

## 288. Ptérobiline et néoptérobilines, réactivité et structures

par Michèle Choussy et Michel Barbier

Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS  
91190 Gif-sur-Yvette, France

(30. VI. 75)

**Pterobiline and neopterobilines, reactivity and structures.** *Summary.* Pterobiline (biliverdine IX  $\gamma$ ) and the two neopterobilines: phorcabiline and sarpédobiline, are the three main bile pigments found in Lepidoptera. Studies on the reactivity of pterobiline (1) and phorcabiline esters are reported. Preparation of derivatives, *in vitro* transformation of pterobiline into phorcabiline, analysis of the pigments and their derivatives by field desorption mass spectrometry and *Fourier* transform NMR., lead to the structure 5 for the dimethyl ester of phorcabiline. By a similar reaction, biliverdine IX  $\delta$  (15) affords the neobiliverdine IX  $\delta$  (16). Possibility of an easy formation of new tetrapyrrolic compounds in the IX  $\gamma$  and IX  $\delta$  series is thus reported for the first time.

**I. Introduction.** – *Wieland & Tartter* montrent en 1940 [1] que le pigment bleu-vert de certains *Pieris* est un pigment biliaire qu'ils appellent ptérobiline. La structure de cette substance est établie en 1968 [2]; il s'agit de la biliverdine IX  $\gamma$  (1). Chez la larve de *Pieris brassicae*, la biosynthèse de la ptérobiline s'effectue selon un schéma comparable à celui rencontré chez les vertébrés pour les pigments biliaires de la série IX  $\alpha$ , seule l'ouverture de la porphyrine au niveau du pont méthine  $\gamma$  constituant une différence [3].

A la suite d'une recherche systématique, la ptérobiline a été détectée chez de nombreux lépidoptères [4–6] mais deux nouveaux pigments biliaires bleu-vert ont également été trouvés, principalement dans les familles des *Papilionidae* et des *Attacidae*: la phorcabiline, isolée pour la première fois de *P. phorcas* et la sarpédobiline, isolée pour la première fois de *P. sarpedon* [4–7]. Le terme général de néoptérobiline a été donné à ces nouveaux pigments tétrapyrroliques [4].

Le traitement par le méthanol absolu acide (chlorhydrique ou sulfurique) est la méthode la plus efficace pour l'extraction des pigments biliaires car elle permet de libérer les substances des protéines et d'estérifier les fonctions acides. Cependant, par cette technique, comme le montre la fig. 1, l'extraction de *P. phorcas* fournit un grand nombre de pigments bleu-vert dont les esters de ptérobiline (1), de phorcabiline (5) et de sarpédobiline (9) [7]. Dans le présent travail [8] nous étudions la réactivité des esters de ptérobiline et de phorcabiline en milieu méthanolique acide et identifions les pigments 2, 3, 6 et 7.

L'étude des réactions observées avec ces pigments permet d'établir la structure de la phorcabiline, de l'isophorcabiline et d'une néobiliverdine  $\delta$ .

**2. Réactivité de la ptérobiline en milieu méthanolique acide.** – L'ester diméthylé de la ptérobiline (1) traité pendant 15 h. à 20° par le méthanol absolu contenant 10% d'acide sulfurique est transformé avec un rendement de 30%

en un pigment plus polaire, identique à la substance **2** (fig. 1). Si ce traitement est prolongé, la température élevée, ou la concentration en acide augmentée, un second pigment est obtenu (**3**), puis un troisième (**4**). Par exemple, après 90 h. de traitement à 20°C par MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 20%:8,5% d'ester diméthyle de ptérobiline subsistent pour 66% de pigment **2**, 12,5% de **3** et 13% de **4**.

La spectrométrie de masse indique pour **2** et **3** des masses moléculaires de 642 et 674 (ester méthyle de la ptérobiline: 610). L'étude de **4** ne sera pas présentée. L'oxydation chromique [9] de **2** fournit les fragments monopyrroliques **10**, **11** et **12** (fig. 2); l'oxydation de **3** donne **10** et **12**. L'oxydation par le bichromate [9] conduit

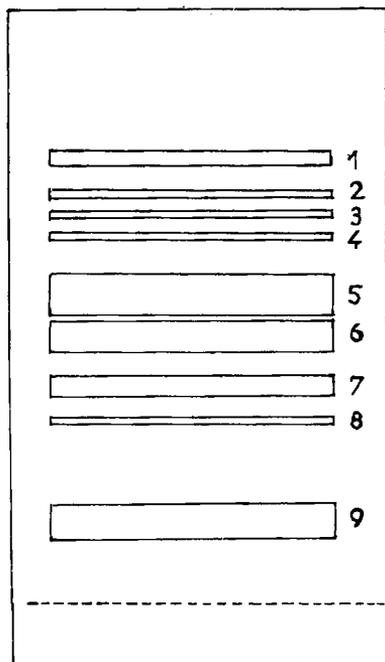


Fig. 1. Chromatographie sur couche mince (CCM.) de SiO<sub>2</sub> des pigments obtenus par traitement des ailes de *P. phorcas* par MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% 48 h. à 5° (développement par benzène/éther de pétrole/méthanol 9:5:3)

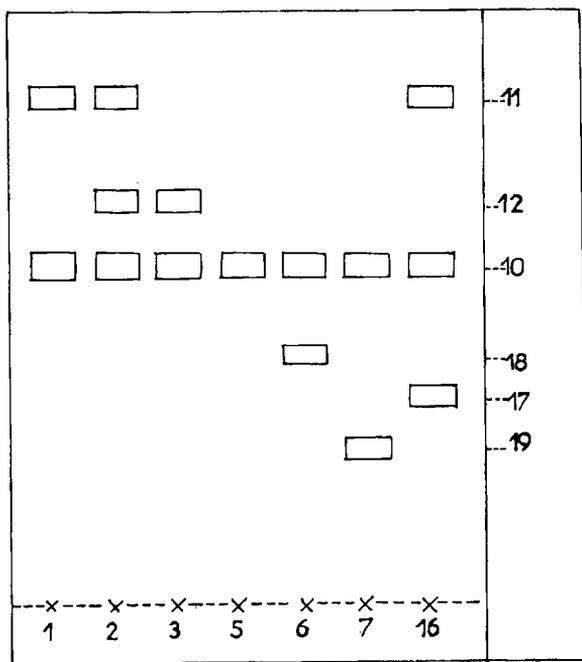
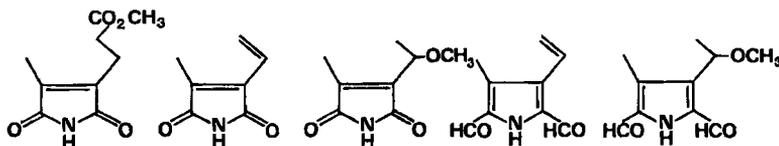


Fig. 2. Oxydation chromique des pigments biliaires (esters méthyliques): **1** ester de ptérobiline; **2** ester de monométhoxy-dihydroptérobiline; **3** ester de diméthoxy-tétrahydroptérobiline; **5** ester de phorcabiline; **6** ester de monométhoxy-dihydrophorcabiline; **7** ester d'isophorcabiline; **16** ester de néobiliverdine  $\delta$ . CCM. (SiO<sub>2</sub>, Merck, développement par tétrachlorure de carbone/cyclohexane/acétate d'éthyle 5:1:3, révélation par Cl<sub>2</sub>/benzidine).

#### Schéma 1



à partir de **2** aux dialdéhydes **13** et **14**, et à partir de **3** au dialdéhyde **14** seulement. Le pigment **2** résulte donc de l'addition d'une molécule de méthanol sur l'un des groupes vinyles de la ptérobiline (**1**) tandis que la substance **3** est le dérivé diméthoxylé correspondant (ester méthylique de la diméthoxy-tétrahydroptérobiline).

Les spectres RMN. de **2** sont présentés dans le tableau 1, en comparaison avec ceux de l'ester de ptérobiline; ils permettent de déterminer sur quelle chaîne vinylique se fixe la première molécule de méthanol. Un motif *ABX* caractéristique d'un groupe vinyle est visible dans le spectre de **2**: ( $J_{AX \text{ trans}} = 18 \text{ Hz}$ ,  $J_{BX \text{ cis}} = 11 \text{ Hz}$ ,  $J_{AB} = 1,3 \text{ Hz}$ ). L'analyse fine de cette région du spectre et la comparaison avec celui de la ptérobiline indiquent que le groupe vinyle conservé dans le pigment **2** est celui résonnant le plus loin vers les champs faibles (c'est-à-dire celui situé en 8, position centrale plus sensible que 7' à l'influence du système pseudo-aromatique de la molécule). On remarque que le singulet du groupe méthyle en 8', trouvé à 2,25 ppm dans le spectre de l'ester de ptérobiline (**1**), subit un déplacement vers les champs forts dans le spectre de **2**, ce qui peut être expliqué par le disparition de la double liaison vinylique voisine en 7'. L'addition du méthanol a suivi la règle de *Markownikoff*: un doublet à 1,46 (3H) et un quadruplet à 4,45 ppm (1H) dont l'interrelation est établie par découplage ( $J = 6 \text{ Hz}$ ) prouvent l'existence d'une chaîne  $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{OCH}_3)\text{-}[\text{OCH}_3 : s, 3\text{H}, 3,27 \text{ ppm}]$ .

**3. Réactivité de la phorcabiline en milieu méthanolique acide.** – Le traitement de l'ester diméthylique de la phorcabiline (**5**) par le méthanol sulfurique à 5%, pendant 20 h. à 5° conduit à la formation de **6** (fig. 1). Un traitement plus énergétique soit de **5** soit de **6** donnera essentiellement **7**. La spectrométrie de masse par désorption de champ permet de connaître les masses moléculaires de ces substances: ester de la phorcabiline (**5**): 610 (donc isomère de l'ester de ptérobiline (**1**)); (**6**): 642; (**7**): 610. Le pigment **7** est l'isophorcabiline, dont les propriétés ont été précédemment reportées [6]. Sa structure sera discutée dans la dernière partie. L'impossibilité d'additionner deux molécules de méthanol à la phorcabiline (ce qui aurait donné un dérivé de masse 674) suggère la présence d'un seul groupe vinyle. Ceci est confirmé par les spectres RMN. (tableau 1, fig. 3). On constate la présence d'un seul système *ABX*, à 5,28 ( $H_B$ ), 5,36 ( $H_A$ ) et 6,36 ppm ( $H_X$ ); ( $J_{AX} = 18 \text{ Hz}$ ;  $J_{BX} = 11 \text{ Hz}$ ;  $J_{AB} = 1,3 \text{ Hz}$ ). Ce motif a disparu dans le spectre de **6** alors que les nouveaux signaux peuvent être attribués à une chaîne  $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{OCH}_3)\text{-C}=[\text{CH}_3 : d, 3\text{H}, 1,46 \text{ ppm}, J = 6 \text{ Hz}$ ;  $\text{CH} : q, 1\text{H}, 4,42 \text{ ppm}, J = 6 \text{ Hz}$ ;  $\text{OCH}_3 : s, 3\text{H}, 3,32 \text{ ppm}]$ . La substance **6** est donc l'ester diméthylique d'une monométhoxydihydrophorcabiline.

**4. Conversion de biliverdines en néobiliverdines.** – Lors de l'étude de la biosynthèse de la phorcabiline (**5**) par la chenille de *Actias selene* (*Attacidae*) [10] il a été démontré que la ptérobiline (ou biliverdine IX  $\gamma$ ) est précurseur biologique de cette néoptérobiline. Nous avons obtenu la transformation *in vitro* de la ptérobiline en phorcabiline par chauffage de son ester en solution méthanolique. Divers essais ont montré que la réaction nécessite un solvant polaire, l'absence d'oxygène et des températures comprises entre 100 et 130°. Dans ces conditions, la transformation peut atteindre 70% après 2 h. Une faible basicité ou acidité de la solution méthanolique ne favorise pas la réaction, car elle catalyse d'autres transformations de la ptérobiline.

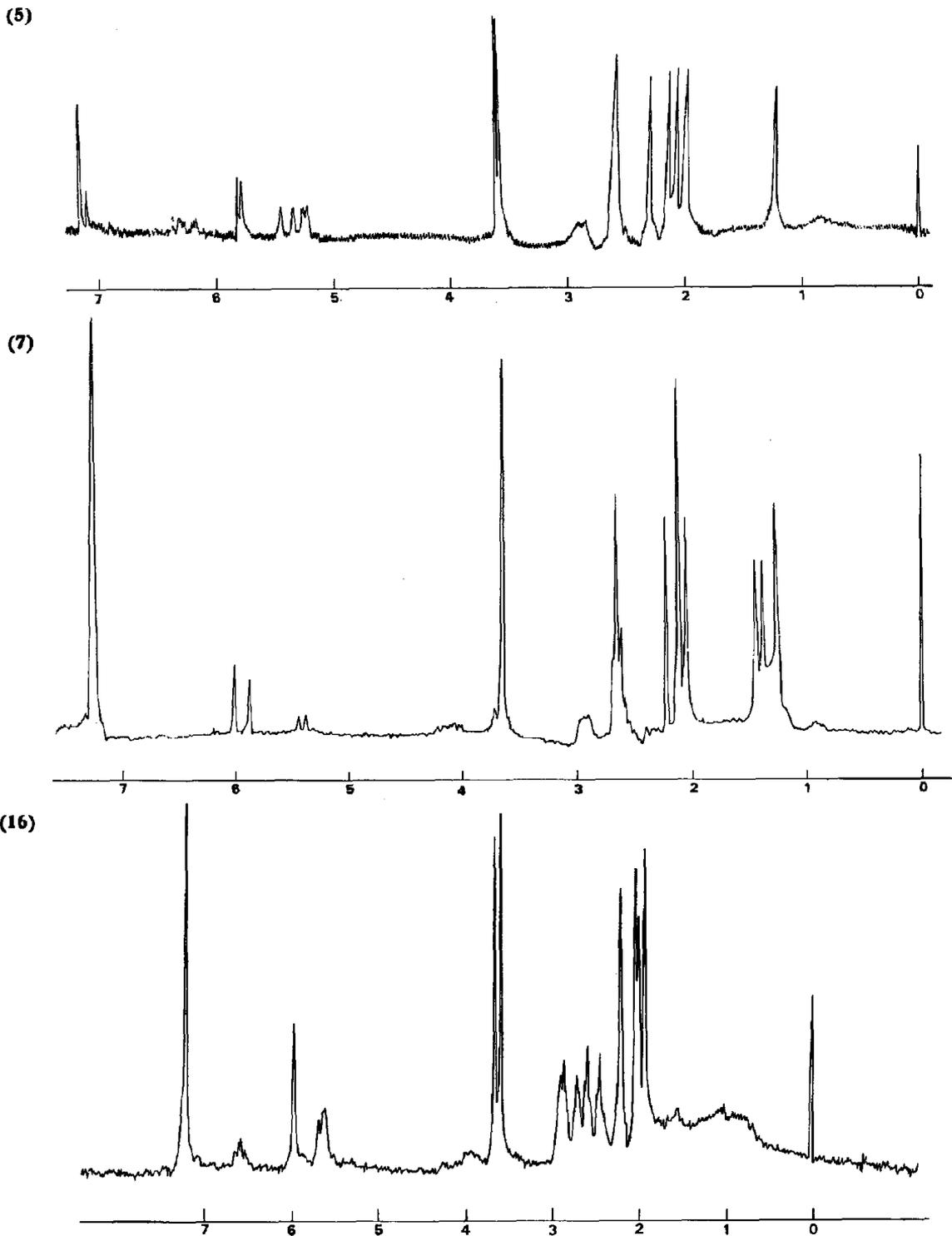
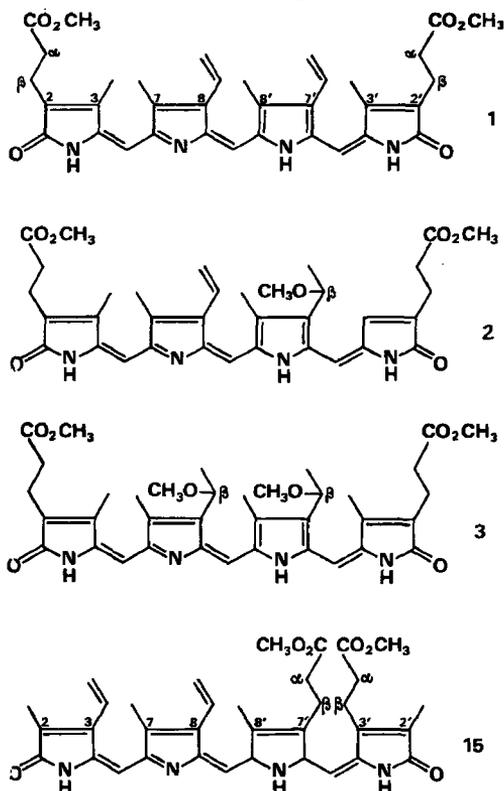


Fig. 3. Spectres RMN. (dans  $\text{CDCl}_3$ ) des esters méthyliques de: phorcabiline (5) (90 MHz), isophorcabiline (7) (90 MHz), néobiliverdine  $\delta$  (16) (240 MHz) (7,27 ppm =  $\text{CHCl}_3$ ; 1,27 ppm = impureté).

Schéma 2



Considérant que la phorcabiline diffère de la ptérobiline par une modification qu'il est possible de localiser au niveau d'une chaîne vinyloxyde, nous avons répété la réaction conduisant à la phorcabiline sur les dérivés suivants: ester de la dihydroptérobiline méthoxylée en  $7'\beta$  (2), ester de la tétrahydroptérobiline méthoxylée en  $8\beta$  et  $7'\beta$  (3), esters des biliverdines IX  $\alpha$  IX  $\beta$  et IX  $\delta$  (15) (groupes vinyloxyde respectivement situés en position 3, 2'; 7', 2' et 3, 8). Avec la première de ces substances, la réaction fournit le pigment 6, dérivé monométhoxylé de l'ester de phorcabiline. Aucune transformation n'est obtenue avec le dérivé diméthoxylé (3) de la tétrahydroptérobiline, de même qu'avec les biliverdines IX  $\alpha$  et IX  $\beta$ . Par contre, l'ester de la biliverdine IX  $\delta$  (15), seule à posséder comme la ptérobiline un groupe vinyloxyde en position centrale 8, se convertit en ester de néobiliverdine  $\delta$ , pigment chromatographiquement et spectrophotométriquement très semblable à l'ester de phorcabiline. Le premier de ces essais (effectué sur 2) indique que le vinyloxyde en  $7'$  reste libre lors de la conversion en phorcabiline. C'est donc le vinyloxyde central en 8 qui réagit lors de la formation d'une néobiliverdine  $\gamma$  (phorcabiline) ou  $\delta$ . Les spectres de  $^1\text{H}$ -RMN, des esters de biliverdine  $\delta$  (15) et de néobiliverdine  $\delta$  (16) sont explicités au tableau 1.

**5. Oxydations chromiques des néobiliverdines.** – Contrairement à ce que l'on observe avec l'ester de ptérobiline (1), l'oxydation de l'ester de la phorcabiline (5) par le bichromate, ne produit pas le dialdéhyde 13, de même son oxydation par l'acide chromique ne fournit pas le méthylvinylmaléimide 11; seul l'ester

Tableau 1. Spectres  $^1H$  - RMN. Déplacements en ppm par rapport au TMS

Attribution	Ester méthylique de ptérobiline		Ester méthylique de monométhoxydihydroptérobiline		Ester méthylique de phorcabiline
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
	CDCl <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	CDCl <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	CDCl <sub>3</sub>
CH <sub>3</sub> -CH-			1,46 <sup>a</sup> <i>d</i> 3H	1,49 <i>d</i> 3H	
CH <sub>3</sub> -C=	2,09 <i>s</i> 6H	1,69 <i>s</i> 6H	2,09 <i>s</i> 6H	1,69 <i>s</i> 3H	2,03 <i>s</i> 3H
	2,14 <i>s</i> 3H	1,85 <i>s</i> 3H	2,14 <i>s</i> 3H	1,76 <i>s</i> 3H	2,09 <i>s</i> 3H
	2,25 <i>s</i> 3H	2,03 <i>s</i> 3H	2,18 <i>s</i> 3H	1,89 <i>s</i> 3H	2,16 <i>s</i> 3H
				1,95 <i>s</i> 3H	2,33 <i>s</i> 3H
-CH <sub>2</sub> -	2,54 <i>m</i> 8H	2,58 <i>m</i> } 2,65 <i>m</i> } 8H	2,54 <i>m</i> 8H	2,58 <i>m</i> } 2,65 <i>m</i> } 8H	2,65 <i>m</i> 10H 2,90 <i>m</i> 2H
-O-CH <sub>3</sub>			3,27 <i>s</i> 3H	3,11 <i>s</i> 3H	
-COOCH <sub>3</sub>	3,62 <i>s</i> 6H	3,41 <i>s</i> 6H	3,62 <i>s</i> 6H	3,41 <i>s</i> 6H	3,62 <i>s</i> 6H
H-C-CH <sub>3</sub>			4,45 <sup>a</sup> <i>q</i> 1H	4,30 <i>q</i> 1H	
$  \begin{array}{c}  \text{H}_A \quad \text{H}_B \\  \diagdown \quad \diagup \\  \text{C} \\  \parallel \\  \text{C} \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{H}_X  \end{array}  $	5,28 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>B</sub> (7 <sub>γ</sub> )	5,30 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>B</sub> (7)	5,36 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>B</sub> (8)	5,36 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>B</sub> (8)	5,28 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>B</sub> (7 <sub>γ</sub> )
	5,32 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>A</sub> (7 <sub>γ</sub> )	5,33 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>A</sub> (7)	5,40 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>A</sub> (8)	5,53 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>A</sub> (8)	5,36 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>A</sub> (7 <sub>γ</sub> )
	5,36 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>B</sub> (8)	5,36 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>B</sub> (8)			
	5,40 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>A</sub> (8)	5,53 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>A</sub> (8)			
	6,50 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>X</sub> (7 <sub>γ</sub> )	6,59 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>X</sub> (7)	6,62 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>X</sub> (8)	6,75 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>X</sub> (8)	6,36 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>X</sub> (7 <sub>γ</sub> )
	6,62 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>X</sub> (8)	6,75 <i>d</i> × <i>d</i> H <sub>X</sub> (8)			
$\text{>CH} =$	5,78 <i>s</i> 1H	5,43 <i>s</i> 1H	5,84 <i>s</i> 1H	5,43 <i>s</i> 1H	5,80 <i>s</i> 1H
	5,90 <i>s</i> 1H	5,63 <i>s</i> 1H	6,10 <i>s</i> 1H	6,09 <i>s</i> 1H	5,85 <i>s</i> 1H
	6,65 <i>s</i> 1H	6,77 <i>s</i> 1H	6,65 <i>s</i> 1H	6,77 <i>s</i> 1H	—

<sup>a</sup> indique les découplages effectués.

hématinique (10) est détectable en CCM. (fig. 2). L'oxydation chromique de l'ester de néobiliverdine IX  $\delta$  (16) (fig. 2) conduit à la formation d'ester hématinique (10), de méthylvinylmaléimide (11) et d'un troisième fragment (17) qui a été étudié par spectrométrie de masse: l'ion moléculaire à  $m/e$  334 et le pic de base à 210 sont chacun accompagnés des fragmentations caractéristiques de la fonction ester méthylique: ( $m/e$  303 ( $M-\text{OCH}_3$ )<sup>+</sup>; 275 ( $M-\text{COOCH}_3$ )<sup>+</sup>; 178 ( $210-\text{CH}_2\text{OH}$ )<sup>+</sup>; 150 ( $210-\text{HCOOCH}_3$ )<sup>+</sup>).

L'oxydation du pigment 6 donne l'ester hématinique et un fragment dimaléimide (18) présentant en spectrométrie de masse les pics à  $m/e$ : 306, 274 ( $M-\text{HOCH}_3$ )<sup>+</sup> et 182. L'oxydation chromique de l'ester d'isophorcabiline (7) conduit à l'ester hématinique et à un nouveau fragment maléimide (19) ( $m/e = 471$ ) qui a été étudié par spectrométrie de masse en haute résolution (tableau 2).

Ces résultats conduisent pour ces produits d'oxydation aux structures 17, 18 et 19 proposées dans le schéma 3, les fragmentations principales observées en spectrométrie de masse correspondant aux coupures en  $\beta$  de N. L'absence de dérivé dimaléimide lors de l'oxydation chromique de la phorcabiline s'explique par l'instabilité du composé qui serait obtenu: le méthylvinylmaléimide est lui-même souvent difficile à détecter pour cette raison.

Ester méthylique de monométhoxydihydrophorcabiline (6)		Ester méthylique d'isophorcabiline (7)		Ester méthylique de biliverdine $\delta$ (15)	Ester méthylique de néobiliverdine $\delta$ (16)	
CDCl <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	CDCl <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>
1,46 <sup>a</sup> <i>d</i> 3H	1,49 <i>d</i> 3H	1,46 <sup>a</sup> <i>d</i> 3H	1,35 <i>d</i> 3H			
2,03 <i>s</i> 3H	1,70 <i>s</i> 3H	2,03 <i>s</i> 3H	1,70 <i>s</i> 3H	1,77 <i>s</i> 3H	1,96 <i>s</i> 3H	1,61 <i>s</i> 3H
2,09 <i>s</i> 3H	1,75 <i>s</i> 6H	2,14 <i>s</i> 6H	1,78 <i>s</i> 3H	1,83 <i>s</i> 3H	1,99 <i>s</i> 3H	1,70 <i>s</i> 3H
2,16 <i>s</i> 3H	1,80 <i>s</i> 3H	2,28 <i>s</i> 3H	1,82 <i>s</i> 6H	2,17 <i>s</i> 6H	2,06 <i>s</i> 3H	1,80 <i>s</i> 3H
2,33 <i>s</i> 3H					2,25 <i>s</i> 3H	1,83 <i>s</i> 3H
					2,48 <i>m</i> 4H	2,22 <i>m</i>
2,65 <i>m</i> 10H	2,58 <i>m</i> 10H	2,65 <i>m</i> 10H	2,58 <i>m</i> 1CH	2,70 <i>m</i> 8H	2,60 <i>t</i> 2H	2,34 <i>m</i>
2,96 <i>m</i> 2H	2,33 <i>m</i> 2H	3,02 <i>m</i> 2H	2,58 <i>m</i>		2,77 <i>t</i> 2H	2,50 <i>m</i>
			2,36 <i>m</i> 2H		2,93 <i>m</i> 4H	
3,32 <i>s</i> 3H	3,11 <i>s</i> 3H					
3,62 <i>s</i> 6H	{ 3,35 <i>s</i> 3H	3,62 <i>s</i> 6H	3,35 <i>s</i> 6H	3,70 <i>s</i> 6H	{ 3,63 <i>s</i> 3H	{ 3,16 <i>s</i> 3H
	{ 3,38 <i>s</i> 3H				{ 3,70 <i>s</i> 3H	{ 3,23 <i>s</i> 3H
4,42 <sup>a</sup> <i>q</i> 1H	4,30 <i>q</i> 1H	5,45 <sup>a</sup> <i>q</i> 1H	5,27 <i>q</i> 1H			
				5,50 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> H <sub>B</sub> ( $\delta$ )		
				5,53 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> H <sub>A</sub> ( $\delta$ )		5,16 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> H <sub>B</sub> ( $\delta$ )
				5,65 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> H <sub>B</sub> ( $\delta$ )	5,66 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> H <sub>B</sub> ( $\delta$ )	5,28 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> H <sub>A</sub> ( $\delta$ )
				5,65 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> H <sub>A</sub> ( $\delta$ )	5,70 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> H <sub>A</sub> ( $\delta$ )	
				6,65 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> H <sub>X</sub> ( $\delta$ )		6,23 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> H <sub>X</sub> ( $\delta$ )
				6,85 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> H <sub>X</sub> ( $\delta$ )	6,65 <i>d</i> $\times$ <i>d</i> H <sub>X</sub> ( $\delta$ )	
5,80 <i>s</i> 1H	5,85 <i>s</i> 2H	5,78 <i>s</i> 1H	5,76 <i>s</i> 2H	6,0 <i>s</i> 1H	6,01 <i>s</i> 2H	5,76 <i>s</i> 1H
5,85 <i>s</i> 1H		5,95 <i>s</i> 1H		6,05 <i>s</i> 1H		5,89 <i>s</i> 1H
7,39 <i>s</i> 1H		6,86 <i>s</i> 1H	—	6,86 <i>s</i> 1H	7,30 <i>s</i> 1H	7,0 <i>s</i> 1H

**6. Structure de la phorcabiline.** – L'évidence d'une structure IX  $\gamma$  pour ce nouveau pigment, résulte des expériences de biosynthèse [10], de l'obtention de phorcabiline à partir de la ptérobiline *in vitro*, ainsi que de données fournies par

Tableau 2. Spectre de masse de 19, fragment d'oxydation de l'ester diméthylique de l'isophorcabiline (7)

Spectre de l'ester méthylique (19)	Intensité relative en %	Formule obtenue par haute résolution	Signification	Pic métastable à <i>m/e</i>	Ions à double charge	Spectre de l'ester CD <sub>3</sub>
471, 1629	16,8	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>				474
440, 1454	8,6	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	471–31(OCH <sub>3</sub> )			440
439, 1379	11,2	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	471–32(HOCH <sub>3</sub> )	409	219,5	439
411, 1437	4,3		471–60(HCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )		205,5	411
347, 1232	47,6	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>				350
316, 1032	5,5	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	347–31(OCH <sub>3</sub> )			316
315, 0960	23,7	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	347–32(HOCH <sub>3</sub> )	286	157,5	315
287, 1026	21,5	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	347–60(HCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )		143,5	287
274, 0961	38,9	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	347–73(CH <sub>2</sub> –CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )			274
224, 0916	16,2	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>4</sub>				227
192			224–32(HOCH <sub>3</sub> )	164		192
164			224–60(HCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )			164
150			224–74(CH <sub>3</sub> –CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )			150

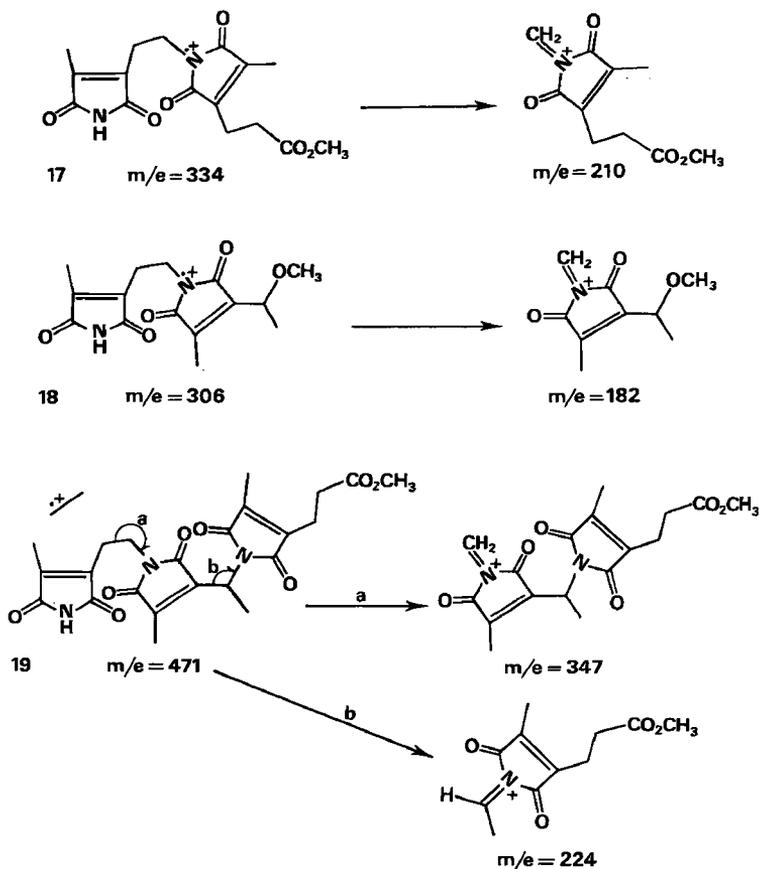


Schéma 3. Structures et fragmentations en spectrométrie de masse des produits d'oxydation particuliers aux esters de néobiliverdines: **17** produit d'oxydation de l'ester de néobiliverdine  $\delta$  (**16**); **18** produit d'oxydation de l'ester de monométhoxydihydrophorcabiline (**6**); **19** produit d'oxydation de l'ester de l'isophorcabiline (**7**)

RMN.: il n'est pas observé de singulets de groupes méthyle situés en 2 ou 2', dont les déplacements chimiques seraient inférieurs à 2 ppm dans  $\text{CDCl}_3$ ; de plus, les quatre groupes méthylène des deux chaînes propioniques donnent un signal large mais unique à 2,65 ppm indiquant que les  $\text{CH}_2$  en  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ester sont équivalents, ce qui n'est possible qu'en position *exo-2,2'* (dans toute autre position de la chaîne propionique, le signal du  $\text{CH}_2$  en  $\beta$  de l'ester, plus influencé par le caractère pseudo-aromatique de la molécule, est déplacé vers les champs faibles).

La spectrométrie de masse par désorption de champ a conduit pour l'ester méthylique de la phorcabiline à une masse de 610 identique à celle de l'ester de ptérobiline. En RMN., les singulets des quatre groupes méthyle sur doubles liaisons sont présents avec des déplacements cependant un peu différents de ceux de la ptérobiline, les protons des ponts méthine extérieurs résonnent comme ceux de la ptérobiline alors que le proton du pont méthine central donne un singulet plus déplacé vers les champs faibles (il est souvent masqué par le signal du chloroforme). La même observation

est faite en comparant les spectres RMN. de la biliverdine  $\delta$  et de la néobiliverdine  $\delta$  (tableau 1), indiquant une modification au niveau du pont méthine central.

Une seule des deux fonctions vinyles subsiste dans la phorcabiline et la néobiliverdine  $\delta$ ; ce fait est confirmé dans le premier cas par l'existence du dérivé **6** provenant de l'addition d'une molécule de méthanol sur un groupe vinyle et dont le spectre RMN. ne possède plus de signaux pouvant être attribués à un groupe vinyle. La localisation en 7' de cette fonction vinyle dans la phorcabiline et du groupe  $\beta$ -méthoxyéthyle dans le pigment **6** repose sur la nature des fragments obtenus par oxydation de **6** et **7** et sur le fait que la 7' $\beta$ -méthoxydihydroptérobiline (**2**) puisse être transformée en **6**.

La nature de la chaîne en 8 chez les néobiliverdines  $\gamma$  et  $\delta$  est suggérée par la formation des dérivés d'oxydation **17**, **18** et **19**. L'obtention de dimaléimides, observés uniquement lors de l'oxydation chromique des néobiliverdines, suppose qu'il existe entre les deux cycles centraux une seconde liaison différente de celle du pont méthine. La conversion de biliverdines en néobiliverdines (schéma 4) peut être considérée comme une réaction d'addition de l'amine du noyau C sur la double liaison du vinyle 8, activée par la résonance avec un carbonyle.

Dans les spectres RMN. de l'ester de la phorcabiline et des pigments **6** et **7**, le CH<sub>2</sub> en 8 $\beta$ , plus déplacé que les CH<sub>2</sub> en 2 $\beta$  et 2' $\beta$  des chaînes propioniques, résonne vers 2,95 ppm, le signal du CH<sub>2</sub> en 8 $\alpha$  se trouve dans le massif à 2,65 ppm (l'intégration de ces spectres, mesurés en transformé de *Fourier* reste cependant douteuse à ce niveau). Le spectre de l'ester de néobiliverdine  $\delta$  (**16**) (tableau 1, fig. 3) (chaînes propioniques en 3' et 7') présente dans cette région une succession de signaux pour lesquels l'intégration est plus claire: 4H à 2,93 ppm, 2H à 2,77 ppm, 2H à 2,60 ppm et 4H à 2,48 ppm. L'irradiation à 2,93 ppm transforme le triplet à 2,60 ppm en singulet et affine le signal à 2,48 ppm. On peut donc attribuer aux CH<sub>2</sub> en 8 $\alpha$  et 8 $\beta$  les déplacements respectifs de 2,60 et 2,93 ppm et aux CH<sub>2</sub> propioniques de la néobiliverdine  $\delta$ , ceux de = 2,48 (CH<sub>2</sub> en 3' $\alpha$  et 7' $\alpha$ ), 2,77 (CH<sub>2</sub> en 3' $\beta$ ) et 2,93 ppm (CH<sub>2</sub> en 7' $\beta$ ).

La structure **7** (schéma 5) de l'isophorcabiline, découle de l'identification de son fragment d'oxydation **19**. Le spectre de masse de **7** ( $m/e = 610$ ) et son spectre de RMN. (absence de singulet à 3,32 ppm) prouvent l'élimination du groupe méthoxyle qui existait dans **6**. La conservation d'un CH<sub>3</sub>-CH< (1,45 ppm, *d*, 3H; 5,45 ppm, *q*, 1H;  $J = 6$  Hz) est en accord avec la réaction de substitution du méthoxyle par l'amine du noyau pyrrolique voisin selon le schéma 5. Le doublet du groupe méthyle a dans CDCl<sub>3</sub> un déplacement identique à celui de **6**, tandis que le signal du proton correspondant est déplacé de 1 ppm vers les champs faibles. Ceci peut s'expliquer par la situation de ce proton qui dans la molécule d'isophorcabiline (**7**) est pris dans une structure rigide et se trouve au centre du cône d'anisotropie du groupe carbonyle du noyau D. Le groupe méthyle, en position axiale, ne subit pas cette influence.

La réaction de transformation des biliverdines  $\gamma$  ou  $\delta$  en néobiliverdines nécessite que les noyaux pyrroliques B, C et D soient en position inversée (schémas 4 et 5) afin que la cyclisation puisse avoir lieu. On ne peut dire si cette situation préexiste chez la ptérobiline et la biliverdine  $\delta$ , ou si c'est l'apport énergétique (thermique ou H<sup>+</sup>) qui produit une isomérisation convenable. Il est peu probable que les pigments tétrapyrroliques du type verdine présentent la structure rigide linéaire (schéma 2)

qui est celle sous laquelle ils sont habituellement représentés. *Schrom & Kroes* [11] mettant en évidence des liaisons hydrogènes entre les azotes et les fonctions acides de la phycocyanobiline sont également partisans de structures à noyaux inversés pour les pigments tétrapyrroliques de la série  $\alpha$ .

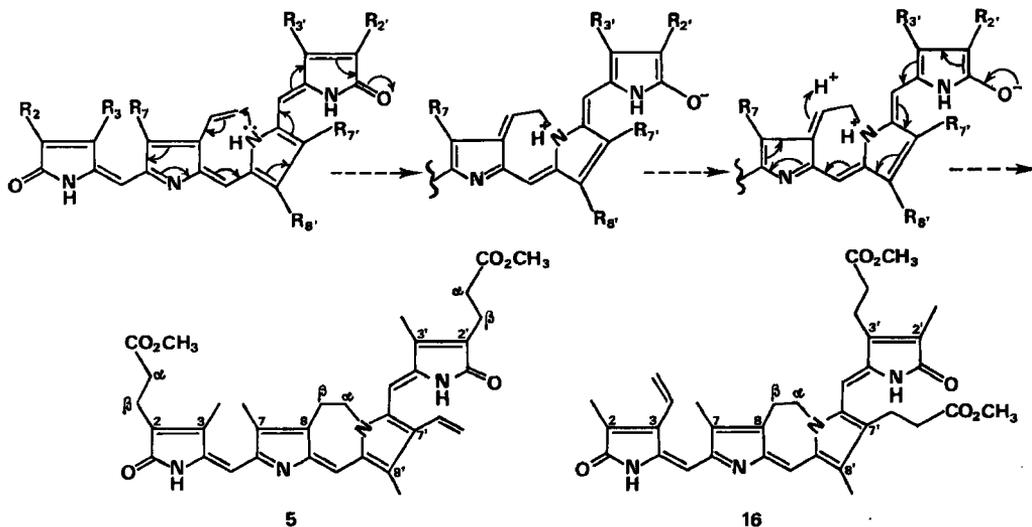


Schéma 4. Hypothèse de formation de la phorcabiline (5) à partir de piérobiline ( $R^3 = R^7 = R^{8'} = R^{3'} = \text{Me}$ ;  $R^{7'} = \text{V}$ ;  $R^2 = R^{2'} = \text{Pr}$ ), et de la néobiliverdine  $\delta$  (16) à partir de la biliverdine  $\delta$  ( $R^2 = R^7 = R^{8'} = R^{2'} = \text{Me}$ ;  $R^3 = \text{V}$ ;  $R^{7'} = R^{3'} = \text{Pr}$ )

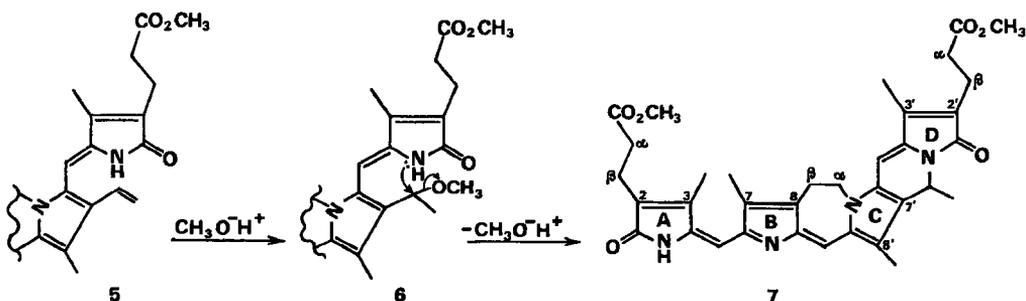


Schéma 5. Transformations successives en milieu  $\text{MeOH}/\text{H}^+$  de phorcabiline (5) en méthoxy-dihydro-phorcabiline (6) puis en isophorcabiline (7)

Nous remercions les Professeurs *E. Lederer* et *J. Bergerard* pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. Nous remercions *M. Bardey* pour la mesure des spectres de masse en impact électronique sous la direction du Dr *B. C. Das*, les Professeurs *A. H. Jackson* et *K. L. Rinehart* pour les spectres en désorption de champ et le Dr *W. Vetter* pour les mesures en haute résolution. Nous remercions la Maison *CAMECA* et le laboratoire d'Electronique de la Faculté d'Orsay pour les mesures de spectres RMN. à 240 MHz ainsi que le Dr *A. Gaudemer* pour ses conseils dans l'interprétation de spectres RMN.

### Partie expérimentale

Les spectres de masse ont été obtenus sur un appareil *AEI MS9* pour les mesures en impact électronique et sur des appareils *Varian MAT CH-5 DF* et *MAT 731* pour les mesures en désorption de champ.

Les spectres RMN. ont été obtenus en transformé de *Fourier* sur des appareils *Bruker* 90 MHz et *CAMECA* 240 MHz.

Les biliverdines IX  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (ptérobiline) et  $\delta$  sont préparées et purifiées selon la méthode de Bonnet & McDonagh [12] par oxydation de l'hémicine en présence d'acide ascorbique. Elles sont identifiées par leur spectre RMN. L'ester méthylique de la ptérobiline peut également être obtenu par traitement d'ailes de *Pieris brassicae* par le méthanol absolu sulfurique.

L'ester méthylique de la phorcabiline a été isolé à partir d'ailes de *Papilio phorcas* (mâles) suivant le procédé décrit [6], purifié par CCM. sur plaques de SiO<sub>2</sub> (Merck) dans le système benzène/éther de pétrole/méthanol 9:5:3 et précipité dans HCCl<sub>3</sub>/éther de pétrole. La sarpédobiline provient du traitement semblable d'ailes de *Papilio sarpedon*.

**Préparation de dérivés.** – La plupart des composés décrits dans ce travail ont été isolés à l'état amorphe en quantités de l'ordre du mg.

**Dérivés de la ptérobiline.** Les substances méthoxylées **2** et **3** sont obtenues par le traitement de l'ester diméthylique de la ptérobiline pendant 90 h. à 20° par MeOH anhydre/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 20%; elles sont extraites par HCCl<sub>3</sub> puis isolées en CCM. sur SiO<sub>2</sub> en développant par le mélange benzène/éther de pétrole/méthanol 9:5:1.

**Dérivés de la phorcabiline.** La substance **6** est préparée en laissant réagir l'ester diméthylique de phorcabiline pendant 48 h. à 20° dans MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 20%; elle est purifiée par CCM. sur SiO<sub>2</sub> dans le mélange benzène/éther de pétrole/méthanol 9:5:3 puis dans AcOEt. Le pigment **7** (ester de l'isophorcabiline) se forme en 30 min. en traitant l'ester de phorcabiline par MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 20% à 80°. L'isolement, après extraction par HCCl<sub>3</sub> se fait par CCM, en développant par l'acétone.

**Néobiliverdines.** L'ester méthylique de la biliverdine choisie, en solution dans le méthanol anhydre, est introduit dans un tube de pyrex pour vide. La solution est dégazée sous vide par congélation-décongélation répétée dans l'azote liquide, puis le tube est scellé et laissé 2 h. à 100°. Les néobiliverdines sont isolées par CCM, en développant par le mélange benzène/éther de pétrole/méthanol 9:5:3.

**Oxydations.** – Les oxydations par l'acide chromique ou le bichromate de potassium ont été réalisées suivant les méthodes de Rüdiger [9]. Elles peuvent être réalisées directement sur la plaque de chromatographie: après dépôt de la substance en tache ou en trait, on recouvre par la solution de l'oxydant, sèche à l'air à 20° et développe par le système CCl<sub>4</sub>/AcOEt/cyclohexane 5:3:1. Les dialdéhydes sont révélés par aspersion d'une solution de chlorhydrate de dinitro-2,4-phénylhydrazine et les maléimides par la benzidine/McOH après avoir préalablement laissé la CCM. quelques min. dans une enceinte saturée en Cl<sub>2</sub>.

Les composés d'oxydation **10** à **14** sont identifiés d'après leur R<sub>f</sub> en CCM. comparés à ceux des substances authentiques. L'ester hématinique (**10**) est isolé et contrôlé en spectrométrie de masse (*m/e*: 197, 165, 137, 124 et 109).

L'ester CD<sub>3</sub> du fragment d'oxydation **19** est préparé en oxydant à 100° l'ester d'isophorcabiline; dans ces conditions hydrolysantes, on peut isoler le fragment acide qui est ensuite réestérifié par CD<sub>3</sub>OH/SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>.

Les faibles quantités obtenues pour l'ensemble des dérivés d'oxydation n'ont jamais permis d'en mesurer des spectres RMN.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. Wieland & A. Tartler, Liebig's Ann. Chem. 545, 197 (1940).
- [2] W. Rüdiger, W. Klose, M. Vuillaume & M. Barbier, Experientia 24, 1000 (1968).
- [3] W. Rüdiger, W. Klose, M. Vuillaume & M. Barbier, Experientia 25, 487 (1969).
- [4] M. Vuillaume & M. Barbier, C. hebd. Séances Acad. Sci 163, 591 (1969).
- [5] M. Vuillaume, M. Choussy & M. Barbier, Bull. Soc. zool. France 95, 19 (1970).
- [6] M. Choussy & M. Barbier, Biochem. Systematics 1, 199 (1973).
- [7] M. Choussy, M. Barbier, W. Rüdiger & W. Klose, Comp. Biochem. Physiol. 44B, 47 (1973).
- [8] Ce travail fait partie de la thèse de Doctorat d'Etat de M. Choussy.
- [9] W. Rüdiger, Z. physiol. Chem. 350, 1291 (1969).
- [10] M. Choussy, M. Barbier & M. Vuillaume, Biochimie 57, 369 (1975).
- [11] B. L. Schrom & H. H. Kroes, Europ. J. Biochemistry 19, 581 (1971).
- [12] R. Bonnett & A. F. McDonagh, J. chem. Soc. Perkin I, 1973, 881.