

# ISOLEMENT DE L'ACIDE 3-AMINO 12-METHYL TETRADECANOIQUE ET DE L'ACIDE 3-AMINO 12-METHYL TRIDECANOIQUE A PARTIR DE L'ITURINE, ANTIBIOTIQUE DE *BACILLUS SUBTILIS*

F. PEYPOUX, M. GUINAND et G. MICHEL

Laboratoire de Chimie Biologique, Université de Lyon I, 43, Boulevard du 11 Novembre 1918, 69621 Villeurbanne, France

L. DELCAMBE

Centre National de Production et d'Etude des Substances d'Origine Microbienne, 32 Boulevard de la Constitution, Liège, Belgique

B. C. DAS, P. VARENNE et E. LEDERER\*

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S. 91190 Gif-sur-Yvette, France

(Received in France 20 March 1973; Received in the UK for publication 24 May 1973)

**Résumé**—L'iturine, antibiotique peptidique isolé de *Bacillus subtilis*, a été fractionnée par chromatographie sur couches minces en trois composés, les iturines A, B, C. L'iturine A, qui possède une activité antifongique, est composée des acides aminés Asp, Glu, Tyr, Ser, Pro dans les rapports molaires 3:1:1:1:1 et d'une fraction lipidique AL qui renferme deux acides aminés l'un en C<sub>14</sub> et l'autre en C<sub>15</sub> (représentant respectivement 40% et 60% de la fraction AL). La structure de ces acides aminés a été démontrée par spectrométrie de masse couplée avec la chromatographie gazeuse des N-acétylméthylesters. Ces dérivés présentent des pics intenses à  $m/e = 144$  et  $m/e = 102$  indiquant une fonction aminée en  $\beta$ . L'oxydation chromique donne un mélange d'acétone et de méthyléthylcétone provenant d'acides *iso* et *anteiso*. Après comparaison des deux acides aminés naturels avec l'acide 3-aminopentadécanoïque synthétique on conclut que la fraction lipidique AL de l'iturine A est un mélange de l'acide 3-amino 12-méthyltétradécanoïque et de l'acide 3-amino 12-méthyltridécanoïque.

**Abstract**—Iturin, a peptide antibiotic from *Bacillus subtilis*, was separated into three iturins: A, B, C by thin-layer chromatography. Iturin A, which has an antifungal activity, contains Asp, Glu, Tyr, Ser, Pro in a molar ratio 3:1:1:1:1 and a lipid moiety AL. The latter was shown to be a mixture of C<sub>14</sub> (40%) and C<sub>15</sub> (60%) amino-acids. The structure of these was determined by combined gas chromatography-mass spectrometry of the N-acetylmethyl esters. Strong peaks at  $m/e = 144$  and  $m/e = 102$  indicate a  $\beta$ -amino group. Identification of acetone and methyl ethyl ketone after chromic acid oxidation indicates an *iso* and *anteiso* structure. After comparison of the natural amino-acids with synthetic 3-amino pentadecanoic acid it is concluded that the lipid AL is a mixture of 3-amino 12-methyltetradecanoic acid and 3-amino 12-methyltridecanoic acid.

## INTRODUCTION

Dans des publications antérieures,<sup>1,2</sup> Delcambe a décrit l'isolement et la structure d'un antibiotique antifongique, l'iturine, isolé de *Bacillus subtilis*. La structure proposée était celle d'un heptapeptide cyclique comprenant 3Asn, Gln, Tyr, Ser, Pro et une partie lipidique non déterminée vraisemblablement liée à l'hydroxyle de la sérine. Nous avons repris l'étude structurale de l'iturine dans le but de déterminer la nature de la fraction lipidique et de vérifier la structure de l'heptapeptide par spectrométrie de masse. Au cours de ce travail nous avons constaté par chromatographie sur couches minces que l'iturine purifiée étudiée précédemment était encore un mélange. Les constituants de ce mélange ont été séparés en iturines A, B, et C et nous avons entrepris l'étude struc-

turelle du composé le plus abondant, l'iturine A. Nous décrivons ici la purification de l'iturine et la détermination de la structure du constituant lipidique.

## RESULTATS

La purification de l'iturine brute donne trois composés peptidiques: les iturines A, B, C ayant la même composition en acides aminés.<sup>3,4,5</sup> l'iturine A, quantitativement la plus importante a été étudiée plus complètement. L'hydrolyse totale de l'iturine A libère une partie lipidique AL, soluble dans le chloroforme et l'éther, représentant 20% du produit initial.

La chromatographie de AL sur couches minces de gel de silice dans les solvants chloroforme-méthanol-eau (65:25:4), chloroforme-méthanol-

eau-acide acétique (65:25:3,2:0,8) et méthyléthyl cétone-pyridine-acide acétique-eau (70:15:2:15) donne une seule tache qui réagit à la ninhydrine. La réaction positive à la ninhydrine indique la présence d'une fonction amine confirmée par le spectre infra rouge (bande à  $3.0 \mu$ ), il y a également une bande à  $6.35 \mu$  correspondant à un groupement carboxyle. Le traitement de AL par le méthanol chlorhydrique modifie le  $R_F$  du composé (voir Tableau 1), par suite de l'estérification d'un groupement carboxyle. Il s'agit donc d'un acide aminé possédant les caractères de solubilité des lipides.

La spectrométrie de masse est effectuée sur l'acide aminé, sur les esters méthylique et éthylique et sur l'ester méthylique N-acétylé. L'acide aminé libre donne un pic moléculaire à  $m/e = 257$  correspondant à un composé  $C_{14}H_{28}(NH_2)-COOH$  et un pic homologue à  $m/e = 243$ , d'intensité légèrement plus faible correspondant à un composé  $C_{13}H_{26}(NH_2)-COOH$ .

L'ester méthylique donne également deux pics homologues à  $m/e = 271$  et  $257$ . L'ester éthylique donne deux pics à  $m/e = 285$  et  $271$  et l'ester

méthylique N-acétylé donne deux pics à  $m/e = 313$  et  $299$ . Il s'agit donc d'un mélange de deux acides aminés homologues en  $C_{14}$  et  $C_{15}$ . La séparation de ces deux acides aminés homologues a été réalisée par chromatographie gazeuse des N-acétylméthylesters sur colonne de silicone SE 30. Le couplage de la chromatographie gazeuse avec la spectrométrie de masse donne les spectres des deux dérivés homologues, (Figs 1 et 2). Les pics moléculaires sont à  $m/e = 313$ :  $C_{14}H_{28}(NH-CO-CH_3)-COOCH_3$  et  $m/e = 299$ :  $C_{13}H_{26}(NH-CO-CH_3)-COOCH_3$ . Dans les deux spectres les pics les plus intenses se situent à  $m/e = 102$  (pic de base) et  $m/e = 144$ . Ces pics sont identiques pour les deux dérivés.  $m/e = 144$  correspond à l'ion  $CH_3-CO-NH=CH-CH_2-COOCH_3$ , provenant de la coupure de la chaîne paraffinique en  $\alpha$  de la fonction amide et le départ du cétène donne le fragment  $NH_2=CH-CH_2-COOCH_3$  à  $m/e = 102$ . La deuxième fragmentation en  $\alpha$  de la fonction amide conservant la chaîne paraffinique donne un pic à  $m/e = 240$   $C_{12}H_{25}-CH=NH^+$

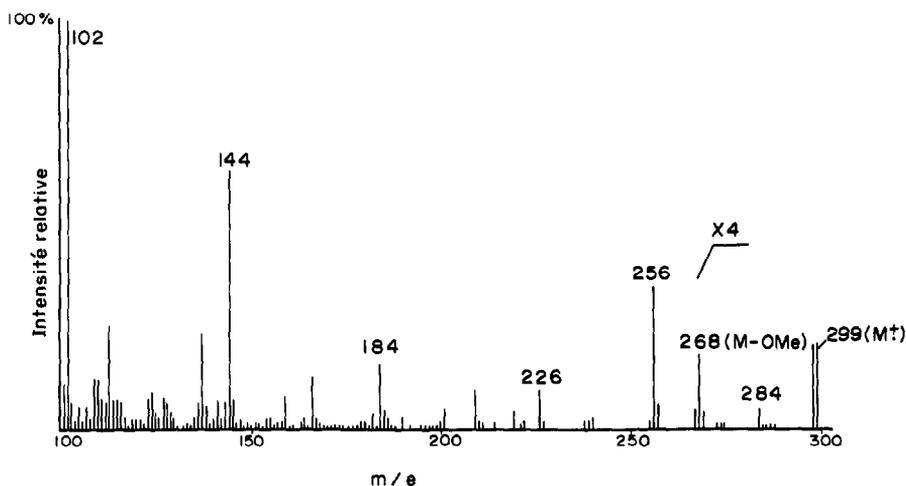
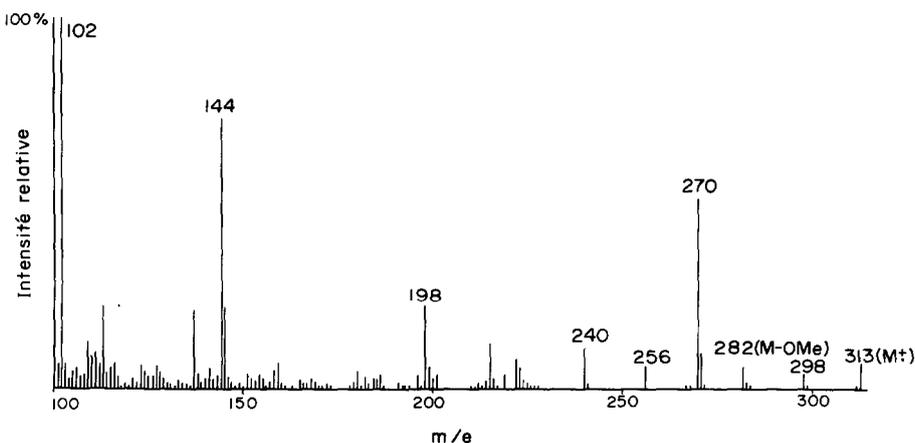


Fig 1. Spectre de masse de l'acide naturel en  $C_{14}$

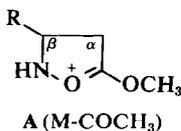
Tableau 1.  $R_F$  de fraction lipidique AL, de l'acide 3-aminopentadécanoïque et de leurs dérivés

Solvants <sup>a</sup>	$R_F$						
	Lipide AL	Acide 3-amino $C_{15}$	Ester méthylique de AL	Ester méthylique de l'acide 3-amino $C_{15}$	Ester éthylique de AL	Dérivé DNP de AL	Dérivé DNP de l'acide 3-amino $C_{15}$
I	0.63	0.63	0.82	0.82	0.82		
II	0.50	0.50					
III	0.77	0.77					
IV						0.68	0.68

<sup>a</sup>Solvants: I—Chloroforme-méthanol-eau (65:25:4), II—chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (65:25:3,2:0,8), III—méthyléthylcétone-pyridine-acide acétique-eau (70:15:2:15), IV—chloroforme-méthanol-acide acétique (9:5:3).


 Fig 2. Spectre de masse de l'acide naturel en  $C_{15}$ 

$CO-CH_3$  (Fig 2) et un pic homologue à  $m/e = 226$   $C_{11}H_{23}-CH=NH-CO-CH_3$  (Fig 1). Des pics caractéristiques de forte intensité se situent à  $m/e = 270$  (Fig 2) et  $m/e = 256$  (Fig 1). L'intensité de ces pics résultant du départ de  $CH_3-CO$  est en faveur d'un ester  $\beta$  aminé. En effet l'élimination du groupement  $CH_3-CO$  est probablement facilitée dans le cas des  $\beta$  aminoesters par la formation d'un ion cyclique (formule A).



Une vérification a été effectuée par comparaison des spectres de masse des esters méthyliques de la N-acétyl  $\beta$  alanine et de la N-acétylalanine; le pic à  $m/e = 102$  (M-43) est environ cinq fois plus intense pour le dérivé de la  $\beta$  alanine que pour celui de l'alanine.

La spectrométrie de masse montre que la fraction lipidique AL comprend un mélange de deux  $\beta$  aminoacides en  $C_{14}$  et  $C_{15}$ .

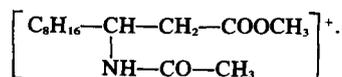
*Etude comparative de la fraction lipidique AL et de l'acide  $\beta$  amino-pentadécanoïque de synthèse.* L'acide  $\beta$  aminopentadécanoïque racémique a été préparé par synthèse. Le tridécanal est condensé avec le bromoacétate d'éthyle en présence de zinc et donne le 3-hydroxypentadécanoate d'éthyle. L'action de l'acide bromhydrique donne l'acide bromé en 3 et la réaction avec l'ammoniaque conduit à l'acide 3-aminopentadécanoïque racémique.

Le comportement de la fraction AL et de l'acide synthétique par chromatographie sur couches minces dans plusieurs solvants ainsi que ceux de leurs esters méthyliques et de leurs dérivés dinitrophénylés est identique (Tableau 1).

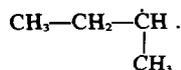
Le spectre de masse du N-acétyl 3-

aminopentadécanoate de méthyle synthétique présente les pics caractéristiques observés dans le spectre de masse de l'acide  $\beta$  aminé en  $C_{15}$  de la fraction lipidique AL (Fig 2). Ces pics se situent à  $m/e = 313$  (pic moléculaire),  $m/e = 270$  (M-( $CH_3-CO$ )),  $m/e = 240$  et  $m/e = 144$  correspondant aux fragmentations de part et d'autre du carbone  $\beta$ ; les pics à  $m/e = 198$  et  $m/e = 102$  proviennent de l'élimination du cétène des deux fragments précédents.

La chromatographie en phase gazeuse des N-trifluoroacétylbutylesters de la fraction lipidique AL et de l'acide  $\beta$ -aminopentadécanoïque synthétique a été effectuée sur colonne d'éthylène glycol adipate, les résultats sont indiqués dans Fig 3. On observe deux pics  $X_1$  et  $X_2$  correspondant aux dérivés des  $\beta$ -aminoacides naturels en  $C_{14}$  ( $X_1$ : 40%) et  $C_{15}$  ( $X_2$ : 60%) avec des composés mineurs en faible quantité. Le dérivé de l'acide  $\beta$ -aminopentadécanoïque synthétique présente un temps de rétention supérieur à celui du pic  $X_2$ . Cette différence entre les temps de rétention des acides  $\beta$ -aminopentadécanoïques synthétique et naturel indique une chaîne carbonée ramifiée chez le composé naturel. La position de la ramification peut être suggérée par le spectre de masse. Le spectre de masse du N-acétylméthylester de l'acide aminé naturel en  $C_{15}$  (Fig 2) présente à côté des pics de fragmentation caractéristiques de la fonction amide en  $\beta$  un pic à  $m/e = 298$  (M-15) et un pic à  $m/e = 256$  (M-57) correspondant au fragment



Ce résultat suggère l'existence d'une ramification en position *anteiso*, le pic à M-57 provenant de l'élimination du fragment



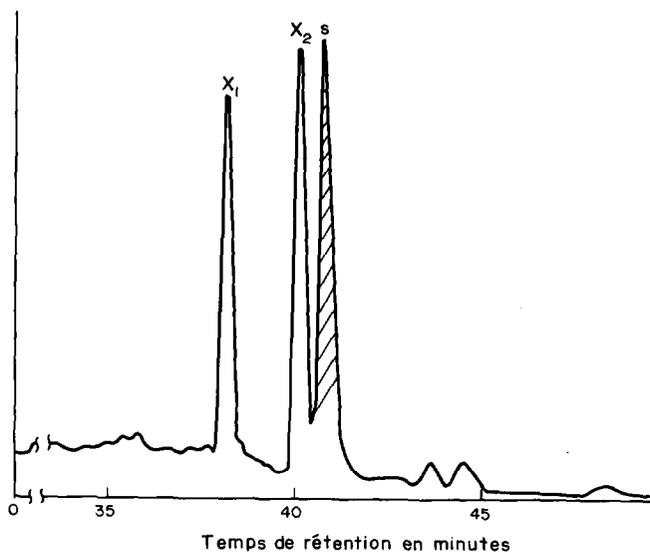


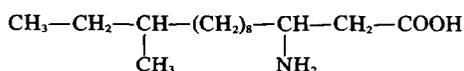
Fig 3. Chromatographie en phase gazeuse des N-trifluoro *n* butylesters de la fraction lipidique AL et de l'acide  $\beta$ -aminopentadécanoïque synthétique (Colonne d'éthylène glycol adipate de 80° à 215°). X<sub>1</sub>: acide 3-amino 12-méthyl tridécanoïque, X<sub>2</sub>: acide 3-amino 12-méthyl tétradécanoïque, S: acide 3-amino-pentadécanoïque.

Le spectre de masse du  $\beta$  aminoacide en C<sub>14</sub> (Fig 1) présente un pic à  $m/e = 284$  (M-15) mais on n'observe pas de pic à M-57 ce qui laisserait prévoir une structure *iso*.

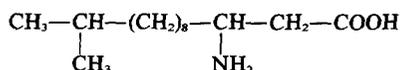
Un argument supplémentaire en faveur d'une structure *anteiso* C<sub>15</sub> et *iso* C<sub>14</sub> a été apporté par oxydation chromique de la fraction AL, mélange des deux acides aminés naturels. Les cétones résultant de l'oxydation sont identifiées par chromatographie sur couches minces de gel de silice après formation des 2,4-dinitrophénylhydrazones.<sup>6</sup> La fraction AL donne deux composés identifiés à l'acétone et à la méthyléthylcétone. Les R<sub>F</sub> des dinitrophénylhydrazones de l'acétone et de la méthyléthylcétone sont respectivement 0.43 et 0.59 avec hexane-alcool-éther (88:2:10), 0.48 et 0.55 avec hexane-benzène-éther (48:48:4), 0.54 et 0.62 avec le chloroforme.

#### CONCLUSION

Les résultats exposés ci-dessus permettent d'attribuer à la fraction liposoluble (AL) de l'iturine A la structure d'acides  $\beta$ -aminés en C<sub>14</sub> et C<sub>15</sub> avec une chaîne *anteiso* pour le composé en C<sub>15</sub>



et une chaîne *iso* pour le composé en C<sub>14</sub>



A notre connaissance de tels acides  $\beta$ -aminés à

longue chaîne n'ont jamais été décrits parmi les composés naturels. La faible quantité de substances disponibles n'a pas permis d'en déterminer la stéréochimie.

Il est possible d'envisager pour ces  $\beta$  aminoacides un processus de biogenèse par amination d'un  $\beta$ -cétoacide provenant d'un acide gras. La présence d'une quantité importante d'acide *anteiso* C<sub>15</sub> et en proportion plus faible d'acide *iso* C<sub>14</sub> dans les lipides de *Bacillus subtilis*<sup>7</sup> est en accord avec cette hypothèse.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

##### Purification de l'iturine

L'iturine brute obtenue à partir d'une culture de *Bacillus subtilis*<sup>1</sup> se dissout partiellement dans le mélange chloroforme-méthanol (2:1); la fraction insoluble est éliminée. La fraction soluble est chromatographiée sur colonne d'acide silicique Bio Sil HA 325 mesh avec le solvant chloroforme-méthanol-eau (65:25:4). Quatre fractions principales sont ainsi obtenues. La fraction I, fortement pigmentée, migre avec le front du solvant par chromatographie sur couches minces de gel de silice dans le solvant chloroforme-méthanol-eau (65:25:4), elle ne possède pas d'activité antifongique. Il faut noter que la quantité de fraction I varie selon les lots d'iturine; dans certaines chromatographies elle représente un pourcentage beaucoup plus faible d'iturine brute. La fraction II donne, par chromatographie sur couches minces dans le solvant précédent une seule tache de R<sub>F</sub> = 0.49; nous appelons cette substance Iturine A.

La fraction III est un mélange de deux composés: l'iturine A et l'iturine B R<sub>F</sub> = 0.49 et R<sub>F</sub> = 0.43 par chromatographie sur couches minces dans les conditions précédentes. La fraction IV renferme un seul composé, l'iturine C, R<sub>F</sub> = 0.36. L'iturine A (fraction II), l'iturine B,

obtenue à partir de la fraction III par chromatographie sur couches minces de gel de silice et l'iturine C (fraction IV) sont hydrolysées à 150° par HCl 6N pendant 8 h. Les hydrolysats sont étudiés par chromatographie sur papier et sur couches minces de cellulose avec les solvants: pyridine-alcool amylique tertiaire-eau (35:35:30), isopropanol-pyridine-acide acétique-eau (40:40:5:20) et phénol-citrate trisodique 10% (50:50), phase supérieure. Les chromatogrammes révélés à la ninhydrine préparée selon Russell<sup>3</sup> sont identiques pour les trois iturines. Le dosage, selon la méthode de Spackman *et al.*,<sup>4</sup> modifiée par Piez et Morris,<sup>5</sup> des acides aminés obtenus à partir de l'iturine A donne les rapports molaires: Asp: 2.9, Glu: 1.0, Ser: 1.0, Pro: 1.1, Tyr: 0.8, en accord avec les résultats obtenus précédemment par Delcambe.<sup>2</sup>

#### Synthèse de l'acide 3-aminopentadécanoïque<sup>8,9</sup>

A 4g de tridécane dissous dans 20 ml de benzène anhydre on ajoute 3g de zinc en poudre et 4g de bromoacétate d'éthyle. Le mélange est agité 30 h à 85°. Le milieu est additionné de 20 ml d'acide sulfurique à 10%. La phase benzénique est décantée et séchée sur sulfate de sodium. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt-célite (2:1). Le 3-hydroxypentadécanoate d'éthyle est élué par le mélange benzène-éther (7:3). La pureté du produit est vérifiée par chromatographie sur couches minces dans le solvant hexane-éther (60:40) et par IR. 1.2g de 3-hydroxypentadécanoate d'éthyle sont ensuite traités par 3.5g d'une solution azéotropique d'acide bromhydrique en présence de 2g d'acide sulfurique concentré. Le mélange est maintenu à ébullition pendant 3 h. La phase supérieure contenant le dérivé bromé est décantée puis lavée par l'eau jusqu'à neutralité. La pureté de l'acide 3-bromopentadécanoïque est vérifiée par chromatographie sur plaque de gel de silice dans le solvant: éther-benzène-éthanol-acide acétique (40:50:2:0.2). 86 mg d'acide 3-bromopentadécanoïque sont traités par 5 ml d'ammoniaque concentrée pendant 24 h à 55°. Après élimination de l'ammoniaque l'acide 3-aminopentadécanoïque est isolé par chromatographie sur couches minces préparatives dans le solvant chloroforme-méthanol-eau (65:25:4).

#### Préparation des dérivés

Les esters méthylique et éthylique du composé lipidi-

que (AL) sont obtenus par action du méthanol ou éthanol anhydre en présence d'HCl gazeux sec pendant 30 min à température ambiante.

Les dérivés dinitrophényles sont préparés par action d'une solution de 2,4-dinitrofluorobenzène 0.1M dans l'éthanol à 60° pendant 45 min en présence de triéthylamine à 10% dans l'éthanol.

Les dérivés acétylés des esters méthyliques sont préparés par action du mélange anhydride acétique-méthanol (1:3) pendant 1 h, sur les acides  $\beta$ -aminés. Après évaporation à sec et dissolution dans le méthanol une solution étherée de diazométhane est ajoutée à la solution.

Les dérivés N-trifluoroacétylés des *n* butylesters sont obtenus selon Roach et Gehrke<sup>10</sup> par addition de butanol chlorhydrique au mélange d'acides aminés puis d'anhydride trifluoroacétique suivie d'un chauffage à 150° pendant 15 min. La chromatographie gazeuse de ces dérivés est effectuée dans un appareil Fractovap GT 200 à double colonne, la phase stationnaire est l'éthylèneglycoladipate à 0.65% sur Chromosorb W 100-200 mesh lavé à l'acide, la température est programmée de 80° à 4°/min.

#### Techniques spectrométriques

Les spectres IR ont été effectués sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer.

Les spectres de masse ont été effectués sur un appareil MS9 à 70 eV couplé avec un appareil à chromatographie gazeuse Varian Aerograph 1400; la chromatographie est réalisée sur colonne de silicone SE 30 à 240°

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup>L. Delcambe, *Bull. Soc. Chim. Belge* **74**, 315 (1965)
- <sup>2</sup>L. Delcambe, *Ibid.* **74**, 329 (1965)
- <sup>3</sup>D. W. Russell, *J. Chromatog.* **4**, 251 (1960)
- <sup>4</sup>D. H. Spackman, W. H. Stein et S. Moore, *Anal. Chem.* **30**, 1190 (1958)
- <sup>5</sup>K. A. Piez et L. Morris, *Anal. Chem.* **1**, 187 (1960)
- <sup>6</sup>C. Bordet et G. Michel, *C.R. Acad. Sci.* **256**, 3482 (1963)
- <sup>7</sup>T. Kaneda, *J. Biol. Chem.* **238**, 1222 (1963)
- <sup>8</sup>E. F. Jenny et C. A. Grob, *Helv. Chim. Acta* **36**, 1936 (1953)
- <sup>9</sup>A. I. Vogel, *Practical Organic Chemistry*, Third Edition, Chap. III, pp. 277 et 432
- <sup>10</sup>D. Roach et C. W. Gehrke, *J. Chromatog.* **44**, 269 (1969)