (Table 1). They were clearly identified by ¹H-NMR due to characteristic overlapping signals at 0.85 (a methyl branch adjacent to the methoxy group of the meroaldehyde chain), 0.88 (a terminal methyl group) and 0.90 p.p.m. (a methyl branch adjacent to a 1,2-disubstituted cyclopropane ring), and also by signals at 2.95 (–CH–OCH₃) and 3.33 p.p.m. (–OCH₃). Methoxy-mycolates containing *cis*- (–0.32, 0.59 and 0.64 p.p.m.) or *trans*- (0.15 and 0.47 p.p.m.) 1,2-disubstituted cyclopropane series of C₇₃–C₈₇ were detected, with series of C₈₁ and C₈₂ predominant for strains ATCC 35759 and ATCC 14470^T, and series of C₈₁ and C₇₉ predominant for strain CL-416C. The ratio of *cis* to *trans* was approximately 1:1, and given the structure of methoxy-mycolates of other mycobacteria (Minnikin, 1982; Watanabe *et al.*, 2001), it seems that the odd series can be attributed to *cis* compounds and the even series can be attributed to *trans* compounds. Meroaldehydes from methoxy-mycolates were not found in EI-MS due, probably, to the loss of 31 mass units (–OCH₃), which resulted in a series of *m/z* ions ranging from 769 to 867 (separated by intervals of 14 mass units) that predicted meroaldehydes at *m/z* 800–898. Other fragments characteristic of meroaldehydes were located at *m/z* 297 (intensity 72%), 307 (intensity 19%) and 321 (intensity 16%); considering the *m/z* 354 and 382 for methyl esters, the tentative structure presented in Table 1 can be postulated for the major compounds found in the strains studied.

Keto-mycolates (Table 1) were characterized by resonances at 0.90 (a methyl branch adjacent to a 1,2-disubstituted cyclopropane ring), 1.05 (a methyl branch adjacent to the keto group in the meroaldehyde chain) and 2.32 p.p.m. (–CH₂–CO–). The major series varied from C₇₉ to C₈₅ and had one *trans*-1,2-disubstituted cyclopropane ring in the structure (resonances at 0.15 and 0.47 p.p.m.). C₈₁ and C₈₃ were the predominant series for strains ATCC 14470^T and ATCC 35759; C₈₁ and C₇₉ were the predominant series for strain CL-416C. FAB-MS also predicted very minor series of mycolates with a chain length of C₇₈–C₈₀ in the three aforementioned strains, probably containing a *cis*-1,2-disubstituted cyclopropane ring, as suggested by ¹H-NMR (data not shown). The tentative structure of the major keto-mycolate series is given in Table 1 and was based on the presence of important fragments at *m/z* 293, 491, 547 and 601 (derived from meroaldehydes), and at *m/z* 354 and 382 (methyl esters).

DISCUSSION

Analyses of mycolic acids are well established in mycobacterial taxonomy. Extensive studies have described mycolic acids as phenotypically stable chemical compounds, although the discontinuous distribution of the different structural types of mycolic acids described has important chemotaxonomic implications. Since the

1950s, GLC and TLC have been the chromatographic techniques most widely used to analyse the composition of mycobacterial mycolic acids as methyl esters (Daffé *et al.*, 1983; Minnikin *et al.*, 1984; Luquin *et al.*, 1991; Valero-Guillén *et al.*, 1985). In the 1990s, phenacyl esters of mycolic acids were separated by HPLC and detected under UV light (Butler & Guthertz, 2001). The strain-identification data generated by HPLC agree with 97% of the results from standard biochemical tests and 98% of the results from DNA probes; hence, HPLC can be used to correctly identify the majority of mycobacterial species of clinical interest (Butler & Guthertz, 2001; Thibert & Lapiere, 1993).

The elucidation of the structures of mycolic acids uses a variety of techniques (Minnikin, 1982), the most widely used of which are EI-MS and NMR. Recently, new techniques, such as matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight MS (MALDI/TOF-MS) (Laval *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001) and FAB-MS (Barry *et al.*, 1998), have been applied to the elucidation of these structures. In this study, FAB-MS data complemented the data obtained by EI-MS, giving more precise information on the molecular mass of the different structural types of mycolic acids present in *M. gordonae*. This information is not always evident when using EI-MS, as there is a tendency for several meroaldehydes (e.g. methoxy and dicarboxy) to break down further due to loss of –OCH₃.

Using HPLC, Cage (1992) demonstrated two different mycolic acid patterns for *M. gordonae* – a single-cluster pattern and a double-cluster pattern. In the present study, we have demonstrated that the second cluster of peaks present in the double-cluster pattern actually corresponds to dicarboxy-mycolates, and that these compounds essentially contain a *trans*-1,2-disubstituted cyclopropane ring, although a minor series with a *cis*-1,2-disubstituted cyclopropane has also been detected. As reported by Lanéelle & Lanéelle (1970), dicarboxy-mycolates and secondary alcohols (2-eicosanol and 2-octadecanol) are naturally combined in the cell wall to form wax-ester mycolates. These compounds are widely distributed in mycobacteria (Barry *et al.*, 1998; Luquin *et al.*, 1991; Minnikin *et al.*, 1984, 1985a), but only a limited number of studies have dealt with their structural elucidation. Thus, the dicarboxy-mycolates of *Mycobacterium phlei* (see Minnikin, 1982) are mixtures of unsaturated and cyclopropyl homologues, and differ from those found in *M. gordonae*, in which only cyclopropyl derivatives were detected.

Taking into account the presence of 2-octadecanol and 2-eicosanol in the *M. gordonae* strains containing dicarboxy-mycolates, the chain length of wax-ester mycolates from *M. gordonae* should range from C₈₁ to C₈₅ for the principal components, which is similar to the chain lengths detected for the principal keto-mycolates. Like the keto-mycolates, the major series of the wax-ester mycolates contain a *trans*-1,2-disubstituted cyclopropane ring, thus supporting the hypothesis that keto- and wax-ester mycolates are biosynthetically related (Minnikin, 1982; Barry *et al.*, 1998).

Partial structural analyses of α -, methoxy- and keto-mycolates from *M. gordonae* have been reported previously (Daffé *et al.*, 1981; Minnikin *et al.*, 1985b). However, for the first time, our work has established the nature of the double bonds and the cyclopropyl rings in this species. Thus, α -mycolates from *M. gordonae* are mostly of type-1, as defined by Watanabe *et al.* (2001) – i.e. they contain two cyclopropyl rings with no double bonds. Most slow-growing mycobacterial species examined to date (Minnikin, 1982; Watanabe *et al.*, 2001) contain predominantly this type of α -mycolate, with a *cis* to *trans* ratio of 1:0 (Watanabe *et al.*, 2001), as in the case of *M. gordonae*, although minor series of *trans*-cyclopropyl α -mycolates have been found in *Mycobacterium kansasii* and in the *Mycobacterium avium* complex (Watanabe *et al.*, 2001). However, other types of α -mycolates have been defined in several mycobacterial species (Watanabe *et al.*, 2001), but only the so-called type-3 α -mycolate (one *cis*-cyclopropyl ring plus one *cis* double bond) seems to be present in the *M. gordonae* strains containing dicarboxy-mycolates (this study). This type of α -mycolate has also been characterized in several strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium microti* and in strains of the *M. avium* complex (Watanabe *et al.*, 2001). The aforementioned species also contain a variety of methoxy-mycolates, the major ones being of the type methoxy-mycolate-1 (Watanabe *et al.*, 2001) (one series with a *cis*-cyclopropyl ring and one series with a *trans*-cyclopropyl ring), a characteristic shared by *Mycobacterium leprae* (Draper *et al.*, 1982) and, according to our results, by *M. gordonae*. As for its α -mycolates, *M. gordonae* seems to lack *trans* double bonds or additional cyclopropyl rings in the mero-aldehyde chain and, contrary to other mycobacteria (Watanabe *et al.*, 2001), it lacks methoxy-mycolates with *cis* double bonds. Among the keto-mycolates of *M. gordonae*, we only detected the keto-mycolate-1 (Watanabe *et al.*, 2001), generally with a *trans*-cyclopropyl ring. Hence, the keto-mycolates of *M. gordonae* resemble those of species such as *M. kansasii* and *M. avium*, and differ from those of the *M. tuberculosis* complex, where, in general, the *cis* to *trans* ratio is more balanced (Watanabe *et al.*, 2001).

According to the results cited above, it seems that a high proportion of the mycolic acids of *M. gordonae* have *trans* cyclopropanation, but like other mycobacteria (Barry *et al.*, 1998; Minnikin, 1982; Watanabe *et al.*, 2001) *M. gordonae* still maintains a *cis* configuration in the cyclopropyls of its α -mycolates. An appropriate ratio in the *cis* to *trans* geometry of both double bonds and cyclopropyls seems to have physiological significance for the bacterial cell wall, but its true relevance remains to be elucidated (Barry *et al.*, 1998).

The *M. gordonae* clinical strains studied here exhibit PRA patterns III and V, which are only present in 12% of *M. gordonae* isolates (Telenti *et al.*, 1993). The mycolic acid pattern exhibited by these clinical isolates is also uncommon in members of the genus *Mycobacterium*, as the presence of α -, methoxy-, keto- and

dicarboxy-mycolates has only been reported in two additional species of the genus, *Mycobacterium komosense* and *Mycobacterium bohemicum* (Minnikin *et al.*, 1985a; Torkko *et al.*, 2001).

We conclude that the variability in the mycolic acid patterns of strains of *M. gordonae*, as detected by HPLC and TLC, exists because of the presence of additional components (dicarboxy-mycolates) in some strains of this species. These additional components give rise to the HPLC-double-cluster pattern. Hence, our findings reiterate the heterogeneity of *M. gordonae* reported previously by several authors (Kirschner & Böttger, 1992; Plikaytis *et al.*, 1992; Telenti *et al.*, 1993; Walton & Valesco, 1991).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr Gary D. Cage (Department of Health Services, Arizona, USA) for his kind collaboration in this work. The technical assistance of Lidia Hernández is gratefully acknowledged. We are also indebted to Dr J. Rodríguez (SACE, University of Murcia, Spain) for mass spectrometry analyses. This work was supported by grants PM98-0180, FIS 97/0584 and AYA 9800/01.

REFERENCES

- Barry, C. E., 3rd, Lee, R. E., Mdluli, K., Sampson, A. E., Schroeder, B. G., Slayden, R. A. & Yuan, Y. (1998). Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res* **37**, 143–179.
- Bernard, E., Michiels, J. F., Pinier, Y., Bourdet, J. F. & Dellamonica, P. (1992). Disseminated infection as a result of *Mycobacterium gordonae* in an AIDS patient. *AIDS* **6**, 1217–1218.
- Butler, W. R. & Guthertz, L. S. (2001). Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev* **14**, 704–726.
- Butler, W. R., Jost, K. C., Jr & Kilburn, J. O. (1991). Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* **29**, 2468–2472.
- Cage, G. D. (1992). High-performance liquid chromatography patterns of *Mycobacterium gordonae* mycolic acids. *J Clin Microbiol* **30**, 2402–2407.
- Clague, H., Hopkins, C. A., Roberts, C. & Jenkins, P. A. (1985). Pulmonary infection with *Mycobacterium gordonae* in the presence of bronchial carcinoma. *Tubercle* **66**, 61–63.
- Daffé, M., Lanéelle, M. A., Promé, D. & Asselineau, C. (1981). Étude des lipides de *Mycobacterium gordonae* comparativement à ceux de *M. leprae* et de quelques mycobactéries scotchromogènes. *Ann Microbiol (Paris)* **132B**, 3–12.
- Daffé, M., Lanéelle, M. A., Asselineau, C., Lévy-Frebault, V. & David, H. (1983). Intérêt taxonomique des acides gras des mycobactéries: proposition d'une méthode d'analyse. *Ann Microbiol (Paris)* **134B**, 241–256.
- Draper, P., Dobson, G., Minnikin, D. E. & Minnikin, S. M. (1982). The mycolic acids of *Mycobacterium leprae* harvested from experimentally infected nine-banded armadillos. *Ann Microbiol (Paris)* **133**, 39–47.
- Glickman, S. E., Kilburn, J. O., Butler, W. R. & Ramos, L. S. (1994). Rapid identification of mycolic acid patterns of mycobacteria by high-performance liquid chromatography using pattern recognition software and a *Mycobacterium* library. *J Clin Microbiol* **32**, 740–745.

- Kirschner, P. & Böttger, E. C. (1992). Microheterogeneity within rRNA of *Mycobacterium gordonae*. *J Clin Microbiol* **30**, 1049–1050.
- Lanéelle, M. A. & Lanéelle, G. (1970). Structure d'acides mycoliques et d'un intermédiaire dans la biosynthèse d'acides mycoliques dicarboxyliques. *Eur J Biochem* **12**, 296–300.
- Laval, F., Lanéelle, M. A., Déon, C., Monsarrat, B. & Daffé, M. (2001). Accurate molecular mass determination of mycolic acids by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* **73**, 4537–4544.
- Le Dantec, C., Duguet, J.-P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S. & Vincent, V. (2002). Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1025–1032.
- Leoni, E., Legnani, P., Mucci, M. T. & Pirani, R. (1999). Prevalence of mycobacteria in a swimming pool environment. *J Appl Microbiol* **87**, 683–688.
- London, R. D., Damsker, B., Neibart, E. P., Knorr, B. & Bottone, E. J. (1988). *Mycobacterium gordonae*: an unusual peritoneal pathogen in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Med* **85**, 703–704.
- Luquin, M., Roussel, J., López-Calahorra, F., Lanéelle, G., Ausina, V. & Lanéelle, M. A. (1990). A novel mycolic acid in a *Mycobacterium* sp. from the environment. *Eur J Biochem* **192**, 753–759.
- Luquin, M., Ausina, V., López-Calahorra, F., Belda, F., García-Barceló, M., Celma, C. & Prats, G. (1991). Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria. *J Clin Microbiol* **29**, 120–130.
- Minnikin, D. E. (1982). Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In *The Biology of the Mycobacteria*, vol. 1, pp. 95–184. Edited by C. Ratledge & J. L. Stanford. London: Academic Press.
- Minnikin, D. E., Minnikin, S. M. & Goodfellow, M. (1982). The oxygenated mycolic acids of *Mycobacterium fortuitum*, *M. farcinogenes* and *M. senegalense*. *Biochim Biophys Acta* **712**, 616–620.
- Minnikin, D. E., Minnikin, S. M., Parlett, J. H., Goodfellow, M. & Magnusson, M. (1984). Mycolic acid patterns of some species of *Mycobacterium*. *Arch Microbiol* **139**, 225–231.
- Minnikin, D. E., Minnikin, S. M., Parlett, J. H. & Goodfellow, M. (1985a). Mycolic acid patterns of some rapidly-growing species of *Mycobacterium*. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg Ser A* **259**, 446–460.
- Minnikin, D. E., Dobson, G., Goodfellow, M., Draper, P. & Magnusson, M. (1985b). Quantitative comparison of the mycolic and fatty acid compositions of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium gordonae*. *J Gen Microbiol* **131**, 2013–2021.
- Papapetropoulou, M., Tsintzou, A. & Vantarakis, A. (1997). Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece. *Can J Microbiol* **43**, 499–502.
- Plikaytis, B. B., Plikaytis, B. D., Yakrus, M. A., Butler, W. R., Woodley, C. L., Silcox, V. A. & Shinnick, T. M. (1992). Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* **30**, 1815–1822.
- Rusconi, S., Gori, A., Vago, L., Marchetti, G. & Franzetti, F. (1997). Cutaneous infection caused by *Mycobacterium gordonae* in a human immunodeficiency virus-infected patient receiving antimycobacterial treatment. *Clin Infect Dis* **25**, 1490–1491.
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E. C. & Bodmer, T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* **31**, 175–178.
- Thibert, L. & Lapierre, S. (1993). Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* **31**, 1759–1763.
- Torkko, P., Suomalainen, S., Iivanainen, E. & 7 other authors (2001). Characterization of *Mycobacterium bohemicum* isolated from human, veterinary, and environmental sources. *J Clin Microbiol* **39**, 207–211.
- Tsukamura, M. (1967). Identification of mycobacteria. *Tubercle* **48**, 311–338.
- Valero-Guillén, P. L., Pacheco, F. & Martín-Luengo, F. (1985). Fatty acid composition and mycolic acid pattern of some chromogenic mycobacteria. *J Appl Bacteriol* **59**, 113–126.
- Vogiatzakis, E., Stefanou, S., Skroubelou, A., Anagnostou, S., Marinis, E. & Matsiota-Bernard, P. (1998). Molecular markers for the investigation of *Mycobacterium gordonae* epidemics. *J Hosp Infect* **38**, 217–222.
- Walton, D. T. & Valesco, M. (1991). Identification of *Mycobacterium gordonae* from culture by the Gen-Probe Rapid Diagnostic System: evaluation of 218 isolates and potential sources of false-negative results. *J Clin Microbiol* **29**, 1850–1854.
- Watanabe, M., Ohta, A., Sasaki, S. & Minnikin, D. E. (1999). Structure of a new glycolipid from the *Mycobacterium avium*–*Mycobacterium intracellulare* complex. *J Bacteriol* **181**, 2293–2297.
- Watanabe, M., Aoyagi, Y., Ridell, M. & Minnikin, D. E. (2001). Separation and characterization of individual mycolic acids in representative mycobacteria. *Microbiology* **147**, 1825–1837.
- Wayne, L. G. & Kubica, G. P. (1986). Genus *Mycobacterium* Lehmann and Neumann 1896, 363^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1436–1457. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.

Received 16 April 2002; revised 11 July 2002; accepted 12 July 2002.

Trafficking pathways of mycolic acids: structures, origin, mechanism of formation, and storage form of mycobacteric acids

Elie Rafidinarivo,^{2,*†} Marie-Antoinette Lanéelle,^{*,†} Henri Montrozier,^{*,†} Pedro Valero-Guillén,[§] José Astola,^{**} Marina Luquin,^{**} Jean-Claude Promé,^{*,†} and Mamadou Daffé^{1,*,§}

Université Paul Sabatier (Toulouse III),* Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (IPBS), 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France; Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche 5089),[†] IPBS, Department 'Mécanismes Moléculaires des Infections Mycobactériennes,' 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France; Departamento de Genética y Microbiología,[§] Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, Spain; and Departament de Genètica y Microbiologia,^{**} Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

Abstract Mycolic acids, the hallmark of mycobacteria and related bacteria, are major and specific components of their cell envelope and essential for the mycobacterial survival. Mycobacteria contain structurally related long-chain lipids, but the metabolic relationships between these various classes of compounds remain obscure. To address this question a series of C₃₅ to C₅₄ nonhydroxylated fatty acids (mycobacteric acids), ketones, and alcohols structurally related to the C_{70–80} dicyclopropanated or diethylenic mycolic acids were characterized in three mycobacterial strains and their structures compared. The relationships between these long-chain acids and mycolic acids were established by following the *in vivo* traffic of ¹⁴C labeled α -mycolic acids purified from the same mycobacterial species. The labeling was exclusively found in mycobacteric acids. The mechanism of this degradation was established by incorporation of ¹⁸O₂ into long-chain lipids and shown to consist in the rupture of mycolic acids between carbon 3 and 4 by a Baeyer-Villiger-like reaction. We also demonstrated that mycobacteric acids occur exclusively in the triacylglycerol (TAG) fraction where one molecule of these acids esterifies one of the three hydroxyl groups of glycerol. Altogether, these data suggest that these compounds represent a pathway of metabolic energy that would be used by mycobacteria in particular circumstances.—Rafidinarivo, E., M-A. Lanéelle, H. Montrozier, P. Valero-Guillén, J. Astola, M. Luquin, J-C. Promé, and M. Daffé. **Trafficking pathways of mycolic acids: structures, origin, mechanism of formation, and storage form of mycobacteric acids.** *J. Lipid Res.* 2009. 50: 477–490.

Supplementary key words mycobacteria • biosynthesis • catabolism • Baeyer-Villiger reaction • oxidation

Mycolic acids, 2-alkyl-branched, 3-hydroxylated long-chain fatty acids, represent major (up to 40% of cell wall dry mass) and specific constituents of the envelope of members of the genus *Mycobacterium* (*M.*) that includes several pathogens such as *M. tuberculosis* and *M. leprae*, the causative agents of tuberculosis and leprosy, respectively. These fatty acids play a crucial structural role in the envelope architecture (1–4) and are essential for the mycobacterial growth (5–7). Mycolic acids covalently linked to the cell wall arabinogalactan are organized with other lipids to form an outer barrier with an extremely low fluidity that confers an exceptional low permeability to mycobacteria (8). Trehalose mycolates, found noncovalently attached to the cell wall core, are known to be important for the physiology and virulence of *M. tuberculosis* (3). In addition, the biosynthesis of mycolic acids is the target of several antituberculous drugs, notably isoniazid (2, 3, 9).

Mycolic acids are found in mycobacterial species as a mixture of structurally related molecules that differ from one another by the nature of the chemical groups at the so-called “proximal” and “distal” positions (relative to the carboxyl group) of their main “meromycolic” chain (Fig. 1). The least polar α -mycolates is ubiquitous in mycobacteria and consist of C_{74–82} fatty acids that contain two *cis* cyclopropyl groups or *cis/trans* double bonds at the proximal and distal positions (Fig. 1); shorter apolar structural analogs (C_{60–68}), called α' -mycolates, may occur in some

The NMR equipment was funded via European structural funds, CNRS, and the Région Midi-Pyrénées funds as part of the 2000–2006 CPER program.

Manuscript received 22 July 2008 and in revised form 3 September 2008.

Published, JLR Papers in Press, September 4, 2008.

DOI 10.1194/jlr.M800384JLR200

Abbreviations: amu, atomic mass unit; BVMO, Baeyer-Villiger monooxygenases; EI, electron impact; MALDI-TOF, MALDI-time-of-flight; MS, mass spectrometry; TAG, triacylglycerol.

¹To whom correspondence should be addressed.

e-mail: mamadou.daffe@ipbs.fr

²Present address of E. Rafidinarivo: Ecole Normale Niveau III, B.P. 881, 101 Antananarivo, Madagascar.

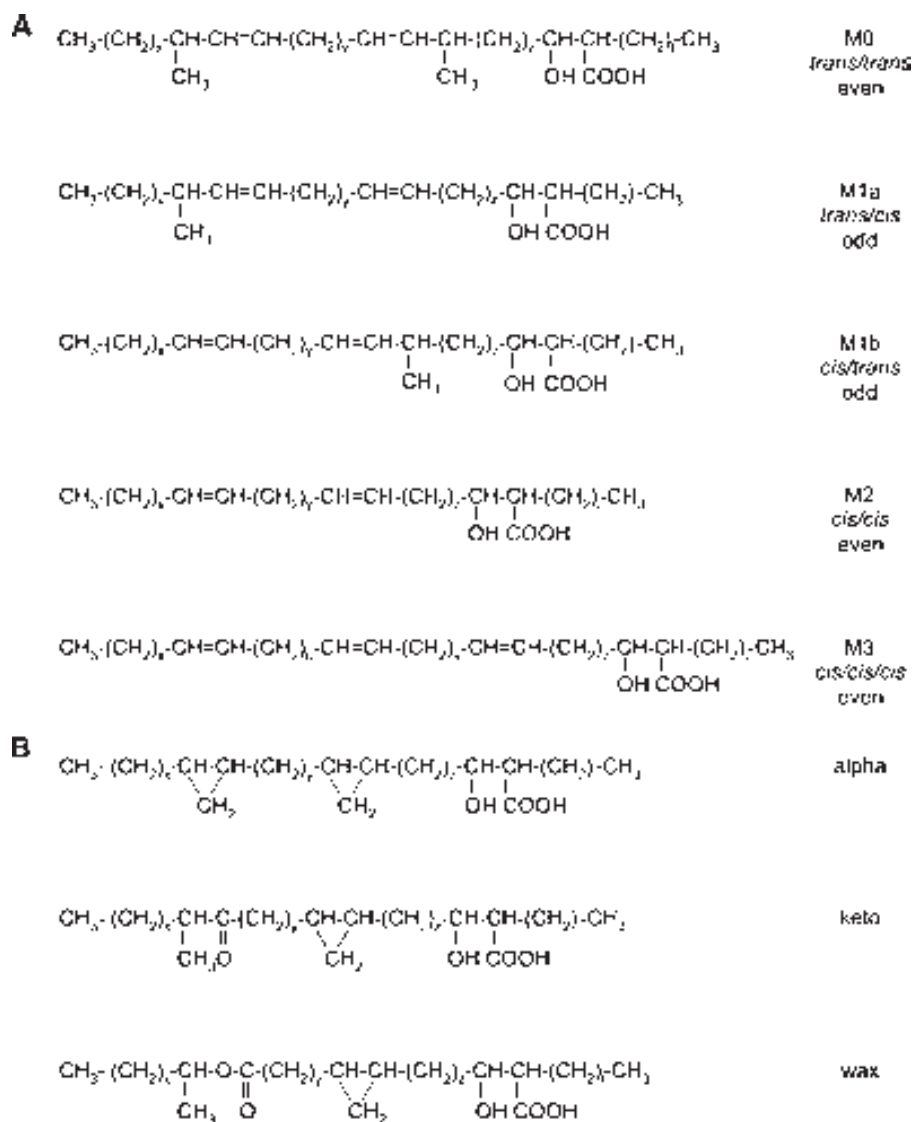


Fig. 1. Structures of the major mycolic acids from *Mycobacterium* (*M. brumae* and *M. fallax* (A) and *M. aurum* (B)). *M. brumae* contains four different types of diethylenic mycolates, namely M0 ($x = 15; y = 12; z = 17; l = 19$), M1a ($x = 15; y = 13; z = 17, 19; l = 19$), M1b ($x = 15; y = 13; z = 15, 17, 19; l = 19$), and M2 ($x = 13, 15; y = 10, 12, 14; z = 15, 17, 19; l = 19$) (28). *M. fallax* also contains four main types of diethylenic mycolates; however, this strain contains M1a ($x = 15, 17; y = 15, 17; z = 15, 17, 19; l = 19, 21$), M1b ($x = 15, 17; y = 15, 17; z = 17, 19; l = 19, 21$), and M2 ($x = 15, 17; y = 14, 16, 18; z = 15, 17, 19; l = 19, 21$), and is devoid of M0 but contains M3 ($x = 13, 15; u = 4; v = 12, 14; z = 15, 17, 19; l = 19, 21$). In addition, small amounts of tetraethylenic homologs occur in this species (31). *M. aurum* contains α - ($x = 13, 15, 17; y = 12, 14, 16; z = 17, 19; l = 19, 21$), keto- and wax-mycolates ($x = 13, 15, 17; y + z = 27, 31, 33; l = 19, 21$). *cis* (*E*) and *trans* (*Z*) are relative to the configuration of the double bonds. “Odd” and “even” refer to the chain lengths of the mycolates.

rapid-growing species such as *M. smegmatis*. More polar mycolates are also produced by most mycobacteria. These contain an oxygenated function at the distal position, with a methyl group on the vicinal carbon atom, and a *cis* or *trans* (with a methyl group on the vicinal carbon atom) cyclopropyl group or double bond at the proximal position. Depending on the mycobacterial species examined, the oxygenated function may be a methoxy-, a keto-, a hydroxyl-group (in slow-growing species), or an epoxy-ring (in rapid-growing species); in some species, the keto-mycolic acids may be oxidized through a Baeyer-Villiger reaction

to yield a wax ester (2, 10). An illustration of the structural diversity of mycolic acids is given by the composition of mycolic acids of the strains under study (i.e., *M. brumae*, *M. aurum*, and *M. fallax*) (Fig. 1).

Long-chain compounds structurally related to mycolic acids are also found in more or less significant amounts in mycobacteria and related genera (e.g., *Nocardia*, *Corynebacterium*); these include long-chain acids, ketones, and alcohols whose general structures are given in **Table 1**. Long-chain C_{40-56} fatty acids that exhibit the structural features of the main chains of mycolic acids have been

TABLE 1. General formulae of long-chain lipids structurally related to mycolic acids and comparison of odd/even ratios of their chain lengths in *Mycobacterium (M.) fallax*

		Odd/even ratios of compounds		
		M1	M2	M3
Mycolic acids (e)	R₁-CH₂-CH(OH)-CH(COOH)R₂	0.74	0.30	0.16
Mycolones (a)	R₁-CH₂-CO-R₂	0.78	0.25	0.26
Mycolols (d)	R₁-CH₂-CH(OH)-R₂	0.75	0.20	0.20
Meroaldehydes	R₁-CH₂-CHO	0.74	0.36	0.19
Primary alcohols (f)	R₁-CH₂OH	0.23	0.82	0.79
Mycobacteric acids (b)	R₁-COOH	0.20	0.73	0.81

M1, M2, and M3 refer to the structural features (numbers and configuration of double bonds) of compounds relative to their putative mycolic acid parents: M1 (two double bonds, mixture of M1a and M1b), M2 (two *cis* double bonds), and M3 (three double bonds) that occur in *M. fallax* (see Fig. 1A); compound M1 is a mixture of 1a (*trans/cis*) and 1b (*cis/trans*). Note that *M. fallax* is devoid of M0. The various types of mycolates from *M. fallax* were separated by argentation TLC as **M1a** and **M1b**, **M2** and **M3** (Fig. 1A). Each class of mycolic acids was then pyrolysed to yield the corresponding meroaldehydes. The same argentation TLC strategy was applied to the minor long-chain compounds (i.e., mycolols, primary alcohols, and mycobacteric acids). After purification, mycolic acids and their structurally related lipids were analyzed and their structures were characterized by mass spectrometry. The calculation of the odd/even (relative to the chain lengths of the molecules) ratios reported was based on the relative abundance of the mass peaks determined for the different homologs. The structural features shared by the various classes of compounds are in bold. Letters into brackets refer to compounds presented in TLC (Fig. 2).

characterized in various mycobacteria and are known as mycobacteric acids (11–15). Their structures have been shown to be related to those of mycolic acids from the same species. For instance, keto and methoxyl groups were shown to occur in mycobacteric acids and mycolic acids isolated from *M. tuberculosis* (11); similarly, keto and wax functions were found in both types of fatty acids isolated from *M. aurum* (16). A series of shorter homologous fatty acids have been also isolated from triacylglycerols (TAGs) of a *Nocardia* species; these consist in C_{35–45} fatty acids containing 3 and 4 double bonds as observed in nocardomycolic acids (17). In addition, long-chain ketones and secondary alcohols parented to mycolic acids have been also found in mycobacteria (e.g., the so-called C₈₀ mycolones and mycolols) (18, 19), in nocardia (C_{50–60} nocardones, nocardols) (20–23), and in corynebacteria (16-hentriacontanone or palmitone) (24, 25). Interestingly, shorter-chain secondary alcohols and ketones (hentriacontan-16-ol and palmitone) have also been characterized in nocardia (26, 27). Because of the above-mentioned similar structural features, it is tempting to postulate biosynthetic or catabolic links between mycolic acids and the other long-chain compounds. To address this question, mycolic acids and their related lipids from *M. brumae* and *M. fallax*, two species that contain only one type of mycolates, the so called α -mycolates (Fig. 1) (28, 29), were isolated, purified, and comparatively analyzed by various complementary analytical methods. In addition, the *in vivo* trafficking of labeled mycolates in *M. aurum*, a species known to metabolize lipids, was investigated to validate the conclusions drawn from the structural findings. Importantly, because the elongation unit in the biosynthesis of mycolates is acetate (C₂), the major homologs contain an even number carbon atoms. The introduction of a methyl branch or a cyclopropyl group results in the production of mycolates possessing an odd number of carbon atoms whereas that of two cyclopropyl groups or two methyl branches does not change the parity. The number of double bonds in mycolates, usually

one in oxygenated compounds and two in α -mycolates with the notable exception of *M. fallax*, does not impact on the even carbon number of the chains (Fig. 1). Therefore, the even versus odd ratio of the chain lengths of the structurally related lipids was determinant in the definition of the biosynthetic relationships between the long-chain lipids and the mechanism that governs their catabolism.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and media

The type strain of *M. brumae* Collection Institut Pasteur (CIP) 103465^T (28) was grown in Sauton's medium as surface pellicles at 37°C for 3 weeks. That of *M. fallax* CIP 8139^T (29) was grown in Middlebrook 7H9 medium supplemented with 0.5% casitone and 1% glucose (Difco, Detroit, MI) at 30°C under agitation. *M. aurum* strain A⁺ was obtained from Pr H. David (Institut Pasteur, Paris) and was grown on Middlebrook 7H9 medium (Difco) supplemented with 0.5% casitone and glucose 1% at 37°C under agitation.

Lipid extraction and purification from *M. brumae*

Complex lipids were extracted from wet cells with CHCl₃/CH₃OH 1:2, 1:1, and 2:1 (v/v), successively. The crude lipid extracts were pooled and then fractionated by column chromatography on Florisil 100–200 mesh equilibrated in petroleum ether, using a gradient of diethyl ether in petroleum ether as eluent. TAGs were eluted with petroleum ether/ether 90:10 (v/v). Free fatty acids were eluted from the column with diethyl ether containing 0.1% acetic acid. The separation was monitored by TLC and infrared spectroscopy for the detection of *trans* double bonds at 965 cm⁻¹.

Saponification of complex lipids

Lipids were saponified using a 5% KOH solution in methanol/benzene 8:2 (v/v) for 7 h under reflux. After acidification of the mixture and extraction of lipids with diethyl ether, the organic phase was dried and treated with diazomethane. The resulting long-chain lipids (i.e., ketones, esters, and alcohols) were

fractionated by column chromatography on Florisil as previously described.

Isolation of lipids from *M. fallax*

Cells (17.5 g dry weight obtained from 10l of cultures) were extracted with $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ as previously indicated to yield 3.1 g crude lipid extract. After saponification, acidification, and methylation, lipids were fractionated on a Florisil column as previously described, and the separation was monitored by TLC. Mycolones (20 mg), mycobacteric esters (20 mg), mycolols (20 mg), and long-chain primary alcohols (10 mg) were obtained, in addition to α -mycolates (1.7 g) and fatty esters that were the main lipids of the mixture.

TLC

TLC was performed on silica gel coated plates (G-60 0.25 mm thickness, Merck, Darmstadt, Germany) developed with either CH_2Cl_2 or with an appropriate combination of petroleum ether/diethyl ether. Lipids (fatty esters, ketones alcohols, and TAGs) were located by spraying either Rhodamine B (0.01% in sodium dihydrogen phosphate 0.25 M) or molybdophosphoric acid (10% solution in ethanol), followed by charring. Glycolipids were detected with anthrone after elution with $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25/4 (v/v/v). For preparative TLC, the same solvents were used but the detection was obtained by spraying Rhodamine B and the visualization was performed under the UV light. The compounds were then scraped off the plates and extracted with diethyl ether and the ethereal solution was evaporated to dryness. The stain was eliminated by passing through a Florisil Pasteur pipette (1 cm length) that was irrigated with diethyl ether. Fatty acid methyl esters were further fractionated according to their double bond content on AgNO_3 -impregnated silica gel TLC plates developed with CH_2Cl_2 ; visualization was performed by spraying a 0.2% ethanolic dichlorofluorescein solution and the compounds were scraped off the plates and eluted with diethyl ether.

Oxidative cleavage of double bonds

Ethylenic lipids were cleaved by permanganate-periodate oxidation (30, 31). Briefly, lipids (around 20 mg) dissolved in benzene (0.6 ml) were added to a mixture of *t*-butanol (8 ml), aqueous 2.10^{-2} M sodium carbonate (2.4 ml), distilled water (1.2 ml) and periodate permanganate (5.4 ml). This last solution contained 0.1 M sodium periodate and potassium permanganate $2.5 \cdot 10^{-2}$ M in water. The oxidation was carried out at 30°C for 2 days with constant shaking. The reaction was stopped by adding sodium metabisulphite until discoloration. The solution was acidified with 20% sulfuric acid, and the resulting oxidation products were extracted with diethyl ether and the solvent evaporated. The crude extract was methylated with diazomethane and purified on preparative TLC with CH_2Cl_2 as developing solvent. Compounds were identified by GC-MS analysis according to their retention times and their fragmentation patterns (32).

Preparation of anilide derivatives of mycobacteric acids

Anilide derivatives were prepared as follows: the carbonyl group was first activated by adding 0.5 ml of a 20% solution of oxalyl chloride (Fluka) in anhydrous benzene to fatty acids (5 mg). The reaction was left at room temperature for 2 h, followed by heating at 50°C for 1 h. After evaporation of the solvent under nitrogen, 0.35 ml of a 20% solution of aniline (Aldrich) in anhydrous benzene (20-fold excess) was added to the acyl chloride. After 1 h at room temperature, the reaction mixture was heated at 70°C for 30 min. The solvent was evaporated, and the residue was dissolved in diethyl ether and the excess of aniline was removed by washing the diethyl ether phase with 1 M HCl. Anilides

were analyzed by TLC with hexane/dioxane 9:1 (v/v) as the running solvent and detected with Rhodamine B before high-pressure liquid chromatography.

Preparation of pyrrolidide derivatives of mycobacteric acids

Fatty acid methyl esters (1 mg) were dissolved in 1 ml of freshly distilled pyrrolidine (Aldrich chemicals Co., WI) and 0.1 ml acetic acid. The mixture was heated at 100°C for 30 min and cooled to room temperature. The amide so-formed was taken up in CHCl_3 , and the organic phase was washed with 1 M HCl and water (33). After evaporation, the purity of the derivatives was checked by TLC.

Pyrolysis of mycolic acid methyl esters

The pyrolytic reaction was realized at 300°C under vacuum and the oxidation of the yielded meroaldehydes was performed as previously described (34). The resulting meromycolic acids were methylated and purified by preparative TLC as described for long-chain lipids.

Catalytic hydrogenation of double bonds in long-chain alcohols

Around 5 mg of lipids were dissolved in 1 ml of hexane in the presence of 2 mg of platinum oxide. Hydrogenation was carried out under shaking for 2 h at room temperature. The mixture was then filtered off to remove the catalyst. The solvent was evaporated under vacuum. Electron impact (EI)-MS analysis showed that the hydrogenation was complete in these conditions.

Incorporation of ^{14}C acetate in long-chain lipids of *M. brumae*

To a growing culture of *M. brumae*, $1 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ of $1\text{-}^{14}\text{C}$ acetate (2GBq mmole^{-1}) were added. After 90 min, the medium was discarded and 30 ml of fresh Sauton's medium was added. At various time intervals (0, 24, 48, 72, 96, and 120 h) a loopful of cells was collected and saponified. Fatty acids were methylated and the profile of long-chain compounds (alcohols, ketones, and fatty esters) was analyzed by TLC with CH_2Cl_2 as developing solvent. The TLC plates were read using a PhosphoImager after a 48-h exposure.

Preparation of labeled $1\text{-}^{14}\text{C}$ mycolic acids of *M. aurum*

One $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ of [$1,2\text{-}^{14}\text{C}$] sodium acetate ($50\text{--}60 \text{ mCi mmol}^{-1}$) was added to a 72-h grown 100-ml culture. After a 90-min growth under shaking, bacteria were harvested by centrifugation and saponified.

Biotransformation of ^{14}C -labeled mycolic acids by *M. aurum*

An ethereal solution of ^{14}C -labeled mycolic acids (0.5 ml, specific radioactivity of $4.10^6 \text{ cpm mg}^{-1}$) was added to a 100 ml culture medium. Bacteria were then inoculated as a 1% suspension after the removal of diethyl ether and collected by centrifugation after a 72-h growth.

Growth under ^{18}O atmosphere

A 4-day culture of *M. fallax* was added to 250 ml medium in a vacuum flask to obtain a 1% cell suspension. Two vacuum 500 ml flasks were used in parallel: one for the assay and the second for the control. Each flask was filled with 250 ml culture medium and inoculated to obtain a 1% cell suspension. After a 5-day growth, the air was partly removed from each flask under a slight vacuum. Approximately 150 ml of $^{18}\text{O}_2$ (99% purity) was introduced in the assay flask and the same amount of $^{16}\text{O}_2$ was filled in the control flask. Both flasks were hermetically closed and the cultures were allowed to grow at 30°C for 48 h. Bacteria were then collected by

centrifugation and saponified. In order to estimate the amount of ^{18}O uptake, the relative abundances between m/z 803 and 805 were more precisely measured by multichannel detection.

Instrumentation

Infrared spectra were recorded using a Perkin-Elmer model FTIR 1600 apparatus. Samples were analyzed as a film between two NaCl discs.

The optical rotations of purified molecules at 589 nm ($[\alpha]_D$) were determined with a Perkin-Elmer model 141 polarimeter. Samples were dissolved in CHCl_3 (5 mg ml^{-1}).

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of the purified samples dissolved in CDCl_3 (100% D) were recorded using a Bruker Avance 600 MHz spectrometer equipped with a 5 mm TCI cryoprobe at 298 K. Chemical shifts values were relative to the internal CHCl_3 resonance (at 7.27 ppm).

High-pressure liquid chromatography was carried out on a Waters 6000A apparatus equipped with a μ Porasil ($0.39 \times 30 \text{ cm}$) column for adsorption chromatography; the elution was performed with hexane/dioxane 9/1 (v/v). The flow rate was 0.5 ml min^{-1} , and the detection was followed using an UV detector Waters 450 at 242 nm for chromophoric derivatives. All solvents were degassed by filtration under vacuum.

GC-MS was performed on a Hewlett-Packard 5989A mass selective detector connected to a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph. The temperature of the direct inlet probe was set at 270°C , the source temperature at 300°C , and the electron energy was 70 eV.

EI-MS was performed using a VG AutoSpec (Fison) instrument fitted with an EI ion source. The accelerating voltage was 8 kV, the electron energy was 70 eV, the source temperature was set at 250°C . The temperature of the solid probe was ramped from 100°C to 300°C in 10 min (35). The same instrument (provided with a caesium gun, 25 kV) was employed for fast-atom bombardment-MS in positive and negative modes; the accelerating voltage was 8 kV and the matrix used was *m*-nitrobenzyl alcohol.

MALDI-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) was performed on a 4700 Analyzer mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA) equipped with a Nd:YAG laser YAG (355 nm wave length) operating by pulses of 500 ps with a frequency of 200 Hz. Twenty-five hundred shots were accumulated in positive ion mode, and MS data were acquired using the instrument default calibration. Lipid samples were dissolved in CHCl_3 at a concentration of 1 mM, and were directly spotted onto the target plate as $0.5 \mu\text{l}$ droplets, followed by the addition of $0.5 \mu\text{l}$ of 2,5-dihydroxybenzoic acid (10 mg ml^{-1}) in $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1, v/v) (36). Samples were allowed to crystallize at room temperature.

The radioactivity was located using an automatic TLC linear analyzer Berthold LB 2832 or a PhosphorImager.

RESULTS

Mycobacteria contain long-chain lipids whose structures are related to those of mycolic acids. They consist on long-chain fatty acids, primary and secondary alcohols, and ketones (Fig. 2) (Table 1). As they are present in small amounts, usually less than 1% of saponified lipids, their detection on TLC is not easy. Accordingly and in order to visualize them and to follow their relationships with mycolic acids, exponentially grown cells of mycobacterial species were labeled with ^{14}C -acetate for 90 min. The medium was then discarded and replaced by a fresh medium and

the labeling was followed for various times (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, and 10 days) by taking off a loopfull of bacteria. After saponification of cells, the resulting lipid extracts were methylated and analyzed by TLC using CH_2Cl_2 as developing solvent. Besides mycolates (compounds e, Fig. 3) and C_{16-24} fatty esters (compounds c), which are the expected major constituents of the mixtures, mycobacteria accumulate substantial amounts of a variety of long-chain compounds (Fig. 3). Compound b, which corresponds to long-chain fatty esters, was also detected after methylation of *M. brumae* native lipids extracted from cells by organic solvents, indicating that these substances exist also as free acids.

Structural features of the long-chain fatty acids from *M. brumae*

To determine the structure of compounds b, free fatty acids were isolated by column chromatography of the extractable lipids from *M. brumae*. Following methylation with diazomethane, the main component of this fraction exhibited a mobility higher than that of nonhydroxylated fatty acid methyl esters (compound c) as observed for compound b on TLC using CH_2Cl_2 as developing solvent. Infrared spectroscopy of the methyl ester derivatives showed the characteristic bands of nonhydroxylated fatty esters: absorption bands assigned to C-H stretching at 2,921 and 2,845 cm^{-1} , to C = O stretching of carboxylic esters at 1,745 cm^{-1} and to long-chain deformations at 722 cm^{-1} . The presence of an intense band at 965 cm^{-1} was indicative of the occurrence of *trans* double bond(s) and suggestive of a methyl branch at their allylic position and, as a consequence, of negative optical rotation values, as found in mycolic acids (37). Consistently, a negative molecular rotation ($[\text{M}]_D = -42^\circ$) was measured for the purified ester.

^1H -NMR analysis of the methyl esters of the purified free fatty acids from *M. brumae* (compound b) showed the occurrence of characteristic signal resonances of long-chain fatty acids (Table 2); these include signals attributable to terminal CH_3 - (at 0.89 ppm, triplet, 3H), to $-\text{CH}_2$ - (at 1.28 ppm, broad signal), to $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$ (at 1.65 ppm, multiplet), and to $-\text{CH}_2\text{-COO-}$ (at 2.38 ppm, multiplet). More specific resonances were observed at 5.35 ppm (assigned to ethylenic protons, two multiplets, 2H), at 2.04 ppm ($-\text{CH}=\text{CH}-$) and 0.96 and 0.99 ppm (attributed to CH_3 - adjacent to double bonds). Successive uncouplings of vicinal CH protons allowed the identification of direct neighboring groups, whereas the analysis of the ^1H homonuclear 2D correlated spectroscopy spectrum further extended the attributions (data not shown). For instance, a cross-peak was observed between the proton resonance at 5.35 ppm ($\text{CH}=\text{CH-}$) and that at 2.04 ppm ($-\text{CH-CH}=\text{CH-}$); the latter resonance correlated with and that at 0.99 ppm (CH_3 - adjacent to double bonds). This allowed the location of a methyl branch at the α -position of a *trans* double bond. The main data deduced from the analysis of the ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra are consigned in Table 2 and consistent with the compounds being a mixture of long-chain ethylenic fatty esters with methyl branch(es) adjacent to *trans* double bond(s), as observed in the merochains of mycolic acids (28).

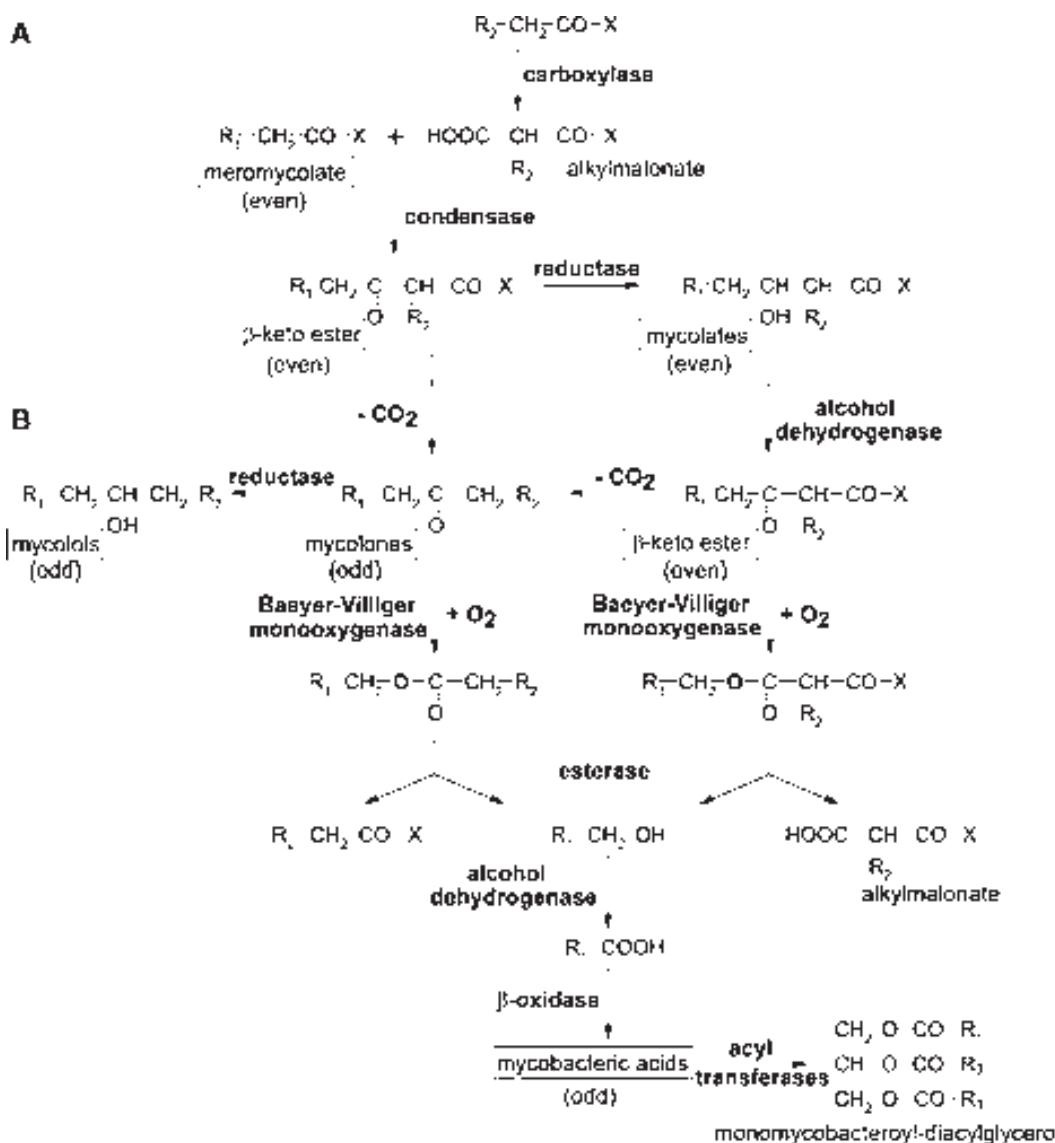


Fig. 2. Trafficking in mycolic acids pathways. A: Biosynthesis of mycolic acids. The long-chain acid at the origin of the meromycolic chain (R_1-CH_2-COOH with an even number of carbon atoms) is first activated (X), in the present case as an acyl AMP derivative. The R_2-CO-X (X = CoA) with 20, 22, or 24 carbon atoms at the origin of the α -branch chain in mycolates, is carboxylated as alkylmalonate. The condensation between the two activated derivatives gives the β -keto ester, the reduction of which leads to mature mycolic acids (with an even number of carbon atoms) that exist either as esters (X = trehalose or cell arabinogalactan). B: Degradation of mycolic acids. The β -keto ester intermediate in the synthesis of mycolates (with an even number of carbon atoms) and/or derived from the oxidation of mycolates would be decarboxylated (either as a consequence of the chemical hydrolysis of lipids or by a decarboxylase) to yield mycolones (with an odd number of carbon atoms). The β -keto esters, and possibly mycolones would be then oxidized, through the addition of an oxygen atom near the keto group by a putative Baeyer-Villiger monooxygenase, to yield a wax. The cleavage of the ester linkage would give primary alcohols (with an odd number of carbon atoms) whose oxidation would be at the origin of the C_{44-56} and their probably β -oxidation C_{35-44} series of mycobacteric acids. These latter substances were isolated both as free fatty acids and triacyl glycerol containing one mycobacteroyl residue (R_1-CO) and two moles of conventional (C_{16-18}) fatty acyl substituents (R_2-CO). The positions of the fatty acyl residues in the triacyl glycerol are arbitrary. Bold character **O** labels correspond to ^{18}O incorporated in lipids. "Even" and "odd" refer to the number of carbon atoms of lipid chains.

Analyses of the fatty acids, as free acids and as methyl ester derivatives by MALDI-TOF MS were unsuccessful. Molecular mass data were obtained by fast-atom bombardment and EI-MS of the free acids and were consistent with the occurrence of a family of C_{37-45} fatty acids of odd and even chain lengths (i.e., mycobacteric acids); the mass peaks of the major homologs were seen at 546, 560, 574 m/z and corresponded to fatty acids containing C_{37} , C_{38} , C_{39} with two unsaturations.

Localization of the double bonds in mycobacteric acids of *M. brumae*

Fatty acids methyl esters were submitted to oxidative cleavage and the resulting fragments, monocarboxylic and dicarboxylic acids, were methylated, purified by preparative TLC, and analyzed by GC-MS. The major monocarboxylic methyl ester was identified as a 2-methyl-octadecanoate (molecular mass peak at 312 m/z and base peak at 88 m/z); minor linear and branched homologs containing 15, 17,

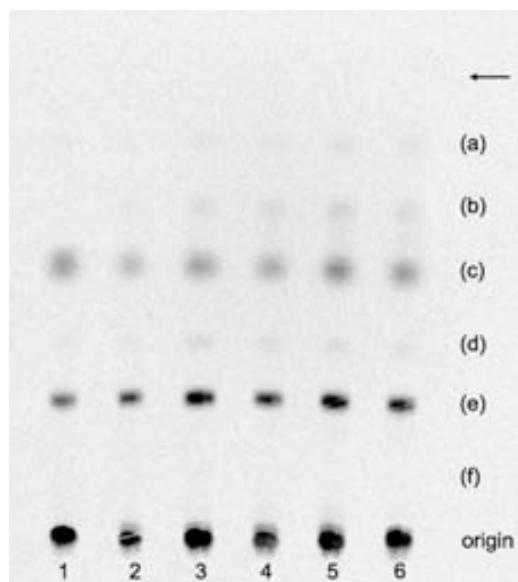


Fig. 3. Radio-TLC of the saponification products from *M. brumae*. Cells were labeled with ^{14}C acetate for 90 min, then the medium was discarded and a fresh Sauton's medium was added. At various time points (i.e., 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, and 10 days (lanes 1, 2, 3, 4, 5, and 6, respectively) aliquots were taken up and saponified. Lipids were extracted, methylated, and analyzed by TLC using dichloromethane as eluent. (a) mycolones, (b) mycobacteric acid methyl esters, (c) C_{16-24} fatty acid methyl esters, (d) mycolols, (e) methyl mycolates. (f) indicates the R_f of primary long-chain alcohols that are not detected in significant amounts in *M. brumae* but present in *M. fallax*. See Table 1 for general formula of the compounds. The arrow indicates the solvent front.

19, and 21 carbon atoms were also found. This result allowed us to localize the double bond at the ω -18 position of the molecules, as found in *M. brumae* mycolic acids (Fig. 1A) and in agreement with the occurrence of a methyl branch at ω -17 position and adjacent to a (*trans*) double bond, as revealed by NMR and infrared spectroscopies.

The dicarboxylic methyl esters arising from the oxidation of the double bonds consisted of a complex mixture of linear molecules with 12, 13, and 14 carbons and com-

TABLE 2. Assignments of the main resonance signals of the NMR spectra of the mycobacteric acids from *M. brumae*

	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	14.11	0.89**
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	22.68–24.67	1.28**
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	29.06–29.77	1.28
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH} = \text{CH-CH}(\text{CH}_3)\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	20.90–22.60	0.96*
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH} = \text{CH-CH}(\text{CH}_3)\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	36.69–37.23	2.04*
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH} = \text{CH-CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_n\text{-}$		1.28
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH} = \text{CH-CH}_2\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	31.92–32.58	1.99***
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH} = \text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_n\text{-}$		1.35***
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH} = \text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	29.06–29.77	1.28
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH} = \text{CH-CH}(\text{CH}_3)\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	136.45	5.25*–5.35*
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH} = \text{CH-CH}(\text{CH}_3)\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	128.41–130.19	5.25*–5.35*
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	37.23	2.38"
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	22.68–24.67	1.65"
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	29.06–29.77	1.28"
$-(\text{CH}_2)_n\text{-CH} = \text{CH-CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-COOH}$	20.90–22.60	0.99*

Bold characters indicate the proton and carbon atoms of interest.
* ** *** **** " Cross-peaks observed in homonuclear COSY spectrum.

pounds with shorter chain lengths that contained branched and linear molecules. As these substances corresponded to the chemical entities between the two double bonds and those located between the proximal double bond and the carboxyl group, it was not possible to precisely assign the identified dicarboxylic acids to one of the two classes. To circumvent this problem and to confirm the molecular masses of the dicarboxylic acids, the native purified fatty acid mixture was derivatized as pyrrolidides and analyzed by EI-MS (33). A regular series of peaks with 14 atomic mass units (amu) interval corresponded to the primary fragmentation of the polymethylene chain. All ions retained the pyrrolidide group. Interestingly, when a double bond is present in the molecule, a gap of 12 amu was observed between the two consecutive mass peaks. The position of the double bond can be deduced from a rule defined for mono- and polyenoic acid pyrrolidides (33).

The mass spectrum of *M. brumae* pyrrolidide derivatives of mycobacteric acids exhibited molecular ion peaks at 585, 599, 613, 627, and 641 m/z , which corresponded to the molecular masses of diethylenic C_{36} to C_{41} compounds (Table 3); the major mass peak was seen at 627 m/z and corresponded to a C_{39} diunsaturated pyrrolidide. However, due to the presence of carbon chain homologs and the possible presence of double bond isomers possessing or not methyl branch, no clear conclusion could be drawn from the analysis of the mixture. Consequently, the pyrrolidide derivatives were fractionated by argentation TLC, a technique that separates substances according to the number and configuration of the double bonds (28, 31), isolated and analyzed as above. The EI mass spectrum of the major purified compound showed an intense molecular ion at 627 m/z , the expected value for the $\text{C}_{39:2}$ pyrrolidide, with a base peak at 113 m/z that is originated from a McLafferty rearrangement (Fig. 4A). The presence of an intense peak at 402 m/z , attributable to the fragment bearing the methyl branch, indicated the occurrence of a methyl branch at the adjacent position of a (*trans*) double bond. Oxidative cleavage of this fraction, followed by methylation, yielded three compounds (Fig. 4A). GC-MS analysis of these molecules led to the identification of methyl esters of: *i*) 2-methyl octadecanoate (molecular ion at 312 m/z and base

TABLE 3. Chain lengths of *M. brumae* mycobacteric acid pyrrolidide derivatives

m/z	Carbon numbers	Relative abundance
697	44:2	0.05
683	43:2	0.10
669	42:2	0.10
655	431:2	0.35
641	40:2	0.55
627	39:2	1.00
613	38:2	0.50
599	37:2	0.60
585	36:2	0.40
571	35:2	0.05

Abundance refers to the proportion of the molecular mass of a given homolog in the mass spectrum of the mycobacteric acid derivatives relative to the major mass peak whose abundance was arbitrary fixed at 1. The main homologs are indicated in bold.

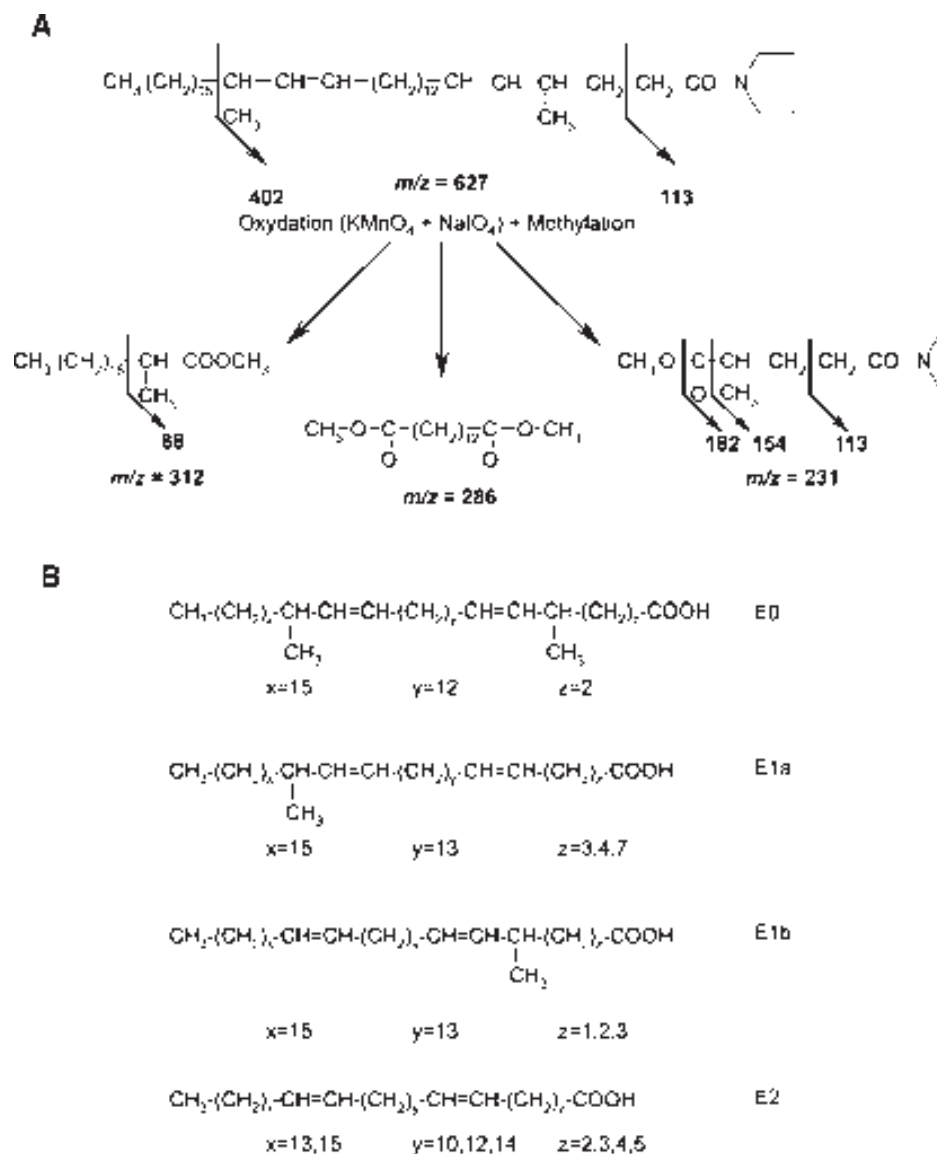


Fig. 4. Structures of the major homologs of mycobacteric acids from *M. brumae*. A: Illustration of the strategy used to establish the structures of mycobacteric acid derivatives deduced from the data from the electron impact (EI)-mass spectra of the pyrrolidide derivatives and from the characterization by GC-MS analyses of the fragments obtained after oxidative cleavage. The $\text{C}_{39}\text{H}_{74}\text{O}_2$ acid (E0) is given as an example. B: Structures of the major homologs of the mycobacteric acids: E0 refers to acids with 2 *trans* double bonds, E1a to molecules with *trans* and *cis* double bonds, E1b to substances with *cis* and *trans* double bonds and E2 to compounds with two *cis* double bonds.

peak at 88 m/z); *ii*) tetradecane-1,14-dioate (base peak at 98 m/z , due to a double cleavage (38), and molecular ion at 286 m/z); and *iii*) a C6 pyrrolidide (molecular mass at 213 m/z and base peak at 113 m/z) with additional peaks at 182 m/z (M-31) and 154 (Fig. 4A). Altogether these results established the structure of the major homolog of free mycobacteric acids of *M. brumae* as a 4,21-dimethyl-5,19-di-(*trans*)-enoyl-heptatriacontanoic acid (compound E0, Fig. 4B). Among the other homologs separated by argentation TLC, compounds E1a (Fig. 4B) related to M1a mycolic acids, were identified. Compounds containing one *cis* double bond in the distal part of the molecule and one *trans* double bond in the proximal portion of the molecule were also characterized (compound E1b, Fig. 4B). De-

tailed NMR analyses led us to propose for some of them the occurrence of a methyl group at the proximal part of the molecule, namely at C3, in agreement with both $^1\text{H-NMR}$ prediction (Table 2, data not shown). The most polar compound on argentation TLC was identified as a mixture of 5,21- and 7,23-di-enoyl pyrrolidides. Indeed, the configuration of the two double bonds was shown to be *cis*, and no methyl branch was detected by EI-MS and NMR analyses of the pyrrolidide derivatives (compounds E2, Fig. 4B). It is important to note, however, that although all the structures established for the mycobacteric acids E0, E1a, E1b, and E2 of *M. brumae* (Fig. 4B) are related, respectively, to mycolic acids M0, M1a, M1b, and M2 (Fig. 1), the fact that the major homolog E0 has an odd chain length

(C₃₉) was unexpected because mycolic acids (and their main meroc chains) that contain two methyl branches or two cyclopropyl rings have been observed to possess an even chain length in accordance with the proposed mechanism of synthesis of *trans* double bonds (39).

Identification of the natural forms of mycobacteric acids of *M. brumae*

The linked forms of the long-chain acids were investigated by fractionating the crude lipid extract by chromatography on a Florisil column and seeking for compounds with *trans* double bonds by infrared spectroscopy. The 965 cm⁻¹ absorption band that indicates the occurrence of *trans* double bonds was exclusively found associated with fractions eluted with petroleum ether/ether. Analysis of these fractions by TLC showed that they were composed of two compounds migrating in the region of TAGs: one of these, TAG2, exhibited an R_f similar to that of the standard tripalmitin, whereas the other, TAG1, was less polar. The two TAGs were purified by preparative TLC, and their infrared spectra were similar to that of tripalmitin except for the presence of an intense band at 965 cm⁻¹ in the spectrum of TAG1. Expectedly, the molecular rotation ([M]_D) of this triglyceride was negative (-40°), consistent with the contribution of the chiral methyl group adjacent to *trans* double bonds (28).

The ¹H-NMR spectra of TAG1 and TAG2 were compared with that of the commercial tripalmitin. They shared characteristic signals of triglycerides, notably those assignable to the proton resonances of the fatty acyl moiety at δ 0.85 (terminal CH₃, 9H, triplet), 1.23 (-CH₂, broad), 1.58 (-CH₂-CH₂-COO, 6H, distorted triplet), 2.28 (-CH₂-COO, 6H, two overlapping triplets). In addition, proton resonances attributable to those of methylene(s) and methine(s) bearing hydroxyl groups esterified by fatty acyl residues were observed at 4.09, 4.13, 4.25, and 4.28 ppm and assigned to those of positions 1 and 3 of glycerol (-CH₂-OOC); the resonance of the proton at position 2 of glycerol (-CH-OOC) was observed at δ 5.25. The spectrum of TAG1 also contained specific proton resonances of ethylenic long-chain esters observed at δ 5.25–5.35 (-CH = CH-), 2.04 [-CH = CH-CH(CH₃)-CH₂-], 0.96 [-CH = CH-CH(CH₃)-CH₂-] and 0.99 [-CH = CH-CH(CH₃)-CH₂-COO]. All the attributions were established by 2D homo- and heteronuclear correlated spectroscopy, demonstrating that TAG1 corresponded to a TAG that contained one or more fatty acyl residue(s) containing methyl branch(es) adjacent to the double bond(s).

To firmly establish the structure of TAG1, we determined the molecular masses of the triglyceride constituents of *M. brumae* by MALDI-TOF mass spectroscopy (Fig. 5). Compared with the spectrum of the commercial tripalmitin (Fig. 5A), which contained a major sodiated molecular ion peak observed at 829 *m/z* expected for a [C₅₁ H₉₈ O₆ Na], that of the TAG fraction of *M. brumae* was more complex. Two series of peaks were seen in its mass spectrum: one with of molecular ion peaks in the range of 773 to 1,051 *m/z* and the other massif at 1,105 to 1,344 *m/z*. The two massifs corresponded to the masses of TAG2

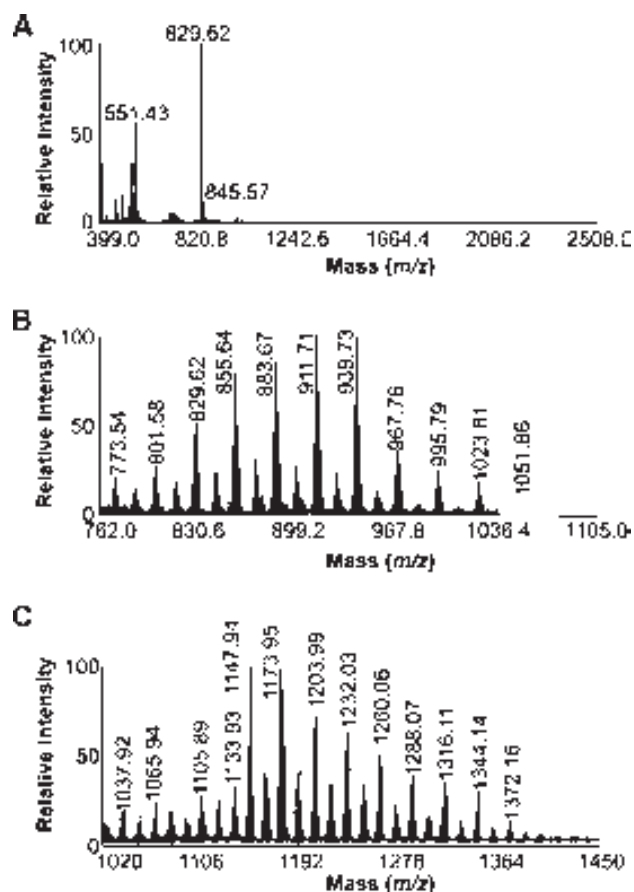


Fig. 5. MALDI-time-of-flight (TOF) spectra of triacylglycerols (TAGs). Mass spectra of the commercial tripalmitin (A), the product isolated from *M. brumae* (TAG2) with a R_f similar to that of tripalmitin (B) and the compound from *M. brumae* with a higher R_f (TAG1) (C). The R_fs of TAG1 and TAG2 from *M. aurum* are shown in Fig. 5A.

and TAG1, respectively, as demonstrated by the analysis of the mass spectra of the purified compounds (Fig. 5B, C). The spectrum of TAG2 exhibited a series of intense pseudomolecular ion peaks from 801 to 967 *m/z*, differing one another by 28 amu, and corresponding to the mass values of triglycerides composed of fatty acid substituents with C_{14–22}. (Fig. 5B). The mass spectrum of the purified TAG1 contained pseudomolecular ion peaks between 1,105 and 1,344 *m/z* (Fig. 5C). The major peak, seen at 1,147 *m/z* [C₇₄ H₁₄₀ O₆ Na], corresponded to the mass of a TAG molecule bearing one mole of C_{39:2} and two moles of C_{16:0} fatty acyl residues. The specific location of mycobacteric acids in TAG, a storage compound, suggested that they correspond to the degradation products of mycolic acids; consistent with this hypothesis is the observation that they have the same structural features as mycolic acids but with shorter and different ratios of odd versus even chain lengths.

Comparative structural analysis of the meromycolic acids and compounds derived from the metabolism of mycolic acids of *M. fallax*

To determine the possible biosynthetic relationships between mycolic acids and the structurally related long-chain

ketones, secondary and primary alcohols (compounds **a**, **d**, and **f**, respectively, Fig. 3) we directly compared their ratios of odd versus even chain lengths, a clear indication of catabolism, to those of the meroaldehyde chains obtained by pyrolytical cleavage of mycolic acids. For this purpose, *M. fallax* was chosen because this species accumulated more ketones and alcohols, notably compound **f**, than did *M. brumae*. The various types of mycolates from *M. fallax* were separated by argentation TLC as **M1a** and **M1b**, **M2**, and **M3** (Fig. 1A). Each class of mycolic acids was then pyrolysed to yield the corresponding meroaldehydes. The same argentation TLC strategy was applied to the long-chain compounds. After purification, mycolic acids and their structurally related minor lipids were analyzed and their structures compared. The results from MS analyses allowed calculating the ratios of odd/even chain lengths for each class of compounds (Fig. 1) (Table 1). Interestingly, the chain lengths of the meroaldehydes from mycolic acid pyrolysis were one carbon longer than those of the long-chain mycobacteric esters. Consistently, the ratio of odd versus even chains was reversed in the mycobacteric acids compared with mycolic acids and the corresponding meroaldehydes, mycolones, and mycolols (Fig. 1) (Table 1). This observation was also valid for long-chain primary alcohols. Furthermore, the meromycolic acids resulting from the reduction of the meroaldehydes exhibited carbon numbers between 50 and 55, whereas mycobacteric acids and long-chain primary alcohols contained a larger pool of homologs with shorter chain lengths, from C_{35–44} and C_{44–56}, respectively. Altogether, these data supported the hypothesis that mycobacteric acids (**b**) and the primary alcohols (**f**) derive from the mero aldehyde chain, whereas mycolones (**a**) and their reduced form (**d**) probably result from the decarboxylation of a β -keto ester.

Degradation of exogenic mycolic acids by *M. aurum*

The structural analogies between mycobacteric acids and the meromycolic chains suggest that the former compounds derive from the degradation of mycolic acids after the cleavage of the mycoloyl chain at the level of the α -branched/ β -hydroxylated structure, the so-called mycolic unit. To test this hypothesis, the strain A+ of *M. aurum* that is known to degrade exogenic lipids (40) was used. Accordingly, uniformly ¹⁴C labeled α -mycolic acids were prepared by growing strain A+ of *M. aurum* on a medium supplemented with ¹⁴C acetate. The labeled α -mycolates were purified and added to the growth medium of the same strain and their degradation was followed. Around 30% to 60% of the labeling was found in the extractable lipids. The labeling was observed in the TAG fraction and most exclusively in TAG1 (Fig. 6A), whereas no labeling was detected in phospholipids, trehalose mycolates, and bacterial residues. This labeled fraction was isolated by preparative TLC, saponified, and the resulting fatty acids were converted into their anilides derivatives and separated by normal phase liquid chromatography in two fractions, LC1 and LC2 (Fig. 6B). The anilide derivatives of the two fractions were analyzed by field desorption mass spectrometry, a technique that produces molecular ions without fragmentation of the car-

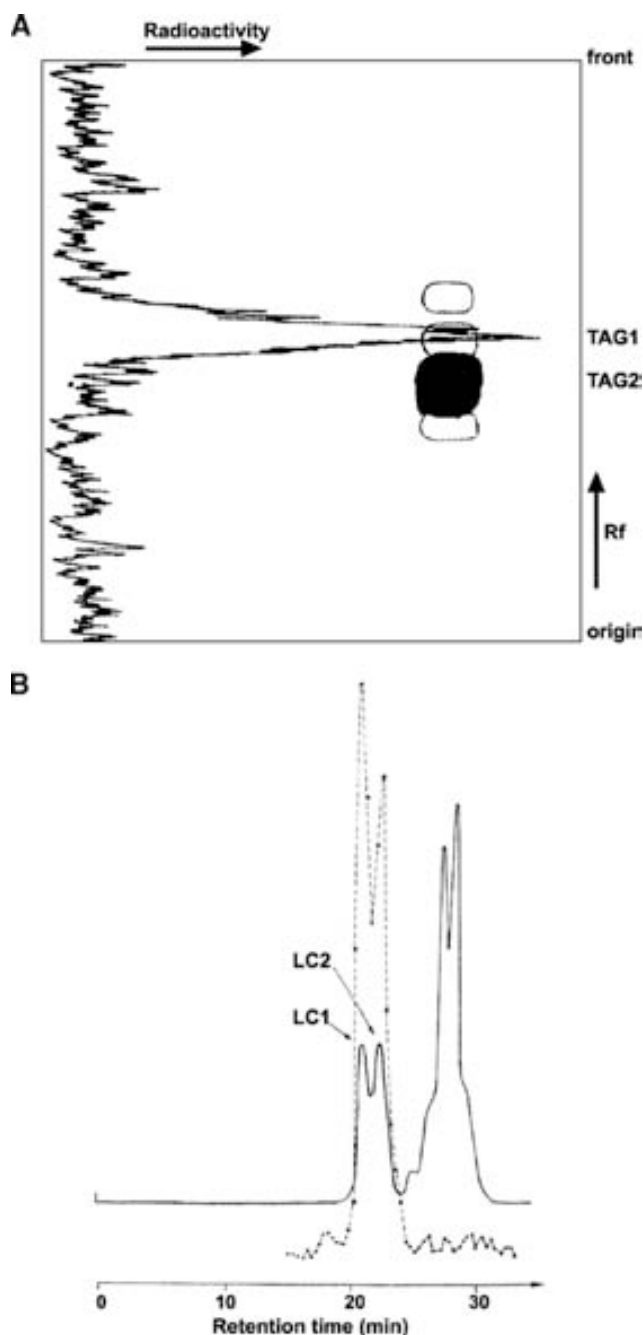


Fig. 6. Radio-TLC and -HPLC of the TAG fraction of *M. aurum*. Bacteria were grown in a medium containing ¹⁴C α -mycolate from *M. aurum* for 72 h under agitation. Cells were then extracted with chloroform/methanol and the resulting lipids were separated on a Florisil column. A: Radio-TLC of the TAG fraction eluted from the column with petroleum ether/ether 85:15 (v/v) and analyzed by TLC with the same solvent system. TAG1 and TAG2 correspond, respectively, to TAGs that contained long (C_{34–55}) and moderate (C_{16–24}) fatty acid chains. The mass spectra of the corresponding substances from *M. brumae* are shown in Fig. 4A, B, respectively. B: Labeling (dotted lines) and UV ($\lambda = 242$ nm) profiles of anilide derivatives of the fatty acids obtained by saponification of the TAG1 fraction. The acid derivatives were fractionated using a μ Porasil HPLC column (0.39 \times 30 cm) eluted with hexane/dioxane (9:1, v/v); a flow rate of 1 ml/min was applied. LC1 and LC2 correspond to the two classes of long-chain fatty acid anilide derivatives.

bon chain. Analysis of the mass spectra showed that the compounds consisted in a mixture of long-chain acids composed of both odd and even chain lengths (Table 4). LC2 was composed of acyl anilides having C₃₅ to C₄₄ acyl moieties, the most abundant corresponding to a C_{39:2} acyl group (molecular mass at 649 *m/z*), whereas LC1 consisted of homologs with 44 to 54 carbon atoms, with the main constituents being C_{49:2} and C_{50:2} acyl groups (molecular masses at 789 and 803 *m/z*). The metabolic products under study contained the two cyclopropyl rings found at the proximal and distal positions of the α -mycolates of *M. aurum* (Fig. 1B), consistent with a structural relationship between the latter compounds and the long-chain fatty acids LC1 and LC2 found in TAG1.

Incorporation of ¹⁸O in long-chain alcohols of *M. fallax*

Two processes of cleavage of mycolic acids may lead to these labeled mycobacteric acid dead products: *i*) a retro-Claisen reaction, the reverse process of mycolic acid condensation, that would lead to compounds with an even number of carbon atoms, as occurring during the biosynthesis of meromycolates; and *ii*) a Baeyer-Villiger oxidation (i.e., oxidation of a keto group by the addition of molecular oxygen to give a wax that would yield upon hydrolysis long-chain fatty alcohols possessing one carbon less than the meromycolates and an alkylmalonate) (Fig. 2). The ratio odd versus even chain lengths of mycobacteric acids characterized from *M. brumae* and *M. fallax* (see previous discussion) did not support the retro-Claisen hypothesis.

TABLE 4. Molecular masses and chain lengths of the mycobacteric acids obtained from the degradation of exogenous ¹⁴C-labeled α -mycolic acids from *M. aurum*

	<i>m/z</i>	Carbon numbers	Relative abundance
LC1	859	54:2	0.15
	845	53:2	0.39
	831	52:2	0.60
	817	51:2	0.94
	803	50:2	1.00
	789	49:2	1.00
	775	48:2	0.91
	761	47:2	0.83
	747	46:2	0.62
	733	45:2	0.32
	719	44:2	0.20
	LC2	719	44:2
705		43:2	0.25
691		42:2	0.46
677		41:2	0.67
663		40:2	0.72
649		39:2	1.00
635		38:2	0.67
621		37:2	0.17
607		36:2	0.15
593	35:2	0.05	

Triacyl glycerols (TAGs) were fractionated by TLC and the only labeled class of TAGs (TAG1, Fig. 5A) was purified, saponified, and the resulting long-chain fatty acids were transformed into their anilide derivatives, and separated by liquid chromatography into LC1 and LC2 (Fig. 5B). Abundance refers to the content of the homolog (relative to the major mass peak whose abundance was arbitrary fixed at 1) in the mycobacteric acid mixtures from LC1 and LC2. The main homologs are indicated in bold. Solvent: hexane/dioxane (9:1, v/v).

To test the Baeyer-Villiger oxidation hypothesis, *M. fallax* was preferred to *M. brumae* and *M. aurum* for the occurrence and abundance of all the lipids. Accordingly, cells of *M. fallax* were incubated under either ¹⁸O₂ or ¹⁶O₂ atmosphere, and the reaction was stopped by saponification. Lipids were isolated, and mycolic acids and alcohols were purified on AgNO₃-impregnated TLC and analyzed by EI-MS. The spectra of alcohols from both conditions were compared. For normal growth conditions, the major molecular ion was seen at 742 *m/z*, the expected mass of a C_{52:2} alcohol. When cells were grown in presence of ¹⁸O₂, a significant increase of the M+2 ion peak was observed at *m/z* 744; the same mass shift was also found for the other homologs (Fig. 7A). This increase in the abundance of the M+2 isotope strongly suggested the incorporation of one ¹⁸O atom into the long-chain alcohols. To ascertain that this increase was due to the incorporation of ¹⁸O isotope, and not to the gain of hydrogen atom during the assay, catalytic hydrogenation was performed and the resulting saturated alcohols were trimethylsilylated to improve the abundance of high mass ions by EI-MS (Fig. 7B). In the high mass range, intense M-15 ions (loss of a methyl group from the trimethylsilyl substituent) of the major homologs of alcohols were obtained. Upon growth in the presence of ¹⁶O, the M-15 ion from the C₅₂ homolog was seen at 803 *m/z*. Under incubation in an ¹⁸O atmosphere, the relative intensity of the ion at 805 *m/z* increased dramatically, indicating that the increase of two amu in the M-15 ion was readily due to the incorporation of an ¹⁸O atom into the molecules.

To determine the specificity of the incorporation of the ¹⁸O into long-chain compounds, a comparative analysis of structurally related lipids, such as mycolones and mycolic acids, was performed. Accordingly, the oxygenated lipids were purified by argentation TLC and the EI spectra of the secondary alcohols derived from mycolones (i.e., mycolols) and those of mycolic acids were compared. Interestingly, comparable EI-MS profiles were obtained for these compounds grown under either ¹⁸O or ¹⁶O (data not shown). Consequently, the absence of incorporation of ¹⁸O in the hydroxyl groups of mycolols and mycolic acids proved the specificity of incorporation of ¹⁸O into the long-chain primary alcohols. It was thus concluded that the long-chain primary alcohols derived from the Baeyer-Villiger oxidation of mycolic acids through a keto intermediate (Fig. 2). Moreover, an alkylmalonate was identified in the GC-MS profile of volatile fatty esters (fragmentation ions *m/z* 132 and 145), in agreement with this mechanism.

DISCUSSION

The presence of long-chain fatty acids structurally related to mycolic acids is known for long to occur in mycobacteria. Two size ranges of chain lengths have been generally found, namely C₃₆₋₄₇ fatty acids for which the name of mycobacteric acids has been proposed, and the other with chains between C₅₀₋₅₆ (11-15). Both classes of long-chain fatty acids contain the structural features observed in the mycolic acids of the same species (i.e., cyclo-

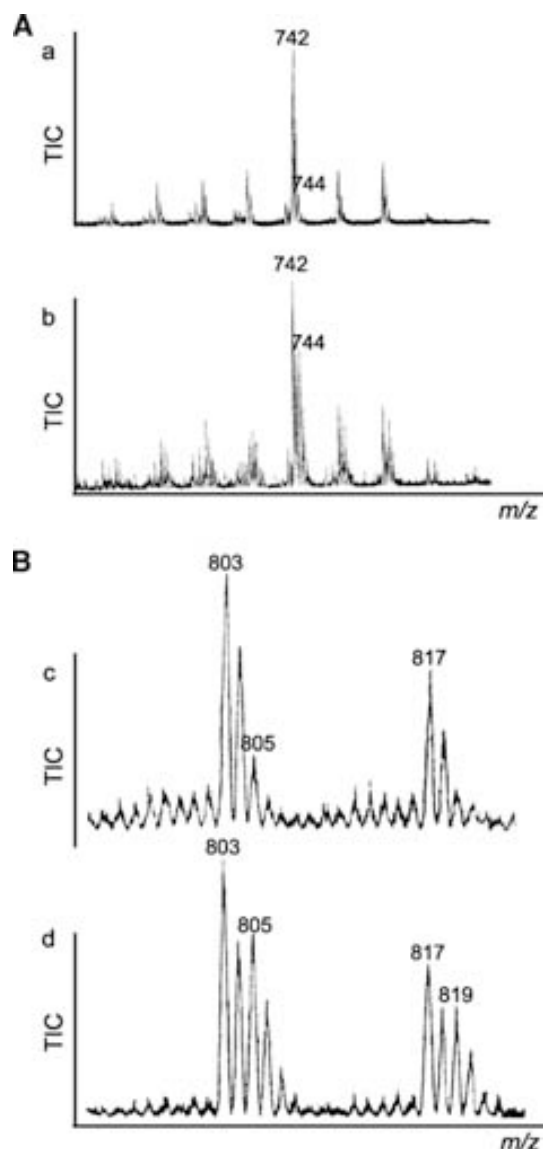


Fig. 7. EI-MS analysis of long-chain primary alcohols from *M. fallax* cultures incubated in presence of ^{18}O . A: Partial EI-mass spectra of *M. fallax* long-chain alcohols. Cells were grown under normal conditions (^{16}O atmosphere) (a) and under ^{18}O atmosphere (b). Ions at m/z 742 and 744 correspond to a C_{52} alcohol. B: Partial-EI-mass spectra of *M. fallax* long-chain alcohols after catalytic reduction of double bonds, followed by silylation. (c) normal conditions; (d) ^{18}O atmosphere. Ions at m/z 803 and m/z 817 correspond to $[\text{M}-15]^+$. Ions at m/z 805 and m/z 819 correspond to $[\text{M}-15] + 2$ (from ^{18}O).

propyl rings, double bonds, and/or oxygenated functions) (11, 13, 16). They have been isolated from a large variety of mycobacteria [e.g., *M. tuberculosis* (11, 12), *M. smegmatis* (15), *M. kansasii* (41), and from a species of *Nocardia* (17)]. In the present work, a series of C_{35-39} acids with odd and even numbers of carbon atoms and containing *trans* and *cis* double bonds was characterized and shown to be structurally related to the mycolic acids of *M. brumae* (28). Two pools of fatty acids, with C_{39} and C_{51} as the main terms, were also characterized in *M. fallax* and were shown to contain double bonds located at the same positions as in the meromycolic chain of the mycolic acids of this species.

The similarities between the structural features of these mycobacteric acids and those of mycolic acids were a priori compatible with the former products being either the precursor or degradation compounds of the latter molecules. In this connection, a role for this type of long-chain fatty acids as mycolic acid precursors in growing cells has been suggested (41, 42). What seems to support this hypothesis is the fact that a cell-free system from *M. tuberculosis* was shown in earlier studies to synthesize saturated and unsaturated C_{30-40} and C_{48-56} fatty acids, the latter exhibiting chain lengths similar to those of the meromycolic chain (14). Similarly, of the two condensing enzymes KasA and KasB, which are components of the fatty acid synthase II system implicated in the biosynthesis of the main (mero) chains of mycolic acids, characterized in *M. tuberculosis*, KasA specifically elongates palmitate into long-chain fatty acids averaging 40 carbons in length; KasB, in the presence of KasA, produces longer fatty acids averaging C_{54} and structurally related to the meromycolic acids (43). However, if mycobacteric acids are implicated in a biosynthetic process, it is puzzling to observe that compounds characterized in the present work and in past studies contain a ratio even versus odd chains different from that of the aldehydes obtained by pyrolytical cleavage of α -mycolic acids.

To arrive to a documented working model about the origin of long-chain fatty acids, we followed the degradation of uniformly ^{14}C labeled dicyclopropanated α -mycolic acids of *M. aurum* by a growing culture of *M. aurum*, a strain known to degrade long-chain compounds (40). Upon saponification of the cells, the labeling was exclusively found in fatty acids with chain averaging C_{39} and C_{51} , as demonstrated by the presence of ^{14}C radiolabeled mycobacteric acids. Interestingly, the two series of labeled fatty acids were shown to derive from the meromycolic chain of the α -mycolic acids, as they contain the two cyclopropyl groups. These results indicated that mycobacteric acids result from the degradation of the mero mycolic chain, implying first the cleavage of the mycolic acid unit to liberate the mero chain, followed by shortening the so-formed long chain by β -oxidation. At least two possibilities of cleavage of the mycolic acid unit would yield the meromycolate chain. One of them implies a mechanism similar to a retro-Claisen reaction, the reverse of the mycolic condensation. Such a reaction has been chemically performed with β -keto acyl trehalose, the product of the mycolic condensation (44, 45). Upon the growth of *M. aurum* cells in the presence of labeled mycolates, however, we were unable to detect radiolabeled acyl trehalose among the complex lipids; instead, the only radiolabeled complex lipid observed was apolar TAGs. Importantly, the retro-Claisen reaction would lead to mycobacteric acids analogous of the biosynthetic precursors, the meromycolic acids, in terms of parity of chain lengths. Because the meromycolic chains of the α -mycolic acids used in this experiment contained an even carbon atom number, it could be postulated that all long-chain acids so-formed and subsequently degraded by β -oxidation would retain an even carbon number. The ratio odd versus even chain lengths of the long-chain labeled molecules we characterized does not support this hypothesis. Alterna-

tively, the rupture of the mycolic acid unit may be realized through a biological process similar to a Baeyer-Villiger reaction. Such a reaction consists in the insertion of one oxygen atom in the C-C bond adjacent to a keto group, yielding an ester function (wax). To perform such a process the reaction substrate would be a β -keto ester or a ketone (Fig. 2). The chain cleavage of the so-formed wax by esterases would occur between carbons 3 and 4 in the case of a keto ester and should produce, on the one hand, a long-chain alcohol that would contain one carbon less than the mero-chain and, on the other hand, an alkylmalonate (Fig. 2). The primary alcohol could be further dehydrogenated into a long-chain fatty acid that would be the substrate of β -oxidation. The chain lengths of mycobacteric acids with the main odd numbered 39 and 51 carbon terms and the characterization of the C₂₂-alkylmalonate in the lipids of saponification support this hypothesis (Fig. 2).

An efficient and specific insertion of one oxygen atom into an organic substrate is easily realized by specific enzymes, the flavoprotein-dependent enzymes [e.g., flavin monooxygenases and Baeyer-Villiger monooxygenases (BVMO)]. These enzymes play a role in the removal of toxic ketones and participate to the degradation of hydrocarbons by microorganisms. Flavin monooxygenases and BVMO have almost identical sequences (46), and several monooxygenases have been characterized in *Corynebacterinae*. For example, a putative BVMO has been detected in *M. avium* (47), a species containing keto- and its Baeyer-Villiger oxidation product, wax-mycolic acids (48–50). Interestingly, *M. tuberculosis* contains seven genes with BMVO motif (51). Their roles remain to be established but it was recently shown that a BMVO (Rv3854c) is responsible for the activation and therefore the efficacy of the widely used anti-tuberculous prodrug ethionamide (52, 53). In the present work, the demonstration that the ¹⁸O labeling was exclusively found in long-chain primary alcohols parented to the mero mycolic chain, with the expected chain lengths, and not in other structurally related oxygenated long-chain lipids examined, clearly establishes that a key step in the degradation of mycolic acids is catalyzed by a Baeyer-Villiger-like process. The ability of these enzymes to convert relatively hydrophobic substrates and their membrane association fits well with a function in mycolic acid degradation. Future biochemical studies should clarify the role of oxygenases in mycobacterial physiology. Interestingly, because no BVMO have been identified in plants, animals, and humans, the identification of new classes of substrates and the corresponding reactivity as Baeyer-Villiger oxidation open new opportunities for developing chemotherapy for treating mycobacterial infections.

We showed that mycobacteric acids occurred either free or esterifying glycerol, solely as TAG but neither as trehalose lipids nor in phospholipids. MS analysis further demonstrated that the main homologs consisted of TAGs bearing one mycobacteric acyl residue per molecule. Interestingly, structurally related apolar nonhydroxylated fatty acids have been recently characterized in TAGs from various other mycobacteria, which include both slow growers (e.g., *M. kansasii*, *M. gastri*, and *M. bovis* BCG) and rapid growers

(e.g., *M. smegmatis* mc²155 and *M. thermoresistibile*) (41). TAG fractions of *M. smegmatis* and *M. bovis* have been shown to be extremely asymmetric molecules, having a series of very long fatty acids located on position 3 of glycerol, in contrast to phospholipids where C_{20–26} fatty acyl substituents were absent (54). TAGs containing significant amounts of C₃₇, C₃₉, and C₄₁ acids with odd chain lengths have been previously found in a *Nocardia* species that contained C_{56–58} linear ethylenic mycolic acids. More polar mycobacteric acids, with additional oxygen functions such as keto and wax, were also characterized in the TAG fractions of mycobacteria producing keto- and wax- mycolates: 2-octadecanol, a secondary alcohol found in wax mycolic acids, has been identified after saponification of TAG from *M. aurum* (16). The proposed storage role of TAGs may be advantageous for mycobacteria in vivo and relevant to the survival in a nonreplicating state. This concept is supported by a report on the upregulation of diacylglycerol transferases involved in TAG biosynthesis in stationary phase of *M. tuberculosis* cultures and by the observation that TAGs accumulate in dormant-like cultures of the bacillus (55). Likewise, *M. kansasii* was reported to accumulate TAGs and a so-called monomeromycoloyl diacylglycerol (similar to TAG1 characterized in the present study) during the late growth phase (41). ■

The authors are grateful to Drs Anne Lemassu and Françoise Laval (IPBS, Toulouse) and Jose Rodríguez (Servicio de Apoyo a la Investigación, Universidad de Murcia, Spain) for NMR and fast-atom bombardment-MS analyses, respectively. We are indebted to Dr Sabine Gavalda (IPBS, Toulouse) for her great help in the preparation of figures.

REFERENCES

1. Asselineau, C., J. Asselineau, G. Lanéelle, and M. A. Lanéelle. 2002. The biosynthesis of mycolic acids by Mycobacteria: current and alternative hypotheses. *Prog. Lipid Res.* **41**: 501–523.
2. Barry III, C. E., R. E. Lee, K. Mdluli, A. E. Sampson, B. G. Schroeder, R. A. Slayden, and Y. Yuan. 1998. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res.* **37**: 143–179.
3. Daffé, M., and P. Draper. 1998. The envelope layer of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* **39**: 131–203.
4. Takayama, K., C. Wang, and G. S. Besra. 2005. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**: 81–101.
5. Vilchère, C., H. R. Morbidoni, T. R. Weisbrod, H. Iwamoto, M. Kuo, J. C. Sacchettini, and W. R. Jacobs. 2000. Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthaseII (FASII) enoyl-carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **182**: 4059–4067.
6. Portevin, D., C. de Souza-D'Auria, C. Houssin, C. Grimaldi, M. Chami, M. Daffé, and C. Guilhot. 2004. A polyketide synthase catalyses the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 314–319.
7. Portevin, D., C. de Souza-D'Auria, H. Montrozier, C. Houssin, A. Stella, M. A. Lanéelle, F. Bardou, C. Guilhot, and M. Daffé. 2005. The acyl-AMP ligase FAD32 and AccD4-containing acylCoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth: identification of the carboxylation product and determination of the acyl-coA carboxylase components. *J. Biol. Chem.* **280**: 8862–8874.
8. Brennan, P. J., and H. Nikaido. 1995. The cell envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 29–63.

9. Banerjee, A., E. Dubnau, A. Quémar, V. Balasubramanian, K. S. Um, T. Wilson, D. Collins, G. de Lisle, and W. R. Jacobs. 1994. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. **263**: 227–230.
10. Marrakchi, H., F. Bardou, M. A. Lanéelle, and M. Daffé. 2008. A comprehensive overview of mycolic acid structure and biosynthesis. In *The mycobacterial cell envelope*. M. Daffé and J. M. Reyrrat, editors. ASM Press Washington DC. 41–62.
11. Promé, J. C., C. Asselineau, and J. Asselineau. 1966. Acides mycobactériques, nouveaux acides isolés des lipides des mycobactéries. *C. R. Acad. Sci.* **263**: 448–451.
12. Takayama, K., and N. Qureshi. 1978. Isolation and characterization of the monounsaturated long chain fatty acids of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lipids*. **13**: 575–579.
13. Qureshi, N., K. Takayama, and H. K. Schnoes. 1980. Purification of C₃₀–C₅₆ fatty acids from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **255**: 182–189.
14. Qureshi, N., N. Sathyamoorthy, and K. Takayama. 1984. Biosynthesis of C₃₀ to C₅₆ fatty acids by an extract of *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra. *J. Bacteriol.* **157**: 46–52.
15. Sathyamoorthy, N., N. Qureshi, and K. Takayama. 1985. Purification and characterization of C₂₈–₅₅ fatty acids from *Mycobacterium smegmatis* Can. *J. Microbiol.* **31**: 214–219.
16. Lanéelle, M. A., C. Lacave, M. Daffé, and G. Lanéelle. 1988. Mycolic acids of *Mycobacterium avium*. Structure and biogenetic implications. *Eur. J. Biochem.* **177**: 631–635.
17. Vacheron, M. J., and G. Michel. 1971. Présence d'acides de poids moléculaire élevé dans les triglycérides isolés des parois cellulaires de *Nocardia kirovani*. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **273**: 1778–1781.
18. Asselineau, J. 1954. Sur la tuberculénone, cétone insaturée isolée des lipides de souches humaines de *Mycobacterium tuberculosis*. *C. R. Acad. Sci.* **239**: 1561–1563.
19. Miquel, A. M., B. C. Das, and A. H. Etémadi. 1966. Sur la structure des α -kansamycolones, cétones à haut poids moléculaire isolées de *Mycobacterium kansasii*. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*. **47**: 2095–2104.
20. Bordet, C., and G. Michel. 1966. Isolement et structure des nocardones, cétones à haut poids moléculaire de *Nocardia asteroides*. *C. R. Acad. Sci.* **262**: 1810–1812.
21. Lanéelle, M. A. 1966. Sur la relation entre des cétones à haut poids moléculaires isolées de *Nocardia brasiliensis* et les acides nocardomycoliques. *C. R. Acad. Sci.* **263**: 560–563.
22. Bordet, C., and G. Michel. 1966. Les nocardols, alcools à haut poids moléculaire de *Nocardia asteroides*. *C. R. Acad. Sci.* **262**: 1294–1296.
23. Bordet, C., and G. Michel. 1969. Structure and biogenesis of high molecular weight lipids from *Nocardia asteroides*. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*. **51**: 527–548.
24. Pudles, J., and E. Lederer. 1954. Sur l'isolement et la constitution de l'acide corynomycolénique et de deux cétones des lipides du bacille diphtérique. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*. **36**: 759–777.
25. Asselineau, J. 1961. Sur la composition des lipides de *Corynebacterium diphtheriae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **54**: 359–360.
26. Bordet, C., and G. Michel. 1964. Isolation of a new alcohol, 16-hentriacontanol from the lipids of *Nocardia brasiliensis*. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*. **46**: 1101–1112.
27. Lanéelle, M. A., J. Asselineau, and G. Castelnuovo. 1965. Etudes sur les mycobactéries et les nocardiae IV Composition des lipides de *Mycobacterium rhodocrous*, *Mycobacterium pellegrino* sp et de quelques souches de nocardiae. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. **108**: 69–82.
28. Luquin, M., V. Ausina, V. Vincent-Lévy-Frébault, M. A. Lanéelle, F. Belda, M. Garcia-Barcelo, G. Prats, and M. Daffé. 1993. *Mycobacterium brumae* sp. nov., a rapidly growing, non photochromogenic *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 405–413.
29. Lévy-Frébault, V., E. Rafidinarivo, J. C. Promé, J. Gandry, H. Boisvert, and H. L. David. 1983. *Mycobacterium fallax* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**: 336–343.
30. Von Rudloff, E. 1956. Periodate-permanganate oxidations V. Oxidation of lipids in media containing organic solvents. *Can. J. Chem.* **34**: 1413–1418.
31. Rafidinarivo, E., J. C. Promé, and V. Lévy-Frébault. 1985. New kinds of unsaturated mycolic acids from *Mycobacterium fallax*. *Chem. Phys. Lipids*. **36**: 215–228.
32. Odham, G., and E. Senhagen. 1972. Fatty acids. In *Biochemical applications of Mass Spectrometry*. G. R. Waller, editor. Wiley-Interscience. New York. 211–228.
33. Andersson, B. A., and R. T. Holman. 1974. Pyrrolidides for mass spectrometric determination of the position of the double bond in monounsaturated fatty acids. *Lipids*. **9**: 185–190.
34. Yuan, Y., D. Mead, B. G. Schroeder, Y. Zhu, and C. E. Barry III. 1998. The biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. Enzymatic methyl(ene) transfer to acyl carrier protein bound mero-mycolic acid. *J. Biol. Chem.* **273**: 21282–21290.
35. Quémar, A., M. A. Lanéelle, H. Marrakchi, D. Promé, E. Dubnau, and M. Daffé. 1997. Structure of a hydroxymycolic acid potentially involved in the synthesis of oxygenated mycolic acids of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Eur. J. Biochem.* **250**: 758–763.
36. Laval, F., R. Haites, F. Movahedzadeh, A. Lemassu, C. Y. Wong, N. Stoker, H. Billman-Jacobe, and M. Daffé. 2008. Investigating the function of the putative mycolic-acid methyltransferase UmaA: divergence between the *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *J. Biol. Chem.* **283**: 1419–1427.
37. Daffé, M., M. A. Lanéelle, and C. Lacave. 1991. Structure and stereochemistry of mycolic acids from *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. *Res. Microbiol.* **142**: 397–403.
38. Rhyage, R., and E. Stenhagen. 1959. Mass spectrometry studies III. Esters of saturated dibasic acids. *Ark. Kemi.* **14**: 497–509.
39. Lederer, E. 1969. Some problems concerning biological C-alkylation reactions and phytosterol biosynthesis. *Q. Rev. Chem. Soc.* **23**: 453–481.
40. Promé, D., C. Lacave, B. Montsarrat, H. David, and J. C. Promé. 1983. Conversion of sterols and triterpenes by mycobacteria. I Formation of progesterone and 1-dehydroprogesterone from *Mycobacterium aurum*, strain A+. *Biochim. Biophys. Acta.* **753**: 60–64.
41. Kremer, L., C. de Chastellier, G. Dobson, K. J. C. Gibson, P. Bifani, S. Balor, J. P. Gorvel, C. Loch, D. E. Minnikin, and G. S. Besra. 2005. Identification and structural characterization of an unusual mycobacterial monomeromycoloyl-diacylglycerol. *Mol. Microbiol.* **57**: 1113–1126.
42. Lacave, C., M. A. Lanéelle, M. Daffé, H. Montrozier, M. P. Rols, and C. Asselineau. 1987. Etude structurale et métabolique des acides mycoliques de *Mycobacterium fortuitum*. *Eur. J. Biochem.* **163**: 369–378.
43. Slayden, R. A., and C. E. Barry. 2002. The role of KasA and KasB in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)*. **82**: 149–160.
44. Aurelle, H., and J. C. Promé. 1980. The reaction of 3-oxo fatty acid esters with trehalose derivatives in an alkaline medium. *Tetrahedron Lett.* **21**: 3277–3280.
45. Promé, J. C., R. W. Walker, and C. Lacave. 1974. Condensation of two molecules of palmitic acid in *Corynebacterium diphtheriae*: formation of a beta-keto ester of trehalose. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*. **278**: 1065–1068.
46. Van Berkel, W. J. H., N. M. Kamerbeek, and M. W. Fraaije. 2006. Flavoprotein monooxygenase, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J. Biotechnol.* **124**: 670–689.
47. Thierry, D., V. Vincent, F. Clément, and J. L. Guesdon. 1993. Isolation of specific DNA fragments of *Mycobacterium avium* and their possible use in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1048–1054.
48. Etémadi, H. A., and J. Gashe. 1965. On the biogenetic origin of 2-eicosanol and 2-octadecanol of *Mycobacterium avium*. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*. **47**: 2095–2104.
49. Lanéelle, M. A., and G. Lanéelle. 1970. Structure d'acides mycoliques et d'un intermédiaire dans la biosynthèse d'acides mycoliques dicarboxyliques. *Eur. J. Biochem.* **12**: 296–300.
50. Toriyama, S., I. Imaizumi, I. Tomiyasu, M. Masui, and I. Yano. 1982. Incorporation of ¹⁸O into long-chain secondary alcohols derived from ester mycolic acids in *Mycobacterium phlei*. *Biochim. Biophys. Acta.* **712**: 427–429.
51. Fraaije, M. W., N. M. Kamerbeek, W. J. H. van Berkel, and D. B. Janssen. 2002. Identification of a Baeyer-Villiger monooxygenase sequence motif. *FEBS Lett.* **518**: 43–47.
52. Fraaije, M. W., N. M. Kamerbeek, A. J. Heidekamp, R. Fortin, and D. B. Janssen. 2004. The prodrug activator EtaA from *Mycobacterium tuberculosis* is a Baeyer-Villiger monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **279**: 3354–3360.
53. Snajdora, R., G. Grogan, and M. D. Mihovilovic. 2006. Resolution of fused bicyclic ketones by a recombinant biocatalyst expressing the Baeyer-Villiger monooxygenase gene Rv3049c from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**: 4813–4817.
54. Walker, R. W., H. Barakat, and J. G. C. Hung. 1970. The positional distribution of fatty acids in the phospholipids and triglycerides of *Mycobacterium smegmatis* and *M. bovis* BCG. *Lipids*. **5**: 684–691.
55. Daniel, J., C. Deb, V. S. Dubey, T. D. Sirakova, B. Abomoelak, H. R. Morbidoni, and P. E. Kolattukudy. 2004. Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacyl glycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. *J. Bacteriol.* **186**: 5017–5030.

Agraïments

Bé, havia pensat en començar a escriure aquesta secció dient allò de “aquesta ha estat la part més difícil d'escriure d'aquesta tesi” però, a part d'una estupidesa i d'un tòpic, no seria veritat. Aquest treball, que acaba en aquesta pàgina, realment m'ha costat massa pel resultat obtingut, massa en hores invertides al laboratori, massa en plasmar-ho escrit i, per suposat, massa en taxes abonades a la Gene. Si ho hagués de començar ara, no ho faria, segur. Si hagués dedicat la meitat d'hores que he perdut fent aquest treball al macramé, ara seria un expert mundial de reconegut prestigi i em guanyaria la vida dignament. Malgrat això, seria un refotut desagraït si no m'enrecordés de la gent que he conegut, dels amics de fet. Fer aquesta gimcana que ha estat la tesi m'ha permès conèixer gent, alguns amics, fantàstics, que m'han fet millor persona. He de agrair a la Marina el fet que em permetés fer la tesi al seu grup tot i no comptar amb beca. També he d'agraïr-li la paciència que ha tingut amb mi en la correcció d'aquest treball. A l'Esther Julià li estic tan agraït que m'és difícil enumerar tot el que va fer per ajudar-me durant els anys que vàrem treballar plegats al laboratori i també després. Espero que li continuïn sortint les coses molt bé perquè realment s'ho mereix. També recordo amb alegria els moments compartits amb la Mercè, l'Irma, el Carlos-Yesid, el Ferran (el gran), l'Eduard, el Manolo, l'Ignasi, la Gemma, la Lídia, la gent de l'IBB, i en els darrers anys tota la gent fantàstica del laboratori del CRESIB/CEK/IDIBAPS...(gràcies Pau per les figures...i per ensenyar-me a apreciar veritablement la música de Sau).