

BIOSYNTHÈSE DE L'ACIDE C₃₂-MYCOCÉROSIQUE INCORPORATION D'ACIDE PROPIONIQUE*

MIREILLE GASTAMBIDE-ODIER, JEANNE-MARIE DELAUMÉNY
ET EDGAR LEDERER

Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette, Seine et Oise (France)

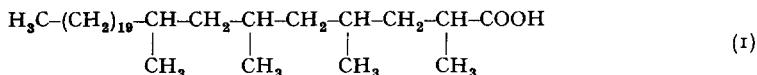
(Reçu le 31 juillet, 1963)

SUMMARY

[I-¹⁴C]Propionic acid is incorporated into the branched end of C₃₂-mycocerosic acid and of its lower C₂₆-homolog.

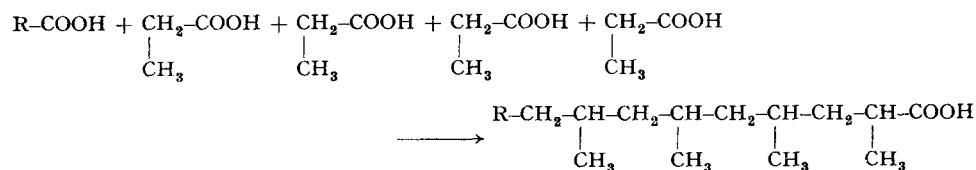
INTRODUCTION

L'acide C₃₂-mycocérosique (I) est le constituant principal d'un mélange d'acides lévogyres ramifiés, isolés du bacille tuberculeux¹⁻⁶.

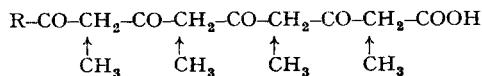


Ce mélange est composé d'acides en C₂₀ 2,4,6-triméthylés, en C₃₀ 2,4,6,8-tétraméthylés et en C₃₂ 2,4,6,8-tétraméthylés. En plus faible proportion, il contient aussi des acides en C₂₅, en C₂₆, en C₂₇ 2,4,6-triméthylés et des acides en C₃₁ et en C₃₄ 2,4,6,8-tétraméthylés^{5,6}.

A priori on peut envisager deux hypothèses de biosynthèse de ces acides: soit par condensation d'un acide normal avec 3 ou 4 molécules d'acide propionique selon le schéma suivant:



soit, selon le "mécanisme de BIRCH"⁷ par introduction d'unités en C₁ sur un poly-β-céto-acide du type



Les résultats ci-dessous démontrent que l'acide propionique est le précurseur

* 70ème communication sur les Lipides des Mycobactéries. 69ème communication, voir *Chem. Ind.*, 1963, 1285.

des chaînes latérales méthyles dans le cas de l'acide C₃₂-mycocérosique et de son homologue inférieur en C₂₆, isolés de la souche H₃₇Ra de *Mycobacterium tuberculosis**.

Plusieurs travaux récents ont déjà prouvé que l'acide propionique est également incorporé dans d'autres substances portant des ramifications méthyles: (a) Macrolides des Streptomycètes: érythromycine^{11,12}, méthymycine¹³, *e*-pyrromycine¹⁴, magnamycine^{15,16}. (b) Phtiocerol des Mycobactéries¹⁷. (c) Acides gras ramifiés des Ascaris: acide α -méthylbutyrique¹⁸, acide α -méthylvalérique¹⁹. (d) Acide gras ramifié de la glande uropygiale de l'oie: acide 2,4,6,8-tétraméthyldécanoïque²⁰.

MÉTHODES

Culture des bacilles

La souche H₃₇Ra de *M. tuberculosis* a été cultivée sur milieu de SAUTON²¹ additionné de: CaCl₂, 0.0005 g/l; ZnSO₄, 0.0001 g/l; CuSO₄, 0.0001 g/l, pendant 41 jours à 37°.

[T-¹⁴C]Propionate de sodium

Le [T-¹⁴C]propionate de sodium (activité spécifique: 2 mC/mmol) nous a été fourni par le Commissariat à l'Énergie atomique, Saclay (France). Sa pureté a été contrôlée par chromatographie sur papier.

Fractionnement des lipides

Les lipides ont été fractionnés selon la méthode décrite par AEBI *et al.*²².

Chromatographie sur colonne

L'acide silicique (100 mesh, Anal. reagent Mallinckrodt) a été utilisé sans autre traitement.

Les solvants ont été purifiés selon les méthodes usuelles.

Chromatographies en phase vapeur

Ces chromatographies ont été effectuées avec un appareil F. et M., modèle 500.

La colonne (3 m) était remplie de Célite-545 (50–60 mesh) Johns Manville (France), imprégnée de 5 % de silicone Dow Corning 550.

Les analyses et chromatographies préparatives ont été effectuées dans les conditions suivantes: débit d'hélium, 2 l/h; transformateur variable de chauffage de la colonne, 120 V; intensité du courant dans le catharomètre, 100 mA; sensibilité, 1, pour les analyses; 2 ou 4, pour les récoltes; transformateur variable du système d'injection, 65 V; température de réglage du système de chauffage du détecteur, 375°; vitesse de déroulement du papier, 2.5 cm/min; limite de température, 275°; température du système d'injection, 260°; température du détecteur, 260°; température de la colonne: l'ester C₃₂-mycocérosique a été purifié et analysé à 240°; la fraction C₂₆ a été purifiée et analysée à 225°.

Les Figs. 1A et 1B sont comparables entre elles au point de vue du temps de rétention, car elles résultent d'injections effectuées à la suite l'une de l'autre.

Les Figs. 1C et 1D ne peuvent être comparées, ni entre elles, ni avec les Figs.

* Un essai préliminaire concernant ce sujet a été effectué en collaboration avec le Professeur H. GRISEBACH⁸⁻¹⁰.

1A et 1B, au point de vue du temps de rétention, car elles résultent d'injections effectuées à des dates éloignées les unes des autres. Les variables étant nombreuses avec l'appareil F. et M., il est difficile d'obtenir des temps de rétention reproductibles lorsque les analyses ne sont pas faites toutes le même jour.

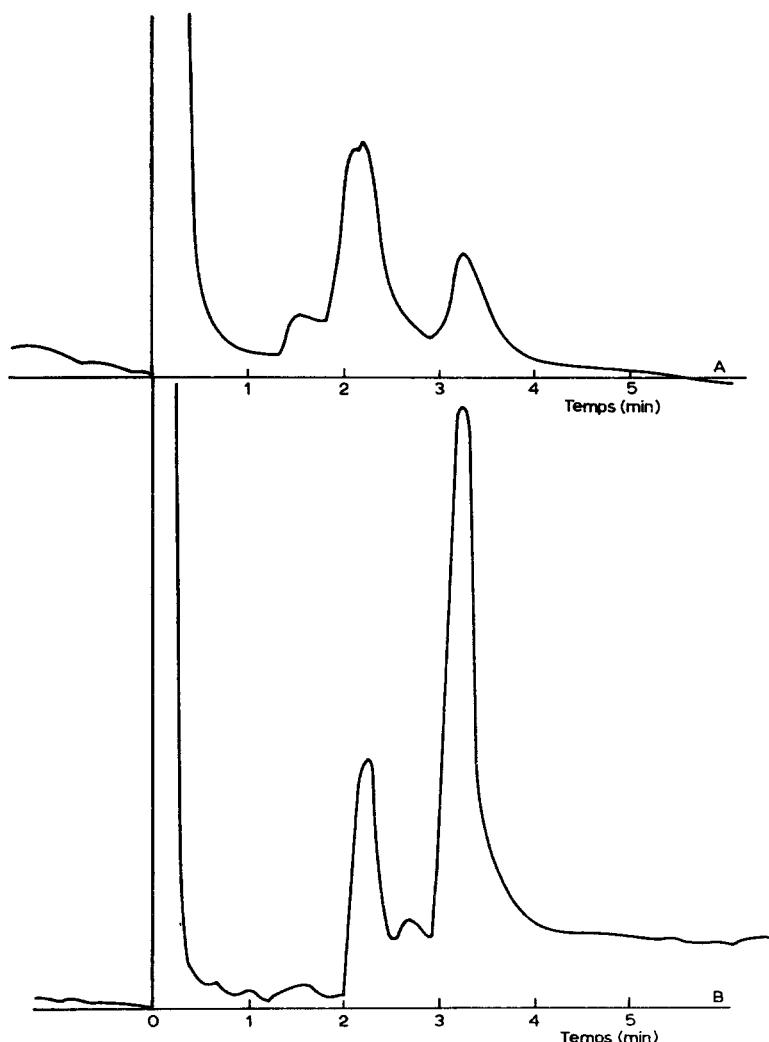
Spectrographie de masse

Les spectres de masse ont été enregistrés à l'aide d'un spectrographe de masse CH₄ Atlas Werke Ag., Brême (Allemagne).

Énergie des électrons, 70 V; température de la source d'ions, 270°; température du système d'injection, 250°.

Mesures de radioactivité

La radioactivité des échantillons a été mesurée en couches infiniment minces



Figs. 1A et 1B. Pour la légende voir p. 673.

au compteur Geiger-Müller à fenêtre mince (1.9 mg/cm^2) et a été exprimée en activité totale (coups/min) ou activité/mg (coups/min/mg) pour les mélanges, et en activité spécifique (coups/min/mmole) pour les corps purs. Toutes les mesures ont été effectuées avec le même compteur et les chiffres donnés représentent des valeurs relatives. Nous avons tenu compte des erreurs dues aux opérations de pesée, dilution, comptage et étalement, et nous les avons exprimées par une valeur égale à deux fois la déviation standard.

Distillation sous vide poussé

Pour les distillations de petites quantités de substance, nous avons utilisé un tube à boules chauffé dans un bain d'air grâce à une boîte métallique munie de voyants en mica.

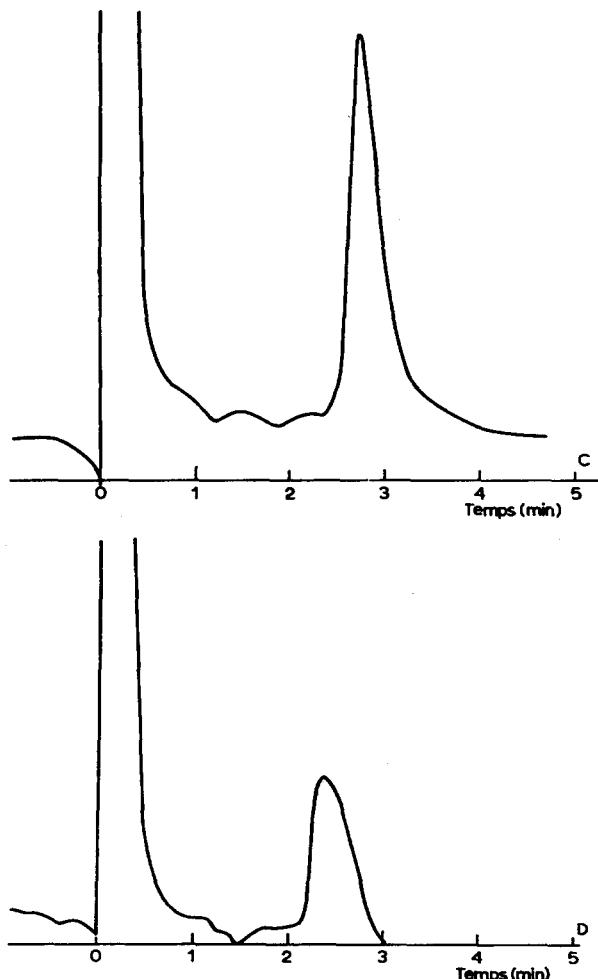


Fig. 1. Chromatographies en phase vapeur. A, fraction radioactive contenant le mycocérosate de méthyle; B, fraction utilisée comme entraineur; C, mycocérosate de méthyle après purification; D, fraction C₃₈ après purification.

Dégradation selon PHARES-SCHMIDT

La dégradation selon PHARES-SCHMIDT²³⁻²⁷ a été effectuée sur les esters méthyliques, pendant 3 h à 65°, en présence de H₂SO₄ ($d = 1.83$) et de NaN₃, sans addition de solvant organique. L'appareil utilisé a déjà été décrit²⁸. Des essais préliminaires ont montré que dans ces conditions le [$\text{I}-^{14}\text{C}$]stéarate de méthyle est complètement décarboxylé. En effet, 9.84 mg de [$\text{I}-^{14}\text{C}$]stéarate de méthyle (8370 coups/min) ont été chauffés 3 h à 65° en présence de 1 ml de H₂SO₄ concentré et de 15 mg de NaN₃.

L'heptadécylamine (F. 54-57°, 2.5 mg) isolée du milieu réactionnel après alcalinisation, extraction à l'éther et distillation sous 0.002 mm, avait une activité de 60 coups/min.

9.85 mg de stéarate de méthyle donnent théoriquement 8.5 mg d'amine. Si 100 % de la radioactivité se trouvait dans l'amine, nous aurions 2127 coups/min/2.5 mg d'amine. Or, nous trouvons 60 coups/min, c'est-à-dire 2 % de la radioactivité du stéarate de méthyle de départ. Le stéarate de méthyle a donc été décarboxylé avec un rendement de 98 %.

Dégradation selon KUHN-ROTH

Elle a été effectuée par chauffage en tube scellé pendant 3 h à 120° dans le mélange oxydant classique préparé selon la technique de GARBERS, SCHMIDT ET KARRER²⁹. L'appareil décrit par KUHN ET ROTH³⁰ a été utilisé pour distiller l'acide acétique par entraînement à la vapeur d'eau.

RÉSULTATS

Incorporation de [$\text{I}-^{14}\text{C}$]propionate

Isolement de l'acide C₃₂-mycocérosique et de la fraction C₂₆: La souche H₃₇Ra de *M. tuberculosis* a été cultivée sur milieu de SAUTON additionné des sels décrits ci-dessus, en présence de 100 μC de [^{14}C]propionate de sodium (activité totale $1.6 \cdot 10^7$ coups/min; activité spécifique $2.6 \cdot 10^8$ coups/min/mmole). Après 41 jours de culture à 37°, les bacilles ont été filtrés, lavés et extraits à l'alcool-éther (1:1, v/v) jusqu'à épuisement. L'extrait a été fractionné selon le schéma d'Anderson modifié par AEBI *et al.*²² et 176.2 mg de cires A (1307100 coups/min) ont été isolés. Celles-ci ont été chromatographiées sur acide silicique. Les fractions élues par l'éther de pétrole, l'éther de pétrole-benzène (3:1), l'éther de pétrole-benzène (1:1) et le benzène, ont été réunies, saponifiées, estérifiées par le diazométhane et rechromatographiées sur acide silicique. Les esters méthyliques élus par l'éther de pétrole ont été distillés sous 0.005 mm. Une fraction de 34.8 mg distillant entre 200 et 250° a été isolée (activité totale 571200 coups/min) et analysée par chromatographie en phase vapeur (Fig. 1A). 20.2 mg d'un mélange déjà enrichi en C₃₂ (Fig. 1B) provenant d'un essai sans ¹⁴C et contenant du C₃₂-mycocérosate de méthyle et une plus faible quantité d'ester C₂₆, ont été rajoutés au mélange radioactif ci-dessus, puis les 2 fractions principales (C₃₂ et C₂₆) ont été séparées par 2 chromatographies en phase vapeur successives. La fraction C₃₂ a été additionnée de 15.6 mg de C₃₂-mycocérosate de méthyle authentique et repurifiée par 2 autres chromatographies en phase vapeur. Finalement 4.8 mg de C₃₂-mycocérosate de méthyle (Fig. 1C) ont été isolés (activité totale 5300 coups/min; activité spécifique $60.9 \pm 14 \cdot 10^4$ coups/min/mmole).

Le spectre de masse de ce produit, effectué sur 0.5 mg, confirme que nous sommes en présence de C₃₂-mycocérosate de méthyle. Les impuretés présentes à l'état de traces sont les suivantes: C₃₁, C₂₉, C₂₇ (environ 2 % de chaque), C₂₈ (environ 7 %).

La fraction C₂₈ a été purifiée sans autre addition d'entraîneur et finalement 1.9 mg (activité totale 6140 coups/min/1.46 mg; activité spécifique 172.4 ± 27.6 · 10⁴ coups/min/mmole) ont été isolés (Fig. 1D). Le spectre de masse, effectué sur 0.5 mg démontre que nous sommes en présence d'un mélange d'ester C₂₈ normal et d'ester C₂₈ ramifié en 2 (sûrement), 4 (probablement) et 6 (?). Les impuretés sont à l'état de traces: C₂₄ (environ 5 %), C₂₅ (environ 8.2 %), C₂₇ (environ 3.6 %), C₂₈ (environ 2 %).

Dégénération du C₃₂-mycocérosate de méthyle: 1.94 mg de C₃₂-mycocérosate de méthyle (2391 coups/min) ont été additionnés de 2.9 mg de NaN₃ et de 0.2 ml de H₂SO₄ concentré et maintenus à 65°, sous N₂, pendant 3 h. Le CO₂ dégagé, entraîné par une petite quantité de CO₂ atmosphérique, a été recueilli dans une solution de baryte. Après filtration, une fraction (0.41 mg) du précipité obtenu (3.69 mg) a servi à la mesure de la radioactivité. La radioactivité totale du BaCO₃ isolé, était de 522 coups/min (= 22 % de la radioactivité de l'ester C₃₂-mycocérosique de départ). Un sulfate d'amine a été isolé du mélange réactionnel par précipitation en présence d'eau distillée. Par alcalinisation, extraction à l'éther et 2 distillations successives sous 0.001 mm, 0.42 mg d'une amine a été isolé (activité 350 coups/min = 62 % de la radioactivité du C₃₂-mycocérosate de méthyle*).

Une autre dégradation identique a été faite sur 1.36 mg de mycocérosate de méthyle. L'amine isolée a été additionnée à l'amine de la première réaction (total: 1.37 mg) et dégradée selon KUHN-ROTH, pendant 3 h à 122° dans 2 ml de mélange oxydant. L'activité de l'acétate de sodium isolé était négligeable (6 coups/min).

Dégénération de l'ester méthylique de la fraction C₂₈: La présence d'ester C₂₈ normal ne pouvant guère gêner pour les réactions de dégradation, celles-ci ont été faites sur 1.46 mg du mélange isolé précédemment + 2.7 mg de NaN₃ + 0.2 ml de H₂SO₄ concentré. La radioactivité totale du BaCO₃ isolé était de 1280 coups/min (= 21 % de la radioactivité de la fraction C₂₈). Des sulfates d'amine ont été isolés du mélange réactionnel par précipitation en présence d'eau distillée. Après alcalinisation, extraction à l'éther et une distillation sous 0.001 mm, 0.76 mg d'un mélange d'amines a été isolé (activité 1896 coups/min = 53 % de la radioactivité de la fraction C₂₈)**.

Une dégradation selon KUHN-ROTH (4 h à 120° dans 2.5 cm³ de mélange oxydant) a été faite sur 0.76 mg de ces amines. L'activité de l'acétate de sodium isolé était négligeable (10 coups/min).

Essai d'incorporation de méthionine

La souche H₃₇Ra de *M. tuberculosis* a été cultivée sur milieu de SAUTON + sels inorganiques, en présence de 37 µC de [Me-¹⁴C]méthionine (activité totale 4.9 · 10⁶

* 1.94 mg (2391 coups/min) de mycocérosate de méthyle donnent théoriquement 1.77 mg d'amine. Si 100 % de la radioactivité se trouvaient dans l'amine, nous aurions 567 coups/min/0.42 mg d'amine. Nous trouvons 350 coups/min, c'est-à-dire 62 % de la radioactivité de l'ester C₃₂-mycocérosique de départ.

** 1.46 mg (6140 coups/min) de fraction C₂₈ donnent théoriquement 1.31 mg d'amines. Si 100 % de la radioactivité se trouvaient dans les amines, nous aurions 3562 coups/min/0.76 mg d'amines. Nous trouvons 1896 coups/min, c'est-à-dire, 53 % de la radioactivité de la fraction C₂₈ de départ.

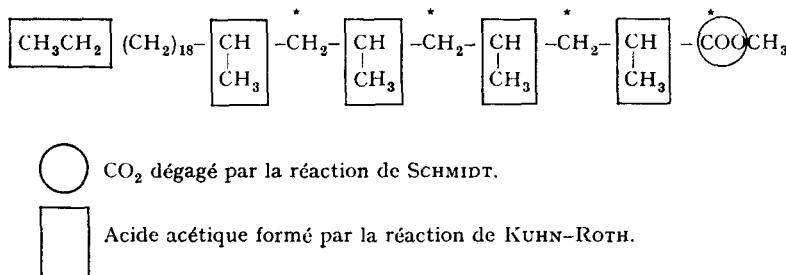
coups/min; activité spécifique $8.7 \cdot 10^8$ coups/min/mmole). Dans cette expérience, les composés ou fractions les plus radioactifs isolés des phospholipides et des cires A étaient le tuberculostéarate de méthyle (953 coups/min/mg; $29.7 \cdot 10^4$ coups/min per mmole) (voir réf. 31), le phiocérol (765 coups/min/mg; $42.6 \cdot 10^4$ coups/min/mmole) (voir réf. 17) et les esters mycoliques (794 coups/min/mg). Une fraction contenant principalement le groupe d'esters mycocérosiques C₂₆ à C₃₂ (Eb. 200–250° à 0.001 mm) n'était que faiblement radioactive (152 coups/min/mg) et n'a pas été purifiée davantage.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats obtenus démontrent que les chaînes latérales méthyle de l'acide C₃₂-mycocérosique et de son homologue en C₂₆ sont formées par incorporation d'acide propionique.

Par contre, la méthionine ne semble pas être incorporée dans ces acides.

Le mycocérosate de méthyle a été dégradé selon le schéma suivant:



Si l'acide C₃₂-mycocérosique est formé, *in vivo*, par incorporation de 4 molécules d'acide propionique, le CO₂ obtenu par décarboxylation du mycocérosate de méthyle doit contenir le quart de la radioactivité du produit de départ, tandis que l'amine isolée du milieu réactionnel doit contenir les trois quarts de cette radioactivité. En

TABLEAU I

<i>C₃₂-mycocérosate de méthyle (1.94 mg, 2391 coups/min)</i>				
<i>BaCO₃</i>		<i>Amine (0.42 mg)</i>		<i>Acétate de sodium</i>
Radioactivité trouvée: 522 coups/min	Pourcentage de l'activité de l'ester C ₃₂ : 22 %	Radioactivité trouvée: 350 coups/min	Pourcentage de l'activité de l'ester C ₃₂ : 62 %	Radioactivité trouvée: 6 coups/min
<i>Fraction C₂₆ (1.46 mg, 6140 coups/min)</i>				
<i>BaCO₃</i>		<i>Amine (0.76 mg)</i>		<i>Acétate de sodium</i>
Radioactivité trouvée: 1280 coups/min	Pourcentage de l'activité de la fraction C ₂₆ : 21 %	Radioactivité trouvée: 1896 coups/min	Pourcentage de l'activité de la fraction C ₂₆ : 53 %	Radioactivité trouvée: 10 coups/min

outre, l'acide acétique obtenu par oxydation de l'amine selon KUHN-ROTH doit être inactif.

Les résultats expérimentaux (Tableau I) concordent assez bien avec ces valeurs puisque le CO₂ contenait 22 % et l'amine 62 % de la radioactivité de l'ester C₃₂-mycocérosique. L'acétate de sodium obtenu après oxydation de l'amine selon KUHN-ROTH était pratiquement inactif (6 coups/min).

Le cas de la fraction C₂₆ est moins clair puisqu'il s'agit, selon la spectrométrie de masse, d'un mélange d'acide hexacosanoïque normal et d'acide C₂₆ avec des ramifications méthyles en 2 et 4. Une ramification éventuelle en 6 ne serait pas visible dans ce spectre. Dans le cas d'un acide en C₂₆ 2,4-diméthylé, on aurait dû trouver, après décarboxylation, 50 % de la radioactivité dans le CO₂ et 50 % dans les amines. Dans le cas d'un acide en C₂₆ 2,4,6-triméthylé ces chiffres seraient respectivement de 33 % et 66 %. L'acide acétique obtenu par oxydation des amines selon KUHN-ROTH doit être inactif dans les 2 cas.

Or, nous avons trouvé 21 % de radioactivité dans le CO₂, 53 % dans les amines et pratiquement pas de radioactivité dans l'acide acétique (10 coups/min); voir Tableau I.

Quoiqu'il en soit, l'incorporation d'acide propionique dans la fraction C₂₆ est certaine.

REMERCIEMENTS

Nous devons les spectres de masse à l'obligeance du Dr. W. VETTER. Nous remercions le Dr. I. J. SAAVEDRA (Madrid) pour un essai de décarboxylation qu'il a effectué lors de son stage dans nos laboratoires. Nous remercions également le Commissariat à l'Énergie Atomique, Saclay, pour une subvention ayant facilité l'achat de radioéléments.

Ce travail a bénéficié d'une subvention du National Institute of Allergy and Infectious Diseases (United States Public Health Service), Grant AI-02838-04.

RÉSUMÉ

L'acide [¹⁻¹⁴C]propionique est incorporé dans la partie ramifiée de l'acide C₃₂-mycocérosique et de son homologue inférieur en C₂₆.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ L. G. GINGER ET R. J. ANDERSON, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 203.
- ² N. POLGAR, *Chem. Ind. London*, (1953) 353.
- ³ N. POLGAR, *J. Chem. Soc.*, (1954) 1011.
- ⁴ J. CASON ET G. J. FORKIN, *J. Biol. Chem.*, 220 (1956) 391.
- ⁵ C. ASSELINEAU, J. ASSELINEAU, R. RYHAGE, S. STÄLLBERG-STENHAGEN ET E. STENHAGEN, *Acta Chem. Scand.*, 13 (1959) 822.
- ⁶ N. POLGAR ET W. SMITH, *J. Chem. Soc.*, (1963) 3081, 3085.
- ⁷ A. J. BIRCH, *Proc. Chem. Soc.*, (1962) 3.
- ⁸ E. LEDERER, *Pure and Applied Chemistry*, 2 (1961) 587.
- ⁹ E. LEDERER, *5th Intern. Congr. Biochem. Moscow*, 1961, Vol. 7, Pergamon Press, Oxford, 1963, p. 90.
- ¹⁰ E. LEDERER, *Corso estivo di Chimica, Accademia dei Lincei, Milano, September 1962*, sous presse.
- ¹¹ H. GRISEBACH ET H. ACHENBACH, *Z. Naturforsch.*, 17b (1962) 634.

TABLE II

STEROID-NUMBER CONTRIBUTIONS FOR REPRESENTATIVE FUNCTIONAL GROUPS
DETERMINED WITH NGS AND QF-I LIQUID PHASES

The steroid-number contributions were determined at 222°; for conditions see Table I.

Functional group	Steroid parent	Steroid number (<i>F</i>)	
		NGS	QF-I
Δ^5	cholestanol/cholesterol	0.4	-0.3
Δ^5	cholestanyl methyl ether/ cholesteryl methyl ether	0.2	-0.3
Δ^5	cholestanyl TFA/ cholesteryl TFA	-0.2	-0.5
Δ^5	cholestanyl TMSi/ cholesteryl TMSi	-0.1	-0.1
3-One	cholestane	8.0	8.1
3-One DMH	cholestane	6.6	5.2
3-One- Δ^4	cholestane	9.9	10.0
3-One- Δ^4 DMH	cholestane	7.9	5.9
11-One (4-ene)	androstene	3.2	2.0
17-One	androstane	6.9	6.7
20-One	5 α -pregnane	6.3	5.9
3 α -Ol(ax.)	cholestane	7.2	4.7
3 β -Ol(ax.)	coprostanone	7.2	4.6
3 α -Ol(eq.)	coprostanone	7.5	5.1
3 β -Ol(eq.)	cholestane	7.7	5.2
3 α -Ol(ax.)TMSi	cholestane	1.3	2.1
3 β -Ol(ax.)TMSi	coprostanone	1.6	2.6
3 α -Ol(eq.)TMSi	coprostanone	2.6	2.4
3 β -Ol(eq.)TMSi	cholestane	3.1	3.4
3 β -Trifluoro- acetoxy(eq.)	cholestane	3.4	5.0
3 β -Methoxy(eq.)	cholestane	4.2	3.5
3 β -Acetoxy(eq.)	cholestane	7.3	7.1
11 β -Ol(ax.)- (4-ene)	androstene	5.9	2.5
17 α -Ol(sec.)	androstane	7.0	4.2
17 β -Ol(sec.)	androstane	7.3	4.3
20 α -Ol	5 α -pregnane	6.9	4.4
20 β -Ol	5 α -pregnane	6.3	4.0
20 β -OITMSi	5 α -pregnane	2.2	2.9
A/B cis	5 α -pregnane/5 β -pregnane	-0.3	-0.3
A/B cis	cholestane/coprostanone	-0.3	-0.3

is specified in the Tables. Column packings were prepared as described in an earlier paper, and the experimental procedures were also the same as described earlier¹.

The steroid-number value for stigmastane was determined with androstane and cholestane as reference substances, and with an SE-30 (non-selective liquid phase) column; a value of 28.95 was found for the hydrocarbon. Cholestane and stigmastane were then used as reference substances with NGS and QF-I columns to determine steroid numbers for the following cholestryl esters: acetate, propionate, butyrate, valerate and heptanoate. The valerate was chosen as an appropriate reference substance for determining relative retention times for the steroids listed in Table I; the heptanoate was used as a second reference substance, and the method of determination of a steroid number with an NGS phase is shown in Fig. 1. The same procedure was used with data obtained with a QF-I phase to determine the steroid-number values in Table I.