

STRUCTURE DES AGLYCONES DES MYCOSIDES A et B*

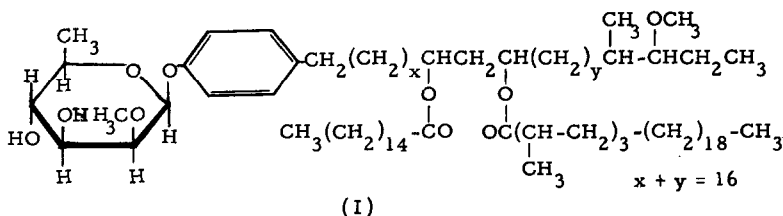
M. Gastambide-Odier, P. Sarda et E. Lederer
 Institut de Chimie des Substances Naturelles,
 C. N. R. S., Gif-sur-Yvette (S & O)

(Received 15 July 1965)

Les souches atypiques photochromogènes de Mycobactéries sont caractérisées par une substance spécifique, le "mycoside A" (1,2,3,4), tandis que les souches bovines de M. tuberculosis contiennent le "mycoside B" (3,4,5,6). Ces mycosides sont des glycolipides contenant des 6-désoxy-sucres que Mac Lennan et coll. ont identifiés (7).

Dans le mycoside A les sucres seraient liés à une partie lipidique aromatique qui est estérifiée par de l'acide mycocérosique (2,3).

Pour le mycoside B la structure (I) a été proposée (8) :



* 79^{ème} communication sur les constituants des Mycobactéries ;
 78^{ème} comm. : voir A.H. Etémadi et J. Gasche, Bull. Soc. Chim.
 Biol., sous presse.

Ce travail a bénéficié d'une subvention du National Institute
 of Health (U. S. Public Health Service), Grant AI-02838.

Une molécule de 2-O-méthyl-L-rhamnose est liée sous forme de glycoside sur le OH phénolique d'un "phénol-glycol B" dont les deux OH aliphatiques sont estérifiés par des acides gras.

Nous avons repris l'étude de ces deux mycosides afin de préciser la structure de leurs aglycones, les "lipides A et B".

Mycoside A

Le mycoside A, isolé de la souche M. kansasii n°4 et purifié par chromatographies successives, est une cire blanche ($F = 108-109^\circ$), $[\alpha]_D^{20} = -37^\circ$ (CHCl_3), qui ne contient ni azote, ni phosphore (7). Il présente une seule tache ($R_f = 0,78$) sur chromatoplaque d'acide silicique dans le chloroforme-méthanol (93:7). La présence dans son spectre I.R. de bandes à 1615 et 1515 cm^{-1} et dans son spectre U.V. de bandes à 223, 276 et 283 $\text{m}\mu$ suggère l'existence d'un éther aromatique (2,3).

L'hydrolyse acide du mycoside A libère l'aglycone ("lipide A"); c'est une substance liquide à la température ordinaire, $[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$ (CHCl_3). Le spectre I.R. présente les bandes caractéristiques du noyau aromatique (1610, 1595 et 1510 cm^{-1}), une bande hydroxyle à 3450 cm^{-1} (absente dans l'éther méthylique) et une bande ester à 1740 cm^{-1} . Une bande à 830 cm^{-1} semble indiquer que le noyau aromatique est disubstitué en para. Le spectre de R.M.N. de l'aglycone confirme cette observation. En effet, il présente un quadruplet symétrique centré à 406,5 cps (système A_2B_2) caractéristique d'un noyau phénolique dont l'hydroxyle est en para par rapport à une chaîne aliphatique (9). On observe également un singulet à 195 cps ($-\text{OCH}_3$), un multiplet (2H) à 288 cps, attribuable à 2 protons du type $(\text{R}-\underset{\text{H}}{\underset{|}{\text{C}}}-\underset{\text{O}^*}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{R}')$ et un signal à 53 cps correspondant aux groupements méthyles.

* Nous remercions très vivement Monsieur A. Gaudemer pour l'interprétation de ce spectre.

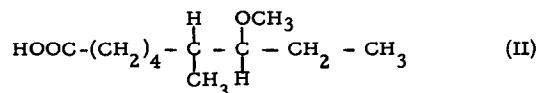
Les acides gras de l'aglycone ont été libérés par saponification prolongée, puis estérifiés par le diazométhane. Les constituants principaux du mélange ainsi isolé ont été identifiés par chromatographie gazeuse et par spectrométrie de masse : ce sont des esters méthyliques d'acides en C_{12} , C_{14} , C_{16} , C_{18} , C_{18} mono-insaturé, de l'acide tuberculostéarique et des acides mycocérosiques en C_{27} , C_{29} , C_{30} et C_{32} (poids moléculaires= 424, 452, 466, 494).

Le "phénol-glycol A" résultant de la saponification de l'aglycone, fond à 60-61°. Le spectre U.V., dans l'éthanol, présente deux maxima : l'un à 225 $m\mu$ et l'autre à 280 $m\mu$. Dans une solution de NaOH dans l'éthanol, ces maxima sont déplacés (244 et 298 $m\mu$) et les extinctions sont augmentées. Cette observation vient confirmer l'existence d'un noyau phénolique (8,10). A l'infra-rouge, on retrouve les bandes caractéristiques du noyau aromatique disubstitué en para (1610, 1595, 1510 et 830 cm^{-1}) et une bande hydroxyle (3300 cm^{-1}), tandis que la bande ester a disparu.

L'éther méthylique du phénol-glycol A (F = 51-52°) présente dans l'ultra-violet des bandes à 225, 279 et 284 $m\mu$, qui, comme attendu, ne sont pas déplacées par addition de NaOH. Dans le spectre I.R. il y a également une bande hydroxyle libre à 3620 cm^{-1} et une bande hydroxyle associée à 3540 cm^{-1} . La différence entre les fréquences d'absorption de ces deux types d'hydroxyles ($\Delta\nu = 92 cm^{-1}$) semble indiquer que nous sommes en présence d'un β -glycol (11). Ces propriétés du phénol-glycol A sont tout à fait analogues à celles du phénol-glycol B décrit précédemment (8).

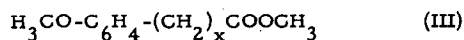
L'éther méthylique du phénol-glycol A a été oxydé selon Bickel, Schmid et Karrer (12) ; de l'acide propionique, ainsi qu'un méthoxy-acide en C_{11} ont été isolés. Il s'agit de l'acide méthyl-6 méthoxy-7 nonanoïque (II) obtenu pour la première fois par Drayson et coll. (13)

par dégradation du phtiocérol.



L'ester méthylique de cet acide obtenu à partir du phénol-glycol A a été identifié par comparaison avec un échantillon authentique, obtenu à partir du phtiocérol par la même méthode de dégradation (même temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse, même spectre de masse : grand pic à m/e 73 caractéristique de la structure partielle $-\overset{\text{OCH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ et autres pics très nets à m/e 187, 185, 155, 123, 95,)(14).

Parmi les produits d'oxydation moins volatils, une série d'homologues supérieurs de l'anisate de méthyle (III) ont été identifiés par spectrométrie de masse (pics moléculaires à m/e : 376, 390, 404, 418, 432, 446 ; un grand pic à m/e 121 correspond au fragment $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{CH}_2^+$) (15, 8).



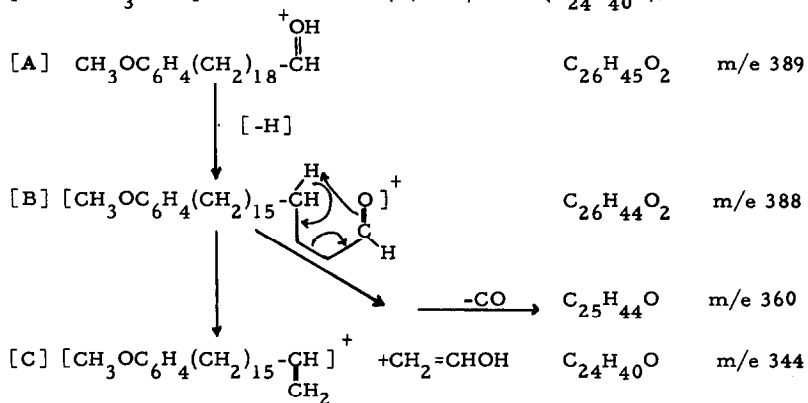
Dans la formule (III), x serait donc égal à 18 pour le constituant principal du mélange (environ 64%) correspondant à un poids moléculaire de 418 ; d'autres homologues seraient également présents.

Le spectre de masse de l'éther méthylique du phénol-glycol A, pris avec un appareil MS9 (A. E. I.) * présente les pics à m/e 73 (14) et 121 (8, 15), caractéristiques des deux extrémités de la chaîne, ainsi qu'un pic moléculaire très net à m/e 590. Des pics intenses situés entre m/e 340 et m/e 400 ont été soumis à des mesures de masse.

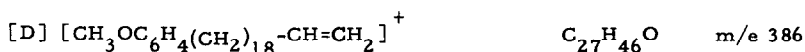
* Nous remercions très vivement le Dr. B. C. Das pour ces mesures et leur interprétation.

Un pic à m/e 389 pourrait correspondre à l'ion A ($C_{26}H_{45}O_2$) qui perdrait un H pour donner l'ion B ($C_{26}H_{44}O_2$) (pic à m/e 388) ; ceci confirme la valeur de $x = 18$.

En haute résolution, on observe que le pic à m/e 360 est un doublet : l'un correspond à la formule brute $C_{24}H_{40}O_2$, précisant ainsi la valeur $x = 16$ pour un homologue inférieur du constituant principal ; l'autre correspond à la formule brute $C_{25}H_{44}O$ et pourrait être formé par décarbonylation de (B). L'ion (B) peut aussi perdre CH_3CHO pour donner l'ion (C) à m/e 344 ($C_{24}H_{40}O$).



Un pic intense à m/e 386 correspond à la formule brute $C_{27}H_{46}O$ d'un ion (D) que l'on pourrait formuler comme ci-dessous :



La formule brute du constituant principal du mélange d'éthers méthyliques du phénol-glycol A serait ainsi $C_{38}H_{70}O_4$ ($M = 590$).

D'autres pics à m/e 562, 576, 604 et 618 correspondraient à des valeurs de x de 16, 17, 19 et 20.

Le pic à m/e 360 ($C_{24}H_{40}O_2$) ainsi que les résultats de l'oxydation selon Bickel, Schmid et Karrer (12) sont également en faveur de l'existence de l'homologue inférieur ($x = 16$).

Ces résultats conduisent à proposer pour le phénol-glycol A la formule (IV a), où $x = 18$ pour le constituant principal du mélange d'homologues.

Dans le "lipide A" (IV a ; $R = R' - \overset{|}{\text{C}}\text{O}$) les deux OH glycoliques sont estérifiés par des acides gras ; ceci ressort notamment de la position du multiplet (2H) à 288 cps mentionné ci-dessus.

Mycoside B

Le mycoside B ($F = 20^\circ$ environ), $[\alpha]_D^{20} = -21^\circ$, CHCl_3 (8), isolé de la souche Marmorek de M. tuberculosis var. bovis, présente une seule tache ($R_f = 0,7$) sur chromatoplaque d'acide silicique dans le chloroforme-méthanol (93:7).

La position des hydroxyles du phénol-glycol B a été précisée, comme dans le cas du phénol-glycol A, grâce à l'oxydation selon Bickel, Schmid et Karrer (12) et au spectre de masse : l'éther méthylique ($F = 47-48^\circ$) a été oxydé et les acides propionique et méthyl-6 méthoxy-7 nonanoïque (II) ont été isolés et identifiés comme dans le cas de l'éther du phénol-glycol A. Les poids moléculaires des homologues supérieurs de l'anisate de méthyle (III) qui ont été identifiés par spectrométrie de masse sont les suivants : 362, 376 (environ 25%), 390 (environ 28%), 404, 418, 432. Dans le spectre de masse de l'éther méthylique du phénol-glycol B, on trouve les pics à m/e 73 (14) et à m/e 121 (8,15) caractéristiques des deux extrémités de la chaîne et un pic moléculaire très net à m/e 562.

Des pics à m/e 361 et 360 correspondent apparemment aux pics à m/e 389 et 388 observés dans le spectre de l'éther méthylique du phénol-glycol A.

La mesure de masse effectuée sur un pic à m/e 358 a montré qu'il correspondait à la formule $C_{25}H_{42}O$; il s'agit donc effectivement d'un homologue inférieur du pic à 386 observé dans le spectre de l'éther méthylique du phénol-glycol A.

x est donc égal à 16 pour le constituant principal, $C_{36}H_{66}O_4$ ($M = 562$), du mélange d'éthers méthyliques des phénol-glycols B. D'autres homologues ($M = 534, 548, 576, 590$) seraient également présents en petite quantité.

Le phénol-glycol B peut donc être représenté par la formule (IV b) *.

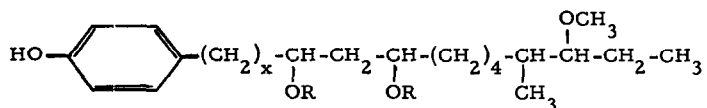
Conclusion :

La formule (IV) est proposée pour les phénol-glycols A et B qui semblent donc identiques, sauf en ce qui concerne x , qui peut varier. Chacun des mycosides A et B est un mélange de substances homologues (les acides gras de ces mycosides sont des homologues et les phénol-glycols sont des homologues) différant essentiellement entre eux par la nature et le nombre des molécules de sucres qui sont fixées sur l'hydroxyle phénolique des aglycones : 2-O-méthyl-fucose, 2-O-méthyl-rhamnose et 2,4-di-O-méthyl-rhamnose sous forme de trisaccharide dans le cas du mycoside A (7), 2-O-méthyl-rhamnose dans le cas du mycoside B (7, 8).

* Notons que les formules (I)(II) et (IV) n'impliquent aucune précision sur la stéréochimie des centres asymétriques des phénol-glycols. La formule (I) est à rectifier : y étant 4, $x + y$ serait 19. Cette erreur est due au fait que le spectre de masse du phénol-glycol B obtenu précédemment ne présentait pas de pic moléculaire. Le pic le plus élevé, à m/e 518, avait été interprété comme étant $M-2$ (8). D'ailleurs, le mycoside B étudié précédemment était extrait du BCG.

Les résultats concernant la biosynthèse de ces mycosides par incorporation d'acide propionique 1-¹⁴C et 3-¹⁴C feront l'objet d'une note ultérieure. Nous pouvons cependant déjà affirmer que ce corps est incorporé dans les mycosides. L'étude de l'origine de la partie aromatique est également en cours.

Aglycones des mycosides A et B



(IV)

Phénol-glycols A et B : R = H

Lipides A et B : R = R¹-C=O

R¹-COOH = acides gras

(IV a) Phénol-glycol A : x = 16, 17, 18, 19, 20

(IV b) Phénol-glycol B : x = 14, 15, 16, 17, 18

REFERENCES

- 1) M. Gastambide-Odier, D. W. Smith, A. L. Koevoet and H. M. Randall, Am. Rev. Tub., 75, 843 (1957).
- 2) D. W. Smith, H. M. Randall, M. Gastambide-Odier and A. L. Koevoet, Ann. N. Y. Acad. Sci., 69, 145 (1957).
- 3) D. W. Smith, H. M. Randall, A. P. MacLennan, R. K. Putney and S. V. Rao, J. Bact., 79, 217 (1960).
- 4) D. W. Smith, H. M. Randall, A. P. MacLennan and E. Lederer, Nature, 186, 887 (1960).
- 5) D. W. Smith, W. K. Harrell and H. M. Randall, Am. Rev. Tub., 69, 505 (1954).
- 6) H. Noll, J. Biol. Chem., 224, 149 (1957).
- 7) A. P. MacLennan, H. M. Randall and D. W. Smith, Biochem. J., 80, 309 (1961).
- 8) H. Demarteau-Ginsburg et E. Lederer, Biochim. Biophys. Acta, 70, 442 (1963).
- 9) R. J. Highet and P. F. Highet, J. Org. Chem., 30, 902 (1965).
- 10) N. O. Coggeshall and A. S. Glassner Jr., J. Am. Chem. Soc., 71, 3151 (1949).
- 11) L. P. Kuhn, J. Am. Chem. Soc., 74, 2492 (1952).
- 12) H. Bickel, H. Schmid and P. Karrer, Helv. Chim. Acta, 38, 649 (1955).
- 13) F. K. Drayson, J. W. Lewis and N. Polgar, J. Chem. Soc., 1958, 430
- 14) R. Ryhage, S. Ställberg-Stenhagen and E. Stenhagen, Ark. för Kemi, 14, 247(1959).
- 15) H. Budzikiewicz, C. Djerassi, D. H. Williams, Interpretation of mass spectra of organic compounds, Holden-Day, Inc., San Francisco, 1964.
- 16) L. Ahlquist, R. Ryhage, E. Stenhagen and E. von Sydow, Ark. för Kemi, 14, 211 (1959).