

## SUR LA STRUCTURE D'UN NOUVEAU TYPE D'ACIDES MYCOLIQUES DE *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*\*

J. KREMBEL et A.-H. ETEMADI

Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette, S. & O.

(Received 28 September 1965)

**Résumé**—La structure Ia est proposée pour un nouveau type d'acides mycoliques isolé de *Mycobacterium smegmatis* le représentant dominant dans le mélange à la formule brute  $C_{48}H_{118}O_8$  et la structure VI.

**Abstract**—The structure Ia is proposed for a novel type of mycolic acids isolated from *Mycobacterium smegmatis*. The major constituent has the formula  $C_{48}H_{118}O_8$  and the structure VI.

LA PRÉSENCE, dans les cires de *Mycobacterium smegmatis*, d'un type d'acides mycoliques appelé acides  $\alpha'$ -mycoliques, a déjà été rapportée.<sup>1</sup> Ces acides ont 60 atomes de carbone environ et donnent par pyrolyse de l'acide tétracosanoïque. Ils constituent environ 25% des acides mycoliques de cette espèce bactérienne.<sup>2</sup>

Des acides mycoliques de ce type n'ont encore jamais été signalés dans les lipides des Mycobactéries; Asselineau<sup>3,4</sup> a bien mis en évidence un "acide hydroxylé en  $C_{60}$ ",  $C_{60}H_{120}O_3$ , en très faible proportion (0.01% du poids sec des bacilles), dans les lipides de deux souches humaines de *M. tuberculosis* (souches Brévannes et H<sub>37</sub> Rv Sr); cependant, la nature mycolique, très probable, de ces acides reste à déterminer.

L'existence d'acides mycoliques en  $C_{60}$  doit susciter de l'intérêt du point de vue de la biogénèse des acides mycoliques et de la phylogénie de certaines espèces d'Actinomycétales;<sup>2</sup> aussi nous a-t-il paru intéressant d'en étudier la structure et d'élucider leur biogénèse.

### *Isolement et purification*

Après saponification des bactéries, l'insaponifiable et les acides gras sont extraits par de l'éther puis traités par le méthanol à chaud selon Clermonté et Lederer.<sup>5</sup> On sépare ainsi les acides mycoliques bruts insolubles.

Le mélange de mycolates de méthyle, obtenu par action du diazométhane, est ensuite chromatographié sur colonne de gel de silice. On isole les fractions contenant

\* 82 ème communication sur les constituants des Mycobactéries; 81 ème comm., voir E. Walczak et A. H. Etemadi, *C.R. Acad. Sci., Paris* **261**, 2771 (1965).

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

<sup>1</sup> A. H. Etemadi, R. Okuda et E. Lederer, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 868 (1964).

<sup>2</sup> A. H. Etemadi, *Sur la structure et la biogénèse des acides mycoliques des Corynebactéries, Nocardia et Mycobactéries*, Thèse ès Sciences, Paris (1965).

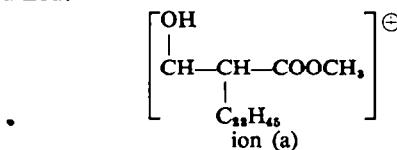
<sup>3</sup> J. Asselineau, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 108 (1954).

<sup>4</sup> J. Asselineau et J. Moron, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 899 (1958).

<sup>5</sup> R. Clermonté et E. Lederer, *C.R. Acad. Sci. Paris* **242**, 2600 (1956).

les  $\alpha'$ -smegmamycolates de méthyle. Ces derniers ont été purifiés par chromatographie préparative sur plaque, puis sur gel de silice imprégné de  $\text{NO}_3\text{Ag}$ . Nous avons constaté la présence d'une "impureté" (environ 10% du poids de l'échantillon). L'étude par spectrométrie de masse de l'impureté a montré qu'il s'agit principalement de deux homologues inférieurs d'esters méthyliques d'acides  $\alpha$ -mycoliques en  $\text{C}_{68}$  et  $\text{C}_{70}$  (diinsaturés), (pic à  $m/e = 382$  correspondant au tétracosanoate de méthyle, pics à  $m/e = 600$  et  $628$  dus au méromycolals, et enfin pics à  $m/e = 964$  et  $992$  attribués aux anhydro-mycolates). Notre étude concerne le produit principal.

*Propriétés des  $\alpha'$ -smegmamycolates de méthyle (I b):*  $F = 50-51^\circ$ ,  $[\alpha]_D = +2.8^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ;  $c = 11$ ). L'analyse élémentaire est en accord avec la formule  $\text{C}_{68}\text{H}_{124}\text{O}_3$ . Le spectre IR présente des bandes OH à  $3535 \text{ cm}^{-1}$ ,  $3580 \text{ cm}^{-1}$  et  $3620 \text{ cm}^{-1}$  et des bandes carbonyles à  $1724$ ,  $1744 \text{ cm}^{-1}$ , indiquant la présence d'une chélation dans la molécule. Le spectre de RMN présente un triplet à  $310-330 \text{ c/s}$  du à une insaturation. Le spectre de masse comporte les pics du tétracosanoate de méthyle (pic moléculaire à  $m/e = 382$ , pics à  $m/e = M-31$  et  $M-43$ , etc.) et ceux des aldéhydes méromycoliques (pics moléculaires à  $m/e = 546$ ,  $574$  et de faibles pics à  $m/e = 528$ ,  $556$  attribuables à  $M-18$  pour ces aldéhydes). La présence des pics du tétracosanoate et des méroaldéhydes s'explique soit par réarrangement de l'ion moléculaire, soit par la pyrolyse des  $\alpha'$ -mycolates de méthyle:<sup>6</sup> l'absence de pic à  $m/e = 411$  attribuable à l'ion (a) montre que la pyrolyse a eu lieu.



Tous ces résultats indiquent la nature  $\alpha$ -ramifiée  $\beta$ -hydroxylée (nature "mycolique") des produits de départ, ainsi que la présence d'une insaturation dans ces composés.

#### Préparation de dérivés

*Acétyl  $\alpha'$ -mycolates de méthyle.* L'analyse élémentaire des  $\alpha'$ -mycolates de méthyle est en faveur de la présence d'un seul hydroxyle dans la molécule; pour le vérifier, nous avons préparé les acétyl  $\alpha'$ -mycolates de méthyle (Ic).  $F = 38-39^\circ$ ,  $[\alpha]_D = +4.6^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ;  $c = 12$ ).

L'analyse élémentaire est en accord avec la formule  $\text{C}_{65}\text{H}_{126}\text{O}_4$ . Le spectre IR présente une bande d'absorption à  $1245 \text{ cm}^{-1}$ ; il n'y a plus de bande OH sur le spectre. Le spectre de RMN présente un singulet à  $121 \text{ c/s}$  attribuable aux protons du groupement acétyle. Son intensité est la même que celle du singulet à  $219 \text{ c/s}$  du aux protons du groupement méthyle ester, ce qui montre la nature monohydroxylée des acides mycoliques de départ.

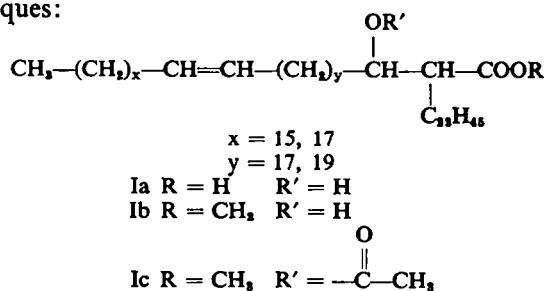
*$\alpha'$ -smegma-méromycolals.* Par pyrolyse des  $\alpha'$ -mycolates de méthyle, nous avons isolé d'une part le tétracosanoate de méthyle et d'autre part les méromycolals (II) que nous avons purifiés par chromatographie sur plaque. L'analyse élémentaire des aldéhydes ( $F = 35^\circ$ ) est en accord avec la formule  $\text{C}_{38}\text{H}_{74}\text{O}$ . Le spectre IR présente une bande d'absorption à  $1737 \text{ cm}^{-1}$  due au carbonyle et une bande à  $2730 \text{ cm}^{-1}$  due à la vibration C—H du groupement aldéhydique. Le spectre de RMN montre un triplet à  $584 \text{ c/s}$ : il n'y a donc pas de ramifications sur le carbone en  $\alpha$  de ces aldéhydes.

\* A. H. Etemadi, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1537 (1964).

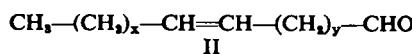
et par conséquent sur le carbone en  $\gamma$  des mycolates de méthyle de départ. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés à propos d'autres acides mycoliques.<sup>2</sup>

*$\alpha'$ -smegma-méromycolates de méthyle.* L'oxydation des aldéhydes méromycoliques (II) par  $\text{Ag}_2\text{O}$  alcalin<sup>7</sup> donne les acides méromycoliques (IIIa) dont nous avons purifié les esters méthyliques par chromatographie sur plaque. L'analyse de ces esters ( $F = 38-40^\circ$ ) est en accord avec la formule  $\text{C}_{33}\text{H}_{78}\text{O}_2$ . Le spectre IR présente une bande carbonyle à  $1746 \text{ cm}^{-1}$ . Le spectre de RMN montre le triplet à  $310-330 \text{ c/s}$  indiquant l'existence d'une insaturation et un singulelet à  $219 \text{ cps}$  dû aux protons du groupement méthyle de l'ester. Le spectre de masse montre des pics à  $m/e = 544$  et  $572$ . Ces pics sont ceux des fragments à  $m/e = M-32$  pour ces esters monoin-saturés. Cette interprétation est en accord avec les résultats obtenus sur les spectres de masse des  $\alpha'$ -méromycolols (on observe les pics moléculaires de ces aldéhydes), ainsi qu'avec les résultats de la spectrométrie de masse des méromycolates de méthyle hydrogénés.

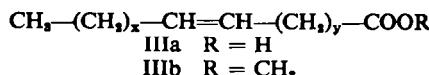
*Dihydro  $\alpha'$ -smegma-méromycolates de méthyle.* Le spectre de masse du produit hydrogéné,  $F = 65-70^\circ$ , montre des pics moléculaires à  $m/e = 578$  et  $606$ , ce qui confirme la présence d'une insaturation dans les méromycolates. Nous constatons également la présence sur ce spectre de pics à  $m/e = 535$  et  $563$  ( $M-43$ ) et d'autres à  $m/e = 547$  et  $575$  ( $M-31$ ) mais ces derniers sont nettement moins importants. Il existe aussi la série des pics attribués aux fragments- $(CH_2)_n-COOCH_3$ <sup>8,9</sup>; le plus important se trouve à  $m/e = 143$ . Ces résultats indiquent la nature linéaire de ces composés. La présence d'un pic important à  $m/e = 74$  confirme, par ailleurs, l'absence d'une ramifications en  $\alpha$ . On peut donc écrire la structure générale Ia pour les acides  $\alpha'$ -smegmamycoliques:



## pour les $\alpha'$ -smehma-méromycolals, la structure III



et pour les acides  $\alpha'$ -smegma-méromycoliques, la structure III



### Localisation de la double liaison

Afin de déterminer la place de la double liaison dans ces molécules, nous avons effectué des ozonolyses et des oxydations dont les résultats sont résumés dans le Tableau I.

<sup>7</sup> F. Asinger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 75, 656 (1942).

<sup>8</sup> R. Ryhage et E. Stenhagen, *Arkiv Kemi* 13, 523 (1959).

\* R. Ryhage et E. Stenhammar, *J. Lip. Research* 1, 523 (1960).

*Ozonolyse des  $\alpha'$ -smegma-méromycolates de méthyle.* Après ozonolyse et destruction oxydative des ozonides par  $H_2O_2$  à 35 vol., les produits ont été traités par le

TABLEAU 1

Esters soumis à l'ozonolyse	Fragments obtenus par ozonolyse oxydative		
	a	b	c
IIIb	$CH_3-(CH_2)_x-COOH$	$HOOC-(CH_2)_y-COOH$	
Ic	$CH_3-(CH_2)_x-COOH$	$  \begin{array}{c}  O \\     \\  O-C-CH_3 \\    \\  HOOC-(CH_2)_y-CH-CH-COOH \\    \\  C_{11}H_{24}  \end{array}  $	
Vb		$HOOC-(CH_2)_y-COOH$	$C_{11}H_{24}-COOH$

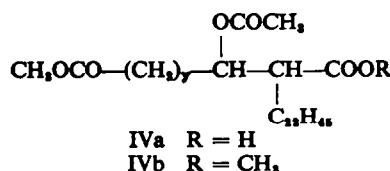
$CH_2N_2$  et séparés par chromatographie préparative sur plaque. On obtient principalement deux fractions: l'une correspond à des monoesters, l'autre à des diesters; chacune de ces fractions a été analysée par chromatographie en phase gazeuse.

Le chromatogramme des mono-esters a montré les pics d'esters de  $C_{15}$  à  $C_{21}$ , les deux pics les plus importants étant ceux de l'heptadécanoate de méthyle et du nonadécanoate de méthyle; le pic du nonadécanoate de méthyle est prédominant.

Le chromatogramme des diesters montre les pics d'esters d'acides dicarboxyliques de  $C_{15}$  à  $C_{23}$ , les deux pics prédominant étant ceux d'esters d'acides en  $C_{19}$  et  $C_{21}$ .

L'identification des mono- et des diesters a été effectuée par chromatographie avec les produits témoins et la vérification de la nature des produits de certains pics par spectrométrie de masse (notamment la structure du nonadécanoate de méthyle et celle du nonadécanedioate de méthyle, qui constituent les pics plus importants).

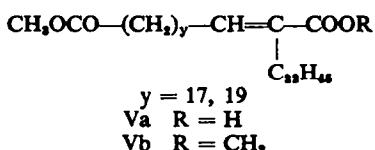
*Ozonolyse des acétyl- $\alpha'$ -smegmamycolates de méthyle.* Les mêmes expériences ont été reprise avec les acétyl- $\alpha'$ -mycolates de méthyle. Nous avons isolé, par chromatographie préparative sur plaque, une fraction composée de monoesters et une deuxième fraction contenant le produit IVb.



La nature des mono-esters est identique à celle des mono-esters obtenus par ozonolyse des méromycolates de méthyle; ici également les esters à nombre impair d'atomes de carbone sont dominants; le nonadécanoate de méthyle notamment est le monoester quantitativement le plus important. Le composé IVb,  $F = 45^\circ$ , a été étudié plus en détail. Son spectre de RMN montre deux singulets de même importance à 213 c/s et 215 c/s dus aux protons de deux groupements méthyles du diester. Le

singulet à 116 c/s est attribuable aux trois protons du groupement acétyle; ce singulet est de même importance que chacun des deux autres. Par ailleurs, on ne trouve pas de signal de proton oléfinique. Le composé que nous avons isolé semble donc avoir la structure IVb.

*Pyrolyse du Composé IVb.* Par cette réaction, il y a départ d'acide acétique; le résidu, le composé Vb, a été isolé:

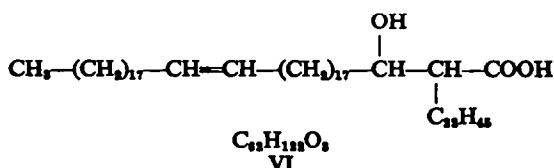


Sur le spectra IR de ce composé ( $F = 48^\circ$ ), une bande apparaît à  $1640 \text{ cm}^{-1}$ , attribuable à une double liaison conjuguée. Le spectre UV présente une bande d'absorption à  $218 \text{ m}\mu$ . ( $\epsilon_{218} = 12,500$ ; cyclohexane.) Le spectre de RMN montre des signaux à 219 et 221 c/s dus aux protons des deux groupements méthyle de diesters le singulet à 116 c/s (du au groupement acétyle) a disparu, mais un triplet à 395-409 c/s apparaît, attribué aux protons se trouvant sur le carbone en  $\beta$  du carboxyle.

*Ozonolyse du Composé Vb.* Cette ozonolyse a été effectuée dans les mêmes conditions que précédemment, les produits de la réaction sont traités par le diazométhane; on isole par chromatographie préparative sur plaque les mono- et les diesters et chacune de ces fractions est chromatographiée en phase vapeur. La fraction des monoesters consiste principalement en tricosanoate de méthyle (chromatographie avec le produit synthétique et spectrométrie de masse). Les diesters forment un mélange où dominent les esters des diacides en  $\text{C}_{15}$ ,  $\text{C}_{17}$ ,  $\text{C}_{19}$ ,  $\text{C}_{21}$ ,  $\text{C}_{23}$ . Les pics les plus importants sont ceux du nonadécanedioate de méthyle et du heneicosanedioate de méthyle.

## CONCLUSION

La structure Ia pour les acides  $\alpha'$ -smegmamycoliques découle de l'ensemble des résultats rapportés ici. Le représentant dominant dans ce mélange a la structure VI:



On constate que les acides  $\alpha'$ -smegmamycoliques représentent un nouveau type d'acides mycoliques: l'acide obtenu par leur pyrolyse est l'acide tétracosanoïque qui constitue l'acide de pyrolyse de certaines Mycobactéries, mais le squelette hydrocarboné des fragments méromycoliques est, à une ou deux doubles liaisons près, de type méronocardique tel que nous l'avons vu dans le cas des acides nocardiques de *Nocardia asteroides*.<sup>10</sup>

Dans une communication publiée ailleurs,<sup>11</sup> nous étudions la biogénèse de ces acides "hybrides" et nous discutons la signification de leur présence chez une Mycobactérie.

<sup>10</sup> C. Bordet, A. H. Etemadi, G. Michel et E. Lederer, *Bull. Soc. Chim., Fr.* 234 (1965).

<sup>11</sup> J. Krembel et A. H. Etemadi, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 196, sous presse.

## PARTIE EXPERIMENTALE

I Méthodes physiques et chromatographiques

(a) *Spectrométrie de masse.* Elle a été effectuée sur appareil Atlas CH<sub>4</sub> (potentiel d'ionisation; 70 V, température d'introduction 160° à 200°, température de la source d'ion 270°) ou sur un appareil MS 9 (potentiel d'ionisation 70 V, introduction directe, température de la source d'ions 180°).

(b) *Spectre de RMN.* L'appareil est un Varian A-60. Le tétraméthylsilane a été utilisé comme référence interne et le solvant est le CDCl<sub>3</sub>.

(c) *Les spectres IR.* Ont été effectués avec un appareil Unicam. Les solvants sont le CCl<sub>4</sub> ou le CS<sub>2</sub>.

(d) *Chromatographie en phase gazeuse.* Appareil F & M 500, température d'injection 250°, température de sortie 250°, programmation: 2-9°/mn de 160° à 200° ou 250; les phases stationnaires sont, soit du silicone DC 550 à 5%, soit le succinate de butane-diol à 15%, le support étant la célite et la longueur des colonnes de 3 m et 2.5 m.

(e) *Chromatographie sur couche mince.* Les chromatographies analytiques ont été effectuées de la manière habituelle. Les chromatographies sur gel de silice imprégné par le NO<sub>2</sub>Ag ont été réalisées selon<sup>12</sup> de la manière suivante. Pour une plaque de 10 × 20 cm, nous utilisons 10 g de gel de silice contenant 5% de NO<sub>2</sub>Ag. Ces plaques sont abandonnées 1 heure à la température ambiante à l'obscurité, puis juste avant l'utilisation, activées pendant 20 mn à 110°. Pour les chromatographies préparatives sur plaque de 25 × 35 cm, nous utilisons 50 g de gel de silice à 5% de NO<sub>2</sub>Ag.

II Isolement et purification

*Mycobacterium smegmatis* a été cultivé sur 8 l. de milieu de Sauton (40 boîtes de Roux) pendant une dizaine de jours. Les bactéries filtrées et encore humides ont été soumises au traitement par la potasse méthanolique à 5% pendant 4 heures. On extrait ensuite l'étherosoluble. Celui-ci séché sur SO<sub>3</sub>Na, anhydre, pèse 8 g. Pour séparer les acides mycoliques des acides banaux, le mélange est traité à plusieurs reprises par 80 ml de méthanol à l'ébullition.<sup>5</sup> L'insoluble (5 g) est ensuite traité par le diazométhane et chromatographié sur 100 g de gel de silice G. Les fractions recueillies sont de 200 ml.

Les α'-smegmamycolates de méthyle sont élués par le mélange éther de pétrole-benzène (55:45). Sur plaque, ils sont légèrement plus retenus que les α'-smegmamycolates de méthyle. Leur purification a été continuée par chromatographie sur plaque dans le solvant éther pétrole-éther (80:20), jusqu'à ce qu'ils ne donnent plus qu'une seule tache: F = 50-51°; [α]<sub>D</sub> = +2.8. Analyse C<sub>65</sub>H<sub>124</sub>O<sub>8</sub>:

Analyse C<sub>65</sub>H<sub>124</sub>O<sub>8</sub>

Calc. %:	C	81,46	H	13,36	O	5,17
Tr. :		81,37		13,37		5,50

III Préparations des dérivés

(1) *Acétyl-α'-smegmamycolates de méthyle.* 143 mg d'α'-smegmamycolates de méthyle ont été dissous dans 2 ml de pyridine. On ajoute le mélange contenant 1 ml de pyridine et 1 ml d'anhydride acétique et on abandonne une nuit à 37°. Après le traitement habituel, on obtient 141 mg d'acétyl-α'-smegmamycolates de méthyle. Les acétates ont été purifiés sur colonne de gel de silice. On obtient ainsi 125 mg de produit ne donnant qu'une seule tache par chromatographie sur plaque. F = 38-39°; [α]<sub>D</sub> = +4.6°. (Analyse C<sub>65</sub>H<sub>126</sub>O<sub>4</sub>: Calc: C, 80.41; H, 12.99; O, 6.59; Tr: C, 80.08; H, 13.02; O, 6.65%).

(2) *Méromycolats.* Pyrolyse. Dans une première expérience, nous avons pyrolyisé 110 mg d'α'-smegmamycolates de méthyle jusqu'à 300° sous 0.01 mm de Hg. Le tétracosanoate et les aldéhydes méromycoliques distillent ensemble dans ces conditions. Dans une deuxième expérience, nous avons pyrolyisé 170 mg des α'-smegmamycolates de méthyle jusqu'à 300° sous le vide de la trompe à eau. On arrive ainsi à séparer le tétracosanoate de méthyle des aldéhydes. On obtient 64 mg de tétracosanoate pour 98 mg d'aldéhydes qui ont été purifiés sur plaque. F = 35°. (Analyse C<sub>38</sub>H<sub>74</sub>O: Calc: C, 83.51; H, 13.55; O, 2.93; Tr: C, 83.59; H, 13.27; O, 3.08%).

(3) *Méromycolates de méthyle.* Oxydation selon Asinger.<sup>7</sup> 100 mg d'aldéhydes sont traités par 200 mg de NO<sub>2</sub>Ag et 12.5 ml de NaOH à 10% pendant 3 heures à 80°. On isole ensuite 102 mg

<sup>12</sup> L. J. Morris, *New biochemical separations* (Edited by A. T. James et L. J. Morris), p. 300. D. Van Nostrand, London (1964).

d'étherosoluble qui sont traités par le diazométhane puis purifiés par chromatographie sur plaque. On obtient ainsi 81 mg d' $\alpha'$ -méromycolates de méthyle ne donnant qu'une seule tache par chromatographie sur plaque.  $F = 38\text{--}40^\circ$ . (Analyse  $C_{29}H_{78}O_4$ . Calc: C, 81.26; H, 13.19; O, 5.43; Tr: C, 81.52; H, 13.38; O, 5.00%).

(4) *Dihydro-méromycolates de méthyle.* L'hydrogénéation a été effectuée sur 5 mg d' $\alpha'$ -méromycolates de méthyle en présence de 10 mg de  $PtO_2$  dans l'acétate d'éthyle, à la température ambiante. Le produit obtenu, après purification sur plaque, a un point de fusion de 65–70°.

#### IV *Localisation des doubles liaisons*

100 à 200 mg de substance sont dissous dans 3 ml de tétrachlorure de carbone. Dans la solution, maintenue à  $-18^\circ$ , on fait passer pendant 15 mn de l'oxygène contenant 8% d'ozone (débit: 0.2 L/mn). Après évaporation de la majeure partie du solvant, on reprend les ozonides par de l'éther. Cette solution est ensuite introduite par petites portions dans un ballon contenant 10 ml d' $H_2O_2$  (à 35 vol.) sous forte agitation. Lorsque tout l'éther est évaporé, on chauffe sous reflux pendant 3 heures. On extrait ensuite les acides qu'on estérifie par le diazométhane.

L'ozonolyse oxydative de 50 mg d'acétyl- $\alpha'$ -mycolates de méthyle donne, après séparation par chromatographie sur couche mince, principalement deux fractions: la première (20 mg) de  $R_f$  assez élevé a été identifiée comme étant un mélange de monoesters, la deuxième (25 mg), plus retenue, correspond au produit IVb.

Nous remercions vivement Monsieur E. Lederer de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail. Nous remercions également le Dr. B. Das et Monsieur P. Varenne de la diligence et du soin apportés à l'exécution des spectres de masse, ainsi que Monsieur A. Gaudemer et Madame L. Alais pour les spectres bc R.M.N.