

Note

Sur la synthèse du cord-factor et de ses analogues

JUDITH POLONSKY, EDUARDO SOLER ET JEANNETTE VARENNE

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

(Reçu le 20 juin 1977; accepté sous forme modifiée le 11 septembre 1977)

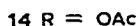
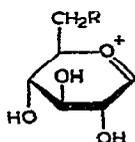
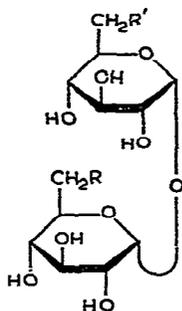
Le cord-factor du *Mycobacterium tuberculosis* est le 6,6'-di-*O*-mycolyl- α,α -tréhalose [(6-*O*-mycolyl- α -D-glucopyranosyl)-6-*O*-mycolyl- α -D-glucopyranoside]¹ (**1**), l'acide mycolique (**15**) étant² un acide gras α -ramifié, β -hydroxylé en C₈₀₋₉₀. Au cours des dernières années il s'est avéré que ce glycolipide ainsi que plusieurs autres 6,6'-diesters du α,α -tréhalose possédaient d'importantes propriétés biochimiques et immunologiques³⁻⁶.

Diverses méthodes de synthèse, plus ou moins laborieuses, du cord-factor et de ses analogues ont été publiées⁷⁻¹¹. Le nouvel intérêt que présente le cord-factor nous a conduits à reprendre l'étude de l'une des premières voies de synthèse que nous avons proposée⁸ en 1958. Celle-ci qui s'effectue en deux étapes, consiste à condenser le 6,6'-di-*O*-*p*-tolylsulfonyl- α,α -tréhalose (**2**) avec le sel de potassium d'un acide mycolique dans le *N,N*-diméthylformamide (chauffage à 125° pendant 80 h). Alors que cette méthode avait été appliquée d'une façon satisfaisante pour la préparation de divers esters d'acide mycolique¹²⁻¹⁵, elle avait aussi été décrite comme donnant des rendements médiocres en cord-factor⁹, lequel serait accompagné des dérivés de 3,6-anhydrotréhalose.

Nous décrivons ici quelques améliorations que nous avons pu apporter à la méthode de synthèse du cord-factor et de ses analogues tout en maintenant le même principe d'estérification du tréhalose. Le composé **2** a été ainsi condensé avec l'acide mycolique naturel en C₈₀₋₉₀ (*A*) et avec chacun des deux diastéréoisomères racémique des acides mycolique synthétiques^{16,17} en C₄₄ et C₃₂ **16**, **17**, **18** et **19**; **19** est l'acide coryno-mycolique racémique.

Nous avons d'abord constaté que la durée de la réaction pouvait être considérablement diminuée. En effet, en suivant le cours de la condensation^{8,18} de **2** avec le sel de l'acide mycolique **15** par chromatographie sur couche mince, on observe que la teneur en cord-factor **1** n'augmente guère après 5-6 h de chauffage; celui-ci est alors isolé avec un rendement de 47% (62% en tenant compte de l'acide mycolique récupéré).

Par ailleurs, nous avons trouvé que la température de la réaction pouvait être abaissée à 90° en employant le toluène anhydre comme solvant, dans lequel les sels de potassium d'acides mycoliques naturels sont solubles. L'emploi de ce solvant présente



15 AH

15_a AK

16 BH

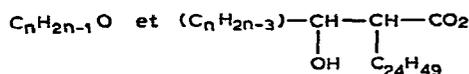
17 B'H

18 CH

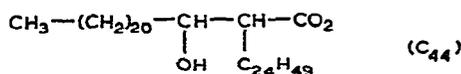
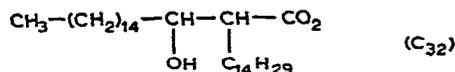
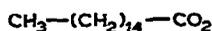
19 C'H

20 DH

	R	R'
1	A	A
2	OTs	OTs
3	B	B
4	B'	B'
5	C	C
6	C'	C'
7	A	OTs
8	C'	OTs
9	D	OTs
10	C'	A
11	D	A
12	A	OAc



A n = 53-63

B (*érythro*)B' (*thréo*)C (*érythro*)C' (*thréo*)

D

un avantage certain quant à l'isolement du cord-factor. En effet, après essorage du *p*-toluènesulfonate de potassium cristallin formé, il suffit d'évaporer le toluène sous vide, de reprendre le résidu par un mélange de chloroforme-acide acétique (9:1) et de séparer, après élimination du solvant, le cord-factor et l'acide mycolique qui n'a pas réagi par chromatographie sur colonne ou sur plaque. De plus, dans ces conditions expérimentales l'acide mycolique récupéré n'est pas accompagné d'un produit secondaire, moins polaire, comme c'est le cas lorsque la réaction est effectuée à 125°; aussi n'observe-t-on, en chromatographie sur couche mince, qu'une faible quantité de produit plus polaire que le cord-factor (~8-10%). Les cord-factors 1, 3, 4 et 5 ont été ainsi synthétisés.

On peut augmenter le rendement en cord-factor lorsqu'on emploie les éthers-couronne^{19,20} et notamment le cyclo-1,4,7,10,13,16-hexaoxaocétadécane (18-crown-6). Celui-ci et le toluène comme solvant ont été employés pour la préparation des cord-factors 1 et 6.

La synthèse des cord-factors 3-6 présente un certain intérêt du fait que chacun des diastéréoisomères (racémiques) des acides mycoliques synthétiques en C₃₂ et C₄₄ y est impliqué. En effet, le problème important de la relation entre la stéréochimie des acides mycoliques et l'activité biologique du cord-factor pourra ainsi être abordé.

Les cord-factors dissymétriques naturels sont très rares. Les seuls cord-factors mixtes isolés des mycobactéries sont, à notre connaissance, le 6-O- α -mycolyl-6'-O- γ -mycolyltréhalose à partir de *M. phlei*²¹ et le 6'-O-acétyl-6-O-mycolyltréhalose à partir de *M. tuberculosis* (souche H37Ra)²². Ce dernier jouerait un rôle important dans le transfert d'acides mycoliques nouvellement synthétisés vers la paroi cellulaire²².

Afin de synthétiser des cord-factors comportant dans leur molécule des acides différents, nous avons étudié les conditions de formation de 6-O-acyl-6'-O-*p*-tolylsulfonyltréhalose et avons préparé les composés 7, 8 et 9 avec un rendement de 30 à 35% (on isole aussi, en plus de l'acide n'ayant pas réagi, les cord-factors correspondants, 8 et 10%). Les 6-O-acyl-6'-O-tosyl esters de tréhalose ont été caractérisés par leur comportement chromatographique, leurs spectres ¹H-r.m.n. qui montrent les pics de résonance dûs aux protons du groupement tosyl et par l'analyse C, H et S pour le composé 7.

L'action des composés monotosylés 8 et 9 sur le sel de potassium de l'acide mycolique naturel (15) fournit les cord-factors dissymétriques 10 et 11, respectivement. Nous avons aussi synthétisé le 6'-O-acétyl-6-O-mycolyltréhalose (12), en condensant l'acétate de potassium en présence d'éther-couronne-« naked » acétate²³ avec le 6-O-mycolyl-6'-O-*p*-tolylsulfonyltréhalose (7) dans le toluène à 100°.

À la spectrométrie de masse par ionisation chimique, on observe pour le 6'-O-mycolyl-6-O-palmityltréhalose (11) un pic intense à *m/e* 401 que l'on peut attribuer à l'ion oxonium 13 (formé par la fragmentation classique des glycosides) et des pics à *m/e* 383 et 365 provenant de la perte successive de deux molécules d'eau à partir de l'ion 13. La protonation de la fonction ester palmitique conduit à l'élimination de l'acide palmitique sous la forme de l'ion MH⁺ à *m/e* 257. On observe aussi des pics à *m/e* 145, 127 et 109 correspondant à l'élimination de l'acide palmitique et de deux molécules d'eau à partir de l'ion oxonium 13. De même, le spectre de masse en ionisation chimique de 12 montre un pic intense à *m/e* 205 correspondant à l'ion oxonium 14 et des pics à *m/e* 187 et 169 dûs à la perte successive de deux molécules d'eau. On observe également des pics à *m/e* 145 et 127 provenant de la perte successive d'une molécule d'acide acétique (pic métastable à *m/e* 102,56) et d'une molécule d'eau à partir de l'ion oxonium 14.

Lors de la condensation de l'acétate de potassium avec 7 on observe en chromatographie sur couche mince, la formation, en faible quantité, de deux produits secondaires dépourvus du groupement tosyl: l'un plus polaire que 12 et qui pourrait être le monomycolyltréhalose et l'autre moins polaire qui est très probablement le 3',6'-anhydro-6-O-mycolyltréhalose. En spectrométrie de masse par ionisation chimique, on observe pour ce dernier un pic à *m/e* 145 attribuable à l'ion oxonium

d'un anhydrohexose et un pic très intense à m/e 127 dû à la perte d'une molécule d'eau à partir de cet ion.

L'étude de l'activité biologique des cord-factors mixtes **10**, **11** et **12** est en cours.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Méthodes générales. — Les points de fusion instantanés ont été mesurés sur banc chauffant de Kofler et ne sont pas corrigés; celui du cord-factor (**1**) a été mesuré sous microscope sur platine chauffante de Kofler. Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés au moyen d'un polarimètre « Quick » Roussel-Jouan. Les chromatographies sur colonne sont effectuées sur Kieselgel 60 Merck (70–230 mesh ASTM, Darmstadt, R.F.A.) et les produits sont élués par du chloroforme progressivement enrichi en méthanol (jusqu'à 15%). Les chromatographies sur plaques préparatives ont été réalisées sur Gel de Silice 60 PF₂₅₄ de Merck et celles sur couche mince ont été faites sur Gel de Silice F₁₅₀₀LS₂₅₄ de Schleicher et Schull; système de solvants: chloroforme–méthanol 9:1 (v/v) ou chloroforme–méthanol–benzène 9:3:8 (v/v); les révélations ont été effectuées par pulvérisation d'acide sulfurique à 50% suivie de chauffage. Les spectres de r.m.n. ont été enregistrés en solution dans le chloroforme-*d* sur un appareil Varian T-60. Les spectres de masse en ionisation chimique ont été mesurés sur un spectromètre MS-9 (A.E.I.) modifié en utilisant l'isobutane comme gaz réactif.

L'acide mycolique ayant servi pour la synthèse du cord-factor a été obtenu par saponification du monomycolate de glycerol, isolé de la souche bovine AN5 du *Mycobacterium tuberculosis*²⁴. Les synthèses décrites ont été, en général, effectuées avec 0.1 mmol de dérivé tosylé. Les glycolipides synthétisés se présentent sous forme de poudre incolore après précipitation de leur solution étherée par un excès de méthanol ou d'acétone. Les composés **5** et **6** restent cireux. Le second rendement est calculé sur la base de l'acide ayant réagi.

6,6'-Di-O-mycolyl- α,α -tréhalose (1). — Une solution de mycolate de potassium (**15a**) (300 mg) et de « 18-crown-6 » (60 mg) (Fluka AG, CH-9470 Buchs, Suisse) dans 8 ml de toluène sec est portée à 90° dans un bain d'huile. A cette solution on ajoute 60 mg de 6,6'-di-*O-p*-tolylsulfonyl- α,α -tréhalose (**2**). Après avoir chauffé sous agitation pendant 5 h à 90° on filtre. Le filtrat est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur plaques préparatives dans le système benzène–chloroforme–méthanol (8:9:3, v/v). Le mélange chloroforme–éthanol (7:3) élue 139 mg d'acide mycolique (**15**) et 146 mg de cord-factor (**1**) (rdt. 56, 83%), p.f. 42–44°, $[\alpha]_D^{20} + 31,2^\circ$ (c 0,86, chloroforme).

*Anal. Calc.** pour C₁₈₀H₃₄₆O₁₅: C, 78,66; H, 12,60; pour C₁₈₂H₃₅₄O₁₇: C, 77,72; H, 12,60. Trouvé: C, 78,00; H, 12,85.

6,6'-Di-O-(érythro-2-icosyl-3-hydroxytétracosanoyl)- α,α -tréhalose (3). — L'action du dérivé ditosylé **2** (1 mmol) sur **16** (1,8 mmol) dans le *N,N*-diméthyl-

*Calculé pour des formules moyennes d'acide mycolique: C₈₄H₁₆₄O₂ et C₈₅H₁₆₈O₃.

formamide (8 ml) à 130° pendant 4,5 h conduit au cord-factor 3 (rdt. 45 %, 71,4 %), p.f. 143–145°, $[\alpha]_D^{20} + 46,2^\circ$ (*c* 0,59, chloroforme).

Anal. Calc. pour $C_{100}H_{194}O_{15}$: C, 73,39; H, 11,95. Trouvé: C, 73,18; H, 11,79.

6,6'-Di-O-(thréo-2-éicosyl-3-hydroxytétracosanoyl)- α,α -tréhalose (4). — L'action de **2** (1 mmol) sur **17** (1,85 mmol) dans le *N,N*-diméthylformamide (8 ml) à 130° pendant 5,5 h conduit à **4** (rdt. 45 %, 60 %), p.f. 136–137°, $[\alpha]_D^{20} + 40,3^\circ$ (*c* 0,84, chloroforme).

Anal. Calc. pour $C_{100}H_{194}O_{15}$: C, 73,39; H, 11,95. Trouvé: C, 73,36; H, 11,94.

6,6'-Di-O-(érythro-2-tétradécyl-3-hydroxyoctadécanoyl)- α,α -tréhalose (5). — L'action de **2** (1 mmol) sur **18** (1,85 mmol) dans le *N,N*-diméthylformamide (8 ml) à 130° pendant 5,5 h donne le cord-factor **5** (rdt. 45 %, 69 %), cire, $[\alpha]_D^{20} + 53,2^\circ$ (*c* 0,82, chloroforme).

Anal. Calc. pour $C_{76}H_{146}O_{15}$: C, 70,04; H, 11,54. Trouvé: C, 69,73; H, 11,44.

6,6'-Di-O-(thréo-2-tétradécyl-3-hydroxyoctadécanoyl)- α,α -tréhalose (6). — L'action de **2** (1 mmol) sur **19** (2,25 mmol) en présence de « 18-crown-6 » (1,1 mmol) dans le toluène anhydre (9 ml) à 90° pendant 6 h conduit au cord-factor **6** (rdt. 55 %, 83 %, cire, $[\alpha]_D^{20} + 51,4^\circ$ (*c* 1,44, chloroforme).

Anal. Calc. pour $C_{76}H_{146}O_{15}$: C, 70,04; H, 11,54. Trouvé: C, 69,83; H, 11,65.

6-O-Mycolyl-6'-O-p-tolylsulfonyl- α,α -tréhalose (7). — À une solution de mycolate de potassium (750 mg) et de 150 mg de « 18-crown-6 » dans 8 ml de toluène sec, portée à 90°, on ajoute **2** (350 mg). Après avoir chauffé sous agitation, pendant 2 h à 100°, on évapore le solvant sous pression réduite et on chromatographie le produit de la réaction sur une colonne de Kieselgel (50 g). Le mélange chloroforme-méthanol (24:1, 250 ml) élue 414 mg d'acide mycolique (**15**). Le mélange chloroforme-méthanol (9:1) élue d'abord 130 mg de cord-factor (**1**), puis 310 mg de **7**. Après dissolution dans l'éther et précipitation à froid par un excès de méthanol, **7** se présente sous forme d'une poudre incolore, p.f. 80–82°, $[\alpha]_D^{20} + 40,3^\circ$ (*c* 0,79, chloroforme), r.m.n.: δ 2,45 (s, 3 H, Me benzénique), 7,25 et 7,70 (2 d, 4 H benzéniques).

Anal. Calc. pour $C_{103}H_{190}O_{15}S$: C, 72,79; H, 11,19; S, 1,89; pour $C_{104}H_{194}O_{16}S$: C, 72,14; H, 11,21; S, 1,85. Trouvé: C, 72,27; H, 11,36; S, 2,01.

6'-Mycolyl-6-O-(thréo-2-tétradécyl-3-hydroxyoctadécanoyl)- α,α -tréhalose (10). — Cire, $[\alpha]_D^{20} + 34,5^\circ$ (*c* 0,92, chloroforme).

Anal. Calc. pour $C_{128}H_{246}O_{15}$: C, 75,96; H, 12,14; pour $C_{129}H_{250}O_{16}$: C, 75,36; H, 12,12. Trouvé: C, 75,30; H, 12,00.

6'-Mycolyl-6-O-palmityl- α,α -tréhalose (11). — Poudre incolore, p.f. 72–75°, $[\alpha]_D^{20} + 36,2^\circ$ (*c* 0,79, chloroforme).

Anal. Calc. pour $C_{112}H_{214}O_{14}$: C, 75,42; H, 12,01; pour $C_{113}H_{218}O_{15}$: C, 74,75; H, 12,01. Trouvé: C, 74,13; H, 11,85.

6'-O-Acétyle-6-O-mycolyl- α,α -tréhalose (12). — Une solution de **7** (210 mg) et de « 18-crown-6 » (36 mg) dans 3 ml de toluène sec est additionnée de 16 mg d'acétate de potassium fondu. On chauffe, en agitant, à 100° pendant 5 h, en suivant l'évolution de la réaction par chromatographie sur plaque. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on reprend le résidu par un faible volume de chloro-

forme et on chromatographie le mélange réactionnel sur plaques préparatives de gel de silice en employant un mélange chloroforme-méthanol (9:1) comme système éluant. On obtient ainsi (par polarité croissante) 24 mg de 6',3'-anhydro-6-O-mycolyl- α,α -tréhalose, 102 mg de 6'-O-acétyl-6-O-mycolyl- α,α -tréhalose (**12**) et 35 mg de produit plus polaire. Le composé **12** se présente après dissolution dans l'éther et précipitation à froid, par un excès de méthanol, sous forme d'une poudre incolore, p.f. 86–88°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +44,8^\circ$ (c 0,53, chloroforme).

Anal. Calc. pour $\text{C}_{98}\text{H}_{186}\text{O}_{14}$: C, 74,14; H, 11,72; pour $\text{C}_{99}\text{H}_{190}\text{O}_{15}$: C, 73,42; H, 11,74. Trouvé: C, 72,99; H, 11,58.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Professeur E. Lederer pour l'intérêt témoigné à ce travail et M. P. Varenne pour les mesures des spectres de masse en ionisation chimique. Ce travail a bénéficié d'une subvention de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique (D.G.R.S.T.) n° 76 7 1678, affectation n° A 650 1493.

RÉFÉRENCES

- 1 H. NOLL, H. BLOCH, J. ASSELINEAU ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 299–309.
- 2 J. ASSELINEAU, *The Bacterial Lipids*, Herman, Paris, 1966.
- 3 M. B. GOREN, *Bacteriol. Rev.*, 36 (1972) 33–64.
- 4 E. LEDERER, *Chem. Phys. Lipids*, 16 (1976) 91–106.
- 5 E. LEDERER, *Med. Chem. (N.Y.)*, 5 (1977) 257–279.
- 6 J. ASSELINEAU ET C. ASSELINEAU, *Progress Chem. of Fats other Lipids*, 16 (1978) 59–89.
- 7 J. POLONSKY, G. FERRÉOL, R. TOUBIANA ET E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1956) 1471–1477.
- 8 G. BROCHERÉ-FERRÉOL ET J. POLONSKY, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1958) 714–717.
- 9 R. TOUBIANA ET M. J. TOUBIANA, *Biochimie*, 55 (1973) 575–578.
- 10 J. F. TOCANNE, *Carbohydr. Res.*, 44 (1975) 301–307.
- 11 R. TOUBIANA, B. C. DAS, J. DEFAYE, B. MOMPON ET M. J. TOUBIANA, *Carbohydr. Res.*, 44 (1975) 308–312.
- 12 J. DEFAYE ET E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 38 (1956) 1301–1304.
- 13 A. DIARA ET J. PUDLEŠ, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41 (1959) 481–486.
- 14 M. KATO ET J. ASSELINEAU, *Eur. J. Biochem.*, 22 (1971) 364–370.
- 15 S. KUSUMOTO, S. OKADA ET T. SHIBA, *Tetrahedron Lett.*, (1976) 4287–4290.
- 16 J. POLONSKY ET E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1953) 504–510.
- 17 J. F. TOCANNE ET C. ASSELINEAU, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1968) 4519–4525.
- 18 R. TOUBIANA, M. J. TOUBIANA, B. C. DAS ET A. C. RICHARDSON, *Biochimie*, 53 (1973) 569–573.
- 19 C. J. PEDERSEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 89 (1967) 7017–7036.
- 20 G. W. GOKEL ET H. D. DURST, *Synthesis*, (1976) 168–184.
- 21 J. C. PROMÉ, C. LACAVE, A. AHIBO-COFFY ET A. SAVAGNAC, *Eur. J. Biochem.*, 63 (1976) 543–552.
- 22 K. TAKAYAMA ET E. L. ARMSTRONG, *Biochemistry*, 15 (1976) 441–447.
- 23 C. L. LIOTTA, H. P. HARRIS, M. McDERMOTT, T. GONZALEZ ET K. SMITH, *Tetrahedron Lett.*, (1974) 2417–2420.
- 24 F. PIRIOU, J. POLONSKY ET E. LEDERER, résultats non publiés.