

DÉTERMINATION DE SÉQUENCES D'ACIDES AMINÉS DANS DES OLIGOPEPTIDES PAR LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE—VI

STRUCTURE DU MYCOSIDE C_b, PEPTIDOGLYCOLIPIDE DE *MYCOBACTERIUM BUTYRICUM**

E. VILKAS, A. ROJAS, B. C. DAS, W. A. WOLSTENHOLME†
et E. LEDERER

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette (Essonne)

(Received 28 December 1965; in revised form 1 February 1966)

Résumé—Le mycoside C_b de *M. butyricum* contient un acide 3-méthoxy-octacosène-4 oïque lié sous forme d'amide à un peptide D-Phe-D-*allo*-Thr-D-Ala-; l'hydroxyle de l'*allo*-Thr est glycosidé par une molécule de di-O-acétyl-6-désoxy-L-talose. La structure partielle VIII est proposée pour le mycoside C_b.

Abstract—The mycoside C_b of *M. butyricum* contains a 3-methoxy octacos-4 enoic acid linked through an amide linkage with a peptide D-Phe-D-*allo*-Thr-D-Ala-; the hydroxyl of *allo*-Thr is glycosidized with one molecule of di-O-acetyl-6-deoxy-L-talose. Partial structure VIII is proposed for mycoside C_b.

Mycobacterium butyricum contient un peptidoglycolipide insoluble dans l'éther et l'eau, soluble dans le chloroforme et dont l'hydrolyse donne: un mélange d'acides gras, des acides aminés et des désoxysucres. Cette substance est ainsi caractérisée comme un mycoside, "glycolipide caractéristique de certaines souches de Mycobactéries".¹ Nous l'appelons mycoside C_b.

Des substances chimiquement très voisines, appelées mycosides C₂ et C_m ont déjà été décrites.^{2,3} La première contiendrait un pentapeptide: D-Phe-D-*allo*-Thr-D-Ala-D-*allo*-Thr-D-Ala et la seconde les mêmes acides aminés composant un heptapeptide; ces mycosides C contiennent en outre, le 6-désoxy-L-talose, le 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose et le 3,4-di-O-méthyl-L-rhamnose.

Selon ces travaux, le 6-désoxytalose et son dérivé monométhylé estérifient le carboxyle de l'alanine C-terminale, tandis que le 3,4-di-O-méthylrhamnose est lié à l'hydroxyle de l'*allo*-thréonine.

Dans le présent mémoire, nous proposons la structure partielle (VIII) pour le mycoside C_b de *M. butyricum*.

* V^e communication, voir M. Guinand, M. J. Vacheron, G. Michel, B. C. Das et E. Lederer, *Tetrahedron*.

85^e communication sur les constituants des Mycobactéries; 84^e comm., voir E. Vilkas, A. Rojas et E. Lederer, *C.R. Acad. Sci., Paris* **261**, 4258 (1965).

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

† Associated Electrical Industries, Manchester, Angleterre.

¹ D. Smith, H. M. Randall, A. P. MacLennan et E. Lederer, *Nature, Lond.* **186**, 887 (1960).

² M. Chaput, G. Michel et E. Lederer, *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 310 (1962).

³ M. Chaput, G. Michel et E. Lederer, *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 329 (1963).

Isolement et propriétés du Mycoside C_b

L'extraction de *M. butyricum* par un mélange alcool-éther (1:1) permet d'obtenir une fraction insoluble dans l'éther et l'eau, soluble à froid dans le chloroforme, à chaud dans l'acide acétique, l'alcool et l'acétone. Cette substance, soumise à deux chromatographies successives sur une colonne de trisilicate de Mg-célite (1:1) est éluée par le chloroforme pur. Le produit ainsi obtenu, chromatographié sur couche mince de silicagel G Merck, n'est pas homogène et donne trois taches. Il est alors rechromatographié sur colonne de silicagel G. Les premières éluions par CHCl₃ contenant 4% de méthanol, fournissent le mycoside C_b sous forme d'un solide incolore, homogène en couche mince, assez hygroscopique, F. 200–202°, [α]_D = –34° (CHCl₃), exempt de soufre et de phosphore.

L'analyse élémentaire correspond à une formule brute approximative C₆₉H₁₁₆N₄O₁₉.

Le spectre IR montre des bandes à 3300 cm⁻¹, à 1540, 1600 et 1660 cm⁻¹ (amide), 1730 et 1225 cm⁻¹ (acétate). Le spectre de RMN (CDCl₃) révèle dans la région de 3,20–3,60 ppm des singulets attribuables aux groupements NCH₃ et OCH₃ et il montre à 2,12 et 2,18 ppm deux pics dûs à des groupements acétyles.

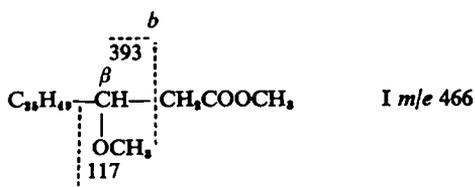
L'analyse fonctionnelle confirme, par ailleurs, la présence de quatre OCH₃, d'un groupement NCH₃ et de deux groupes acétyles.

Identification des produits d'hydrolyse du mycoside C_b

(1) *Acides gras*. L'hydrolyse acide (HCl 6 N à 110° pendant 24 h) du mycoside permet d'obtenir une préparation d'acides gras dont la composition centésimale correspond à la formule brute C₂₉H₅₆O₃.

La présence d'une double liaison est mise en évidence par la microhydrogénation dans l'acide acétique en présence de PtO₂. L'absence d'absorption importante à 220 mμ indique que la double liaison n'est pas conjuguée avec le carboxyle. La présence d'un méthoxyle est indiquée par l'analyse selon Zeisel.

Le spectre de masse de l'ester méthylique montre un ion moléculaire à *m/e* 466 (=C₃₀H₅₈O₃). On trouve aussi un pic moins intense à *m/e* 494 (=C₃₂H₆₂O₃) dû à la présence d'environ 30% d'un homologue supérieur. La perte successive de deux fois 32 unités de masse de l'ion moléculaire à *m/e* 466 donne des pics à *m/e* 434 et 402, respectivement. Cette fragmentation est confirmée par des pics métastables (trouvés et calculés à *m/e* 404,19 et 372,35); elle s'explique par la présence d'un méthoxyle supplémentaire dans cette molécule, en plus du groupe ester. La position de ce méthoxyle en β du groupe carboxyle est suggérée par deux ions importants, à savoir: un pic très intense à *m/e* 117 et un pic beaucoup plus petit à *m/e* 393. La formation de ces deux ions peut s'expliquer par la fragmentation de la structure (I).

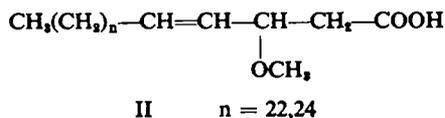


Le clivage des liaisons C—C suivant les lignes pointillées a et b (voir I) des deux côtés du carbone porteur du groupe méthoxyle, conduit à la formation de ces deux

pics caractéristiques. La composition élémentaire de l'ion à m/e 393 ($C_{27}H_{53}O$) indique que l'insaturation dans la molécule se trouve dans le fragment $C_{25}H_{49}$.

La position de la double liaison ressort de l'ozonisation du mélange des deux acides monoinsaturés, qui fournit un mélange d'acides tétra-et hexacosanoïques normaux. Ces acides ont été identifiés par le temps de rétention de leurs esters méthyliques en phase gazeuse et par leurs spectres de masse. Ces mêmes acides sont obtenus par ozonisation du mycoside C_b intact. Ceci montre que l'acide (II) n'est pas un artefact formé au cours de l'hydrolyse acide énergique.

Ces résultats permettent d'attribuer la structure (II) aux acides gras obtenus par hydrolyse acide du mycoside C_b .*



Les acides gras méthoxylés monoinsaturés en C_{29} et C_{31} décrits ci-dessus sont accompagnés par des acides méthoxylés saturés possédant le même nombre de carbones. Leur présence est indiquée par des pics à m/e 436, 404 et 395. Dans le spectre de masse de l'ester méthylique $C_{30}H_{60}O_8$ obtenu par hydrogénation de l'ester $C_{30}H_{58}O_8$, les pics à m/e 434, 402 et 393 disparaissent, tandis que ceux à m/e 436, 404 et 395 subsistent. L'absence d'un pic moléculaire à m/e 468 est en accord avec les travaux de Ryhage et Stenhagen,⁴ qui montrent que dans le cas du 11-méthoxyoctadécanoate de méthyle le pic moléculaire est pratiquement inexistant.

Dans le spectre de masse du mycoside intact, tous les pics comportant la partie lipidique sont sous forme de doublets différant de deux unités de masse.

(2) *Acides aminés.* La chromatographie sur papier d'un hydrolysât du mycoside C_b (HCl 6 N pendant 24 h à 110°) fournit quatre taches d'acides aminés: trois ont pu être identifiés par la chromatographie sur papier dans plusieurs solvants et par le dosage quantitatif selon la méthode de Moore et Stein, modifiée par Piez et Morris,⁵ comme étant la *phénylalanine*, l'*alanine* et l'*allo-thréonine*.† Ces trois acides aminés sont présents dans les proportions 1:1:1. L'action des L-et D-amino acide oxydases a permis d'établir que la phénylalanine et l'alanine se trouvent exclusivement sous la forme D, comme dans les mycosides C_2 et C_m .^{2,3,6}; par analogie avec ces derniers, nous pouvons admettre que l'*allo-thréonine* est également de forme D.

Le quatrième acide aminé a pu être identifié à la *N-méthyl-O-méthyl-L-sérine*, qui ne semble pas encore avoir été trouvée dans la Nature. Il passe inaperçu au cours du dosage selon la méthode de Moore et Stein, mais il est facilement décelable sur

* Nous ne savons encore rien sur la configuration (*cis* ou *trans*) de la double liaison, le spectre infrarouge ne permettant pas de conclure. De même, la configuration optique de l'acide (II) n'a pas pu être déterminée. Selon Chaput *et al.*,³ la partie lipidique du mycoside C_m serait un hydroxyacide $C_{30}H_{58}O_8 \pm 3CH_2$; la partie lipidique du mycoside C_1 n'a jamais été caractérisée.³

† Nous remercions Mlle Cl. Gros (Institut de Biochimie, Orsay) d'avoir bien voulu effectuer ces dosages.

⁴ R. Ryhage et E. Stenhagen, *Arkiv Kemi* **15**, 545 (1960).

⁵ S. Moore et W. H. Stein, *Analyt. Chem.* **30**, 1190 (1958); K. A. Piez et L. Morris, *Anal. Biochem.* **1**, 187 (1960).

⁶ M. Ikawa, E. E. Snell et E. Lederer, *Nature, Lond.* **188**, 558 (1960).

papier dans des conditions spéciales (chauffage prolongé après action de la ninhydrine). Son identification détaillée a fait l'objet d'une note séparée.⁷

(3) *Désoxysucres*. Le mycoside de *M. butyricum* contient deux désoxysucres: le 6-désoxytalose (identifié précédemment dans les mycosides C₃ et C_m par MacLennan⁸ et Chaput *et al.*^{2,3}) et le 2,3,4-tri-O-méthylrhamnose, qui ne semble pas encore avoir été trouvé dans la Nature.*

La présence du 6-désoxytalose a été confirmée par comparaison de ses R_f avec ceux d'un échantillon authentique.

TABLEAU I

Solvants	2,3,4-tri-O-méthyl rhamnose R _f †	6-désoxytalose R _f †
Isopropanol-ac. acétique-eau (6:3:1)	0.85	0.55
Acétate d'éthyle-ac. acétique-eau (3:1:3)	0.84	0.37
Butanol-éthanol-eau (5:1:4)	0.82	0.36

Nous avons identifié le 2,3,4-tri-O-méthylrhamnose par la chromatographie sur papier dans plusieurs solvants avec un échantillon authentique (voir Tableau I).

D'autre part, nous avons déméthylé le mycoside C_b par BCl₃ selon Allen *et coll.*⁹; la chromatographie sur papier du produit de la réaction, hydrolysé par HCl N, a permis de trouver principalement le rhamnose, accompagné toutefois de son dérivé monométhylé, et le 6-désoxytalose.‡

Les dosages des sucres totaux d'après Dische,¹⁰ spécifiques des méthylpentoses, effectués sur l'hydrolysate partiel du mycoside, indiquent la présence de 15% de sucres. Soulignons, cependant, que le dosage par cette méthode du 2,3,4-tri-O-méthylrhamnose témoin donne des valeurs très inférieures à la théorie; la déméthylation du triméthylrhamnose par BCl₃ n'étant pas quantitative, le rhamnose obtenu de cette façon ne peut non plus être dosé avec précision. D'autre part, la présence de l'*allo*-thréonine rend les dosages à l'anthrone inexacts.¹¹

La teneur en désoxysucres indiquée n'est, de ce fait, que très approximative. La théorie pour deux molécules de 6-désoxysucres serait 30%.

Enchaînement des divers constituants

(1) *Identification d'un amide de la D-phénylalanine*. L'hydrolyse du mycoside par HCl 6 N à 100° pendant 24 h, l'estérification par le diazométhane de la fraction

* Selon une communication personnelle du Professeur J. Asselineau (Toulouse), ce même sucre a également été trouvé, dans son laboratoire, dans un mycoside d'une souche atypique.

† Les R_f des sucres isolés du mycoside C_b sont rigoureusement identiques à ceux des échantillons témoins.

‡ Nous ne connaissons pas encore la configuration des deux sucres. On verra par la suite que le 6-désoxytalose porte deux, respectivement trois groupes O-acétyles.

⁷ E. Vilkas, A. Rojas et E. Lederer, *C.R. Acad. Sci., Paris* **261**, 4258 (1965).

⁸ A. P. MacLennan, *Biochem. J.* **82**, 394 (1962).

⁹ S. Allen, T. G. Bonner, E. J. Bourne et N. M. Saville, *Chem. & Ind.* 630 (1958).

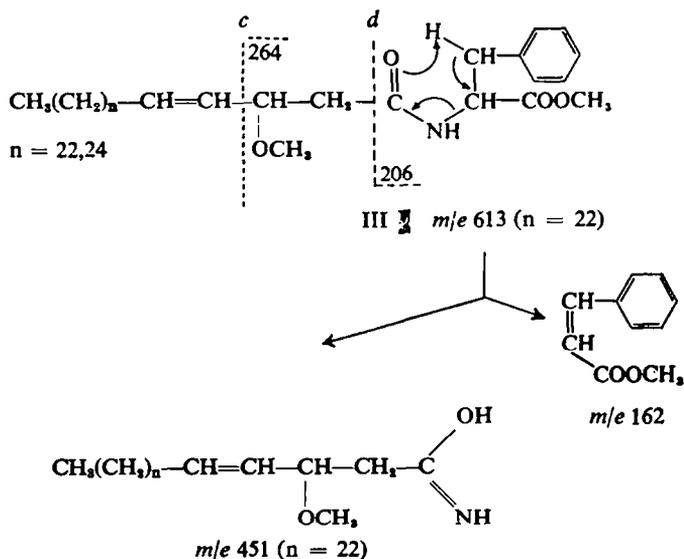
¹⁰ Z. Dische et L. B. Shettles, *J. Biol. Chem.* **175**, 595 (1948).

¹¹ G. Toennies et J. J. Kolb, *Anal. Biochem.* **8**, 54 (1964).

étherosoluble obtenue et sa chromatographie sur trisilicate de Mg: Célite (1:1) ont permis d'isoler, à côté de l'ester méthylique de l'acide gras mentionné ci-dessus, une substance F. 53–55°, $[\alpha]_D = -7^\circ(\text{CHCl}_3)$. L'analyse élémentaire est en accord avec la formule brute $\text{C}_{39}\text{H}_{67}\text{NO}_4$.

Dans le spectre de masse de cette substance, on trouve un pic moléculaire intense à m/e 613 correspondant à cette formule; un pic moins intense se trouve à m/e 641, dû à l'homologue supérieur du radical acyl déjà mentionné ci-dessus Fig. 1.

Connaissant la structure de la partie lipidique (II) et la présence de phénylalanine dans le mycoside, on peut déduire du spectre de masse que la substance F. 53–55° est un amide de phénylalanine (III).



Le pic de base à m/e 162 correspond à l'ester méthylique de l'acide cinnamique; ce dernier se forme apparemment à partir de l'ester méthylique de la phénylalanine par le mécanisme indiqué ci-dessus.

On trouve également un pic à m/e 451 (M-162) correspondant à la perte de cinnamate de méthyle à partir de l'ion moléculaire à m/e 613.

Un ion important à m/e 264 peut être expliqué par un clivage suivant la ligne *c* (voir III) avec rétention de la charge positive sur le carbone substitué par le méthoxy.

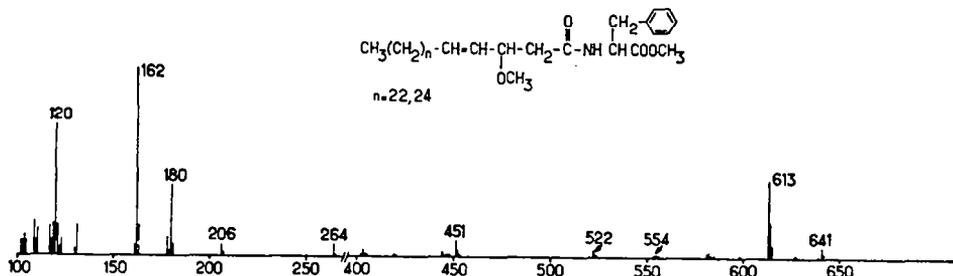


FIG. 1. Spectre de masse de l'ester méthylique de l'amide de phénylalanine (III).

La composition élémentaire de tous les ions mentionnés ci-dessus a été confirmée par haute résolution.

Deux pics intenses à m/e 180 et 120 sont dûs, selon des mesures de masse, aux ions A et B respectivement. La formation de l'ion A implique un transfert de deux hydrogènes sur l'azote; le mécanisme de ce transfert n'est cependant pas clair.



La présence d'autres pics, moins intenses, à m/e 582 (M-31), 581 (M-32), 554 (M-59) et 522 (M-91) peut facilement être expliquée par la perte à partir de l'ion moléculaire à m/e 613 de $-\text{OCH}_3$, CH_3OH , $-\text{COOCH}_3$ et benzyle, respectivement. Un pic à m/e 403 représente probablement l'ion acyle après perte de méthanol. Le clivage suivant la ligne *d* (voir III) et la localisation de la charge sur le carbonyle expliquent l'ion à m/e 206.

L'étude du spectre de masse de cette substance établit donc clairement la structure (III).

Il en résulte que la D-phénylalanine constitue l'acide amine N-terminal du térapeptide du mycoside C_b . La liaison acide gras-phénylalanine a déjà été établie par Chaput et coll. pour les mycosides C_2 et C_m .^{2,3}

(2) *Détermination de la séquence peptidique.* L'hydrolyse partielle du mycoside C_b (HCl 12 N à 37° pendant 72 h) permet d'obtenir un dipeptide contenant uniquement de l'*allo*-thréonine et de l'alanine, comme dans les travaux précédents sur les mycosides C_2 et C_m .^{2,3}

Après réaction du dipeptide avec le 2,4-dinitrofluorobenzène¹² et hydrolyse, on obtient le dérivé DNP-*allo*-thréonine identifié par la comparaison de son R_f par chromatographie sur papier et couche mince avec celui de DNP-*allo*-thréonine authentique.

Le dipeptide a donc la structure D-*allo*-Thr-D-Ala.

On peut ainsi envisager la séquence (IV), déjà mise en évidence dans les mycosides C_2 et C_m .^{2,3}



N'ayant pu obtenir, parmi les produits d'hydrolyse partielle un peptide contenant la N-méthyl-O-méthyl sérine, nous avons soumis le mycoside intact à la réduction par LiBH_4 selon Bailey.¹³ Parallèlement, nous avons réduit l'ester éthylique de la N-méthyl-O-méthyl-sérine synthétique. Dans les deux cas, nous obtenons, après hydrolyse acide, une nouvelle tache de R_f 0,56 (solvant n-butanol saturé d'eau contenant 0,1% de NH_3), qui semble correspondre au N-méthyl O-méthyl sérinol; l'*allo*-thréonine et l'alanine n'ont pas été touchées par la réduction, tandis que la tache correspondant au quatrième acide aminé a disparu. Ce résultat semble indiquer que la N-méthyl-O-méthyl sérine occupe une position C-terminale, ce qui conduirait à la séquence (V); la spectrométrie de masse ayant fourni peu d'arguments en faveur de cette structure, nous préférons laisser cette question en suspens.



(3) *Position du 6-désoxytalose.* Une saponification douce (NaOH 0,5 N en solution hydroalcoolique à la température ambiante pendant 48 h) libère 30% de

¹² F. Sanger et E. O. P. Thompson, *Biochem. J.* **53**, 353 (1953).

¹³ L. Bailey, *Biochem. J.* **60**, 170 (1955).

6-désoxytalose en détruisant une quantité équivalente d'*allo*-thréonine. Un traitement par NaOH 0.1 N à 37° pendant 24 heures enlève la quasi totalité du 6-désoxytalose et détruit 80% de l'*allo*-thréonine. Ceci semble indiquer que le 6-désoxytalose est lié, sous forme glycosidique, à l'hydroxyle de l'*allo*-thréonine. Il est connu, en effet, que sous l'action d'alcalis la thréonine O-glycosidée subit une β -élimination avec libération du sucre (voir le cas des glycoprotéines des glandes sous-maxillaires de Brebis, signalé récemment par plusieurs auteurs.¹⁴

L'oxydation chromique du mycoside C_b intact, selon Sheehan *et al.*¹⁵ suivie, d'hydrolyse acide totale, permet de récupérer l'*allo*-thréonine quantitativement, ce qui indique que l'hydroxyle de cet acide aminé est bloqué. Comme les deux groupements acétyles du mycoside C_b sont fixés sur le 6-désoxytalose (voir ci-dessous) cette expérience suggère également que l'hydroxyle de l'*allo*-thréonine est engagé dans la liaison glycosidique.

La réduction du mycoside intact par NaBH₄ permet d'obtenir le 6-désoxy-talitol et un produit de dégradation de l'*allo*-thréonine, dont le R_f sur papier et sur colonne d'échangeurs d'ions (Dowex-50 selon Piez et Morris⁵) correspond à celui de l'acide α -aminobutyrique.

L'ensemble de ces résultats conduit à la structure partielle (VIII) confirmée par la spectrométrie de masse, comme nous allons le voir ci-après.

Spectrométrie de masse du mycoside C_b. Le spectre mesuré à faible résolution montre, dans la région de l'ion moléculaire, deux pics dûs à des homologues, à *m/e* 1246 et 1274; il y a aussi des pics beaucoup plus faibles à *m/e* 1288 et 1316. D'autres pics importants, avec un pic homologue correspondant à 28 unités plus haut, existent à *m/e* 1083, 1041, 984, 793, 736, 665 et 582. Tous ces pics contiennent donc la partie lipidique de la molécule. Des pics intenses, sans pics homologues associés, existent à *m/e* 273, 231, 203 et 189, ce dernier est le plus intense de ce groupe (Fig. 2).

Le pic à 1041 correspond, selon la mesure de masse à C₆₈H₉₇N₄O₁₂. Un grand pic à *m/e* 793 correspond à C₄₈H₆₁H₄O₆, ce qui fait une différence de C₁₀H₁₆O₇. Cette unité doit correspondre à une molécule de 6-désoxy-hexose di-O-acétylée, c'est-à-dire au di-O-acétyl-6-désoxytalose (VI). Le pic à *m/e* 231 peut correspondre à l'ion (VI a).

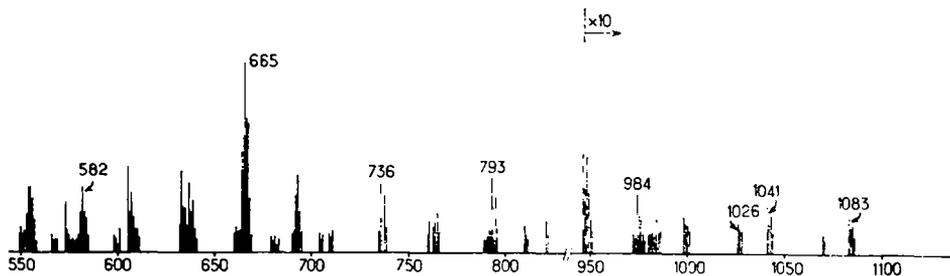
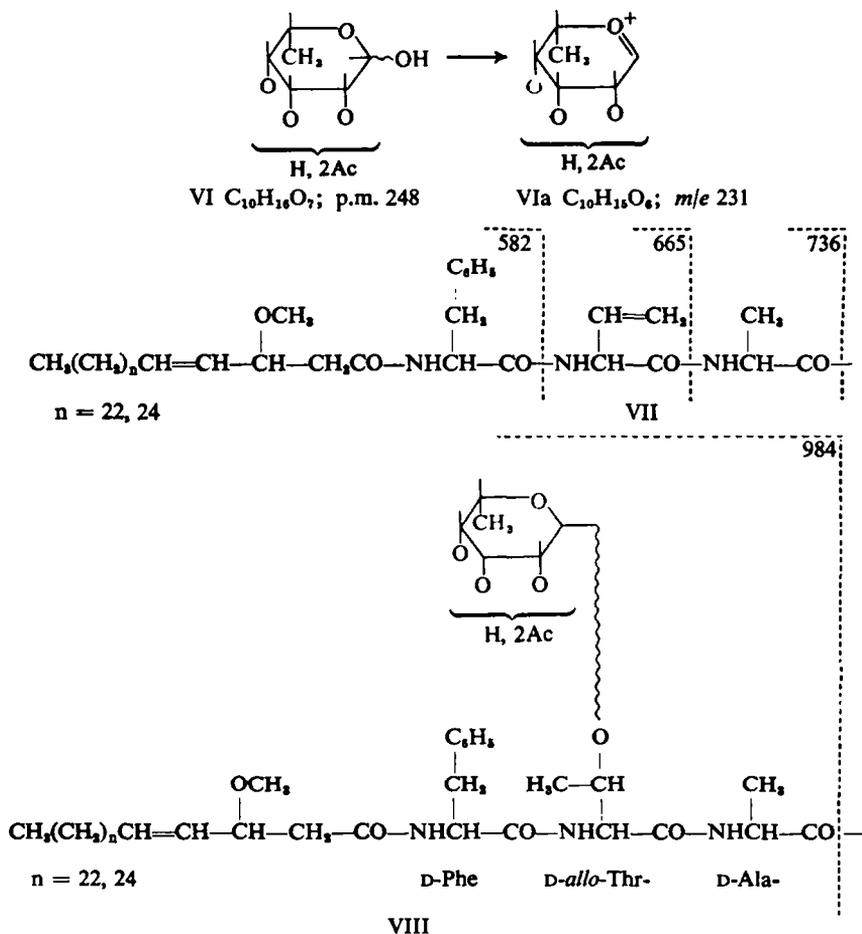
La présence d'un pic à *m/e* 1083, c'est-à-dire de 42 unités de masse au-dessus de *m/e* 1041, suggère qu'il y a aussi un composant contenant un sucre *tri*-O-acétylé à la place du sucre *di*-O-acétylé. L'existence des pics à *m/e* 231 et 273, qui peuvent perdre 60 unités de masse pour donner des pics à *m/e* 171 (pic métastable à *m/e* 126,6) et 213 est en accord avec cette interprétation.

La séquence peptidique peut être déduite des pics suivants: un pic intense à *m/e* 736 correspond, selon la mesure de masse à C₄₆H₇₄N₃O₆.

Le pic suivant est à *m/e* 665; la mesure de masse confirme que cette différence de 71 unités de masse correspond à l'unité d'*alanine*. Le pic à *m/e* 582 est un doublet dont la composante principale correspond à C₂₈H₆₄NO₃. La différence entre cette formule et celle du pic à *m/e* 665 correspond à une unité d'*anhydrothréonine*. La composition élémentaire C₂₈H₆₄NO₃ de cet ion à *m/e* 582 montre qu'il contient une

¹⁴ * S. Harbon, G. Herman, B. Rossignol, P. Jollès et H. Clauser, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 57 (1964); * B. Anderson, N. Seno, P. Sampson, J. G. Riley, P. Hoffman et K. Meyer, *J. Biol. Chem.* **239**, PC 2716 (1964); * R. Carubelli, V. P. Bhavanandan et A. Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta* **101**, 67 (1965).

¹⁵ J. C. Sheehan, H. G. Zachau et W. B. Lawson, *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 3351 (1958).

MYCOSIDE C_bFIG. 2. Spectre de masse partiel du mycoside C_b.

unité d'acide aminé et correspond à la partie lipidique (II) du mycoside C_b acylant une unité de *phénylalanine* (voir III).

Ainsi, la spectrométrie de masse confirme clairement la structure partielle RCO-Phe-*allo*-Thr-Ala (voir VII).

Le pic à m/e 984 est apparemment dû à un ion correspondant à C₆₅H₉₀N₃O₁₂ et contenant encore le *di*-O-acétyl-6-désoxytalose (voir VIII). Un pic à 42 unités de

masse de plus existe également (à m/e 1026), ce qui est en accord avec ce qui a été dit plus haut sur la présence d'un 6-désoxy-hexose *tri-O*-acétylé.

Il ressort de l'interprétation donnée ci-dessus de certains pics significatifs au-dessous de m/e 984, que la seule position à considérer pour la liaison avec le 6-désoxytalose acétylé est l'hydroxyle de l'*allo*-thréonine. L'élimination de cette unité de sucre *intacte* (VI) à partir de l'ion à m/e 984 conduit à l'ion à m/e 736, qui contient une unité d'anhydrothréonine (voir VII); la présence de celle-ci ressort de la différence de 83 unités de masse entre les pics à m/e 665 et m/e 582.

Ainsi, la spectrométrie de masse a également confirmé la localisation du 6-désoxytalose déterminée par voie chimique.

Ces résultats établissent la structure partielle (VIII) du mycoside C_b de *M. butyricum*.

D'après des mesures de masse des pics à 793 et 1041, un quatrième atome d'azote est présent, donc un quatrième acide aminé; nous avons évidemment envisagé un tétrapeptide (V), dont le carboxyle C-terminal pourrait être lié avec l'hydroxyle réducteur du 2,3,4-*tri-O*-méthyl rhamnose; une telle substance correspondrait à une formule brute $C_{69}H_{116}N_4O_{19}$ (p.m. 1304), en accord avec les analyses élémentaires et les analyses fonctionnelles. Nous espérons pouvoir apporter prochainement des précisions à ce sujet.

Notons que la spectrométrie de masse a servi ici, pour la première fois, semble-t-il, à préciser la structure d'une substance contenant à la fois une partie lipidique, une partie peptidique et des molécules de sucre.

PARTIE EXPERIMENTALE*

Isolement et purification du mycoside de M. butyricum

M. butyricum a été cultivé pendant 3 semaines sur milieu de Sauton. Les bacilles sont ensuite filtrés et lavés à l'eau distillée. L'extraction répétée des bacilles par le mélange alcool-éther (1:1) à la température ordinaire fournit une fraction insoluble dans l'eau et dans l'éther contenant environ 60% de peptidoglycolipides. Ce mélange brut est purifié par trois chromatographies successives.

Chromatographie I. 3.5 g de mycoside brut sont chromatographiés sur 150 g de trisilicate de Mg (Mallinckrodt): Célite n° 545 (2:1) activé à 120° pendant 18 h. Elutions: 150 ml.

Fractions	Solvant	Poids en mg
1.	Chloroforme	12
2.	Chloroforme	1106
3.	Chloroforme	266
4.	Chloroforme	142
5.	Chloroforme	74
6.	Chloroforme-méthanol (95:5)	77
7.	Chloroforme-méthanol (95:5)	795
8.	Chloroforme-méthanol (95:5)	331
9.	Chloroforme-méthanol (95:5)	40
10.	Chloroforme-méthanol (90-10)	33
11.	Chloroforme-méthanol (90-10)	63
12.	Chloroforme-méthanol (90-10)	82
13.	Chloroforme-méthanol (90-10)	41
14.	Chloroforme-méthanol (80:20)	39
15.	Chloroforme-méthanol (80:20)	45
16.	Chloroforme-méthanol (80:20)	28
17.	Chloroforme-méthanol-ac. acétique (80:19.5:0.5)	45
18.		traces
		3219 mg

* Avec la collaboration technique de Mme M. Guespin.

Les fractions 2 à 5 sortant avec le CHCl_3 pur sont épuisées plusieurs fois par l'éther chaud; on obtient finalement 830 mg de produit insoluble dans l'éther qui est ensuite rechromatographié dans les mêmes conditions.

Chromatographie II. 800 mg sont chromatographiés sur 50 g de trisilicate de Mg-célite (2:1); éluions de 75 ml.

Fractions	Solvant	Poids en mg
1.	Chloroforme	0
2.	Chloroforme	0
3.	Chloroforme	235
4.	Chloroforme	126
5.	Chloroforme	53
6.	Chloroforme	24
7.	Chloroforme-méthanol (95:5)	16
8.	Chloroforme-méthanol (95:5)	112
9.	Chloroforme-méthanol (95:5)	118
10.	Chloroforme-méthanol (95:5)	76
11.	Chloroforme-méthanol (95:5)	27
12.	Chloroforme-méthanol (95:5)	traces
13.	Chloroforme-méthanol (95:10)	traces
		<u>787 mg</u>

La fraction 3 est chromatographiée en couche mince sur silicagel G Merck activé 20 min. à 110° dans le chloroforme contenant 8% de méthanol; elle donne trois taches, sur couche mince. Elle est soumise à une chromatographie sur colonne de Silicagel G.

Chromatographie III. 200 mg de produit sur une colonne de Silicagel G Merck de 23 cm de hauteur et 2.5 cm de diamètre; éluions de 1 ml; éluant: CHCl_3 contenant 4% de méthanol.

Fractions	Produit	Poids en mg
1-24		traces
25-31	tache 1	35
32-52	tache 1 + 2	68
53-70	tache 2	32
71-81	tache 2 + 3	18
82-106	tache 3	27
		<u>180 mg</u>

Le mycoside C_b , décrit dans le présent mémoire est constitué par les fractions 25-31 de l'essai ci-dessus et d'autres chromatographies analogues. (Analyse: calculé pour $\text{C}_{98}\text{H}_{116}\text{N}_4\text{O}_{10}$: C, 62.7; H, 8.5; N, 4.2 (O) CH_2 , (CO) CH_2 , (N) CH_2 = 1.14. Trouvé: C, 62.99; H, 8.87; N, 4.13; (O) CH_2 , 4.87; (CO) CH_2 , 2.76; (N) CH_2 , 1.23; C, 62.59; H, 8.58; N, 4.25; (O) CH_2 , 4.57; (CO) CH_2 , 2.54; (N) CH_2 , 1.05.)

Identification des produits d'hydrolyse du mycoside

Acides gras. 50 mg de mycoside purifié sont chauffés avec 3 ml d'HCl 6N à 110° pendant 24 h. La fraction lipidique, très colorée, est ensuite extraite par l'éther et la solution étherée concentrée sous vide. Le produit de plusieurs hydrolyses analogues (150 mg) est méthylé par le diazométhane et chromatographié sur 6 g de trisilicate de Mg-célite (2:1); éluions de 20 ml.

Chromatographie IV.

Fractions	Eluant	Poids en mg
1.	Benzène	20
2.	Benzène	17
3.	Benzène	16
4.	Benzène	9
5.	Benzène	4
6.	Benzène	3
7.	Benzène-éther 1:1	26
8.	Benzène-éther 1:1	12
9.	Benzène-éther 1:1	4
10.	Benzène-éther 1:1	4
11.	Ether	traces
12.	Ether	3
13.	CHCl ₃ + 5% de méthanol	10
		128 mg

Les fractions 1 et 2 sont constituées par les esters méthyliques de deux acides gras homologues C₂₃H₄₆O₂ et C₂₁H₄₂O₂. (Analyse: calculé pour C₂₀H₄₀O₂: C, 77.2; H, 12.4; OCH₃, 6.4. Trouvé: C, 77.02; H, 12.1; OCH₃, 6.1%.)

Les fractions 3, 4, 5 et 6 contiennent le phenylalaninate de méthyle amidifié par l'acide gras en C₂₃ et son homologue en C₂₁. (Analyse calculé pour C₂₉H₄₇NO₄: C, 76.34; H, 10.92; N, 2.28; OCH₃, 4.89. Trouvé: C, 76.05; H, 11.00; N, 2.44; OCH₃, 4.79.)

Ozonisation des esters obtenus par hydrolyse du mycoside

17 mg de la fraction 2 (chromatographie IV) sont dissous dans 5 ml de CCl₄ refroidis à 0° et soumis à un courant d'oxygène ozonisé (6% d'O₃) pendant 40 min. Le solvant est ensuite chassé sous vide à la température ambiante et l'ozonide décomposé par chauffage à reflux pendant 3 h avec l'eau oxygénée à 35 vol. sous agitation. Après acidification, les monoacides formés sont extraits à l'éther et estérifiés par le diazométhane. Leur chromatographie en phase gazeuse est effectuée sur un appareil "Chromagaz CG-1 Profit" muni d'un détecteur à ionisation de flamme; gaz vecteur: azote; débit 100 ml/min. Colonne QF1 10% de Célite silanisée, tamis 25; température 200°. Les principaux pics correspondent à ceux de tétra- et hexacosanoate de méthyle.

Ozonisation du mycoside intact

25 mg de mycoside sont dissous dans 5 ml de CH₂Cl₂ refroidis à 0° et soumis à un courant d'oxygène ozonisé (6% d'O₃) pendant 45 min. Après décomposition d'ozonide comme ci-dessus, les acides gras obtenus, 3 mg, sont estérifiés par le diazométhane et soumis à la spectrométrie de masse.

Acides aminés

Les hydrolyses totales du mycoside sont effectuées en tube scellé à 110° dans HCl 6N, (0.1 ml de HCl/1 mg) pendant 24 heures. Pour les dosages quantitatifs, un chauffage de 48 h est nécessaire, l'amide de phenylalanine étant très résistante à l'hydrolyse. D'autre part, la N-méthyl O-méthyl-L-sérine est partiellement déméthylée dans ces conditions.

Les acides aminés libres sont chromatographiés sur papier Whatman n° 1 (chromatographie analytique) ou Whatman n° 3 (chromatographie préparative) dans les solvants suivants:

- (A) Isopropanol-acide acétique-eau (6:3:1)—18 heures.
- (B) Acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3)—6 heures.
- (C) Butanol-acide acétique-eau (65:10:25)—20 heures.

Toutes ces chromatographies sont descendantes, la révélation se fait à la ninhydrine.

Pour différencier *allo*-thréonine et thréonine, nous utilisons le solvant: butanol-eau-acétone-ammoniaque (200:150:25:25). R_f , respectifs: 0.12 et 0.16.

Oxydation par les L- et D-amino acide-oxydases

La L-aminoacide-oxydase (venin de *Crotalus adamanteus*) et la D-aminoacide-oxydase (rein de porc) proviennent de Nutrit. Biochem. Company.

4 μ mol du mycoside sont hydrolysés 24 h dans 0.5 ml de HCl 6N. Ensuite l'hydrolysate est extrait par l'éther et débarrassé de HCl. La partie hydrosoluble est divisée en deux portions. Env. 2 μ mol sont dissous dans 0.4 ml de tampon Tris à pH = 7.5; 0.2 ml de cette solution sont additionnés de 100 μ g de L-amino-acide-oxydase et incubés 24 h à 37°; 0.2 ml de solution sans enzyme servent comme témoin (voir 16).

La deuxième portion de l'hydrolysate est dissoute dans 0.4 ml de tampon de pyrophosphate à pH 8.4 séparée également en deux parties dont une est additionnée de 500 μ g de D-amino-acide-oxydase et incubée également 24 heures à 37°.

Les produits d'incubation sont chromatographiés ensuite dans le solvant A. La phenylalanine et l'alanine sont totalement oxydées par la D-aminoacide-oxydase. La N-méthyl O-méthyl sérine semble être partiellement oxydée par la L-aminoacide-oxydase, mais le résultat n'est pas concluant.

Désoxysucres

Identification du tri-O-méthylrhamnose. 15 mg du mycoside intact sont dissous dans 3 ml de CH_2Cl_2 anhydre et additionnés de 1.5 ml de BCl_3 . On laisse en contact à -70° pendant 2 heures. Ensuite la solution est évaporée à la température ambiante, pendant 20 heures; on termine sa concentration sous vide. 3 ml de méthanol aqueux sont ajoutés pour décomposer le résidu et le méthanol chassé sous vide. Le produit de réaction est ensuite hydrolysé par ébullition à reflux dans HCl pendant 6 h et l'hydrolysate chromatographié dans les solvants A et B (voir ci-dessus) et dans le butanol-éthanol-eau (5:1:4). Les deux taches obtenues ont, dans le solvant A, les R_f : 0.46 (rhamnose) et 0.55 (6-désoxytalose); dans le solvant B: 0.25 (rhamnose) et 0.37 (6-désoxytalose); dans le butanol-éthanol-eau: 0.27 (rhamnose) et 0.36 (6-désoxytalose).

Enchâtement des divers constituants

Hydrolyse partielle. 20 mg de mycoside C_b sont hydrolysés par 1 ml de HCl 12N à 37° pendant 72 heures.

Après extraction par CHCl_3 de la partie lipidique, la phase hydrosoluble est amenée à sec, reprise par 0.1 ml d'eau et chromatographiée sur papier dans les solvants A et B. Après la révélation, la tache à R_f 0.63 (solvant A) et 0.29 (solvant B) devient jaune et vire ensuite au pourpre.

Par chromatographie préparative dans le solvant A nous isolons 2 mg du produit correspondant.

1 mg est hydrolysé; l'hydrolysate est chromatographié sur papier dans le solvant A et soumis au dosage quantitatif par la méthode de Moore et Stein, modifiée par Piez et Morris.⁴ Il contient uniquement *allo*-thr ($R_f = 0.35$) et ala ($R_f = 0.45$) en proportion 1:1.

Dinitrophenylation du peptide

1 mg de peptide est dissous dans 0.1 ml de solution de triméthylamine à 1% (pH 9 ajusté par addition à la solution de triméthylamine de quelques gouttes de NaOH). On ajoute ensuite 0.2 ml de solution éthanolique de dinitrofluorobenzène à 5%. On laisse en contact à la température ambiante pendant 2 heures. Ensuite on chasse l'alcool sous vide, on ajoute quelques gouttes d'eau et extrait la solution 3 fois avec de l'éther pour éliminer l'excès de DNFB. La phase aqueuse est ensuite séchée, reprise par 0.2 ml de HCl 6N et hydrolysée pendant 8 heures dans un tube scellé à 105°. L'hydrolysate est concentré, repris par l'éther et les DNP-aminoacides sont extraits par l'éther. La phase aqueuse est chromatographiée sur papier (solvants A et B); elle donne une seule tache à R_f correspondant à celui d'alanine: 0.45 et 0.19. La phase étherée est chromatographiée en couche mince sur Silicagel G Merck activé à 120° pendant 20 min dans: chloroforme-alcool benzylque-ac. acétique (70:30:3).¹⁷ On obtient une seule tache au niveau de DNP-*allo*thr à $R_f = 0.25$.

¹⁶ R. O. Studer et W. Lergier, *Helv. Chim. Acta* **48**, 460 (1965).

¹⁷ M. Brenner, H. Niederwieser et G. Patalir, *Experientia* **17**, 145 (1961).

Réduction du mycoside Cb par LiBH₄

8 mg de mycoside séché préalablement sous vide à 80° sont dissous dans 1 ml de tétrahydrofurane anhydre et additionnés de 2 ml de la solution de LiBH₄ 0.1M dans le tétrahydrofurane. On laisse 15 heures à la température ambiante. Ensuite on extrait la solution par le chloroforme, on évapore à sec et on hydrolyse le résidu par HCl 6N à 105° pendant 24 h.

La chromatographie sur papier dans le solvant B et dans n-butanol saturé d'eau contenant 0.1% de NH₃ montre l'apparition d'une nouvelle tache à R_f 0.53 (solvant B) et 0.56 dans le butanol. La tache correspondant à la N-méthyl O-méthyl sérine (R_f = 0.28) n'apparaît plus.

Position du 6-désoxytalose

(1) 5 mg de mycoside sont dissous dans 0.5 ml de méthanol ± 0.1 ml de CHCl₃ et additionnés de 0.6 ml d'une solution méthanolique de NaOH 0.5N. On laisse en contact pendant 20 heures à la température ambiante. Après extraction par CHCl₃ on dose les sucres libérés dans la phase aqueuse; la chromatographie sur papier (solvant A et B) donne une seule tache à R_f = correspondant au 6-désoxytalose.

(2) 10 mg de mycoside sont dissous dans 1 ml d'éthanol et additionnés de 2 ml de NaOH en solution hydroalcoolique 0.1N. On abandonne pendant 24 heures à 37°. Après extraction du produit de réaction par le chloroforme, on chromatographie la phase aqueuse sur papier. La phase chloroformique est soumise à une hydrolyse totale et l'hydrolysats chromatographié également. La totalité de 6-désoxytalose a été libérée et l'allo-thréonine détruite.

Réduction du mycoside Cb par NaBH₄

35 mg de mycoside purifié sont dissous dans 6 ml d'éthanol chaud et additionnés de 4 ml de solution hydroalcoolique à 80% contenant 30 mg de NaBH₄. Quand le dégagement d'hydrogène a cessé on chauffe la solution à reflux pendant 30 minutes et on ajoute ensuite encore 20 mg de NaBH₄. On chauffe de nouveau la solution à 60° env. pendant 30 min. Après refroidissement, le mélange réactionnel est acidifié par SO₄H₂ et concentré sous vide. Le résidu est ensuite extrait par l'eau et le chloroforme. La fraction hydrosoluble est désalifiée par Amberlite MB₃ et chromatographiée sur papier dans isopropanol-acide acétique-eau; elle donne une seule tache révélable par le nitrate d'argent et par le système periodate-benzidine, non décelée après la révélation par le phthalate d'aniline à R_f 0.53 comparable avec celui du 6-désoxytalitol témoin. La partie liposoluble est hydrolysée par HCl 6N et les acides aminés obtenus sont chromatographiés sur papier. Seule l'allo-thréonine a disparue et nous observons l'apparition d'une nouvelle tache à R_f 0.57 (R_f d'acide α-amino-n-butyrique = 0.58).

Oxydation chromique du mycoside Cb

8 mg de mycoside sont dissous dans 0.3 ml de la solution oxydante (sol. oxydante: 10 mg d'acide chromique dans 0.1 ml de pyridine + 3 ml d'acide acétique) et laissés en contact pendant 20 heures à la température ambiante. On dilue ensuite cette solution avec de l'eau et on l'extrait par le chloroforme. La phase chloroformique est concentrée à sec et le résidu hydrolysé par HCl 6N à 110° pendant 16 h. L'hydrolysats est chromatographié sur papier dans les solvants B et C. On retrouve les 4 acides aminés du mycoside. Le dosage par la méthode de Moore et Stein confirme que l'allo-thréonine n'a pas été oxydée.

Spectrométrie de masse. Tous les spectres de masse ont été déterminés dans un spectromètre de masse MS 9 (A.E.I.) à 70 ev. La substance (environ 0.1 mg) est placée à l'extrémité en céramique du système d'introduction directe, lequel est alors introduit par l'intermédiaire d'un sas dans la source d'ions, puis chauffée à des températures de 150 à 300°.

Le spectre à basse résolution est obtenu à une résolution d'environ 1500; la mesure de masse de certains pics a été effectuée à une résolution d'environ 15,000.