

Note

Sur une nouvelle voie de synthèse du cord-factor, glycolipide toxique de *Mycobacterium tuberculosis* (Esters du tréhalose et d'acides gras α -ramifiés, β -hydroxylés)

JEAN-FRANÇOIS TOCANNE

Centre de Recherche de Biochimie et de Génétique Cellulaires, 118, Route de Narbonne,
31077 Toulouse (France)

(Reçu le 4 février 1975; accepté le 19 juin 1975)

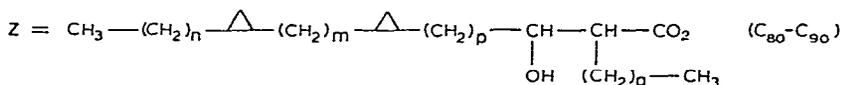
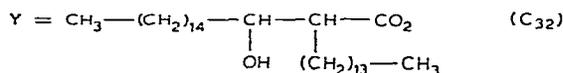
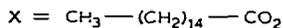
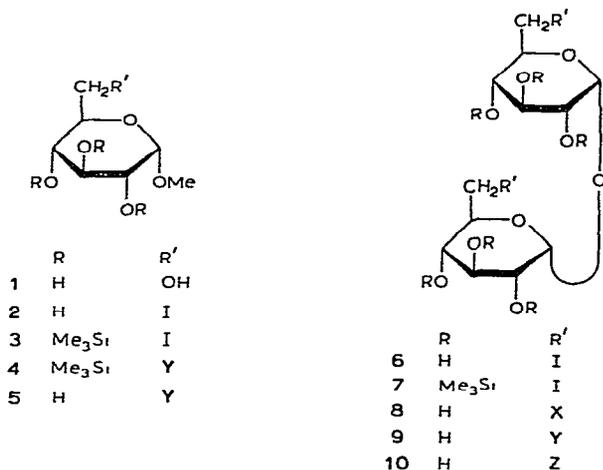
Le cord-factor, ou 6,6'-di-*O*-mycoloyl- α,α -tréhalose [(6-*O*-mycoloyl- α -D-glucopyranosyl)-6-*O*-mycoloyl- α -D-glucopyranoside, **10**] est un glycolipide toxique extrait des parois de souches variées de *Mycobacterium tuberculosis*¹. Des expériences d'incubation réalisées *in vivo* et *in vitro* ont montré que cette toxine bactérienne affectait les membranes mitochondriales des cellules infectées en provoquant une disparition progressive de la structure de la membrane interne, accompagnée d'une perte du contrôle respiratoire et d'une inhibition de la respiration². Des expériences plus récentes font penser que le cord-factor est en partie responsable de la propagation de la tuberculose dans l'hôte. Un sérum anti-cord-factor a pu être préparé, qui retarde momentanément mais efficacement la progression de la maladie chez des animaux infectés³. Comme les mycobactéries, le cord-factor provoque la formation de granulomes dans les tissus infectés⁴. Enfin, on a fait état récemment de l'inhibition de la croissance de cellules cancéreuses (cellules d'ascites d'Ehrlich) par ce glycolipide⁵. Si l'intérêt biologique de ce composé n'est plus à démontrer, peu de choses sont connues encore sur son mode d'action au niveau des membranes mitochondriales et sur les relations entre structure, conformation et toxicité. L'étude de telles relations, actuellement en cours au laboratoire, exige la possession de substances modèles accessibles seulement par synthèse chimique. Les méthodes de synthèse du cord-factor décrites jusqu'ici sont peu satisfaisantes⁶⁻¹⁰. Nous proposons dans cet article une méthode d'intérêt général dans la synthèse d'esters de sucres, qui permet d'obtenir le cord-factor et ses analogues rapidement et avec de bons rendements.

L'une des premières voies de synthèse proposées consistait à condenser le 6,6'-di-*O*-tosyl- α,α -tréhalose [(6-*O*-*p*-tolylsulfonyl- α -D-glucopyranosyl)-6-*O*-*p*-tolylsulfonyl- α -D-glucopyranoside], sous forme peracétylée, avec le sel de potassium d'un acide mycolique⁶. En fait, la tosylation en 6,6' du tréhalose n'est pas sélective¹¹. Les groupes hydroxyles secondaires en 2 et 2' ont une réactivité non négligeable et les

rendements en produit 6,6'-ditosylé sont faibles. Si la condensation entre le sel d'acide et le di-*p*-toluènesulfonate est décrite avec de bons rendements (environ 80%), en revanche la saponification des groupements acétyles protecteurs s'accompagne toujours d'une perte partielle de l'acide mycolique. La condensation du di-*p*-toluènesulfonate, sans protection des groupes hydroxyles secondaires, a été proposée^{7,8}, mais dans ce cas la réaction procède avec de plus faibles rendements (environ 45%). Des méthodes d'alcoylation directe par les chlorures d'acides⁹ ou par transestérification¹⁰ ont été décrites. Dans ces cas encore les rendements indiqués sont faibles (10–20%). De plus ces procédés ne sont pas spécifiques des groupes hydroxyles primaires des sucres et leur application aux acides mycoliques exige la protection du groupement hydroxyle des acides eux-mêmes.

Durant ces dernières années, divers procédés d'iodation sélective en 6,6' du tréhalose ou en 6 de sucres pyranosyles ont été proposés^{12,13}, permettant une approche de la synthèse du cord-factor et de ses analogues à l'aide d'une méthode d'estérification particulièrement efficace, récemment décrite. Celle-ci repose sur la condensation d'iodures d'alkyle avec des sels de potassium d'acides carboxyliques dans l'hexaméthylphosphoramide comme solvant^{14–16}. Pour la préparation du méthyl-6-désoxy-6-iodo- α -D-glucopyranoside (**2**) et du 6,6'-didésoxy-6,6'-diiodo- α,α -tréhalose [(6-désoxy-6-iodo- α -D-glucopyranosyl)-6-désoxy-6-iodo- α -D-glucopyranoside, **6**] qui nous intéressent, le procédé qui utilise le réactif triphénylphosphine-*N*-iodosuccinimide¹² et qui fournit ces dérivés directement et avec un bon rendement a été préféré. Si les sels de potassium des acides mycoliques peuvent être préparés et manipulés sans difficulté, l'utilisation des dérivés iodés en 6(6') des sucres exige en revanche la protection des groupes hydroxyles secondaires afin d'éviter toute réaction secondaire d'élimination ou de pontage interne entre le carbone iodé et les groupes hydroxyles voisins¹⁷. De tous les dérivés essayés, seuls les dérivés *O*-triméthylsilylés ont donné de bons résultats. Les réactions de silylation et de désilylation sont quantitatives. Les dérivés de synthèse iodés, bruts, peuvent être triméthylsilylés et purifiés aisément sous cette forme pourvu que des conditions anhydres soient respectées.

La méthode a été testée en condensant les dérivés iodés **3** et **7** du méthyl- α -D-glucopyranoside et de l' α,α -tréhalose avec l'acide palmitique **X**, un acide mycolique de synthèse **Y** (acide C₃₂-synthétomycolique)¹⁸ et un mélange d'acides mycoliques d'origine naturelle (**Z**) en C₈₀–C₉₀ (souches humaines P.N., D.T., de bacille tuberculeux)¹⁹. Les conditions expérimentales et les résultats sont consignés dans le Tableau I. La faible réactivité des acides gras utilisés, attribuable à la longueur des chaînes aliphatiques, impose une élévation de la température de la réaction, que nous avons fixée à 80°, en conciliant les impératifs de stabilité des réactifs, de rendement et de durée de la réaction. Cependant la température utilisée n'est pas indifférente car il est connu qu'à l'ébullition, vers 230–240°, l'hexaméthylphosphoramide catalyse la déshydratation des alcools²⁰. À 80°, la déshydratation, si elle se produit, est négligeable et les acides hydroxylés du type mycolique peuvent être utilisés sans protection de leur fonction hydroxyle. En effet, un échantillon d'ester méthylique de l'acide C₃₂-synthétomycolique, maintenu pendant 40 h à 80° dans l'hexaméthyl-



phosphoramidate, n'a subi aucune dégradation. De même, des échantillons des différents esters mycoliques de sucres préparés restituent, après saponification, les acides de départ. Après condensation, l'élimination des groupements triméthylsilyles est effectuée à chaud dans le mélange de solvants chloroforme-méthanol-eau 4:2:1 (v/v) additionné de 10% d'acide acétique, système assurant une bonne dissolution des réactifs et un temps court de réaction (~2 h). La méthode fournit quantitativement le méthyl-6-(C₃₂-synthétomycoloyl)- α -D-glucopyranoside (5). Des rendements de 65% et 55% sont respectivement obtenus pour les diesters C₃₂-synthétomycolique (9) et mycolique (10) de l' α,α -tréhalose. Dans ces deux derniers cas la présence du monoester est détectable dans le mélange réactionnel. Le 6,6'-dipalmitoyl- α,α -tréhalose [(6-O-palmitoyl- α -D-glucopyranosyl)-6-O-palmitoyl- α -D-glucopyranoside, 8] est préparé avec un rendement de 55%. Bien que l'acide palmitique ait un poids moléculaire moins élevé que les acides mycoliques employés, la réaction est plus difficile dans ce cas en raison de la mauvaise solubilité du sel de potassium dans l'hexaméthylphosphoramidate, en contraste avec la parfaite solubilité des sels des acides mycoliques. La moindre solubilité des sels d'acides gras normaux comparée à celle des sels des acides ramifiés a déjà été observée par ailleurs¹⁵.

La structure de ces composés découle de la spécificité de la méthode de synthèse proposée. Une modification partielle de structure, par migration de la fonction ester au cours de la désilylation, est théoriquement possible. En fait, dans les conditions douces employées — temps de réaction court, acide faible dilué en milieu aqueux — une telle éventualité peut être pratiquement écartée, la fonction hydroxyle primaire étant nettement privilégiée^{21,22}. Dans les limites de sensibilité des techniques d'analyse utilisées (chromatographie sur couche mince de gel de silice, i.r., r.m.n.) ces différents glycolipides sont homogènes et correspondent à la structure attendue.

Il faut remarquer que l'acide C₃₂-synthétomycolique employé est un mélange des acides racémiques diastéréoisomères *thréo* et *érythro* en proportions sensiblement égales. Que ce soit avec les dérivés du méthyl-D-glucoside ou du tréhalose, la réaction de condensation n'est apparemment pas stéréosélective. Le rapport *thréo* à *érythro* 1:1 n'est pratiquement pas modifié, ni pour les acides récupérés après la condensation, ni pour les acides obtenus par saponification des glycolipides. Le problème de la relation entre la stéréochimie des acides mycoliques, la structure et la toxicité du cord-factor est d'importance, mais ne peut être résolue à ce niveau d'investigation.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Méthodes générales. — Les spectres i.r. ont été effectués à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer modèle 177. Les spectres de r.m.n. ont été réalisés à 60 MHz sur un appareil Perkin-Elmer R 24A, avec le tétraméthylsilyle en référence interne ou externe. Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés au moyen d'un spectropolarimètre Perkin-Elmer modèle 141. Les points de fusion, mesurés sur banc de Kofler, ne sont pas corrigés. Le *N,N*-diméthylformamide a été préparé par distillation avec du benzène²³. L'hexaméthylphosphoramide a été desséché pendant 20 h sur aluminohydrure de lithium puis distillé sous vide²⁴. Ces solvants sont maintenus sur tamis moléculaires.

Acides gras. — L'acide palmitique (« puriss », Fluka, CH-9470 Buchs, Suisse) a été utilisé sans autre purification. Les acides C₃₂-synthétomycoliques¹⁸ et mycoliques d'origine naturelle (souches humaines P.N., D.T., de bacille tuberculeux)¹⁹ ont été purifiés sous forme d'esters méthyliques par chromatographie préparative sur couche mince de gel de silice avant d'être convertis en sels de potassium⁸.

Dérivés désoxy-iodoper-O-triméthylsilyles. — Les 6,6'-didésoxy-6,6'-diiodo- α,α -tréhalose (**6**) et méthyl-6-désoxy-6-iodo- α -D-glucopyranoside (**2**) ont été préparés selon Hanessian et Lavallée¹² à partir d' α,α -tréhalose anhydre²⁵ (p.f. 212–213°) et de méthyl- α -D-glucopyranoside (séché sous vide en présence du pentaoxyde de phosphore); après l'étape d'élimination azéotropique des solvants, les résidus d'évaporation sont directement triméthylsilylés par le système hexaméthylidisilazane-chlorotriméthylsilane 2:1 (v/v) dans la pyridine anhydre²⁶. Après 0,5 h de contact à la température ordinaire le mélange réactionnel est repris par de l'éther. La phase étherée, lavée plusieurs fois avec de l'eau glacée, est séchée sur sulfate de sodium puis évaporée sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne d'acide silicique par

élutions successives d'éther de pétrole progressivement enrichi en éther anhydre (jusqu'à 3%). Au préalable, l'acide silicique a été desséché pendant 15 h à 150°.

Méthyl-6-désoxy-6-iodo-2,3,4-tri-O-triméthylsilyl- α -D-glucopyranoside (3). — À partir de 6 g de méthyl- α -D-glucopyranoside sont obtenus 10,7 g (67%) de ce composé, liquide à température ambiante; $[\alpha]_D^{20} +76,7^\circ$ (c 2,1, chloroforme); i.r.: $\nu_{\max}^{\text{filim}}$ 1250, 860 cm^{-1} (groupes triméthylsilyles); r.m.n. (C_6D_6): δ 0,17, 0,3 et 0,35 (3 s, 3×9 p, 3 triméthylsilyles), 3,25 (1 s, 3 p, 1 OMe), 3-4,3 (massif, 6 p, H-2,3,4,5, 2 H-6), 4,65 (1 d, 1 p, H-1).

(6-Désoxy-6-iodo-2,3,4-tri-O-triméthylsilyl- α -D-glucopyranosyl)-6-désoxy-6-iodo-2,3,4-tri-O-triméthylsilyl- α -D-glucopyranoside (7). — À partir de 1,7 g d' α , α -tréhalose sont obtenus 3,2 g (65%) de ce dérivé qui cristallise à froid dans l'acétonitrile sous forme de paillettes brillantes, p.f. 135-136°; $[\alpha]_D^{20} +96^\circ$ (c 2,4, chloroforme); i.r.: ν_{\max}^{KBr} 1250, 860 cm^{-1} (groupes triméthylsilyles); r.m.n. (C_6D_6): δ 0,15, 0,3 et 0,35 (3 s, 3×18 p, 6 triméthylsilyles), 3,3-4,4 (massif, 12 p, H-2,2',3,3',4,4',5,5', 2 H-6,6'), 5,16 (1 d, 1 p, H-1,1').

Synthèse des glycolipides. — Le dérivé iodé et le sel de potassium appropriés sont dissous dans l'hexaméthylphosphoramide ($c \sim 20\%$) et maintenus en contact à 80° pendant le temps nécessaire à l'achèvement de la réaction. L'état d'avancement de cette dernière peut être estimé en suivant sur spectre i.r. l'évolution de la bande carbonyle-ester à 1740 cm^{-1} . Dans le cas des dérivés du tréhalose, un excès d'acide gras de 50% environ par rapport au sucre est nécessaire. Avec le dérivé du méthylglucoside, un excès de l'un ou l'autre des réactifs peut être employé indifféremment selon les besoins. Après condensation, le mélange réactionnel est repris par de l'éther. La phase étherée est lavée à l'eau pour éliminer l'hexaméthylphosphoramide puis séchée sur sulfate de sodium et évaporée. Le résidu obtenu est redissous dans le mélange chloroforme-méthanol-eau 4:2:1 (v/v) additionné de 10% d'acide acétique et chauffé à léger reflux jusqu'à élimination complète des groupes triméthylsilyles (~ 2 h). Après évaporation sous vide des solvants, suivie d'un traitement par le toluène (2 fois) afin d'éliminer les restes d'eau et d'acide acétique, le résidu est chromatographié sur acide silicique à l'aide de chloroforme progressivement enrichi en méthanol (jusqu'à 15%). La purification est achevée sur couche mince de gel de silice. Les conditions et les résultats de la synthèse des esters préparés (5, 8, 9 et 10) sont rassemblés dans le Tableau I.

Le dipalmitate de tréhalose (8) et le cord-factor (10) recristallisent respectivement dans l'acétone et le méthanol. Le point de fusion du dipalmitate de tréhalose préparé au cours de ce travail (154-155°) diffère notablement de celui du composé de référence¹⁰ (88-90°). Ceci peut être dû au fait que ce dernier a été préparé par une méthode de transestérification, non spécifique des fonctions hydroxyiles primaires du tréhalose¹⁰. Les dérivés C_{32} -synthétomycologiques (5 et 9) restent cireux. Tous ces dérivés ont des caractéristiques chromatographiques comparables. Celles du cord-factor de synthèse (10) sont identiques à celles d'un échantillon authentique de cord-factor d'origine naturelle. Pour le même composé 10, le pouvoir rotatoire mesuré (+33,3°) est comparable à ceux rapportés dans la littérature¹ pour des cord-factors

TABLEAU I

CONDITIONS DE PRÉPARATION ET CONSTANTES PHYSIQUES DES COMPOSÉS 5, 8, 9 ET 10

Conditions et constantes	Glycolipides synthétisés			
	5	8	9	10
Conditions				
Temp. (°)	80	80	80	80
Durée (h)	5	10	10	20
Rdt. (%) ^a	100	55	65	55
P.f. (°)				
Ce travail		154-155		46-47
Litt.		88-90 ^b		39-40 ^c
$[\alpha]_D^{20}$ (°)				
Ce travail		+68		+33,3
Litt.		(c 1,1, CHCl ₃)		(c 1, CHCl ₃)
		+75 ^b		+33 ^c
		(c 1, <i>p</i> -dioxanne)		(c 1,75, chloroforme)

^aCalculé sur la base des dérivés iodés de départ. ^bRéf. 10. ^cRéf. 8.

d'origines variées (environ $+30 \pm 2^\circ$). Les spectres i.r. et de r.m.n. des dérivés préparés sont semblables et conformes à la structure attendue et peuvent se résumer comme suit en prenant le dipalmitate de tréhalose (8) comme référence; i.r.: ν_{\max}^{KBr} 3400 (OH), 2910 et 2840 (CH₂, CH₃), 1740 (C=O ester) (cette bande apparaît à 1720 cm⁻¹ dans le cas des esters mycoliques), 1460 (CH₂, CH₃) 990 (bande caractéristique des dérivés de l' α,α -tréhalose; cette bande se situe vers 1050 cm⁻¹ pour les dérivés du méthyl- α -D-glucopyranoside), 720 cm⁻¹ [(CH₂)_n]; r.m.n. (pyridine-*d*₅): δ 0,9 (1 m, 6 p, 2 CH₃), 1,2 (1 m, 52 p, 28 CH₂), 2,2 (1 m, 4 p, 2 CH₂CO), 4-5,2 (massif, 12 p, H-2,2',3,3',4,4',5,5', 2 H-6,6'), 5,75 (1 d, 2 p, H-1,1'), 6,6 (1 m, 6 p, 6 OH). Une bande attribuable aux 4 protons méthyléniques en 6,6' (CH₂-O-CO) émerge nettement à δ 4,8 p.p.m. Dans le spectre du dihydrate d' α,α -tréhalose (pyridine-*d*₅), ces 4 protons (CH₂OH) apparaissent à δ 4,3 p.p.m.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement M. Welby-Gieusse de son assistance technique. Ce travail a reçu un support financier particulier du Centre National de la Recherche Scientifique dans le cadre de l'Action Thématique Programmée « Relations entre structure et propriété des espèces chimiques » (A.T.P. N° 2607).

RÉFÉRENCES

- 1 J. ASSELINEAU, *The Bacterial Lipids*, Herman, Paris, 1966, p. 173.
- 2 M. KATO, *Arch. Biochem. Biophys.*, 140 (1970) 379-390.
- 3 M. KATO, communication orale.
- 4 A. BEKIERKUNST, I. S. LEVIT, E. YARKONI, E. VILKAS, A. ADAM ET E. LEDERER, *J. Bacteriol.*, 100 (1969) 95-102.

- 5 E. YARKONI, A. BEKIERKUNST, J. ASSELINEAU, R. TOUBIANA, M. J. TOUBIANA ET E. LEDERER, *J. Natl. Cancer Inst.*, 51 (1973) 717-720.
- 6 J. POLONSKY, G. FERRÉOL, R. TOUBIANA ET E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1956) 1471-1478.
- 7 G. BROCHÈRE-FERRÉOL ET J. POLONSKY, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1958) 714-717.
- 8 T. GENDRE ET E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1956) 1478-1482.
- 9 J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1955) 1232-1240.
- 10 R. TOUBIANA ET M. J. TOUBIANA, *Biochimie*, 55 (1973) 575-578.
- 11 R. TOUBIANA, M. J. TOUBIANA, B. C. DAS ET A. C. RICHARDSON, *Biochimie*, 55 (1973) 569-573.
- 12 S. HANESSIAN ET P. LAVALLÉE, *Carbohydr. Res.*, 28 (1973) 303-311.
- 13 B. CASTRO, Y. CHAPLEUR ET B. GROSS, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1973) 3034-3039.
- 14 P. E. PFEFFER, T. A. FOGLIA, P. A. BARR, I. SCHMELTZ ET L. S. SILBERT, *Tetrahedron Lett.*, (1972) 4063-4066.
- 15 J. E. SHAW, D. C. KUNERTH ET J. J. SHERRY, *Tetrahedron Lett.*, (1973) 689-692.
- 16 J. E. SHAW ET D. C. KUNERTH, *J. Org. Chem.*, 39 (1974) 1968-1970.
- 17 M. L. WOLFROM ET W. A. SZAREK, dans W. PIGMAN ET D. HORTON (Eds.), *The Carbohydrates*, Vol. IA, Academic Press, New-York, 1972, ch. 7.
- 18 J. F. TOCANNE ET C. ASSELINEAU, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1968) 4519-4525.
- 19 D. E. MINNIKIN ET N. POLGAR, *Chem. Comm.*, (1967) 916-918; 1172-1174.
- 20 S. ARIMATSU, R. YAMAGUCHI ET M. KAWANISHI, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 47 (1974) 1693-1697.
- 21 J. M. SUGIHARA, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 8 (1953) 1-44.
- 22 M. L. WOLFROM ET W. A. SZAREK, dans W. PIGMAN ET D. HORTON (Eds.), *The Carbohydrates*, Vol. IA, Academic Press, New-York, 1972, p. 228.
- 23 J. A. RIDDICK ET W. B. BUNGER, *Organic Solvents*, Wiley-Interscience, New-York, 1970 p. 836.
- 24 Réf. 23, p. 876.
- 25 G. G. BIRCH, *J. Chem. Soc.*, (1965) 3489-3490.
- 26 G. G. S. DUTTON, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 28 (1973) 23-33.