

à sec et reprise par un mélange de 20 ml de CH_2Cl_2 , 1 ml de pyridine et 1 ml (7 mmoles) de $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$. Après $\frac{1}{2}$ h à 0° et $\frac{1}{2}$ h à 20° , le milieu réactionnel est versé sur 30 g de glace, extrait (3×30 ml de CHCl_3) et les extraits organiques lavés (HCl N, NaHCO_3 10% dans H_2O) et séchés (MgSO_4) sont évaporés à sec, puis soumis à l'analyse par CGL. Les pics les plus constants et les plus importants ont été repérés par des lettres et leurs $V_{\text{RR}}^{180^\circ}$ sont les suivantes: A (0,07), B (0,09), C (0,13), D (0,21), E (0,72), F (0,80), G (0,29), H (0,31), I (0,70), J (0,69). Les résultats sont portés dans le tableau.

La structure de certains des composés obtenus – A (23), D (15), E (24) – a été établie par comparaison avec des échantillons authentiques obtenus par trifluoroacétylation du composé adéquat dans les conditions décrites plus haut. Les mélanges ont d'autre part été soumis à l'analyse par CGL.-SM. à l'aide d'un chromatographe *Perkin-Elmer* 990 couplé à un spectromètre de masse RMU 6L *Hitachi Perkin-Elmer*.

Il ne se forme de 23 (CGL.) ni lors de la trifluoroacétylation de 5, ni lors du traitement de 19 par des mélanges $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ /pyridine et CF_3COOH /pyridine. Lors de la réduction de 5 (essais n° 3) il ne se forme pas de désoxy-5-O-isopropylidène-1,2- β -D-arabinofurannose, alors même que la trifluoroacétylation du milieu réactionnel conduit à 13,5% de 23.

Les analyses élémentaires ont été effectuées par le Dr *K. Eder* (Ecole de Chimie, Université de Genève) que nous remercions bien vivement. Les SM. ont été réalisés dans le Laboratoire de Spectrométrie de masse de l'Ecole de Chimie de l'Université de Genève sous la direction du Prof. *A. Buchs* à qui nous exprimons notre reconnaissance. Les expériences de CGL.-SM. ont été effectuées par le Prof. *Tabacchi* (Institut de Chimie, Université de Neuchâtel) que nous remercions bien vivement. Nous remercions le Dr *U. Burger* (département de Chimie organique) pour l'enregistrement de certains des RMN. à 100 MHz. Nous remercions le *Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique* de subsides (n° 2123-69 et 2479-71).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *J. M. J. Tronchet, R. Graf & J. Tronchet*, *Helv.* 52, 315 (1969).
- [2] *J. M. J. Tronchet & R. Graf*, *Helv.* 53, 851 (1970).
- [3] *J. M. J. Tronchet, J. M. Bourgeois, J. M. Chalet, R. Graf, R. Gurny & J. Tronchet*, *Helv.* 54, 687 (1971).
- [4] *J. M. J. Tronchet, R. Graf & R. Gurny*, *Helv.* 55, 613 (1972).
- [5] *G. J. Karabatsos & R. A. Taller*, *Tetrahedron* 24, 3923 (1968); *J. M. J. Tronchet, F. Barbalat-Rey & N. Le-Hong*, *Helv.* 54, 2615 (1971).
- [6] *J. R. Dyer, W. E. McConigal & K. C. Rice*, *J. Amer. chem. Soc.* 87, 654 (1965).
- [7] *J. M. J. Tronchet & J. M. Bourgeois*, *Helv.* 53, 1463 (1970); 54, 1718 (1971).
- [8] *J. M. J. Tronchet & R. Graf*, *Helv.* 55, 1141 (1972).
- [9] *J. A. Cifonelli & F. Smith*, *Anal. Chemistry* 26, 1132 (1954).
- [10] *P. A. Levene & J. Conpton*, *J. biol. Chemistry* 116, 189 (1936).

227. Premières études sur la biogénèse de la proferrorosamine A

par **M. Pouteau-Thouvenot, J. Padikkala, M. Barbier**

Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS, F-91 Gif-sur-Yvette

A. Helbling et M. Viscontini¹⁾

Institut de Chimie organique de l'Université, Rämistrasse 76, CH-8001 Zurich

(28 VII 72)

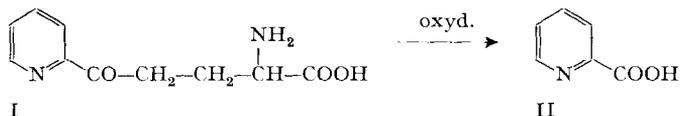
Résumé. Nous avons pu montrer à l'aide de substances radioactives que l'acide picolique est le précurseur immédiat de la proferrorosamine A. L'acide glutamique peut être transformé par *Pseudomonas roseus fluorescens* en acide picolique puis être incorporé dans la partie pyridinique du

¹⁾ Produits naturels chez les microorganismes, 5^e communication [1].

propigment tandis que les atomes de carbone formant le noyau pyrrolinique proviennent d'autres métabolites que nous n'avons pas encore identifiés. La lysine semble jouer le même rôle que l'acide glutamique et ceci d'une manière encore plus prononcée.

La proferrosamine A (I) est produite en grande quantité lorsque *Pseudomonas roseus fluorescens* J. C. Marchal 1937 est cultivé en milieu synthétique dépourvu d'ions ferreux.

Nous avons déjà constaté que par adjonction de tryptophane à ce milieu de culture la production de proferrosamine A était fortement inhibée [1]. En vue de mettre en évidence la relation pouvant exister chez ce microorganisme entre la proferrosamine A et la biosynthèse du tryptophane, nous avons décidé d'étudier quels étaient les métabolites précurseurs de ce propigment. Nous rapportons dans ce mémoire les premiers résultats obtenus avec l'acide picolique et l'acide glutamique. Ayant constaté que l'acide glutamique favorisait la formation de proferrosamine A, nous avons commencé par cultiver *Ps. roseus fluorescens* en présence d'acide D,L-glutamique [^{14}C (3, 4)]. On obtient alors une proferrosamine A radioactive (pourcentage d'incorporation: 1,3% rapporté au seul acide L-glutamique). Après dégradation oxyda-

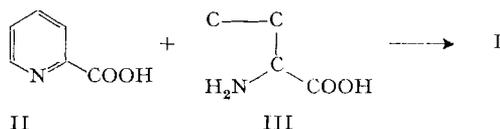


tive, toute la radioactivité du propigment I se retrouve dans l'acide picolique II. On peut donc supposer que l'acide glutamique est un précurseur du noyau pyridinique chez *Ps. roseus fluorescens* et que celui-ci est ensuite condensé avec un deuxième fragment encore à déterminer pour former la proferrosamine A.

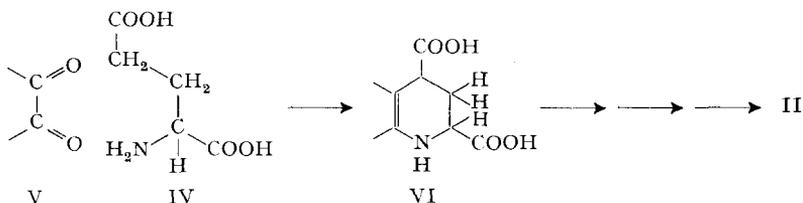
Pour vérifier cette nouvelle hypothèse nous avons synthétisé l'acide picolique- $^{14}\text{COOH}$ et cultivé *Ps. roseus fluorescens* dans le milieu synthétique dépourvu d'ions ferreux, en présence de ce nouveau produit. Nous avons alors constaté que l'acide picolique radioactif était massivement incorporé (environ 50%) dans la proferrosamine A et se retrouvait intégralement dans l'acide picolique obtenu par dégradation oxydative du propigment.

De ces expériences nous pouvons tirer deux conclusions:

1° la proferrosamine A (I) est biosynthétisée à partir d'acide picolique (II) et d'un deuxième métabolite contenant la structure III encore à déterminer.



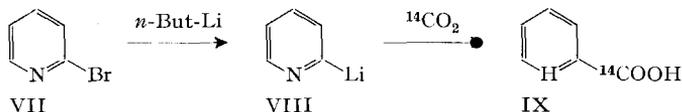
2° Chez *Ps. roseus fluorescens* et dans les conditions expérimentales de ce travail, l'acide glutamique peut servir de précurseur à la biosynthèse de l'acide picolique. On peut envisager la condensation de l'acide glutamique (IV) avec un métabolite (V) conduisant à un dérivé VI de l'acide lutidique lequel est ensuite transformé en acide picolique II.



Jusqu'ici on a toujours présenté la lysine comme précurseur de l'acide picolique. Il en est probablement de même chez *Ps. roseus fluorescens*, car chez ce microorganisme la lysine accentue la formation de proferrorosamine A plus fortement que l'acide glutamique (travaux en cours). Il est possible, comme il est de règle chez les êtres vivants, que l'acide picolique soit biosynthétisé par deux chaînes enzymatiques différentes, l'une à partir de la lysine, l'autre à partir de l'acide glutamique. Nous poursuivons nos expériences dans cette direction.

Enfin nous avons vérifié que l'acide pipécolique n'est pas incorporé d'une manière sensible dans la proferrorosamine A et qu'il ne participe pas de manière appréciable à la biosynthèse de ce pigment.

La synthèse de l'acide picolique [$^{14}\text{COOH}$] (IX) a été effectuée en traitant le pyridyl-2-lithium (VIII) par $^{14}\text{CO}_2$ selon les réactions suivantes:



Nous avons pour cela adapté à nos besoins un ensemble de procédés assez compliqués [2] que nous avons réunis et simplifiés ainsi que nous le décrivons dans la partie expérimentale de ce travail.

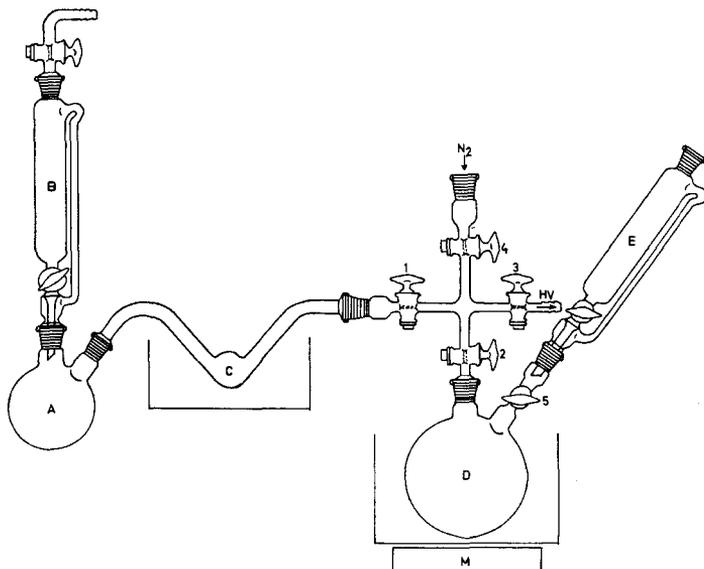


Fig. 1.

Nous remercions le Prof. J. G. Marchal, Université de Nancy, du *Pseudomonas roseus fluorescens* qu'il a bien voulu mettre à notre disposition, M. H. Frohofer, chef du laboratoire de micro-analyse de l'Institut de Chimie Organique de l'Université de Zurich pour les mesures de radio-activité et le Prof. E. Ledever, Gif-sur-Yvette, de l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Nous remercions également le CEA (Saclay) pour une subvention ayant facilité l'achat de l'acide glutamique-¹⁴C(3, 4)].

Partie expérimentale

n-Butyl-lithium. – Dans un ballon à trois cols de 200 ml, muni d'un entonnoir à robinet, d'un thermomètre pour basses températures, d'un tube à azote et dont on a chassé tout l'oxygène par un courant d'azote, on introduit 50 ml d'éther anhydre et 2,18 g (0,315 équiv.) de lithium en fines lamelles. On refroidit à -10° , mélange le tout par agitation magnétique et ajoute goutte à goutte dans l'espace de 30 min. une solution de 17,1 g (0,125 mole) de bromo-1-butane dans 25 ml d'éther anhydre. Lorsque l'addition est terminée on laisse la température remonter à 5° en continuant l'agitation pendant une heure. La suspension est alors filtrée sous azote, sur de la laine de verre, dans une ampoule à décantation remplie d'azote. La solution obtenue est titrée selon Gilman [3]; rendement 90%.

Acide picolique (II). – On utilise pour cette synthèse l'appareillage reproduit à la fig. 1. Dans le flacon A on introduit 395 mg (2 mmoles) de carbonate de baryum pur qu'on recouvre d'environ 10 g de petites perles de verre (diamètre 2 mm). On place 10 ml d'acide sulfurique concentré dans l'entonnoir à robinet B et on laisse le montage sous haut vide pendant 4 h pour bien dessécher le tout. L'appareillage est alors rempli d'azote pur; les robinets 1 et 3 sont ensuite fermés, les robinets 4, 2 et 5 ouverts, et on introduit dans le ballon D par l'intermédiaire de l'entonnoir à robinet E, une solution de 790 mg (5 mmoles) de bromo-2-pyridine (VII) dans 10 ml d'éther anhydre. Ceci fait, on remplit l'entonnoir à robinet E avec 5 ml d'une solution d'éther renfermant 4 mmoles de *n*-butyl-lithium, solution qu'on laisse couler goutte à goutte sous agitation magnétique dans le ballon D refroidi à -45° après fermeture du robinet 4. Lorsque l'addition est terminée on laisse réagir pendant 5 min. à -45° on ferme le robinet 5 et on refroidit la solution réactionnelle à l'aide d'air liquide. L'appareillage est porté une fois de plus sous haut vide (robinets 1, 2, 3 ouverts, robinets 4 et 5 fermés) qu'on maintient en fermant le robinet 3 et en refroidissant la boule C à -50° . On ajoute alors très lentement l'acide sulfurique dans le flacon A, puis on agite vigoureusement les billes de verre (agitateur magnétique) tout en chauffant le flacon à 50° . En environ 30 min., la majeure partie de CO_2 est condensée dans le flacon D. Le robinet 2 est fermé, on retire l'air liquide dans lequel est plongé le flacon D et on le remplace par un mélange réfrigérant à -70° . La carboxylation s'amorce d'elle-même lorsque la température du mélange réactionnel atteint -70° et est terminée à $+10^{\circ}$ (45 min.). Pendant ce temps on purge le reste de la verrerie du CO_2 qui peut s'y trouver, par lavage à l'azote et barbotage dans un flacon-laveur à NaOH (10%). Le mélange réactionnel est ensuite hydrolysé à la température ambiante par adjonction de 5 ml d'une solution d'HCl 2,4 N tandis que l'excès de CO_2 libéré est également absorbé dans le flacon-laveur à NaOH.

La solution acide est portée à pH 12 avec 4 ou 5 pastilles de NaOH solide, puis débarrassée des impuretés organiques par extraction continue à l'éther pendant 24 heures. L'acide picolique est ensuite mis en liberté par acidification à pH 2,7 (pH isoélectrique de l'acide). Une extraction continue à l'éther pendant 60 h le fait passer dans le solvant organique. L'extrait étheré est séché puis évaporé sous vide. On obtient ainsi 118,5 mg d'acide picolique brut qu'on purifie par sublimation à $140\text{--}150^{\circ}$ (760 mm). Rendement: 72,2 mg (29,4%) d'acide pur, F: 135° (sublimation).

Acide picolique [¹⁴COOH] (IX). – Nous l'avons obtenu de la même manière à partir de 2 mmoles de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$, activité spécifique 20,3 mCi/mme. Les rendements de la synthèse radioactive sont moins bons. Nous avons isolé 60 mg d'acide IX brut qui ont donné après sublimation 30 mg (12%) d'acide pur (spectres de masse, RMN., IR., chromatographie en couche mince, microanalyse). Activité: $10,4297 \cdot 10^6$ dpm/mg soit $3,129 \cdot 10^8$ dpm pour les 30 mg. Rendement radioactif: 14%.

Préparation des cultures:

a) Avec de l'acide D, L-glutamique radioactif. 200 ml du milieu suivant: asparagine: 9 g, glycérol: 25 g, K_2HPO_4 : 2,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$: 0,4 g, eau bidistillée: 1000 ml, pH: 6,8 (ajusté avec HCl), sont placés dans une boîte de Roux, stérilisés à l'autoclave (20 min. à 115°),

puis inoculés avec 0,5 ml d'une culture de trois jours de *Ps. roseus fluorescens*. La boîte de Roux est maintenue à l'étuve à 25° pendant 24 heures. A ce moment-là on additionne de 5 ml d'une solution stérile d'acide D,L-glutamique [$^{14}\text{C}(3,4)$] (0,1 mCi dans 50 ml de solution) et on replace la culture à l'étuve à 25° pendant trois jours. Au bout de ce temps la culture est centrifugée et le liquide surnageant concentré sous vide; on ajoute finalement au résidu la quantité de sulfate ferreux suffisante pour complexer en ferrosamine rouge la proferrosamine A formée dans le milieu de culture.

b) Avec de l'acide picolique radioactif (IX). Une boîte de Roux renfermant 200 ml du même milieu de culture synthétique inoculé avec *Ps. roseus fluorescens* que sous a) est incubée à 25° pendant trois jours. On y ajoute alors 10 ml d'une solution, stérilisée, renfermant 10 mg pour 100 ml d'acide picolique [$^{14}\text{COOH}$] (IX). La culture est ensuite maintenue à 25° pendant six jours puis centrifugée, concentrée sous vide et additionnée de sulfate ferreux pour former la ferrosamine rouge.

Isolement de la ferrosamine formée à partir d'acide glutamique [$^{14}\text{C}(3,4)$]. La solution concentrée renfermant la ferrosamine est purifiée par chromatographie descendante sur des feuilles de papier *Whatman* 3MM à l'aide des solvants suivants:

- 1° Propanol-2/eau/méthanol 2:1:1, 4 feuilles, deux fois.
- 2° Propanol-2/eau/ammoniacque concentrée 200:100:3,3, 3 feuilles, une fois. (Dans les solvants 1.) et 2.) la ferrosamine a le même R_f que l'acide glutamique.)
- 3° Ethanol/eau 90:10, 3 feuilles, une fois.
- 4° Butanol/eau/méthanol 20:7:3, 3 feuilles, une fois.

La bande rouge correspondant à la ferrosamine est éluée chaque fois par de l'eau distillée. Au cours de ces chromatographies successives la radioactivité a été mesurée par comptage dans un scintillateur. Chaque mesure a porté sur 150 μg de ferrosamine, déterminés par colorimétrie à 556 nm; 93 μg de ferrosamine en solution dans 1 ml d'eau sous épaisseur de 1 cm possède à cette longueur d'onde une densité optique de 1. Pour chaque comptage radioactif, le rendement du scintillateur est déterminé avec 0,2 ml d'une solution témoin d'acide glutamique [$^{14}\text{C}(3,4)$] correspondant à 880 dpm. Chaque fiole de comptage renferme en plus du pigment 12 ml de dioxanne scintillant, 0,5 ml de méthanol et 0,2 ml d'eau distillée.

Après la chromatographie dans le solvant 4° la radioactivité spécifique de la ferrosamine reste constante. La solution de ferrosamine ainsi purifiée est évaporée à sec sous vide. Le résidu sec est repris dans un petit volume d'éthanol à 95%. La solution éthanolique est centrifugée pour éliminer les impuretés insolubles, le liquide surnageant est additionné d'éther anhydre, la ferrosamine qui précipite est centrifugée, lavée à l'éther et séchée. Poids recueilli: 24,25 mg, radioactivité: 5860 dpm/mg soit une activité totale de 142250 dpm. La culture avait été additionnée d'acide D,L-glutamique d'activité totale de $22 \cdot 10^6$ dpm. On en déduit une incorporation du produit marqué de 0,64% par rapport à l'acide D,L-glutamique et de 1,28% par rapport à l'acide L-glutamique naturel.

Isolement de la ferrosamine formée à partir d'acide picolique [$^{14}\text{COOH}$] (IX). – Il se fait selon le principe précédent par chromatographie sur feuilles de papier *Whatman* 3MM à l'aide des solvants suivants:

- 1° Propanol-2/eau/méthanol 2:1:1.
- 2° Butanol/eau/méthanol 20:7:3. (Dans ce solvant le R_f du complexe acide picolique- Fe^{2+} est de 0,40, celui de la ferrosamine 0,03.)
- 3° Propanol-2/ammoniacque à 1% 2:1. Après cette chromatographie la radioactivité de la ferrosamine est de 125800 dpm/mg.
- 4° Butanol/eau/pyridine 13:20:20. La radioactivité de la ferrosamine (145800 dpm/mg) ne varie pratiquement plus.

Poids obtenu: 33,75 mg, radioactivité totale $4,92 \cdot 10^6$ dpm. On avait introduit avec l'acide picolique [$^{14}\text{COOH}$] une radioactivité de $10,43 \cdot 10^6$ dpm. Le taux d'incorporation de l'acide picolique est donc d'environ 50%.

Oxydation nitrique de la ferrosamine. – Un tube scellé renfermant 12,5 mg de ferrosamine isolée après culture en milieu acide glutamique [$^{14}\text{C}(3,4)$], dissous dans 0,8 ml d'acide nitrique à 65% sont maintenus à 70° pendant 15 heures. Après ouverture du tube l'acide nitrique est évaporé

sous vide dans un dessiccateur avec KOH. Le résidu sec est chromatographié sur feuilles de papier *Whatman* 3MM avec butanol/eau/acide acétique 4:1:1 jusqu'à radioactivité constante. La zone correspondant à l'acide picolique est révélée par vaporisation avec une solution de FeSO_4 . Elle est éluée par l'eau et l'acide IX est évalué par mesure de la densité optique à 263 nm (1,4 mg).

La radioactivité spécifique de cet acide est de 12292 dpm/mg. 722 g de ferrosamine renferment théoriquement 369 g d'acide picolique; 12,5 mg de ferrosamine (activité spécifique 5860 dpm/mg soit 73325 dpm en tout) devraient donc donner naissance à 6,38 mg de cet acide dont l'activité totale serait de 78000 dpm. On voit donc qu'aux erreurs d'expérience près, toute la radioactivité de la ferrosamine est concentrée dans le squelette de l'acide picolique.

La radioactivité spécifique de la ferrosamine obtenue par culture avec l'acide picolique- $^{14}\text{COOH}$ étant trop élevée pour permettre des mesures correctes nous oxydons en tube scellé un mélange de 0,575 mg de ferrosamine radioactive (83835 dpm) avec 28,7 mg de ferrosamine froide. La radioactivité de l'acide picolique ainsi obtenu est de 5000 dpm/mg. Les 29,5 mg de ferrosamine initiale renferment théoriquement 14,93 mg de cet acide dont l'activité totale serait de 74650 dpm. Ici encore, aux erreurs d'expérience près, toute la radioactivité de la ferrosamine est donc concentrée dans le squelette de l'acide picolique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] 4^e Communication: *M. Pouteau-Thevenot, M. Choussy, M. Barbier & M. Viscontini*, *Helv.* 52, 2392 (1969).
[2] *H. R. Schütte & G. Bachmann*, *Chem. Techn.* 12, 599 (1960); *W. Schenk*, *Z. der Chem.* (Leipzig) 2, 115 (1962).
[3] *H. Gilman & A. H. Haubein*, *J. Amer. chem. Soc.* 66, 1515 (1944).

228. Anil-Synthese

7. Mitteilung¹⁾

Über die basenkatalysierte Umsetzung von methylsubstituierten 2-Phenyl-2H-benzotriazolen mit Anilen aromatischer Aldehyde

von **A. E. Siegrist** und **R. Zweidler**

Forschungslaboratorien der Division Farbstoffe und Chemikalien CIBA-GEIGY AG, Basel

In memoriam Dr. Heinrich Häusermann (1916–1971)

(18. VII. 72)

Zusammenfassung. 2-(*p*-Tolyl)-2H-benzotriazole und 2-Phenyl-5-methyl-2H-benzotriazole können mit Anilen aromatischer Aldehyde in Dimethylformamid in Gegenwart von Kaliumhydroxid in 2-(Stilben-4-yl)-2H-benzotriazole bzw. 2-Phenyl-5-styryl-2H-benzotriazole übergeführt werden («Anil-Synthese»). Durch Einführung von Substituenten wie Chlor oder Methoxygruppen kann die Lage des Fluoreszenzspektrums in Dimethylformamid eine erhebliche bathochrome oder hypsochrome Verschiebung erfahren.

In der vorangehenden Arbeit [1] wurde der Einfluss von Substituenten auf die Fluoreszenz von 2-(Stilben-4-yl)-2H-naphtho[1,2-*d*]triazolen aufgezeigt. Dabei kann insbesondere durch Einführung von Methoxy-Gruppen in den Stilbenyl-Rest eine bemerkenswerte bathochrome Verschiebung der Fluoreszenz beobachtet werden. Wir haben nun unsere Untersuchungen auf 2-(Stilben-4-yl)-2H-benzotriazole und auf die

¹⁾ 6. Mitt. s. [1].