

HYDROGENATION ET DESHYDROGENATION SELECTIVES
DE Δ^4 -CETO-3 STEROIDES PAR NOCARDIA

G. LEFEBVRE, F. SCHNEIDER, P. GERMAIN et R. GAY

Laboratoire de Chimie Biologique I, Université
de Nancy I, France, C.o. 140 ; 54037 Nancy Cédex

(Received in France 21 November 1973; received in UK for publication 30 November 1973)

Les Actinomycétales (Nocardia, Mycobacterium) sont très actives dans la bioconversion des stéroïdes (1). Les Δ^1 -deshydrogénases de certains de ces microorganismes ont été mises en évidence (2,3). D'autre part, nous avons montré que Nocardia corallina est capable d'hydrogéner des Δ^4 -cêto-3 stéroïdes (4). Nous rapportons ici des méthodes permettant d'orienter sélectivement les bioconversions de Δ^4 -cêto-3 stéroïdes par Nocardia dans le sens de la formation de dérivés Δ^1 -deshydrogénés ou Δ^4 -dihydrogénés.

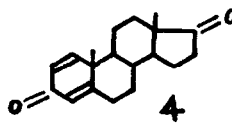
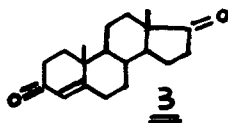
Hydrogénation de la progestérone 1 en 5 α -pregna-3,17-dione 2



Nocardia corallina ATCC 13259 est cultivé, en l'absence de stéroïde inducteur, dans un milieu limitant en sources d'azote (extrait de levure à 2 g/l) et comportant un excès de source de carbone glucidique (glucose à 20 g/l). Les cellules correspondant à un poids sec de 5 g, sont récoltées en phase stationnaire de croissance (après 60 h), lavées puis mises en suspension dans 100 ml de tampon phosphate 0,038 M de pH 7,4 contenant 0,3 g de progestérone (dissoute dans 2 ml de DMF), 3 g de glucose et 20 mg de chloramphénicol (5). La suspension est agitée 38 h à 27°C en aérobiose. Après addition de 20 ml de HCl 4 N, les stéroïdes sont extraits par 2 x 50 ml de chloroforme, puis séparés par chromatographie en progestérone résiduelle et un produit moins polaire. La recristallisation de ce dernier composé dans l'acétone fournit 115 mg de cristaux $F = 197-200^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D + 128^\circ$ (CHCl_3) identifiés à la 5 α -pregna-3,20-dione 2 [Litt. $F = 200-201^\circ\text{C}$ (6) ; $[\alpha]_D + 124^\circ\text{C}$ (6)]. $|\text{IR}_{\text{CHCl}_3}^{\text{Max}}$ 1720 et 1732 cm^{-1} ; SM m/e 316 (M^+) (7)].

Dans les mêmes conditions, l'androst-4-ène 3,17-dione est réduite en 5 α -androsta-3,17-dione (rendement : 32 %). De même l'androst-1,4-diène 3,17-dione est transformée en 5 α -androsta 3,17-dione (24 %), la 16-dehydro-progestérone en 5 α -pregna-3,20-dione (21 %). D'autres stéroïdes conjugués tels que la cholesta-3,5-diène 7-one et la cholesta-4-ène 3,6-dione ne sont pas réduits. Nocardia opaca ATCC 4176 mène à des résultats semblables. Les Mycobactéries (Mycobacterium phlei et M. smegmatis) réduisent aussi la fonction cétone en 3 ; la cholest-4-ène 3-one est hydrogénée en 5 α -cholestan 3 β -ol (8).

Deshydrogénation de l'androst-4-ène 3,17-dione 3 en androsta-1,4-diène 3,17-dione 4



Nocardia corallina ATCC 13259 est cultivé dans un milieu à glucose limitant (5 g/l) contenant 4 g/l d'extrait de levure. Un stéroïde inducteur (progestérone à 500 mg/l) est ajouté après 10 h et les cellules sont récoltées en fin de phase exponentielle de croissance (30 h). Après lavage, les cellules (correspondant à un poids sec de 2 g) sont mises en suspension dans 50 ml de tampon Tris 0,03 M pH 9,3, en présence de 0,5 g d'androst-4-ène 3,17-dione, de 200 mg de méthanesulfonate de phémozine, accepteur d'électrons (9), de 10 mg de chloramphénicol et de 10 mg d' α '-dipyridyle (10). Après 2 h d'incubation à 27°C en aérobiose, puis addition de HCl, les stéroïdes sont extraits au chloroforme et séparés par chromatographie. On obtient 0,38 g d'androsta-1,4-diène 3,17-dione $F = 138-141^\circ\text{C}$; $UV_{\lambda_{\text{Max}}}^{\text{Ethanol}}$ 243 nm (ϵ 15.700) ; $IR_{\text{CHCl}_3}^{\text{Max}}$ 1735, 1663, 1624 et 1604 cm^{-1} ; RMN : 3 signaux dus aux protons vinyliques à τ 3,88, 3,77 et 3,14 ppm. Ces données correspondent à celles de la littérature (11).

En conclusion, il est possible d'orienter sélectivement les bioconversions de stéroïdes vers les réductions, en limitant les oxydations ce qui permet la préparation stéréospécifique de stéroïdes 5 α dihydrogénés, en particulier de stéroïdes marqués comme la 5 α dihydro-progestérone 4- ^{14}C . Pour ce faire, nous avons tenu compte de la biosynthèse non induite par les stéroïdes de la 5 α réductase et de la stimulation de la réduction, in vivo, dans un milieu déficient en sources azotées et contenant un excès de source carbonée glucidique (12).

Remerciements - Les auteurs remercient M. Guy RAVAL pour sa collaboration technique efficace.

REFERENCES

- (1) W. CHARNEY et H.L. HERZOG, *Microbial Transformations of Steroids. A Handbook*, Acad. Press, New York, (1967) p. 61
- (2) P. TALALAY, *Ann. Rev. Biochem.*, 34, 347 (1965)
- (3) C.J. SIH et J. WHITLOCK, *Ann. Rev. Biochem.*, 37, 661 (1968)
- (4) G. LEFEBVRE, P. GERMAIN et R. GAY, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 274, 449 (1972)
- (5) Le chloramphénicol inhibe toute nouvelle biosynthèse protéique et toute croissance
- (6) J. JACQUES, H. KAGAN et G. OURISSON, *Constantes sélectionnées I_a Stéroïdes*, Pergamon Press, Oxford (1965)
- (7) H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI et D.H. WILLIAMS, *Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds*, Holden Day Inc., San Francisco (1964)
- (8) K. SCHUBERT et G. KAUFMANN ont déjà constaté que le cholestérol est réduit en 5 α -cholestan-3 β -ol par M. smegmatis : *Biochim. Biophys. Acta.*, 106, 592 (1965)
- (9) H.R. LEVY et P. TALALAY, *J. Biol. Chem.*, 234, 2014 (1959)
- (10) Inhibiteur d'hydroxylases : il évite des réactions secondaires : G. WIX et K. ALBRECHT, *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 8, 339 (1961)
- (11) E. VISCHER et A. WETTSTEIN, *Experientia*, 91, 371 (1953)
- (12) G. LEFEBVRE, P. GERMAIN et R. GAY, *Eur. J. Biochem.*, à paraître