

PRESENCE DE MYCOSIDES C' (FORMES SIMPLIFIEES DE MYCOSIDE C) DANS LES BACTERIES ISOLEES DE BOVINS ATTEINTS DU FARCIN

G. LANEELLE et J. ASSELINEAU

Laboratoire de Chimie biologique, Université Paul Sabatier, 31-Toulouse

et

G. CHAMOISEAU

Imperial Veterinary Institute, Debre-Zeit, Ethiopie

Received 1 October 1971

1. Introduction

L'actinomycétale responsable du farcin des bovins au Tchad et au Sénégal se présente sous forme de deux variétés qui se distinguent notamment par leur vitesse de croissance. Des travaux antérieurs ont montré que la variété tchadienne n'est pas une nocardia, mais une mycobactérie [1, 2].

Au cours d'une étude des lipides de deux souches de la variété sénégalaise, nous avons isolé une forme simplifiée de mycoside C, glycoside de peptidolipide, que nous désignerons sous le nom de mycoside C'.

2. Matériel et méthodes

Les souches 378 et 397 proviennent de la collection de l'I.E.M.V.T. (Alfort). Ces bactéries, à croissance rapide, ont été cultivées en voile sur bouillon tryptose-serum de cheval.

Après culture, les bactéries sont séparées par filtration, lavées à l'eau et extraites par un mélange (1:1) d'alcool et d'éther. Les extraits réunis sont amenés à sec sous vide, et le résidu est épuisé à l'éther. La solution étherée est séchée sur Na_2SO_4 et concentrée. Par séjour en glacière, une poudre presque incolore précipité, qui est séparée par centrifugation. Ce produit est redissous à chaud dans l'éther et reprécipité par refroidissement. Il est désigné par X-378 ou X-397, selon la souche utilisée.

Les techniques d'hydrolyse et de chromatographie ont déjà été décrites [3]. Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre automatique Perkin-Elmer modèle 141. Les spectres de masse ont été réalisés, soit à l'Institut de Chimie organique de l'Université de Stockholm, soit à l'Institut de Chimie des Substances naturelles du C.N.R.S., à Gif sur Yvette.

3. Résultats

Le spectre I.R. de X-378 montre des bandes à 6,15 et 6,50 μ , caractéristiques de liaisons amides. Par hydrolyse acide, on obtient une solution aqueuse qui contient alanine, *allo*-thréonine, phénylalanine et alaninol (mis en évidence par chromatographie sur papier), et un résidu lipidique. Ce dernier, soumis à une nouvelle hydrolyse acide, libère de la phénylalanine.

X-378 s'avère donc semblable aux mycosides C de mycobactéries, constitués par un tripeptide (Phe-*allo*.Thr-Ala), lié à un acide gras par le $-\text{NH}_2$ de la phénylalanine, et à l'alaninol par le carboxyle de l'alanine: par exemple, le mycoside C_{1217} possède la structure (I) [3].

La chromatographie sur papier d'un hydrolysât acide de X-378, avec révélation par le chlorhydrate de p-anisidine, permet de détecter trois sucres réducteurs, dont deux sont identifiés par leur migration dans

plusieurs systèmes de solvants au 3,4-di-O-méthyl-rhamnose et au rhamnose (ce dernier étant présent en très faible proportion). Le troisième sucre, de R_f intermédiaire aux deux autres, se comporte comme un dérivé monométhylé du rhamnose.

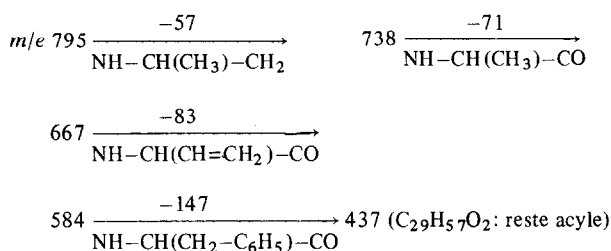
Par chromatographie sur papier préparative, nous avons isolé les deux dérivés méthylés du rhamnose. Le pouvoir rotatoire du dérivé diméthylé ($[\alpha]_D +21^\circ$ (eau)) montre qu'il s'agit du 3,4-di-O-méthyl L-rhamnose. Le dérivé monométhylé, $[\alpha]_D +28^\circ$ (eau), a été déméthylé par traitement par le trichlorure de bore [4], ce qui libère du rhamnose. Son comportement chromatographique et son pouvoir rotatoire sont identiques à ceux du 3-O-méthyl L-rhamnose. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse du tétraacétyl alditol [5], effectuée par le Dr. J. Lönngren, montre qu'il s'agit bien de 3-O-méthyl-rhamnose.

Par chromatographie en couche mince (solvant: éther de pétrole-éther 7:3) du lipide obtenu par hydrolyse complète de X-378, suivie de méthylation par le diazométhane, nous avons isolé un ester (R_f 0,8) qui présente le même comportement, en chromatographie en couche mince et en phase gazeuse, que le méthoxy-3 octacosanoate de méthyle (préparé par méthylation de l'hydroxy-3 octacosanoate de méthyle, provenant du mycoside C_{1217}); un homologue inférieur est présent. Le spectre de masse de X-378 est en accord avec l'existence de deux acides méthoxylés saturés, $C_{29}H_{58}O_3$ et $C_{27}H_{54}O_3$ (dans le rapport approximatif 3:2).

Nous n'avons pas pu déceler de 6-désoxy-talose dans les produits d'hydrolyse de X-378, alors que tous les mycosides C étudiés jusqu'ici en renferment [3, 6-9], à côté de dérivés plus ou moins complètement méthylés du rhamnose. Compte tenu de la structure du type (I) attribuée aux mycosides C, nous avons recherché si, dans X-378, les hydroxyles de l'alaninol et de l'*allo*-thréonine sont tous les deux engagés dans des liaisons glycosidiques avec les O-méthyl-rhamnose.

Le produit X-378 a été soumis à un traitement alcalin susceptible de provoquer une β -élimination au niveau de l'hydroxyle de l'*allo*-thréonine. Deux essais, effectués dans des conditions différentes, n'ont provoqué, ni la disparition d'un sucre, ni celle de l'*allo*-thréonine. Cette observation, qui conduit à penser qu'aucun sucre n'est lié à l'hydroxyle de l'*allo*-thréonine, est en accord avec l'examen du spectre de masse.

Le spectre de masse de X-378 montre une série de pics permettant de proposer la séquence de fragmentation suivante:



Ces pics sont généralement accompagnés de pics à $m-32$ (perte de CH_3OH dans la partie lipidique) et, à partir de m/e 738, de pics à $m-28$ (perte de CO , et/ou dérivé de l'acide gras homologue inférieur). Ceci établit la séquence Phe-*allo*.Thr-Ala-alaninol.

Des pics intenses à m/e 175 et 161 doivent correspondre respectivement à des résidus de di- et mono-O-méthyl-rhamnose. A la différence du spectre de masse du mycoside C_{1217} , celui de X-378 ne met pas en évidence de fragmentations correspondant à l'élimination de deux restes de sucre: il est donc très probable que mono- et di-O-méthyl-rhamnose ont un seul site de liaison. D'autre part, on ne peut déceler aucune fragmentation correspondant à la perte d'un acétyl.

Ces résultats permettent de proposer la structure (II) pour un groupe de constituants majeurs de la préparation X-378 (qui n'a fait l'objet d'aucune purification poussée). L'espèce moléculaire avec un acide gras en C_{29} et un di-O-méthyl-rhamnose a un poids moléculaire de 1004: on observe dans le spectre de masse un pic à m/e 987, pouvant correspondre à $(M+1)-\text{H}_2\text{O}$.

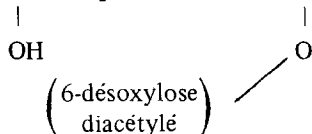
Un premier examen des lipides de la souche 397 laisse penser qu'ils contiennent un produit analogue à X-378.

4. Discussion

Les mycosides C n'ont été isolés jusqu'ici que de mycobactéries (*M. avium* et certaines espèces de mycobactéries atypiques) [10]. Il est donc probable que la souche 378 appartient au genre *Mycobacterium* (ce qui est en accord avec la caractérisation d'acides mycoliques dans cette souche [11]).

Structures

(I): $C_{25}H_{51}-CH-CH_2-CO-Phe-*allo*.Thr-Ala-alaninol-(tri-O-méthyl-rhamnose)$



(II): $C_{25}H_{51}-CH-CH_2-CO-Phe-*allo*.Thr-Ala-alaninol-(di- ou mono- O-méthyl rhamnose)$



Le mycoside C' a été isolé de la souche 378 dans les conditions habituelles d'isolement des mycosides C: il n'en diffère essentiellement que par l'absence d'un résidu de diacétyl-désoxytalose. Actuellement, nous ne pouvons pas exclure que, dans la souche 378, une glycosidase particulièrement active ait détaché ce résidu de sucre au cours des premières phases du traitement des bactéries. Si ce n'est pas le cas, l'absence de désoxy-talose inciterait à penser que celui-ci n'intervient pas directement dans la fonction (encore à définir) que remplissent les mycosides C dans la physiologie de la cellule.

Remerciements

Nous remercions M. le Dr. Perreau, chef du service de microbiologie de l'I.E.M.V.T. à Alfort, qui a bien voulu mettre les deux souches à notre disposition. Nous remercions le Dr. J. Lönngren (Université de Stockholm) qui a procédé à l'analyse de notre échantillon de monométhyl-rhamnose par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse, et le

Dr. B.C. Das (Institut de Chimie des Substances naturelles, Gif sur Yvette) pour le spectre de masse du mycoside C_{378} .

Références

- [1] G. Chamoiseau, Rev. Élevage Med. Vet. Pays Trop. 22 (1969) 195.
- [2] J. Asselineau, M.-A. Laneelle et G. Chamoiseau, Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 22 (1969) 205.
- [3] G. Laneelle et J. Asselineau, European J. Biochem. 5 (1968) 487.
- [4] S. Allen, T.G. Bonner, E.J. Bourne et N.M. Saville, Chem. Ind. (1958) 630.
- [5] J. Lönngren et A. Pilotti, Acta Chem. Scand. 25 (1971) 1144.
- [6] M. Chaput, G. Michel et E. Lederer, Biochim. Biophys. Acta 63 (1962) 310.
- [7] M. Chaput, G. Michel et E. Lederer, Biochim. Biophys. Acta 78 (1963) 329.
- [8] E. Vilkas, C. Gros et J.-C. Massot, Comp. Rend. Acad. Sci. (Paris), Ser. C, 266 (1968) 837.
- [9] E. Vilkas et E. Lederer, Tetrahedron Letters (1968) 3089.
- [10] G.B. Fregnan, D.W. Smith et H.M. Randall, J. Bact. 82 (1961) 517.
- [11] G. Chamoiseau et J. Asselineau, résultats inédits.