

Note

Étude du cord-factor et de ses analogues.

Partie III*. Synthèse du cord-factor (6,6'-di-*O*-mycoloyl- α,α -tréhalose) et du 6,6'-di-*O*-palmitoyl- α,α -tréhalose

RAOUL TOUBIANA[†], BHUPESH C. DAS, JACQUES DEFAYE[§], BERNARD MOMPON
ET MARIE-JOSÈPHE TOUBIANA

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

(Reçu le 24 avril 1975; accepté après modification le 1^{er} août 1975)

Le cord-factor [6,6'-di-*O*-mycoloyl- α,α -tréhalose, (6-*O*-mycoloyl- α -D-glucopyranosyl)-6-*O*-mycoloyl- α -D-glucopyranoside, **1**] est un glycolipide bactérien ayant des propriétés immunostimulantes²; par ailleurs, l'importance biologique — qualitativement analogue — de divers 6,6'-diesters du α,α -tréhalose a pu être démontrée³. Divers modes de préparation de ces composés ont été étudiés au laboratoire^{1,4} afin de disposer de cord-factor et d'analogues variés en quantité satisfaisante pour en développer l'étude biologique.

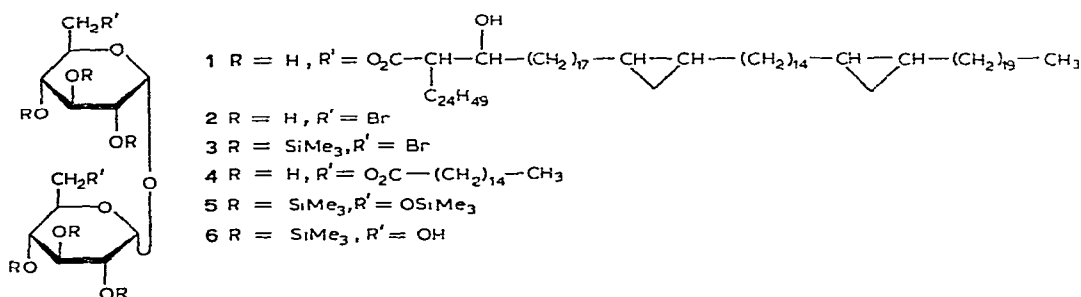
Dans la synthèse du cord-factor (**1**), le principe⁴ de l'estérification d'oses utilisant une réaction de type SN_2 a été gardé, mais quelques améliorations ont été apportées. Le *N,N*-diméthylformamide est avantageusement remplacé par l'hexaméthylphosphotriamide^{5,6}: à partir des mêmes réactifs [sel d'acide mycolique (**7**) et (6,6'-di-*O*-*p*-tolylsulfonyl- α,α -tréhalose)], le rendement en cord-factor est de 10%; d'autre part un 6,6'-dibromo-6,6'-didésoxy- α,α -tréhalose⁷ (**2**) (62 % de rendement) est utilisé, évitant la préparation laborieuse⁸ du 6,6'-di-*O*-*p*-tolylsulfonyl- α,α -tréhalose dont le rendement n'est que de 15%. Mais surtout, les groupements alcooliques secondaires de **2** ont été protégés avant la réaction d'estérification par des groupements triméthylsilyles. Après hydrolyse des groupements triméthylsilyles⁹ de **3**, extraction à l'éther et purification⁴, le cord-factor (**1**) est obtenu avec un rendement de 33%. Les constantes physiques et le spectre infrarouge sont identiques à ceux d'un échantillon authentique¹⁰; le haut poids moléculaire du composé peracétylé ne nous a pas permis d'obtenir en spectrométrie de masse l'ion oxonium attendu; on observe néanmoins des séries de pics correspondant aux fragmentations déjà décrites¹¹. L'amélioration du rendement peut être attribué à la protection des groupements alcooliques secondaires du disaccharide prévenant la formation du 3,6:3',6'-dianhydro- α,α -

*Pour la partie II, voir Réf. 1.

[†]Auteur à qui toute correspondance doit être adressée.

Adresse actuelle : CERMAV, C.N.R.S., Domaine Universitaire, 38 Saint Martin d'Hères (France).

tréhalose^{1,2}; ce mode d'utilisation du groupement triméthylsilyle n'est pas fréquent et semble très approprié à ce type de synthèse; nous l'avons aussi appliqué à une préparation nouvelle du 6,6'-di-*O*-palmitoyl- α,α -tréhalose (4).



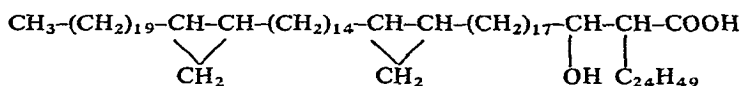
L'intérêt biologique propre du 6,6'-di-*O*-palmitoyl- α,α -tréhalose [(6-*O*-palmitoyl- α -D-glucopyranosyl)-6-*O*-palmitoyl- α -D-glucopyranoside, 4] a été précédemment rapporté³. La synthèse en était réalisée par transestérification avec de faibles rendements et des séparations laborieuses, vu la formation de divers diesters isomères de position¹.

La méthode développée dans le cas des acides mycoliques est d'application difficile pour des acides à faible longueur de chaîne: plus la chaîne carbonée diminue, plus l'insolubilité du sel augmente^{1,3}. Le principe de la méthode proposée ici repose sur l'hydrolyse sélective des groupes triméthylsilyles situés en position 6 et 6' du tréhalose pertriméthylsilylé⁹ (5). L'action du carbonate de potassium sur 5 conduit avec un rendement de 90 % au 2,2',3,3',4,4'-hexa-*O*-triméthylsilyl- α,α -tréhalose (6). La réaction sur 6 du chlorure de l'acide palmitique livre, après hydrolyse des groupements triméthylsilyles par le méthanol aqueux, le 6,6'-di-*O*-palmitoyl- α,α -tréhalose (4) avec 60 % de rendement. Dans ce cas la protection des groupements hydroxyles secondaires du tréhalose permet la parfaite sélectivité de l'estérification par le chlorure de l'acide; cette méthode est plus simple et plus rapide que celle mise en œuvre dans le cas d'acides β -hydroxylés (acides mycoliques).

L'intérêt des éthers triméthylsilyles comme groupements protecteurs dans certaines synthèses est ainsi démontré. Ce travail présente aussi une voie d'accès aisée à des composés bien définis [cord factor (1) et 6,6'-diesters de tréhalose] et, plus généralement, à des esters primaires d'oses.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Méthodes générales. — Tous les points de fusion de ce travail pris avec l'appareil de Kofler sont corrigés. Les spectres i.r. ont été mesurés soit à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer modèle 257 soit avec un appareil Unicam. Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés à l'aide d'un polarimètre électronique Roussel-Jouan. Les spectres de masse ont été mesurés sur un spectrographe MS 9. Les analyses ont été effectuées dans le laboratoire de microanalyse du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette.



7

Acide mycolique (souche Brévante) (7). Extraction et purification. — Il est obtenu par saponification des cires C du bacille tuberculeux. (Pour la nomenclature des cires du bacille tuberculeux et pour le protocole de saponification, voir Réf. 14). Une série de trois chromatographies est nécessaire pour obtenir un acide homogène sur couche mince. L'analyse en spectrométrie de masse montre que c'est un mélange d'homologues, dont l'homologue prépondérant possède la formule¹⁵ 7 ($\text{C}_{84}\text{H}_{164}\text{O}_3$), p.f. 55–57°; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 2,8^\circ$ (c 1, chloroforme). À une solution d'acide mycolique (150 mg) dans le chloroforme (2 ml) sont ajoutés une goutte de phénolphthaléine et 1,35 ml d'une solution méthanolique d'hydroxyde de sodium 0,85M (virage de la phénolphthaléine). Après une nuit au froid, le précipité formé est essoré, soit 80 mg de mycolate de sodium.

6,6'-Dibromo-6,6'-didésoxy-2,2',3,3',4,4'-hexa-O-triméthylsilyl- α,α -tréhalose [(6-bromo-6-désoxy-2,3,4-tri-O-triméthylsilyl- α -D-glucopyranosyl)-6-bromo-6-désoxy-2,3,4-tri-O-triméthylsilyl- α -D-glucopyranoside] (3). — Le 6,6'-dibromo-6,6'-didésoxy- α,α -tréhalose (préparé selon Hanessian *et al.*⁷, 80 mg) est dissous dans 5 ml d'une solution de Tri-Sil Z (*N*-triméthylsilylimidazole-pyridine Pierce, Chemical Co., Rockford, Ill. 61105, U.S.A.) et maintenu pendant une nuit à température ambiante. Après addition de glace, le produit est extrait à l'hexane; 110 mg de substance sont ainsi obtenus, p.f. 140–142°; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 95^\circ$ (c 1, chloroforme); s.m.: 998 (M^+), 441 (ion oxonium¹¹).

Anal.Calc. pour $\text{C}_{30}\text{H}_{66}\text{Br}_2\text{O}_9\text{Si}_6$: C, 40,07; H, 7,40; Br, 17,77. Trouvé: C, 39,90; H, 7,35; Br, 17,50.

6,6'-Di-O-mycoloyl- α,α -tréhalose [(6-O-mycoloyl- α -D-glucopyranosyl)-6-O-mycoloyl- α -D-glucopyranoside, *cord-factor*] (1). — Une solution de mycolate de sodium (80 mg) dans l'hexaméthylphosphotriamide (1 ml) distillé sur hydrure de lithium et d'aluminium est portée à 70° dans un bain d'huile. À cette solution, devenue rapidement limpide, on ajoute goutte à goutte le composé 3 (30 mg) en solution dans l'hexaméthylphosphotriamide⁷ (0,5 ml), puis le chauffage est poursuivi pendant 3 h. L'extraction est faite à l'éther après addition de glace; l'extrait étheré est ensuite détriméthylsilylé [2 h à reflux en présence de méthanol (10 ml), de benzène (10 ml) et d'eau (0,5 ml)], et le solvant est éliminé sous vide. Le résidu est chromatographié en solution dans l'hexane sur une colonne de gel de silice Davison (100–200 mesh, Touzart et Matignon). La première fraction éluée à l'hexane, soit 70 mg, est purifiée à nouveau par chromatographie sur 3 g de gel de silice Merck (0,063 mm). Le produit est élué au chloroforme additionné de 0,6% de méthanol. On obtient 35 mg d'un produit amorphe (rdt. 33%), homogène sur couche mince et de même R_F que le cord-factor naturel. Après dissolution dans l'éther, et addition de méthanol, un précipité est formé, qui est centrifugé, puis décanté de son eau-mère. Après séchage au dessiccateur,

le cord-factor se présente sous forme d'une poudre blanche, p.f. 40°; $[\alpha]_D^{20} + 28^\circ$ (c 1, chloroforme).

Anal. Calc. pour $C_{180}H_{346}O_{15}$ ($\pm 10 CH_2$): C, 78,59; H, 12,68. Trouvé: C, 78,05; H, 12,50.

2,3,4,6,2',3',4',6'-Octa-O-triméthylsilyl- α,α -tréhalose [(2,3,4,6-tétra-O-triméthylsilyl- α -D-glucopyranosyl)-2,3,4,6-tétra-O-triméthylsilyl- α -D-glucopyranoside] (5). — À 1 g de tréhalose dihydrate commercial (Fluka, CH-9470 Buchs, Suisse) en solution dans 100 ml de pyridine fraîchement distillée, sont ajoutés 20 ml de chlorure de triméthylsilyle (Pierce) et 40 ml d'hexaméthylidisilazane (Pierce). Après une nuit à température ambiante, le solvant est éliminé sous vide, et après extraction 2,1 g de substance, qui cristallise spontanément, sont obtenus, p.f. 80–82° (recristallisation dans le méthanol); $[\alpha]_D^{20} + 95^\circ$ (c 1, chloroforme); s.m.: 918 (M^+), 451 (ion oxonium¹¹).

Anal. Calc. pour $C_{36}H_{86}O_{11}Si_8$: C, 47,01; H, 9,43. Trouvé: C, 46,91; H, 9,29.

2,3,4,2',3',4',4'-Hexa-O-(triméthylsilyl)- α,α -tréhalose [(2,3,4-tri-O-triméthylsilyl- α -D-glucopyranosyl)-2,3,4-tri-O-triméthylsilyl- α -D-glucopyranoside] (6). — À 660 mg du composé précédent 5, en solution dans 22 ml de méthanol, sont ajoutés 22 ml d'une solution méthanolique de carbonate de potassium (4,5 g/litre). Le mélange réactionnel est maintenu pendant 2 h à 0° (mélange glace-sel), puis neutralisé par 2 ml d'acide acétique. Le méthanol est éliminé sous vide (trompe à eau), de la glace est ajoutée et le produit extrait 2 fois à l'héxane; après séchage sur sulfate de magnésium, le solvant est évaporé et 550 mg de substance, qui cristallise spontanément, sont obtenus. La chromatographie du produit ainsi obtenu est accomplie sur gel de silice (Merck 0,063 mm) préalablement lavé à l'eau distillée, afin d'éliminer toute trace d'acide commercial résiduel, et ensuite réactivé pendant 1 h à 120°. Compte tenu des risques d'hydrolyse pouvant survenir par un contact prolongé avec l'adsorbant, la chromatographie est effectuée dans la journée sur une colonne de gel de silice traité, à raison de 300 mg de produit pour 6 g de gel de silice (20 fois le poids de produit à chromatographier). On obtient 253 mg de produit (rdt. 90 %), p.f. 115–118° (cristallisation dans le méthanol); $[\alpha]_D^{20} + 100^\circ$ (c 1, chloroforme); s.m.: 774 (M^+), 379 (ion oxonium).

Anal. Calc. pour $C_{30}H_{70}O_{11}Si_6$: C, 46,47; H, 9,10. Trouvé: C, 46,52; H, 9,03.

6,6'-Di-O-palmitoyl- α,α -tréhalose [(6-O-palmitoyl- α -D-glucopyranosyl)-6-O-palmitoyl- α -D-glucopyranoside] (4). — La réaction du chlorure de palmitoyle sur le composé précédent conduit au 6,6'-di-O-palmitoyl-2,2',3,3',4,4'-hexa-O-triméthylsilyl- α,α -tréhalose qui n'est pas caractérisé, l'hydrolyse des groupements triméthylsilyles résiduels étant effectuée immédiatement après. À 270 mg du composé précédent, en solution dans 5 ml de benzène et 0,5 ml de pyridine, sont ajoutés 216 mg de chlorure de palmitoyle commercial (Fluka) en solution dans 2 ml de benzène anhydre. La solution est ensuite chauffée à 80° pendant 2,5 h. Après élimination du solvant sous vide, la solution du produit, dans 3,3 ml de méthanol-eau (1:10), est portée à ébullition pendant 2 h. Le méthanol aqueux est éliminé sous vide et le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice Davison (100–200 mesh, Touzart et

Matignon); 170 mg de produit sont obtenus (rdt. 60 %), p.f. 154–158°; $[\alpha]_D^{20} + 80^\circ$ (c 1, chloroforme); s.m.: 1070 (M^+), 527 (ion oxonium)*.

Anal. Calc. pour $C_{56}H_{94}O_{19}$: C, 62,76; H, 8,85. Trouvé: C, 62,87; H, 8,87.

REMERCIEMENT

Nous remercions M. E. Lederer de l'intérêt porté à ce travail.

RÉFÉRENCES

- 1 R. TOUBIANA ET M. J. TOUBIANA, *Biochimie*, 55 (1973) 575–578.
- 2 E. LEDERER, *Pure Appl. Chem.*, 25 (1971) 135–165; A. BEKIERKUNST, L. WANG, R. TOUBIANA ET E. LEDERER, *Infect. Immun.*, 10 (1974) 1044–1050; T. J. MEYER, E. RIBI, I. AZUMA ET B. ZBAR, *J. Natl. Cancer Inst.*, 52 (1974) 103–111.
- 3 E. YARKONI, A. BEKIERKUNST, J. ASSELINEAU, R. TOUBIANA, M. J. TOUBIANA ET E. LEDERER, *J. Natl. Cancer Inst.*, 51 (1973) 717–720; R. TOUBIANA ET M. KATO, résultats non publiés.
- 4 J. POLONSKY, G. FERRÉOL, R. TOUBIANA ET E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1956) 1471–1478.
- 5 H. NORMANT, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2 (1968) 791–826.
- 6 J. E. SHAW, D. C. KUNNERTH ET J. J. SHERRY, *Tetrahedron Lett.*, (1973) 689–692.
- 7 S. HANESSIAN, M. M. PONPIPOM ET P. LAVALLEE, *Carbohydr. Res.*, 24 (1972) 45–56.
- 8 R. TOUBIANA, M. J. TOUBIANA, B. C. DAS ET A. C. RICHARDSON, *Biochimie*, 55 (1973) 569–573.
- 9 D. T. HURST ET A. G. MCINNES, *Can. J. Chem.*, 43 (1965) 2004–2011.
- 10 J. ASSELINEAU, *Les Lipides Bactériens*, Hermann, Paris, 1962, p. 175.
- 11 A. ADAM, M. SENN, E. VILKAS ET E. LEDERER, *Eur. J. Biochem.*, 2 (1967) 460–468.
- 12 E. R. GUILLoux, F. PERCHERON ET J. DEFAYE, *Carbohydr. Res.*, 10 (1969) 267–278; G. BIRCH, C. K. LEE ET A. C. RICHARDSON, *Carbohydr. Res.*, 16 (1971) 235–238.
- 13 R. TOUBIANA ET M. J. TOUBIANA, résultats non publiés.
- 14 A. H. ETÉMADI, Thèse de Doctorat d'État, n° 5358, Paris, 1965.
- 15 R. TOUBIANA, résultats non publiés.

*Un point de fusion plus bas a été rapporté pour 4 obtenu par transestérification¹. Le premier était pris sur bloc Maquenne, ce dernier sur un appareil de Kofler; une contamination du premier produit par des isomères de position n'est pas non plus à exclure.