

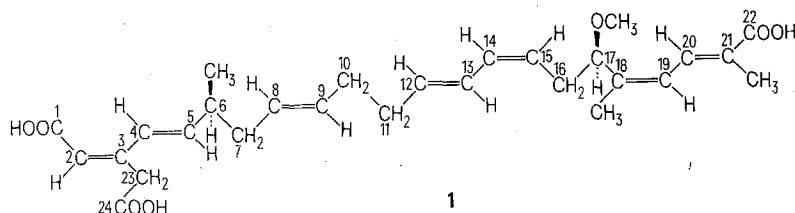
Configuration absolue de l'acide bongkrékique*

L'acide bongkrékique, antibiotique toxique produit par *Pseudomonas cocovenenans*, a la structure **1**¹. Toutefois les configurations absolues des deux centres asymétriques présents dans la molécule n'avaient pu être établies de manière certaine.

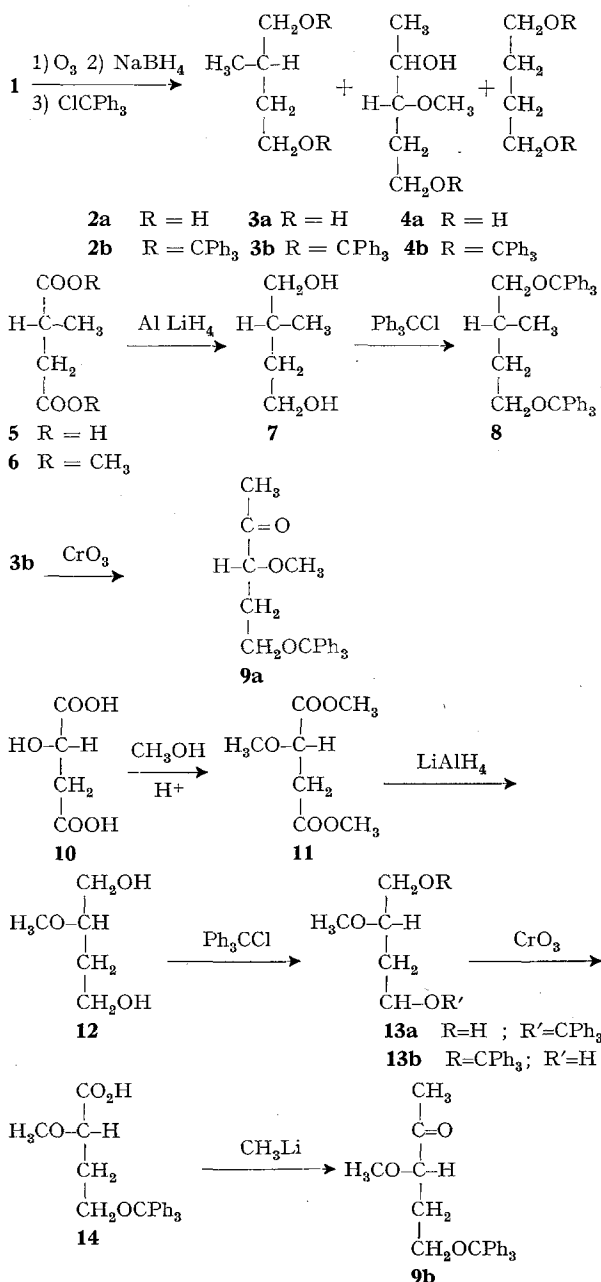
Pour déterminer la chiralité des centres C-6 et C-17 de la molécule, nous l'avons scindée par ozonisation réductive², isolé les fragments C-5 à C-8 et C-15 à C-18 conte-

nant ces deux centres asymétriques et synthétisé ces fragments à partir de précurseurs optiquement actifs de configuration connue.

L'action de l'ozone sur une solution méthanolique d'acide bongkrékique à 0° pendant 3 h conduit, après traitement par NaBH₄, à un mélange d'hydroxy-acides et de diols. La fraction neutre est composée du méthyl-2 butanediol-1,4 **2a**, du dihydroxy-1,4 méthoxy-3 pentane



1



3a, les deux fragments recherchés, ainsi que du butanediol-1,4 **4a** et de l'éthylèneglycol.

Le mélange est tritylé puis chromatographié sur colonne de gel de silice ce qui a permis d'isoler le composé monotritylé **3b** et le composé ditritylé **2b** optiquement actifs.

Composé 2b. Le composé **2b**, obtenu de la manière indiquée, n'est pas pur mais accompagné du dérivé ditritylé du butanediol **4b** (F. 182–184°). La faible quantité de produits récupérés n'a pas permis une séparation complète de ces deux composés qui ont des comportements très voisins en chromatographie. Les spectres de RMN et de masse du mélange ont permis d'établir que ce mélange cristallisé F 141–161° contient 60% du composé **2b**. Ce mélange a un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = +6,2^\circ$ (c = 0,77, CHCl₃) ce qui correspond pour le composé **2b** à un pouvoir rotatoire de $[\alpha]_D = +10,7^\circ$. Le spectre de RMN présente 4 groupes de pics à: $\delta = 0,82$ ppm (doublet, CH₃-CH), 1,60 ppm (multiplet, -CH-CH₂-), 2,95 ppm (multiplet, -CH₂-O-trityle) et 7,25 ppm (multiplets, H aromatiques).

Le trityle **2b** a été par ailleurs synthétisé à partir de l'acide R (+)-méthylsuccinique **5** $[\alpha]_D = +14,5^\circ$ (c = 3,25, éthanol) [lit.³, $[\alpha]_D = +13,11^\circ$ (c = 4,42, éthanol)].

Cet acide a été méthylé par le diazométhane en diester méthylique **6** qui a été réduit en méthyl-2 butanediol-1,4 **7**. La tritylation de ce diol conduit au dérivé ditritylé **8** F. 114–115°, $[\alpha]_D = -9,7^\circ$ (c = 4,07, CHCl₃) qui présente le même R_f en chromatographie sur couche mince et le même spectre de RMN que le composé **2b**.

Ces résultats indiquent une configuration S pour le composé **2b** et par conséquent pour le centre C-6 de l'acide bongkrékique.

Composé 3b. Le composé **3b** contient deux carbones asymétriques mais seul le centre C-3 est également présent dans l'acide bongkrékique. Afin de supprimer l'asymétrie du centre C-4 qui est créé lors de la réduction de l'ozonide par NaBH₄, le composé **3b** a été oxydé par le réactif de JONES⁴. On obtient le composé **9a** non cristallisé $[\alpha]_D = +24^\circ$ (c = 1,07, CHCl₃), qui présente un spectre de RMN en accord avec la structure proposée: $\delta = 1,86$ ppm (multi-

* Dédié au Professeur E. LEDERER en l'honneur de son 65^e anniversaire.

¹ J. DE BRUIJN, D. J. FROST, D. H. NUGTEREN, A. GAUDEMER, G. W. M. LIJBACH, H. C. COX et W. BERENDS, Tetrahedron, sous presse (1973).

² D. G. M. DIAPER et D. L. MITCHELL, Can. J. Chem. 38, 1976 (1960).

³ R. ROSSI, P. DIVERSI et G. INGROSSO, Gazz. chim. ital. 98, 1391 (1968).

plet, 2H: CH₂ en C-2), 2,13 ppm (singulet, 3H: CH₃-C=O), 3,25 ppm (triplet, 2H: -CH₂-O-trityle), 3,30 ppm (singulet, 3H: OCH₃), 3,83 ppm (quadruplet, 1H: >CH-OCH₃), 7,30 ppm (multiplet, 15H: H aromatiques).

Le composé **9** optiquement actif a été par ailleurs obtenu à partir de l'acide S (-)-malique au moyen de la séquence de réaction suivante. L'acide **10** a été transformé en *O*-méthyl malate de méthyle **11**⁵. La réduction de ce diester par LiAlH₄ dans l'éther anhydre fournit le méthoxy-2 butanediol-1,4 **12** [α]_D = -23,0° (c = 3,26, acétone) (lit.⁵, [α]_D = -23,5°). Le diol est traité par un 1,1 équivalent de chlorure de trityle dans la pyridine anhydre ce qui fournit un mélange des deux dérivés monotritylés **13a** et **13b** dans lequel le monotrityl **13a** est le produit prépondérant. Ces deux isomères ont été séparés par chromatographie sur gel de silice. Le composé **13a** non cristallisé [α]_D = +2,30° (c = 3,07, CHCl₃) a été oxydé par le réactif de JONES⁴ en acide **14** [α]_D = -15,6° (c = 4,23, CHCl₃) qui se présente sous forme d'une huile incolore.

En traitant l'acide **14** par 3 équivalents de méthyllithium dans l'éther anhydre⁶, on obtient un mélange de produits dont le composant prépondérant est la méthyl cétone **9b** [α]_D = -23,7° (c = 1,8, CHCl₃). Celle-ci présente le même R_f en chromatographie sur couche mince et le même spectre de RMN que le produit **9a** isolé à

partir de l'acide bongkrékique. Le carbone C-17 de l'acide bongkrékique a par conséquent la configuration R, ce qui confirme l'assignation faite précédemment à partir de la courbe de dichroïsme circulaire de l'acide bongkrékique^{1,7}.

Summary. The chiralities of the two asymmetric centers of the toxic antibiotic bongkreikic acid have been determined: the C-6 center has the S configuration and the C-17 center the R configuration.

J. ZYLBER, F. GAUDEMER et A. GAUDEMER

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., F-91190 Gif-sur-Yvette (France), 24 Novembre 1972.

⁴ K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES et B. C. L. WEEDON, J. chem. Soc. 1946, 39.

⁵ A. LARDON et T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 32, 2003 (1949).

⁶ C. H. DE PUY, G. M. DAPPEN, K. L. EILERS and R. A. KLEIN, J. org. Chem. 29, 2813 (1964).

⁷ Tous les composés préparés au cours de ce travail ont présenté des spectres de RMN (CDCl₃, 60 MHz), de masse en accord avec leur structure.

⁸ Nous remercions sincèrement M. le Professeur E. LEDERER pour l'intérêt témoigné à ce travail, Mme A. KORNPBST pour la mesure de spectres de RMN⁷.

Integumental Distribution of Tyrosinase Activity in the Slow Loris, *Nycticebus coucang*, and the Presence of Integumental Tyrosinase Inhibitor(s)

In the study of melanin biosynthesis from an evolutionary viewpoint, relatively little is known of the primate pattern of integumental tyrosinase distribution. As the availability of the primates for such studies has been limited, the gift of a lower primate, the slow loris (*Nycticebus coucang*), provided a unique opportunity to extend our understanding of tyrosinase distribution. Thus, a study of the subcellular distribution of tyrosinase activity in various integumental regions differing in pigmentation as well as the eye was undertaken. Further, in the course of these studies it was discovered that preparations derived from certain skin areas also showed the presence of integumental tyrosinase inhibitor(s).

Methods and materials. Two female (451 and 549 g) and 1 male (454 g) loris (*Nycticebus coucang*) were sacrificed and the retinas and integumental areas (Table I) were removed, trimmed, weighed and frozen as previously described¹. The usual enzyme preparation procedure, radiometric assay, protein analysis and statistical procedures were utilized¹⁻³. The activities of the enzyme preparations were dopa dependent and inhibited by sodium diethyldithiocarbamate (6 mM). The tyrosinase inhibitory activity was demonstrated by the incubation of mushroom tyrosinase with L-tyrosine-¹⁴C in the presence and absence of skin enzyme preparations. A duplicate series of experiments using non-radioactive L-tyrosine to determine substrate concentration pre- and post-incubation with mushroom tyrosinase was also undertaken. The available L-tyrosine in the supernatant fraction post-trichloroacetic acid precipitation of protein was determined by the Folin-Ciocalteu procedure⁴. Wherever possible data are expressed in the form $\bar{X} \pm \text{SEM}$.

Results and discussion. The tyrosinase activity varied anatomically in the skin (Table I). The highest enzymatic activities occurred in the genital skin areas and in the retina. The subcellular tyrosinase distribution differed in

the retina and in the skin; the retina showed tyrosinase activity in both the particulate and soluble fractions whereas the skin tyrosinase activity was confined to the particulate fraction.

In the skin, the tyrosinase activities of the dorsal brown stripe, the left and right lateral trunk skin areas and the left and right ventral trunk skin areas were low. However, the enzymic activity was higher in the dorsal dark brown stripe than in the lateral or ventral skin. Interestingly, the tyrosinase activity of the ventral skin was higher than that of the lateral skin. Generally, the darker skin areas, such as the cranial skin, ears, black circum-orbital ring and black area of male genital skin as well as the eye showed higher activity than the light brown colored skin area. In contrast, the light colored skin of the external female genitalia showed the highest tyrosinase activity and the relatively dark forehead skin area had very low activity.

In the homogenates, the specific activity of the enzyme was highest in the scalp, female external genitalia and the dorsum of the forepaw. In all integumental areas studied, the specific activity in the particulate fraction was higher than that in the homogenate. In some skin areas the particulate fraction tyrosinase activity exceeded that of the homogenate. The tyrosine carboxyl group incorporation into melanin was approximately 16% in the retina and ranged from 19 to 29% in the skin.

In the forepaw palm, interorbital streak and forehead, the enzymic activity of the particulate fraction was higher than that present in the homogenate from which

¹ Y. M. CHEN and W. CHAVIN, *Analyt. Biochem.* 13, 234 (1965).

² Y. M. CHEN and W. CHAVIN, *Analyt. Biochem.* 27, 463 (1969).

³ W. CHAVIN, *Am. Zool.* 9, 505 (1969).

⁴ Y. M. CHEN, unpublished.