

Sur le mycoside C_m, nouveau peptido-glyco-lipide isolé de *Mycobacterium marianum*¹

L'extraction de *Mycobacterium marianum* par le mélange alcool-éther (1:1) puis par le chloroforme, fournit 33% de lipides totaux². L'extrait éthéro-alcoolique, après évaporation des solvants, donne une fraction insoluble dans l'éther et dans l'eau; ces caractères de solubilité ont déjà été observés pour des composés de nature peptido-lipidique³ ou peptido-glycolipidique⁴.

Purification. La substance insoluble dans l'éther est dissoute dans le chloroforme; la solution est passée sur filtre Seitz puis sur colonne de poudre de cellulose pour éliminer les amino-acides libres éventuellement présents⁵.

Après évaporation du solvant, on obtient une substance incolore que l'on purifie par chromatographie sur colonne de trisilicate de magnésium activé. Le chloroforme élue 22% du produit initial, le mélange chloroforme-méthanol (95:5), 54%.

Nous avons étudié cette dernière fraction; sa structure est assez voisine de celle du mycoside C, peptido-glycolipide caractéristique de *M. avium*^{4,6,7}; nous proposons pour cette substance le nom de mycoside C_m.

Propriétés. C'est un solide incolore F.: 198–200°, $[\alpha]_D = -31^\circ$ (CHCl_3), insoluble dans l'eau et dans l'éther, peu soluble à froid dans le méthanol et l'éthanol, très soluble dans le chloroforme et l'acide acétique glacial. Le spectre IR, pratiquement identique à celui du mycoside C^{4,6,7}, indique la présence du groupement acétyle (1225 cm⁻¹), et de la liaison peptidique (1530, 1630, et 3300 cm⁻¹).

Composition. La substance est exempte de soufre et de phosphore. L'analyse élémentaire donne: C% 64,65, 64,22; H% 8,52, 8,87; N% 4,70; (O)-CH₃% 2,44, 2,41; (CO)-CH₃% 2,28. Le poids moléculaire déterminé par la micro-méthode de BARGER⁸ modifiée par RAST⁹ est voisin de 2000. L'hydrolyse acide totale donne environ 40% d'une partie lipidique éthérosoluble et une partie hydrosoluble contenant des acides aminés et des sucres. La recherche du glycérol et de l'inositol est négative.

Fraction aminée. Trois acides aminés sont décelés par chromatographie mono- et bidimensionnelle sur papier avec différents solvants: la thréonine, lalanine et la phénylalanine. L'étude microbiologique⁶ et la chromatographie sur Dowex 50 × 4 selon la méthode de MOORE et STEIN¹⁰ ont permis de préciser la nature et la proportion molaire des acides aminés; il s'agit de D-allo-thréonine, de D-alanine et de D-phénylalanine en proportion 3:3:1. D'après la teneur en azote et le poids moléculaire on peut conclure que le mycoside C_m contient sept molécules d'acides aminés.

Fraction glucidique. La chromatographie sur papier de l'extrait aqueux après hydrolyses chlorhydriques répétées selon MACLENNAN¹¹ montre 2 taches révélatrices par le phthalate d'aniline et par le système periodate-benzidine. La chromatographie préparative sur papier dans le système acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3) donne 2 composés de Rf très différents et nettement supérieurs à ceux des hexoses et des pentoses. S₁: Rrh = 1,31; S₂: Rrh = 3,13 (Rrh = Rf par rapport au rhamnose). La présence de 6-désoxyhexoses, O-méthylés ou non, ayant été signalée dans les substances lipidiques isolées de plusieurs Mycobactéries¹² en particulier dans le mycoside C de *Mycobacterium avium*^{4,7,11}, nous avons utilisé le test de DISCHE et SHETTLES¹³ spécifique des 6-désoxyhexoses pour l'identification de S₁ et S₂. Les courbes d'absorption en milieu cystéine-acide sulfurique, identiques pour S₁ et S₂ et pour le rhamnose témoin, ont montré que ces deux sucres étaient effectivement des 6-désoxyhexoses.

a) *Nature de S₁.* L'examen des Rf en présence de 6-désoxy-talose et d'autres 6-désoxyhexoses authentiques¹⁴ dans plusieurs solvants: butanol-pyridine-eau (6:4:3), acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3), butanol-éthanol-eau (5:1:4) permet d'affirmer que S₁ est le 6-désoxy-talose. Il reste inchangé après démethylation par BCl_3 ¹⁵, l'analyse montre l'absence de groupements (O)-CH₃. D'autre part, les points de fusion de S₁ (F: 112–120°) et du 6-désoxytalose (F: 116–118°) sont pratiquement identiques; le point de fusion du mélange ne subit pas de dépression. Les quantités de S₁ disponibles n'ont pas permis de mesurer la rotation.

b) *Nature de S₂.* Le comportement chromatographique de S₂ est celui d'un di-O-méthyl-6-désoxyhexose. Après démethylation par BCl_3 ¹⁶ la chromatographie sur papier donne trois taches. L'une correspond à l'ose initial, l'autre à un 6-désoxyhexose monométhylé, la troisième à un 6-désoxyhexose. Dans de nombreux solvants, ce dernier se comporte comme le rhamnose. S₂ est donc un di-O-méthyl-rhamnose.

D'autre part, il est révéable par le système periodate-benzidine; or, parmi les dérivés diméthylés, seul le 3,4-di-O-méthylrhamnose, qui possède deux hydroxyles, adjacents, réagit avec le periodate. Par chromatographie sur papier dans plusieurs solvants: butanol-pyridine-eau (6:4:3), acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3), butanol-éthanol-eau (5:1:4), S₂ a le même Rf que le 3,4-di-O-méthyl rhamnose.

Le pouvoir rotatoire indique qu'il s'agit du dérivé L: $[\alpha]_D = +20^\circ \pm 2^\circ$ (H_2O), $[\alpha]_D$ théorique = +18,5°¹⁸.

Le dosage par spectrophotométrie après hydrolyse selon MACLENNAN¹¹ donne 20,4% de sucres totaux. Le dosage de chaque sucre après chromatographie sur papier, élution et spectrophotométrie donne S₁: 7%, S₂: 13,4%. Il y a donc une molécule de 6-désoxy-talose et deux moles de 3,4-di-O-méthyl-L-rhamnose.

Fraction lipidique. Quand on hydrolyse le mycoside C_m par HCl N selon MACLENNAN¹¹ on obtient une partie lipidique azotée; l'hydrolyse totale de cette substance

¹ 60ème communication sur les constituants des Mycobactéries; 59ème comm. voir: ref. 7.

² G. MICHEL, Thèse de Doctorat, Paris 1958; Bull. Soc. Chim. Biol. 41, 1619 (1959).

³ M. GUINAND, G. MICHEL et E. LEDERER, C. R. Acad. Sci. 246, 848 (1958);

⁴ C. W. SMITH, H. M. RANDALL, A. P. MACLENNAN et E. LEDERER, Nature 186, 888 (1960).

⁵ C. H. LEA et D. N. RHODES, Biochem. J. 54, 467 (1953).

⁶ M. IKAWA, E. E. SNELL et E. LEDERER, Nature 188, 558 (1960).

⁷ P. JOLLÈS, F. BIGLER, T. GENDRE et E. LEDERER, Bull. Soc. Chim. Biol., sous presse.

⁸ G. BARGER, Ber. 37, 1754 (1904).

⁹ K. RAST, Ber. 54, 1979 (1921).

¹⁰ S. MOORE et W. H. STEIN, J. biol. Chem. 211, 893 (1954).

¹¹ A. P. MACLENNAN, Communication personnelle.

¹² A. P. MACLENNAN, D. W. SMITH et H. M. RANDALL, Biochem. J. 74, 3 P (1960).

¹³ Z. DISCHE et L. B. SHETTLES, J. biol. Chem. 175, 595 (1948).

¹⁴ Nous remercions les Professeurs E. L. HIRST (Edinburgh), T. REICHSTEIN (Bâle) et G. F. SPRINGER (Philadelphia) pour des échantillons de 6-désoxyhexoses et de leurs dérivés.

¹⁵ S. ALLEN, T. G. BONNER, E. J. BOURNE et N. M. SAVILLE, Chem. and Ind. 1958, 630.

¹⁶ R. S. TIPSON, C. C. CHRISTMAN et P. A. LEVENE, J. biol. Chem. 128, 609 (1939).

¹⁷ G. MICHEL, C. BORDET et E. LEDERER, C. R. Acad. Sci. 250, 3518 (1960).

¹⁸ Ce travail a bénéficié d'une subvention de la Fondation Waksman pour le développement des Études microbiologiques en France, et d'une subvention du National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Grant E 28 38).

libère de la phénylalanine et une fraction acide étherosoluble qui représente 42% du mycoside C_m initial. Après estérisation par le diazométhane, cette fraction est chromatographiée sur colonne d'acide silicique. L'analyse élémentaire de l'ester élut par benzène-éther (9:1) donne C% 80,45; H% 13,02; (O)-CH₃% 1,1. Calculé pour C₅₁H₉₈O₃: C% 80,67; H% 12,91; (O)-CH₃% 2,0. Le spectre infra-rouge indique la présence d'une fonction alcool. En attendant un examen plus approfondi de cette substance, la formule brute ci-dessus doit être considérée comme tout à fait provisoire.

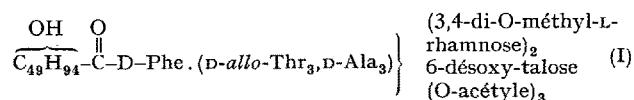
Rappelons, cependant, que nous venons d'isoler de *Nocardia asteroides* un acide mycolique C₅₀H₉₆O₃ ± 3 CH₂ que nous avons appelé acide nocardique¹⁷.

Le dosage des groupements acétyle effectué sur le mycoside C_m indique la présence de 3 CO-CH₃ par mole; trouvé: (CO)-CH₃% 2,28; calculé pour 3 (CO)-CH₃% 2,15.

Structure partielle du mycoside C_m. La molécule du mycoside C_m contient donc les constituants suivants: 7 molécules d'acides aminés (un D-Phe, trois D-allo-Thr., et trois D-Ala = C₃₀H₅₉N₇O₁₇), trois molécules de sucres (un 6-désoxy-talose, deux 3,4-di-O-méthyl-L-rhamnose = C₂₂H₄₄O₁₅), une partie lipidique de formule approximative C₅₀H₉₆O₃ et trois groupements acétyle. La formule brute du mycoside C_m serait C₁₀₈H₁₈₅N₇O₂₈, ce qui est en assez bon accord avec les valeurs trouvées.

C₁₀₈H₁₈₅N₇O₂₈ calculé C 63,90 H 9,18 N 4,82 (O)-CH₃ 2,95 trouvé 64,22 8,87 4,70 2,44

Les résultats exposés ci-dessus permettent d'attribuer au mycoside C_m la formule provisoire (I).



Rappelons que le mycoside C₁ de *M. avium* contient les trois mêmes acides aminés, mais en proportions différentes (un D-Phe, deux D-allo-Thr et deux D-Ala) et trois désoxyhexoses différents en quantité équimoléculaire, dont le 6-désoxy-talose et le 3,4-di-O-méthyl-rhamnose⁷.

Dans le mycoside C₁ c'est également la D-phénylalanine qui est amidifiée, avec le carboxyle de la partie lipidique.

Summary. Mycoside C_m, m.p. 198–200° [α]_D = –31° (CHCl₃), a new peptido-glycolipid isolated from *Mycobacterium marinum*, has the approximate molecular formula C₁₀₈H₁₈₅N₇O₂₈ and gives on hydrolysis seven molecules of D-amino acids (one D-phenylalanine, three D-allo-threonine, three D-alanine), three molecules of 6-deoxyhexoses (one 6-deoxy-talose of as yet undetermined configuration and two molecules of 3,4-di-O-methyl-L-rhamnose); the lipid moiety of mycoside C_m is a hydroxy-acid of approximate formula C₅₀H₉₆O₃; three O-acetyl groups are also present. The preliminary formula (I) is proposed for mycoside C_m.

MAUD CHAPUT, G. MICHEL et E. LEDERER¹⁸

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté catholique des Sciences, Lyon (France), et Institut de Biologie physico-chimique, Paris (France), le 4 novembre 1960.

Eine neue Isomerisierungsreaktion der Mutterkornalkaloide vom Peptidtypus¹

Mit den neu zur Verfügung stehenden analytischen Methoden wurde festgestellt, dass sich am Ergotamin in Lösung neben der schon lange bekannten Epimerisierung am Kohlenstoffatom 8 des Lysergsäureteils eine weitere

Umlagerungsreaktion abspielt. Diese Isomerisierung beobachtet man auch bei allen anderen natürlichen Mutterkornalkaloiden vom Peptidtypus, ebenso bei ihren Dihydroderivaten, dagegen nicht beim Ergobasin und den anderen einfachen Lysergsäureamiden. Daraus geht hervor, dass die Umlagerung im Peptidteil des Moleküls vor sich geht.

Die neuen Isomeren bilden sich in saurer Lösung, weshalb wir sie durch die Vorsilbe «Aci» kennzeichnen möchten. Sie bilden sich beim Kochen der Lösungen schon nach wenigen Minuten. Die gleichen Verbindungen entstehen langsam auch bei Raumtemperatur, denn sie lassen sich ebenfalls in mehrere Jahre gelagerten pharmazeutischen Präparaten nachweisen.

Die Umlagerung ist reversibel. So entsteht ausgehend von Ergotamin oder Aci-ergotamin ein Gleichgewicht, zwischen Ergotamin, Aci-ergotamin, Ergotaminin und Aci-ergotaminin; ausgehend von Dihydro-ergotamin oder Aci-dihydro-ergotamin ein Gemisch von Dihydro-ergotamin und Aci-dihydro-ergotamin. Untersuchungen zur Abklärung des Chemismus der Aci-Isomerie sind im Gange.

Die Aci-Verbindungen lassen sich von den Ausgangsalkaloiden mittels chromatographischer Methoden trennen. Sie zeigen gute Kristallisationseigenschaften. Da der Chromophor des Moleküls, der Lysergsäure- bzw. der Dihydro-lysergsäure-Teil, von der Isomerisierung nicht betroffen wird, zeigen die Aci-Formen die gleichen UV-Spektren wie die entsprechenden Ausgangsmaterialien. Die spezifischen Drehwerte weisen geringe, doch deutliche Unterschiede auf.

Aci-ergotamin kristallisiert aus Methanol in Nadeln vom Smp. 185–187° (Zers.), [α]_D²⁰ = –32° (± 3°) (c = 1,2 in Pyridin). Für die Analyse wurde die Substanz, gleich wie die beiden nachstehenden Präparate, im Hochvakuum bei 120° getrocknet. C₃₃H₅₅O₅N₅, ber. C 68,1%, H 6,1%, N 12,0%; gef. C 67,8%, H 6,6%, N 11,9%. UV-Spektrum in Methanol: Maxima bei 245 mμ (4,3), 312 mμ (3,9).

Aci-ergotaminin kristallisiert aus Methanol/Äther in feinen Nadeln, Smp. 203° (Zers.); [α]_D²⁰ = +258° (± 2) (c = 1,2 in Pyridin). C₃₃H₅₅O₅N₅, ber. C 68,1%, H 6,1%, N 12,0%; gef. C 67,5%, H 6,1%, N 12,0%. UV-Spektrum in Methanol: Maxima bei 239 mμ (4,3), 311 mμ (3,9).

Aci-dihydro-ergotamin kristallisiert aus Methanol in Nadeln vom Smp. 188° (Zers.); [α]_D²⁰ = –96° (± 2°) (c = 1,3 in Pyridin). C₃₃H₅₇O₅N₅, ber. C 67,9%, H 6,4%, N 12,0%; gef. C 68,0%, H 6,8%, N 12,0%. UV-Spektrum in Methanol: Maxima bei 221 mμ (4,5), 280 mμ (3,8), 291 mμ (3,7).

Über die pharmakologische Wirksamkeit der Aci-Mutterkornalkaloide, die gegenüber den Ausgangsverbindungen im allgemeinen abgeschwächt ist, wird demnächst an anderer Stelle berichtet.

Summary. Ergot alkaloids of the peptide type and their dihydro-derivatives can be converted reversibly in acid solution into isomeric compounds. They are characterised by the prefix 'aci', e.g. aci-ergotamine, aci-dihydro-ergotamine. The isomerisation takes place in the peptide part of the molecule.

W. SCHLIENTZ, R. BRUNNER,
F. THUDIUM and A. HOFMANN

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium SANDOZ, Basel,
2. Februar 1961.

¹ 49. Mitteilung über Mutterkornalkaloide. 48. Mitt. s. Helv. chim. Acta 42, 2696 (1959).