

## SUR LE MÉCANISME DES C-MÉTHYLATIONS BIOLOGIQUES PAR LA MÉTHIONINE\*

G. JAUREGUIBERRY, M. LENFANT

B. C. DAS et E. LEDERER†

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

(Received 2 June 1966)

**Résumé**—Le groupe  $—CD_3$  de la méthionine-méthyle- $D_3$  est incorporé en entier dans la sclérotiorine (I) de *Penicillium sclerotiorum*, dans la dihydro-ménaquinone 9 (II) de *M. smegmatis* et dans l'acide  $\alpha$ -smegmamycolique (III) de *M. smegmatis*. La signification de ces résultats en ce qui concerne le mécanisme des C-méthylations biologiques est commenté; le schéma 2 permet d'expliquer les différents produits résultant des C-méthylations *in vivo*.

**Abstract**—The  $—CD_3$  group of methionine-methyl- $D_3$  is incorporated as a whole into sclerotiorin (I) produced by *Penicillium sclerotiorum*, into the dihydromenaquinone-9 (II) of *M. smegmatis* and into  $\alpha$ -smegmamycolic acid (III) of *M. smegmatis*. The significance of these results is discussed; scheme 2 explains the various reaction products resulting from C-methylation *in vivo*.

Nous avons montré précédemment,<sup>1</sup> en utilisant la méthionine-méthyle- $D_3$ , qu'il existe au moins deux mécanismes de C-méthylations biologiques; ils sont caractérisés par le transfert de deux ou de trois des atomes de deutérium.

Un transfert de deux atomes de deutérium a été observé dans le cas de la biosynthèse de l'acide tuberculostéarique par *M. smegmatis* et de l'ergostérol par *Neurospora crassa* ("mécanisme  $CD_2$ ").<sup>1</sup>

Un transfert de trois atomes de deutérium a été observé par Tropp *et al.*<sup>2</sup> dans la biosynthèse du riboside de la thymine à partir de l'uridine, et par nous-mêmes, dans le cas de la biosynthèse de l'acide mycophénolique ("mécanisme  $CD_3$ ").<sup>3</sup>

En commentant ces résultats, nous avons pensé que le transfert de  $CD_2$  intervenait dans le cas de méthylation de doubles liaisons aliphatiques non activées, donc faiblement nucléophiles, et que le transfert de  $CD_3$  avait lieu dans le cas de méthylation de doubles liaisons liées à des donneurs d'électrons, donc fortement nucléophiles.<sup>4</sup>

\* Ce travail est dédié à Sir Robert Robinson en hommage respectueux à l'occasion de son 80ème anniversaire.

† Nos recherches ont bénéficié d'une subvention du National Institute of Allergy and Infectious Diseases (U.S. Public Health Service, Grant AI-02838), du Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, pour l'achat d'isotopes et de la collaboration technique de Mme G. Farrugia.

<sup>1</sup> G. Jauréguiberry, J. H. Law, J. A. McCloskey et E. Lederer, *C. R. Acad. Sci. Paris* **258**, 3587 (1964);  
G. Jauréguiberry, J. H. Law, J. A. McCloskey et E. Lederer, *Biochemistry* **4**, 347 (1965).

<sup>2</sup> B. E. Tropp, J. H. Law et J. M. Hayes, *Biochemistry* **3**, 1837 (1964).

<sup>3</sup> G. Jauréguiberry, G. Farrugia-Fougerouse, H. Audier et E. Lederer, *C. R. Acad. Sci. Paris* **259**, 3108 (1964).

<sup>4</sup> a E. Lederer, *Biochem. J.* **93**, 449 (1964);

b E. Lederer, *Experientia* **20**, 473 (1964);

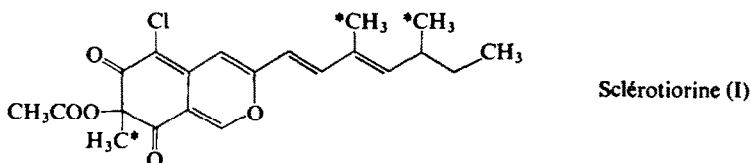
c E. Lederer, *Israel J. Medical Sciences* **1**, 1129 (1965).

Dans la présente note, nous rapportons trois nouveaux cas de "mécanisme-CD<sub>3</sub>". Nous commenterons la signification de ces résultats.

### 1. Biosynthèse de la sclérotiorine

Birch *et al.*<sup>5</sup> ont montré que trois groupes méthyle de la sclérotiorine (I) de *Penicillium sclerotiorum* proviennent de la méthionine<sup>6</sup> (voir aussi Whalley<sup>7</sup>).

Nous avons fait pousser *P. sclerotiorum* sur milieu de Czapek-Dox en présence de 300 mg de méthionine-méthyle-D<sub>3</sub> par litre. Le spectre de masse de la sclérotiorine (I), F.206-207°, isolée de ces cultures, montre des pics moléculaires à M+3, M+6 et M+9, M étant le pic moléculaire de la sclérotiorine non deutériée.<sup>8</sup> Ceci indique que l'incorporation de chacun des trois groupes méthyle se fait avec conservation des *trois* atomes de deutérium de la méthionine-méthyle-D<sub>3</sub>.



### 2. Biosynthèse de la vitamine K<sub>2</sub> de *M. smegmatis*

Azerad *et al.*<sup>9,10</sup> ont montré récemment, en utilisant la méthionine-<sup>14</sup>CH<sub>3</sub> que le carbone du groupe méthyle en 2 de la vitamine K<sub>2</sub><sup>11</sup> de *M. phlei* (II) provient du méthyle de la méthionine. Nous avons répété leurs essais avec *M. smegmatis*, en utilisant la méthionine-méthyle-D<sub>3</sub>.

Après culture de *M. smegmatis* sur milieu de Sauton contenant 200 mg de méthionine-méthyle-D<sub>3</sub> par litre, la dihydroménaquinone-9 (II) C<sub>56</sub>H<sub>82</sub>O<sub>2</sub>, (PM = 786), a été isolée comme décrit précédemment.<sup>9,10</sup> Un pic de masse à *m/e* 789 indique clairement l'incorporation de *trois* atomes de deutérium (environ 21% de D<sub>3</sub>). Etant donné que, cultivé dans les mêmes conditions, *M. smegmatis* n'incorpore que deux des trois atomes de deutérium du groupe-CD<sub>3</sub> de la méthionine dans l'acide tuberculostéarique,<sup>1</sup> ces essais montrent que le même organisme peut effectuer des C-méthylations suivant les deux mécanismes (—CD<sub>2</sub> ou —CD<sub>3</sub>).

<sup>5</sup> A. J. Birch, P. Fitton, E. Pride, A. J. Ryan, H. Smith et W. B. Whalley, *J. Chem. Soc.* 4576 (1958).

<sup>6</sup> Dans les formules du texte, les groupes méthyles provenant de la méthionine sont marqués d'un astérisque.

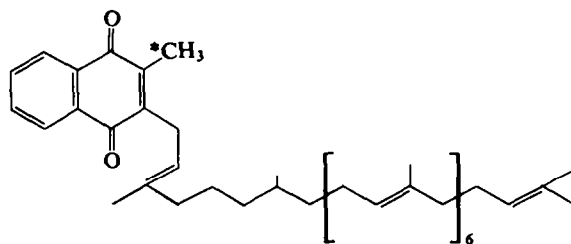
<sup>7</sup> W. B. Whalley, *Proc. Symp. Chem. & Biochem. Fungi & Yeasts IUPAC* Dublin, (1963); Butterworths, London, 565 (1963).

<sup>8</sup> L'intensité de ces pics indique la présence d'environ 8,5% de M+3, 6% de M+6 et 6% de M+9. Dans les exemples étudiés (I, II, III), la précision des mesures de l'intensité des différents pics ne permet pas d'exclure, à côté de composés trideutériés (en quantité notable), l'éventuelle présence de produits mono- ou dideutériés.

<sup>9</sup> R. Azerad, R. Bleiler-Hill et E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 19, 194 (1965).

<sup>10</sup> M. Guérin, R. Azerad et E. Lederer, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47, 2105 (1965).

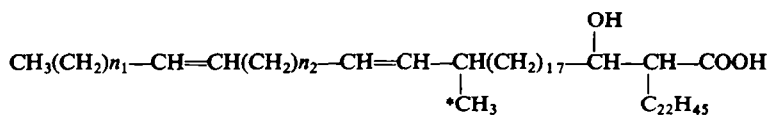
<sup>11</sup> Il s'agit de la vitamine K<sub>2</sub>(45)H décrite par P. H. Gale, B. H. Arison, N. R. Trenner, A. C. Page Jr. et K. Folkers, (*Biochemistry* 2, 200, 1963) et appelée maintenant dihydroménaquinone-9 [ou MK-9-(H<sub>2</sub>)] (pour la nomenclature voir *Biochim. Biophys. Acta* 107, 5, 1965, recommandée par une Commission IUPAC-IUB). L'un de nous (E. Lederer, 6th Intern. Congress of Biochemistry, New York, 1964, *I.U.B. Symposium Series* 33, 63 (1964)), en collaboration avec R. Azerad et M. Barber, a proposé la formule (II) pour cette substance.


 Dihydroménaquinone-9 [vitamine K<sub>2</sub>(45)H] (II)

### 3. Biosynthèse de l'acide $\alpha$ -smegmamycolique

Au cours de l'étude de la biosynthèse de l'acide tuberculostéarique de *M. smegmatis* à l'aide de méthionine-méthyle-D<sub>3</sub>,<sup>1</sup> nous avons également isolé les acides  $\alpha$ -smegmamycoliques. Etémadi *et al.*<sup>12</sup> ont établi récemment la structure (III) pour ces acides et ont montré que le carbone du méthyle "solitaire" provient de la méthionine.<sup>13</sup> Le spectre de masse des esters méthyliques de ces acides présente les pics des aldéhydes méromycoliques (IV) à *m/e* 712, 726, 740, 754, 768, 782, 796, 810, 824.<sup>14,15</sup> Dans le cas des produits biosynthétisés en présence de méthionine-méthyle-CD<sub>3</sub>, les pics à *m/e* 726, 754, 782 et 810 sont accompagnés de pics de 3 unités plus élevés, qui correspondent à la présence du groupe-CD<sub>3</sub> dans la molécule.<sup>16</sup>

La pyrolyse *in vitro* des esters mycoliques conduit à la formation des méromycolals (IV), qui, après ozonolyse, oxydation, estérification et purification, permettent d'obtenir l'ester diméthylque de l'acide  $\alpha$ -méthyl eicosanedioïque (V).<sup>12,15</sup> Le spectre de masse de ce diester présente deux pics caractéristiques correspondant à des fragments porteurs du méthyle à *m/e* 112 et *m/e* 88, attribués aux ions (VI) et (VII).<sup>15</sup> Dans le spectre du diester (V) obtenu à partir des acides  $\alpha$ -smegmamycoliques deutériés, ces pics sont accompagnés de pics à *m/e* 115 et *m/e* 91,<sup>17</sup> ce qui confirme la présence des trois atomes de deutérium dans le groupe méthyle "solitaire" des acides  $\alpha$ -smegmamycoliques (III).<sup>18</sup>


 Acides  $\alpha$ -smegmamycoliques (III)

$$n_1 = 15 \text{ à } 19$$

$$n_2 = 12 \text{ à } 16$$

<sup>12</sup> A. H. Etémadi, R. Okuda et E. Lederer, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 868 (1964).

<sup>13</sup> Le représentant le plus abondant des acides  $\alpha$ -smegmamycoliques correspond à la formule C<sub>79</sub>H<sub>154</sub>O<sub>3</sub> pour laquelle  $n_1 = 17$  et  $n_2 = 13$ . A. H. Etémadi et E. Lederer, *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, 160 (1965).

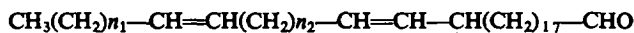
<sup>14</sup> A. H. Etémadi, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1537 (1964).

<sup>15</sup> A. H. Etémadi, Thèse de Doctorat d'Etat, Paris (1965).

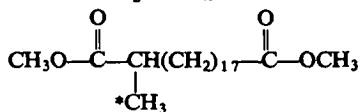
<sup>16</sup> Les pics des méromycolals (IV) non accompagnés de pics à (+ 3) proviennent d'esters mycoliques à nombre pair d'atomes de carbone et qui ne seraient pas méthylés. Cette observation est en accord avec les résultats d'Etémadi *et al.* <sup>23,24</sup>.

<sup>17</sup> L'intensité de ces pics indique la présence d'environ 10% de composé trideutérieré.

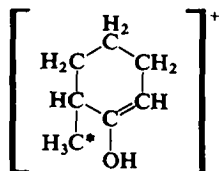
<sup>18</sup> Nous remercions M. A. H. Etémadi pour des discussions et conseils concernant l'expérience avec l'acide  $\alpha$ -smegmamycolique et pour des échantillons authentiques d'acides  $\alpha$ -smegmamycoliques et d'eicosanedioate de méthyle.



$$\begin{array}{c} n_1 = 15 \text{ à } 19 \\ n_2 = 12 \text{ à } 16 \end{array}$$

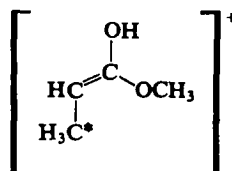


$\alpha$ -Méthyl eicosanedioate de méthyle (V)



*m/e* 112

VI



*m/e* 88

VII

### Commentaires sur le mécanisme des C-méthylations

Le présent travail décrit trois nouveaux cas de transfert *en entier* du groupe  $-\text{CD}_3$  de la méthionine-méthyle- $\text{D}_3$ :

(a) Le premier cas concerne la sclérotiorine (I); on peut penser que les trois méthylations se font successivement sur un précurseur énolique présentant des doubles liaisons fortement nucléophiles.

(b) Le deuxième cas concerne la dihydroménaquinone-9 (II); deux précurseurs possibles de ce composé peuvent être envisagés: l'hydroquinone de la desméthyl dihydroménaquinone-9 et l'énol de la desméthyl dihydroménaquinone-9. Ainsi la méthylation de ces précurseurs se fait sur des doubles liaisons fortement nucléophiles.

(c) Le troisième cas, cependant, concerne une double liaison aliphatique non-activée. Il mérite d'être commenté: le groupe méthyle "solitaire" de l'acide  $\alpha$ -smegma-mycolique (III) se trouve sur un carbone allylique. Cette structure nous avait suggéré<sup>4b,c</sup> un mécanisme particulier (Schéma I), selon lequel une double liaison aliphatique serait activée par une oxydation en  $\alpha$ , pour donner un carbocation (VIII) qui pourrait réagir avec un ylidyde (IX) formé à partir de la S-adénosyl-méthionine par abstraction d'un proton; il en résulterait le dérivé (X) (ne contenant plus que deux des trois hydrogènes de la méthionine) qui donnerait (XI) par réduction.

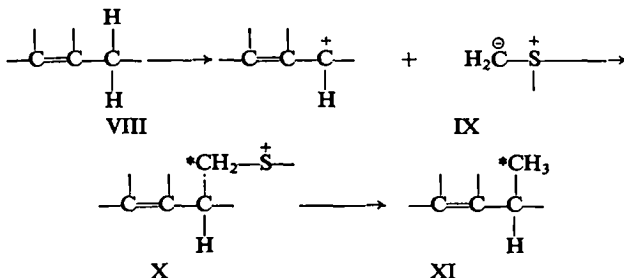
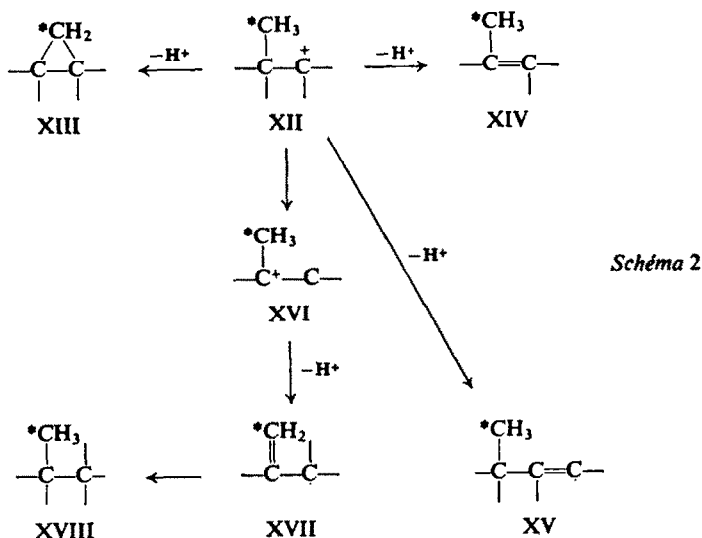


SCHÉMA I

Le fait de trouver une incorporation du méthyle entier ("mécanisme-CD<sub>3</sub>") est évidemment incompatible avec ce schéma, mais pourrait s'expliquer par le Schéma 2 dérivé de ceux proposés récemment par Nes *et al.*<sup>19</sup> et par Clayton,<sup>20</sup> selon lequel, le premier produit de la réaction des C-méthylations serait un carbocation (XII), qui, par perte de H<sup>+</sup> pourrait évoluer vers:

- Un dérivé cyclopropanique (XIII).<sup>21</sup>
- Des dérivés C-méthylés insaturés (XIV) ou (XV).
- Un dérivé méthylénique (XVII) (après isomérisation du carbocation (XII) en carbocation (XVI)).
- Un dérivé saturé (XVIII).

La réaction (XII)→(XIV) se ferait dans le cas des méthylations de doubles liaisons aromatiques, alors que le passage de (XII) à (XV), (XVII) et (XVIII) se rencontrerait en série aliphatique.



Selon le Schéma 2, qui semble actuellement le mieux en accord avec tous les résultats obtenus, le "mécanisme-CD<sub>2</sub>" serait réalisé dans le cas où un dérivé méthylénique (XVII) serait l'intermédiaire; la perte d'un atome de deutérium se ferait au stade (XVI→XVII) et non par transformation de la S-adenosyl-méthionine en ylides (IX; Schéma 1).<sup>4,22</sup>

Dans le cas de la C-méthylation conduisant à la biosynthèse de l'acide α-smegmamycologique (III), on aurait donc un précurseur (XIX) qui, par l'intermédiaire de (XX),

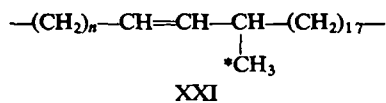
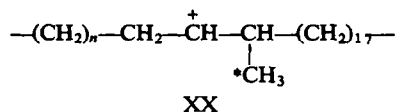
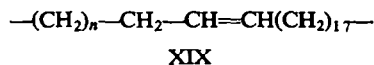
<sup>19</sup> M. Castle, G. Blondin et W. R. Nes, *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 3306 (1963).

<sup>20</sup> R. B. Clayton, *Quart. Rev.* **19**, 201 (1965).

<sup>21</sup> Dans un article de revue, W. M. O'Leary (*Transmethylation and methionine biosynthesis*, Edited by S. Shapiro et F. Schlenk, p. 94, Univ. Press Chicago 1965) a envisagé plusieurs intermédiaires différents dans la conversion des acides gras insaturés en acides cyclopropaniques: des composés saturés du type XVIII et insaturés du type XIV ou XVII ou même cyclopropéniques.

<sup>22</sup> Nous avons précédemment<sup>4</sup> envisagé la réaction XII→XIII→XVIII, mais il n'y a actuellement aucune preuve expérimentale d'une telle réaction *in vivo*.

donnerait (XXI), résultant en un *déplacement de la double liaison*. Cette interprétation est en accord avec les résultats d'Etémadi *et al.*<sup>23,24</sup> concernant la structure d'acides  $\alpha$ -smegmamycoliques non méthylés.



$$n = 11 \text{ à } 15$$

Nous remercions très vivement Mlle B. Tchoubar pour de nombreuses discussions concernant les mécanismes de C-alcoylation.

<sup>23</sup> A. H. Etémadi et F. Pinte, *C. R. Acad. Sci. Paris* **262**, Série D, 115 (1966).

<sup>24</sup> A. H. Etémadi, F. Pinte et J. Markovits, *C. R. Acad. Sci. Paris* **262**, Série C, 1343 (1966).