

SUR LA STRUCTURE CHIMIQUE DU MYCOSIDE B*

H. DEMARTEAU-GINSBURG ET E. LEDERER

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette, Seine-et-Oise (France)

(Reçu le 4 janvier, 1963)

SUMMARY

Studies on the chemical structure of mycoside B

Mycoside B, a specific glycolipid found in bovine strains of *Mycobacterium tuberculosis* is shown to be a mixture of homologous compounds differing by the nature of the fatty acids. The principal constituent of this mixture is a mycoside B having the molecular formula $C_{84}H_{156}O_{10}$; it contains one molecule of 2-O-methyl-D-rhamnose bound in β linkage to the phenolic hydroxyl of a phenolic, methoxylated glycol $C_{32}H_{58}O_4$, the two aliphatic hydroxyls of which are esterified with 1 molecule of palmitic acid and with 1 molecule of C_{29} -mycocerosic acid. A provisional formula for mycoside B is presented (see formula (V)).

INTRODUCTION

Certains types de Mycobactéries peuvent être caractérisés par des constituants lipidiques qui leur sont particuliers, ainsi que l'ont montré SMITH, RANDALL *et al.*¹⁻³. Ces constituants sont des glycolipides, ou des peptidoglycolipides, auxquels on a donné le nom de "mycosides" (voir réf. 4) et dont la partie osidique contient des désoxysucres⁵.

Le mycoside B, caractéristique des souches bovines de *Mycobacterium tuberculosis*, est une cire blanche, F 25°; $[\alpha]_D^{20}$ —22° dans le $CHCl_3$. La présence dans son spectre infrarouge de bandes à 1610 cm^{-1} et à 1510 cm^{-1} et dans son spectre ultraviolet de bandes à 222, 275 et $282\text{ m}\mu$, suggère l'existence d'un éther aromatique^{3,6}.

Le sucre du mycoside B a été identifié par MACLENNAN *et al.*⁵ au 2-O-méthyl-rhamnose, sans précision sur sa configuration.

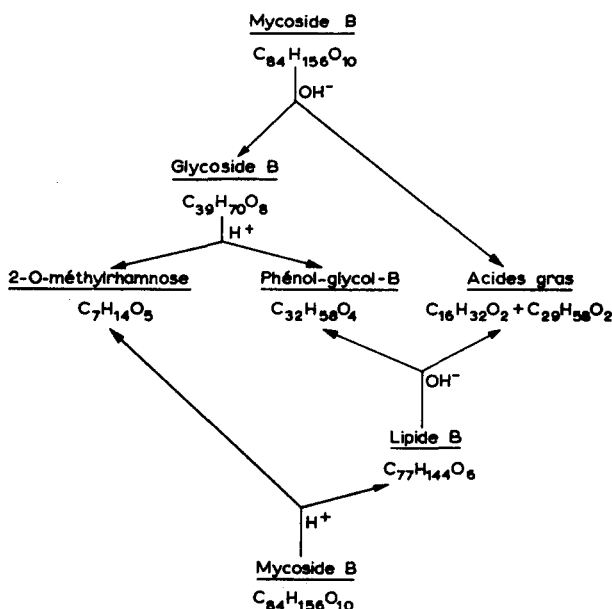
Dans le présent travail, nous exposons les résultats d'une étude sur la structure du mycoside B conduisant à la formule (V).

L'hydrolyse acide du mycoside B libère une fraction osidique hydrosoluble et une fraction lipidique (lipide B) contenant le noyau aromatique. L'hydrolyse alcaline du mycoside B libère un mélange d'acides gras et une substance aromatique, le glycoside B, qui, lui, donne par hydrolyse acide le 2-O-méthylrhamnose et un composé que nous appelons "phénol-glycol B". L'hydrolyse alcaline du lipide B donne le mélange d'acides mentionné ci-dessus et le phénol-glycol B (voir Fig. 1).

* 65ème communication sur les constituants des Mycobactéries. 64ème communication, E. VILKAS, A. M. MIQUEL ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 70 (1963) 217.

Identification des acides gras

Les analyses élémentaires et l'équivalent moléculaire du mélange d'acides gras correspondent à une formule moyenne $C_{23}H_{46}O_2$. Par distillation sous vide, on sépare un mélange d'acides cristallisant par refroidissement (environ 1/3 du poids des acides) et distillant entre 150° et 180° sous 0,01 mm de mercure, et une fraction semi-liquide distillant au-dessus de 180° (environ 2/3 du poids des acides).



Le mélange des acides les plus volatils a été analysé par chromatographie en phase vapeur: il contient les acides myristique, palmitique, et stéarique, avec prédominance de l'acide palmitique, ainsi qu'une petite quantité d'un acide supérieur non identifié.

La fraction la moins volatile a les propriétés physiques et chimiques de l'acide mycocérosique, $C_{32}H_{64}O_2$ (voir réfs. 7-10): équivalent moléculaire, analyses élémentaires, pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D -8^\circ$), spectre infrarouge*.

La spectrométrie de masse de l'ester méthylique de cette fraction montre cependant qu'il s'agit d'un mélange de six à sept acides ayant des formules brutes $C_{26}H_{52}O_2$, (environ 15 % du mélange) $C_{27}H_{54}O_2$, $C_{28}H_{56}O_2$, $C_{29}H_{58}O_2$ (environ 70 %), $C_{30}H_{60}O_2$, $C_{32}H_{64}O_2$ (traces).**

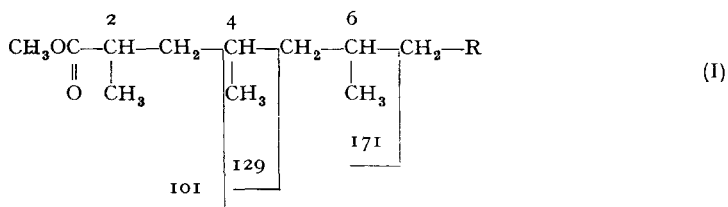
La présence d'un pic de base à m/e 101 et d'un grand pic à m/e 88 (66 % du pic de base) et de pics très faibles à m/e 87 (1.9 %) et à m/e 74 (1.0 %) montrent que ce mélange d'acides consiste essentiellement en substances portant un méthyle en C-2 (voir réf. 11).

La comparaison des pics à m/e 115 (1.0 %), m/e 129 (6.9 %) et m/e 157 (0.6 %) montre que le C-4 porte également un méthyle, au moins dans le constituant principal.

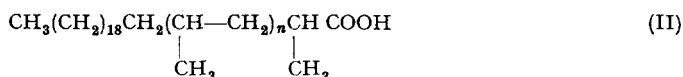
* SMITH *et al.*³ avaient déjà signalé la présence d'acide mycocérosique dans le mycoside B.

** Nous remercions le Dr. R. RYHAGE (Stockholm) pour les spectres de masse des acides mycocérosiques et du phénol-glycol B, ainsi que le Dr. W. VETTER (Gif) pour l'interprétation de ces spectres.

La même conclusion s'impose en ce qui concerne le C-6 (pics à m/e 157 (0.6 %); m/e 171 (3.5 %) et m/e 185 (0.6 %) (voir réf. 12) (formule (I)).



Nous voyons donc que nous sommes en présence de trois représentants de la "série mycocérosique" (II).



L'acide en C_{28} ($n = 1$) représente environ 15 %, l'acide en C_{29} ($n = 2$) environ 70 % des acides de cette fraction, tandis que l'acide en C_{32} ($n = 3$) n'est présent qu'à l'état de traces.

Les acides en C_{27} , C_{28} et C_{30} qui font ensemble 15 % du mélange ont probablement des structures ramifiées analogues.

Rappelons que l'acide mycocérosique étudié par spectrométrie de masse par ASSELINEAU *et al.*⁹ provenait d'une souche humaine de *M. tuberculosis* et que son constituant principal était l'acide en C_{32} , portant quatre ramifications (II, $n = 3$).

Dans toutes les fractions de mycoside B obtenues par chromatographie, nous retrouvons les acides gras normaux et l'"acide mycocérosique" à peu près dans les mêmes proportions, correspondant à environ 1 molécule d'acide palmitique (ou de ses homologues) pour 1 molécule d'"acide mycocérosique". De ce fait, il semble vraisemblable que le mycoside B contient en moyenne une molécule d'"acide mycocérosique" pour une molécule d'acide en C_{16} ou homologue*.

Pour l'établissement de la formule brute et de la structure du mycoside B nous négligerons les constituants acides mineurs et nous admettrons que le mycoside B contient une molécule d'acide palmitique et une molécule d'acide C_{29} -mycocérosique (II, $n = 2$).

Structure du phénol-glycol B

L'analyse élémentaire du phénol-glycol B correspond à la formule brute $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{O}_4$ et le dosage de méthoxyle montre la présence d'un méthoxyle. Le dosage de Kuhn-Roth indique la présence de deux (C)- CH_3 . Les petites quantités de phénol-glycol B dont nous avons disposé n'ont permis que peu de réactions chimiques; les conclusions structurales sont tirées principalement des données spectroscopiques.

Spectre ultraviolet: Le spectre ultraviolet du phénol-glycol B dans l'alcool présente deux maxima, l'un à 225 $m\mu$ et l'autre à 279 $m\mu$. Dans une solution 1 N de NaOH dans l'éthanol, les maxima sont fortement déplacés vers les grandes longueurs d'ondes et les extinctions sont sensiblement augmentées (voir Tableau I). Ce phénomène est caractéristique des phénols¹³.

* L'ensemble correspond bien à une formule moyenne $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{O}_2$ trouvée par titration et par analyse élémentaire du mélange brut des acides.

TABLEAU I

MAXIMA D'ABSORPTION ULTRAVIOLETTE DU MYCOSIDE B ET DE QUELQUES DÉRIVÉS

Produit	Solvant	$\lambda_{\text{max.}}$ (m μ)	ϵ	$\lambda_{\text{max.}}$ (m μ)	ϵ	$\lambda_{\text{max.}}$ (m μ)	ϵ
Mycoside B	Cyclohexane*	222	8500	274	1360	280	1110
Glycoside B	Éthanol	223	7850	274	1040	281	860
	1 N NaOH dans l'éthanol	—**	—	275	1100	281	910
Lipide B	Cyclohexane*	222	7750	274	900	281	805
Phénol-glycol B	Éthanol	225	7100	279	1770		
	1 N NaOH dans l'éthanol	242	11 200	296	2900		
Phénol-glycol B monométhylé	Éthanol	223	7060	276	1500	283	1320
	1 N NaOH dans l'éthanol	—**	—	276	1610	284	1430

* Le mycoside B et le lipide B sont insolubles dans l'éthanol.

** Les absorptions ne peuvent être lues qu'à partir de 228 m μ environ et on ne peut pas voir le 1er maximum.

Spectre infrarouge: Le spectre infrarouge du phénol-glycol B (fondu et resolidifié) présente une large bande OH à 3330 cm⁻¹ et une série de trois bandes à 1610, 1595 et 1510 cm⁻¹, caractéristiques du noyau aromatique.

La présence d'une bande à 825 cm⁻¹ montre que ce noyau aromatique est disubstitué en para. Le spectre de résonance magnétique nucléaire donne la même indication: le noyau aromatique porte donc un hydroxyle et une chaîne aliphatique en para l'un de l'autre*.

Par traitement du phénol-glycol par l'iodure de méthyle en milieu alcalin (K₂CO₃), on peut méthyliser l'hydroxyle phénolique sans méthyliser les hydroxyles aliphatiques. Les maxima du spectre ultraviolet du produit ainsi méthylé ne sont pas déplacés en milieu alcalin; ceci montre que l'hydroxyle phénolique du phénol-glycol B est bloqué (voir Tableau I).

Le spectre infrarouge présente cependant toujours une forte bande à 3330 cm⁻¹. Par traitement du phénol-glycol B monométhylé par l'acétone anhydre en présence d'une trace d'acide *p*-toluènesulfonique, on obtient un produit liquide dont le spectre infrarouge est assez analogue à celui du phénol-glycol B, mais ne présente plus de bande OH; sa bande C-CH₃ à 1380 cm⁻¹ est par contre beaucoup plus intense.

En chauffant ce produit dans l'alcool avec une trace d'HCl, on obtient à nouveau le phénol-glycol B monométhylé.

Nous avons ainsi la preuve de la formation d'un dérivé isopropylidène de l'éther méthylique du phénol-glycol B. Ceci prouve la présence de deux hydroxyles, en α ou en β l'un de l'autre, sur la chaîne aliphatique.

D'autre part, le spectre du phénol-glycol B méthylé, mesuré en solution 0.003 M dans CCl₄ présente une bande d'hydroxyle libre à 3632 cm⁻¹ et une bande d'hydroxyle associé à 3545 cm⁻¹.

La différence entre les fréquences d'absorption des hydroxyles libres (secondaires)

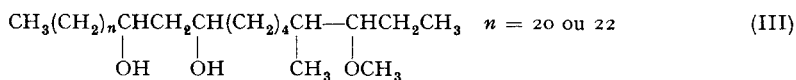
* Nous remercions vivement M. M. FÉTIZON pour l'interprétation des spectres infrarouges et

** M. A. GAUDEMER pour celle du spectre de résonance magnétique nucléaire.

et des hydroxyles associés intramoléculairement correspondrait à ceux d'un β -glycol*, $\Delta\gamma = 87 \text{ cm}^{-1}$ (voir réf. 14).

En résumé, le phénol-glycol B est un phénol para-substitué dont la chaîne aliphatique porte un groupement β -glycol, probablement disécondaire, et un méthoxyle.

Spectre de masse: Le spectre de masse de l'éther monométhylque du phénol-glycol B montre un pic de base à m/e 121 correspondant au fragment $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{CH}_2^-$, ce qui confirme les résultats exposés ci-dessus et permet de conclure, en plus, qu'il y a bien un CH_2 en para du OH phénolique. Par analogie avec le spectre de masse du phtiocérol^{15,16} (III)



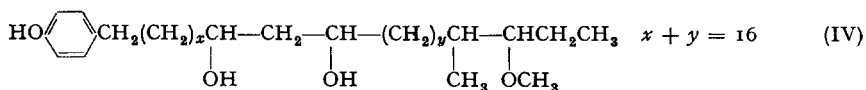
nous pouvons attribuer le pic à m/e 73 à la structure $\begin{array}{c} -\text{CHCH}_2-\text{CH}_3 \\ | \\ \text{OCH}_3 \end{array}$ et un pic à

m/e 101 à la structure $\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2\text{CH}_3 \\ | \quad | \\ \text{CH}_3 \quad \text{OCH}_3 \end{array}$ **. Les deux bouts de la chaîne aliphatique

du phénol-glycol B sont ainsi déterminés.

Quant au poids moléculaire du phénol-glycol B, il semble qu'on puisse le déduire d'un petit pic à m/e 518 qui pourrait correspondre à une molécule ayant perdu 2 hydrogènes; le poids moléculaire serait ainsi 520 correspondant à la formule de l'éther méthylque $\text{C}_{33}\text{H}_{80}\text{O}_4$.

Le phénol-glycol B aurait ainsi la formule brute $\text{C}_{32}\text{H}_{88}\text{O}_4$ et la formule partielle (IV).



Structure du glycoside B

L'analyse élémentaire et le dosage de méthoxyle du glycoside B, F 43–44°; $[\alpha]_D -36^\circ$ dans le CHCl_3 , sont en accord avec la formule brute $\text{C}_{39}\text{H}_{70}\text{O}_8$ avec 2 méthoxyles, formule correspondant à un glycoside contenant une molécule de 2-O-méthylrhamnose et une molécule de phénol-glycol B.

Le spectre ultraviolet du glycoside B dans l'éthanol présente 3 maxima (voir Tableau I), qui ne sont pas déplacés vers les grandes longueurs d'ondes par addition de soude. Dans le glycoside B, l'hydroxyle phénolique est donc bloqué, ce qui prouve que le 2-O-méthylrhamnose est lié à l'hydroxyle phénolique du phénol-glycol B.

Le glycoside B s'hydrolyse facilement dans l'alcool chlorhydrique aqueux, libérant le phénol-glycol B et le 2-O-méthylrhamnose identifié par son R_F . Son pouvoir rotatoire mesuré dans l'eau est de -27° (la littérature donne pour le 2-O-méthyl-L-rhamnose un $[\alpha]_D$ de $+24^\circ$ et de $+31^\circ$ dans l'eau¹⁶).

Le sucre du mycoside B est donc le 2-O-méthyl-D-rhamnose.

* Nous remercions vivement M. CHABAUD pour son aide dans la mesure et l'interprétation de ce spectre.

** SMITH *et al.*² avaient déjà supposé que le mycoside B contient un "analogue aromatique" du phtiocérol.

Rappelons que très récemment MARKOWITZ¹⁷ a isolé, pour la première fois semble-t-il, le D-rhamnose (et le 6-désoxy-D-talose) d'un polysaccharide bactérien.

La différence négative des rotations moléculaires du glycoside B et du 2-O-méthyl-D-rhamnose (-240°)—(-48°): -192° indique qu'il s'agit d'une liaison β -glycosidique*.

Structure du lipide B

Le lipide B, F 30–32°, $[\alpha]_D -7^\circ$, a un spectre ultraviolet avec deux maxima, à 222 et 274 m μ (dans le cyclohexane); il n'a pas été possible de faire des spectres en présence de NaOH, pour des raisons de solubilité. Le spectre infrarouge du lipide B présente des bandes esters à 1720 cm⁻¹.

Puisque nous savons que dans le glycoside B l'hydroxyle phénolique du phénol-glycol B est glycosidé par le sucre, les deux molécules d'acides gras du mycoside B doivent être estérifiées avec les OH glycoliques du lipide B.

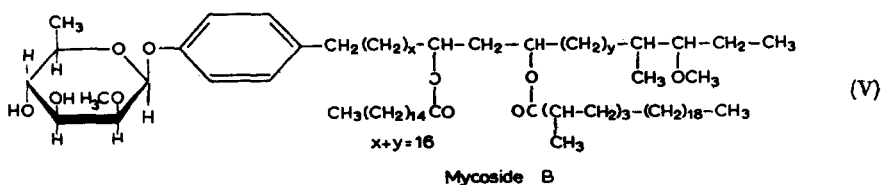
Nous avons décidé de négliger les acides gras mineurs et d'admettre qu'il y a une molécule d'acide palmitique et une d'acide C₂₉-mycocérosique (voir ci-dessus). Le lipide B doit donc avoir la formule brute C₇₇H₁₄₄O₆ (calculée d'après ses constituants: C₃₂H₅₈O₄ + C₂₉H₅₈O₂ + C₁₆H₃₂O₂ — 2H₂O); cette formule est en assez bon accord avec les valeurs trouvées.

Structure du mycoside B

L'analyse élémentaire et le dosage de méthoxyle du mycoside B correspondent à une formule globale C₈₄H₁₅₆O₁₀ avec deux méthoxyles. D'après les proportions des différents constituants obtenus par hydrolyse, le mycoside B contient:

1 molécule de 2-O-méthylrhamnose C₇H₁₄O₅, 1 molécule de phénol-glycol B C₃₂H₅₈O₄, 1 molécule d'acide palmitique** C₁₆H₃₂O₂ et 1 molécule d'acide C₂₉-mycocérosique*** C₂₉H₅₈O₂.

Les résultats de notre travail permettent de proposer pour le mycoside B la formule provisoire (V), où la structure exacte du phénol-glycol B et l'emplacement respectif des deux molécules d'acides gras restent à préciser.



PARTIE EXPÉRIMENTALE

Isolément

Le mycoside B a été isolé par chromatographie à partir d'un extrait méthanolique de BCG préalablement dégraissé à l'acétone.

La fraction contenant le mycoside B a été repérée grâce à son spectre infrarouge

* Quelques préparations de mycoside B donnent à l'hydrolyse acide une deuxième, faible tache révélabile au phthalate d'aniline et dont le R_F correspond à celui d'un di-O-méthylrhamnose.

** Ou, en proportions plus faibles, d'acides myristique ou stéarique.

*** Ou, en proportions plus faibles, d'autres acides analogues.

(bande à 1510 cm^{-1}). Il s'agit d'une fraction soluble à froid dans un mélange éther-méthanol (1:1, v/v), mais insoluble dans le méthanol pur.

11.5 g de cette fraction sont chromatographiés sur 350 g d'un mélange de trisilicate de magnésium-Célite (2:1). Les éluions sont de 250 cm^3 .

	Poids (mg)	$[\alpha]_D$	Extinction moléculaire	
			à $222\text{ m}\mu^*$	à $274\text{ m}\mu^*$
1 Éther de pétrole	0			
2 Éther de pétrole	0			
3 Éther de pétrole-benzène (1:1)	Traces			
4 Éther de pétrole-benzène (1:1)	4084			
5 Éther de pétrole-benzène (1:1)	1131			
6 Éther de pétrole-benzène (1:1)	244			
7 Benzène	313			
8 Benzène	567			
9 Benzène	121			
10 Benzène	409			
11 Benzène	194			
12 Benzène	087			
13 Benzène	049			
14 Benzène-éther (96:4)	293			
15 Benzène-éther (96:4)	380		1850	340
16 Benzène-éther (96:4)	141			
17 Benzène-éther (96:4)	104			
18 Benzène-éther (96:4)	098		2300	280
19 Benzène-éther (96:4)	235	-18°	7150	1080
20 Benzène-éther (96:4)	235	-20°	8400	1360
21 Benzène-éther (96:4)	183	-22°	8500	1360
22 Benzène-éther (96:4)	241	-23°	8100	1340
23 Benzène-éther (96:4)	158	-21°	8050	1250
24 Benzène-éther (96:4)	173	-23°	8100	1380
25 Benzène-éther (90:10)	178	-25°	4900	940
26 Benzène-éther (90:10)	187		1540	—
27 Benzène-éther (80:20)	301		1180	—
28 Benzène-éther (50:50)	577			
29 Éther	335			
30 Éther	210			
31 Éther	215			
32 Éther-méthanol (95:5)	045			

* Calculé en admettant le poids moléculaire de 1326 pour le mycoside B.

Les fractions 20-24 sont constituées par du mycoside B relativement pur. F 25° environ. La fraction 22 a été analysée.

(Calculé pour $\text{C}_{84}\text{H}_{156}\text{O}_{10}$: C, 76.1; H, 11.9; OCH_3 , 2.3 %. Trouvé: C, 76.4, 76.6; H, 12.0, 12.0; OCH_3 , 4.3, 4.4.)

Étant donné que le mycoside B n'est pas un produit homogène, mais une famille de produits différant par la nature de leurs acides gras, son analyse élémentaire peut varier dans certaines limites. C'est ainsi que SMITH, RANDALL *et al.*³ ont trouvé, pour leur préparation de mycoside B, l'analyse suivante: C, 77.1; H, 12.3; OCH_3 , 4.0.

Hydrolyse acide du mycoside B

80 mg de mycoside B sont mis en suspension dans 5 ml d'acide chlorhydrique N et chauffés 16 h à 105° à l'étuve en ampoule scellée. Le produit est repris par l'éther et l'eau; la solution éthérée, lavée jusqu'à neutralité et évaporée, donne 72 mg (soit

90 % du poids de départ; en théorie le lipide B représente en poids 88 % du mycoside B). L'éthersoluble est chromatographié sur 4 g de silicate désactivé par 4 % d'eau. Éluions de 20 ml.

1 Éther de pétrole	0 mg
2 Éther de pétrole	0
3 Éther de pétrole-benzène (1:1)	2
4 Éther de pétrole-benzène (1:3)	3
5 Benzène	12
6 Benzène-éther (98:2)	30
7 Benzène-éther (98:2)	4
8 Benzène-éther (90:10)	6
9 Benzène-éther (75:25)	12
10 Éther	2

La Fraction 6, F 30°; $[\alpha]_D -7^\circ$ est constituée par du lipide B.

(Calculé pour $C_{77}H_{144}O_8$, C, 79.3; H, 12.5; OCH_3 , 2.6%. Trouvé: C, 79.7; H, 12.7; OCH_3 , 2.1).

Cette fraction ne contient pas de sucre (test à l'anthrone); elle est soluble dans l'éther, le benzène, le cyclohexane et insoluble dans l'alcool.

L'hydrosoluble du mycoside B dessalifié sur colonne d'Amberlite MB3 et concentré est chromatographié sur papier dans le système de solvants butanol-acide acétique-eau (5:1:4). Les chromatogrammes révélés par le chlorure de *p*-anisidine montrent un spot de $R_{\text{rhamnose}} = 1.51$ correspondant à celui donné par MacLENNAN pour le 2-*O*-méthylrhamnose¹⁸, et un spot beaucoup moins intense de $R_{\text{rhamnose}} = 1.92$.

Hydrolyse alcaline du lipide B

250 mg de lipide B dissous dans 10 ml de benzène et additionnés de 10 ml de potasse alcoolique à 6 % sont chauffés à reflux pendant 8 h. Le produit de réaction, concentré, est repris par l'éther et l'eau; la fraction acide est séparée (110 mg), fraction semi-liquide, équivalent moléculaire 360; la fraction neutre, lavée jusqu'à neutralité, évaporée et séchée (139 mg) est chromatographiée sur silicate de magnésium (5.6 g). Éluions de 30 ml.

1 Éther de pétrole-benzène (2:1)	18 mg
2 Éther de pétrole-benzène (1:2)	12
3 Benzène	10
4 Benzène	6
5 Benzène	Traces
6 Benzène-éther (98:2)	8
7 Benzène-éther (96:4)	32
8 Benzène-éther (96:4)	14
9 Benzène-éther (90:10)	9
10 Éther	5
11 Éther-méthanol (95:5)	Traces

Les fractions 7 + 8 + 9 sont réunies: F 55°; $[\alpha]_D -3^\circ$.

(Calculé pour $C_{32}H_{58}O_4$: C, 75.8; H, 11.5; pour 1 OCH_3 , 6.2; pour 1 $-C-CH_3$, 5.3%. Trouvé: C, 75.6; H, 11.6; OCH_3 , 5.4; $-C-CH_3$, 11.7.)

Les premières fractions qui possèdent encore un "spectre aromatique" sont constituées par du "lipide B" non hydrolysé.

Hydrolyse alcaline du mycoside B

176 mg de mycoside B dissous dans 5 ml de benzène sont additionnés de 8 ml d'éthanol contenant 6 % de potasse et chauffés 5 h à reflux. Le produit est repris par l'éther et l'eau, la phase étherée est épuisée en milieu alcalin, puis acidifiée et lavée jusqu'à neutralité.

La fraction neutre pèse 97 mg. La fraction acide, semi-liquide, pèse 81 mg (équivalent moléculaire 380).

La fraction neutre est chromatographiée sur 4.5 g de silicate de magnésium; le produit insoluble dans l'éther de pétrole est dissous dans le benzène.

1 15 ml benzène	Traces
2 15 ml benzène-éther (98:2)	21 mg
3 25 ml benzène-éther (96:4)	10
4 15 ml benzène-éther (95:5)	4
5 25 ml benzène-éther (75:25)	7
6 25 ml éther	35
7 25 ml éther	11
8 25 ml éther	Traces
9 25 ml éther-méthanol (95:5)	0

Les premières fractions sont constituées par le mycoside B non hydrolysé; les fractions 6 + 7 sont réunies: F 38°, $[\alpha]_D -35^\circ$.

Il s'agit du glycoside B.

(Trouvé: C, 70.3; H, 10.7; OCH₃, 9.0. Calculé pour C₃₉H₇₀O₈ C, 70.2; H, 10.6; pour 1 OCH₃, 4.6 %.)

Hydrolyse acide du glycoside B

128 mg de glycoside B sont dissous dans 6 ml de méthanol chlorhydrique N et laissés 24 h à la température ordinaire, puis chauffés 4 h à reflux. On sépare l'éthersoluble (soit 99 mg) de l'hydrosoluble (29 mg).

L'éthersoluble chromatographié sur silicate est élué en majorité par un mélange benzène-éther (95:5). Son point de fusion, son spectre infrarouge, son spectre ultraviolet sont identiques à ceux du phénol-glycol B.

Analyse des acides gras

250 mg d'acides gras provenant du mycoside B (équivalent moléculaire 370) sont distillés sous vide dans un tube à boules.

La première fraction (70 mg) E 160-180° sous 0.01 mm Hg (température du bain d'air) cristallisant par refroidissement, a été ensuite méthylée par le diazométhane et analysée par chromatographie en phase vapeur.

Entre 180 et 250° il distille peu de produit (environ 15 mg).

La deuxième fraction E 250-300° est constituée essentiellement par de l'acide mycocérosique". Equivalent moléculaire 500. Pas d'absorption en ultraviolet au-dessus de 215 mμ, $[\alpha]_D -8^\circ$ dans le CHCl₃ (c = 0.3).

Après méthylation par le diazométhane, cette fraction a été soumise à la spectrométrie de masse.

Méthylation du phénol-glycol B

Après l'échec d'un essai de méthylation du phénol-glycol B par le diazométhane, nous l'avons méthylé par l'iodure de méthyle en milieu alcalin. 30 mg de phénol-glycol

B en solution dans 4 ml d'acétone sec sont chauffés à reflux pendant 12 h avec 1 ml d'iodure de méthyle fraîchement distillé, et 1 g de carbonate de potassium sec avec agitation. Au bout de 12 h on rajoute 1 g de K_2CO_3 et 1 ml d' ICH_3 . Le produit est ensuite extrait à l'éther, lavé à l'eau, puis à l'acide. On constate que le phénol est méthylé par le fait que les maxima du spectre ultraviolet ne sont plus déplacés en milieu alcalin.

Préparation du dérivé isopropylidène

25 mg de phénol-glycol B en solution dans 10 ml d'acétone sont chauffés 3 h à reflux avec quelques cristaux d'acide *p*-toluènesulfonique. L'acétone est chassée sous vide, le produit repris à l'éther, lavé à la soude, et chromatographié sur silicate. Avec le benzène on élue 6 mg d'un produit dont le spectre infrarouge ne présente plus de bande dans la région de 3600 cm^{-1} tandis que celle à 1380 cm^{-1} est devenue beaucoup plus intense.

Ce produit mis en solution dans l'alcool avec une trace d'HCl aqueux et chauffé 1 h à reflux redonne le phénol-glycol B.

REMERCIEMENT

Ce travail a bénéficié d'une subvention du National Institute of Allergy and Infectious Diseases U.S. Public Health Service (Grant No. E28-38).

RÉSUMÉ

Le mycoside B, glycolipide caractéristique des souches bovines de *M. tuberculosis*, est un mélange de substances homologues différant par la nature des acides gras. Le représentant principal a la formule brute $C_{84}H_{156}O_{10}$ et contient une molécule de 2-O-méthyl-D-rhamnose, liée sous forme de β -glycoside avec l'OH phénolique d'un phénol-glycol méthoxylé $C_{32}H_{56}O_4$, dont les deux OH aliphatiques sont estérifiés par une molécule d'acide palmitique et une molécule d'acide C_{29} -mycocérosique. Pour le mycoside B une formule provisoire est proposée (voir formule (V)).

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ D. W. SMITH, H. M. RANDALL ET K. KARREL, *Ann. Rev. Tuberc.*, 69 (1954) 505.
- ² D. W. SMITH, H. M. RANDALL, M. GASTAMBIDE-ODIER ET A. L. KOEVOET, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 69 (1957) 145.
- ³ D. W. SMITH, H. M. RANDALL, A. P. MACLENNAN, R. K. PUTNEY ET S. V. RAO, *J. Bacteriol.*, 79 (1960) 217.
- ⁴ D. W. SMITH, H. M. RANDALL, A. P. MACLENNAN ET E. LEDERER, *Nature*, 186 (1960) 887.
- ⁵ A. P. MACLENNAN, H. M. RANDALL ET D. W. SMITH, *Biochem. J.*, 80 (1961) 309.
- ⁶ H. NOLL, *J. Biol. Chem.*, 224 (1957) 149.
- ⁷ L. G. GINGER ET R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 203.
- ⁸ J. CASON ET G. J. FONKEN, *J. Biol. Chem.*, 220 (1956) 391.
- ⁹ C. ASSELINEAU, J. ASSELINEAU, R. RYHAGE, S. STÄLLBERG-STENHAGEN ET E. STENHAGEN, *Acta Chem. Scand.*, 13 (1959) 822.
- ¹⁰ N. POLGAR, *Chem. Ind. London*, (1961) 1158.
- ¹¹ R. RYHAGE ET E. STENHAGEN, *Arkiv Kemi*, 15 (1960) 291.
- ¹² R. RYHAGE ET E. STENHAGEN, *Arkiv Kemi*, 15 (1960) 333.
- ¹³ J. C. DEARDEN ET W. F. FORBES, *Can. J. Chem.*, 37 (1959) 1294.
- ¹⁴ L. P. KUHN, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 2492.
- ¹⁵ L. AHLQUIST, R. RYHAGE, E. STENHAGEN ET E. VON SYDOW, *Arkiv Kemi*, 14 (1959) 211.
- ¹⁶ H. DEMARTEAU-GINSBURG, E. LEDERER, R. RYHAGE, S. STÄLLBERG-STENHAGEN ET E. STENHAGEN, *Nature*, 183 (1959) 117.
- ¹⁷ E. MARKOWITZ, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 1767.
- ¹⁸ A. P. MACLENNAN, communication personnelle.