

APPLICATION DU COUPLAGE  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  A LA DETERMINATION DE L'ORIGINE BIOGENETIQUE DES SUBSTITUANTS EN C-4 DES VIRESCENOLS A ET B

Judith POLONSKY et Gabor LUKACS

Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 91190 Gif-sur-Yvette, France

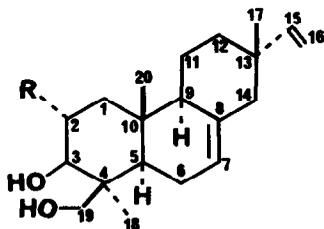
Néra CAGNOLI-BELLAVITA et Paolo CECCHERELLI

Instituto di Chimica Organica, Facoltà di Farmacia dell'Università, Perugia, Italie

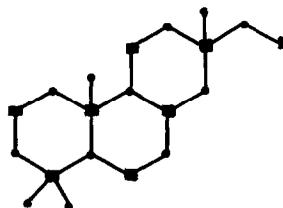
(Received in France 18 October 1974; received in UK for publication 13 January 1975)

Le virescenol A 1 et le virescenol B 2 sont les aglycones diterpéniques de plusieurs virescenosides, métabolites d'*Oospora virescens* (Link) Wallr (1)

Leur biosynthèse à l'aide de  $[1-^{13}\text{C}] \text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$  et de  $[2-^{13}\text{C}] \text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$  a été étudiée antérieurement (2) L'examen des spectres du  $^{13}\text{C}$  des iso-virescenols ( $\Delta^{8,9}$ ) isolés lors de ces expériences d'incorporation a montré une forte augmentation d'intensité des signaux des carbones représentés dans la formule 3, en accord avec les théories actuelles de la biosynthèse des terpènes



1 R = OH, 2 R = H



3 =  $[1-^{13}\text{C}]$  acétate  
 •  $[2-^{13}\text{C}]$  acétate

Il nous a semblé intéressant d'étudier l'incorporation de  $[1, 2-^{13}\text{C}] \text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$  dans les virescenols A et B et d'établir ainsi l'origine biogénétique de leurs substituants en C-4. Cette technique de double marquage mettant en jeu le couplage  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ , récemment utilisée dans l'étude de la biosynthèse des composés d'origine polyacétique (3, 4, 5), ne semble pas encore avoir été appliquée à l'étude des terpénoïdes ou des stéroïdes.

Le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  (enregistré avec découplage par bruit) du virescenol B isolé lors de l'incorporation de  $^{13}\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$  (6) est représenté dans la Figure 1 L'incorporation du précurseur dans le métabolite se manifeste par l'apparition dans son spectre de signaux à trois pics, le pic central correspondant à celui dû à l'abondance naturelle du  $^{13}\text{C}$  et les deux satellites au couplage spin-spin  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ . Ce couplage s'observe

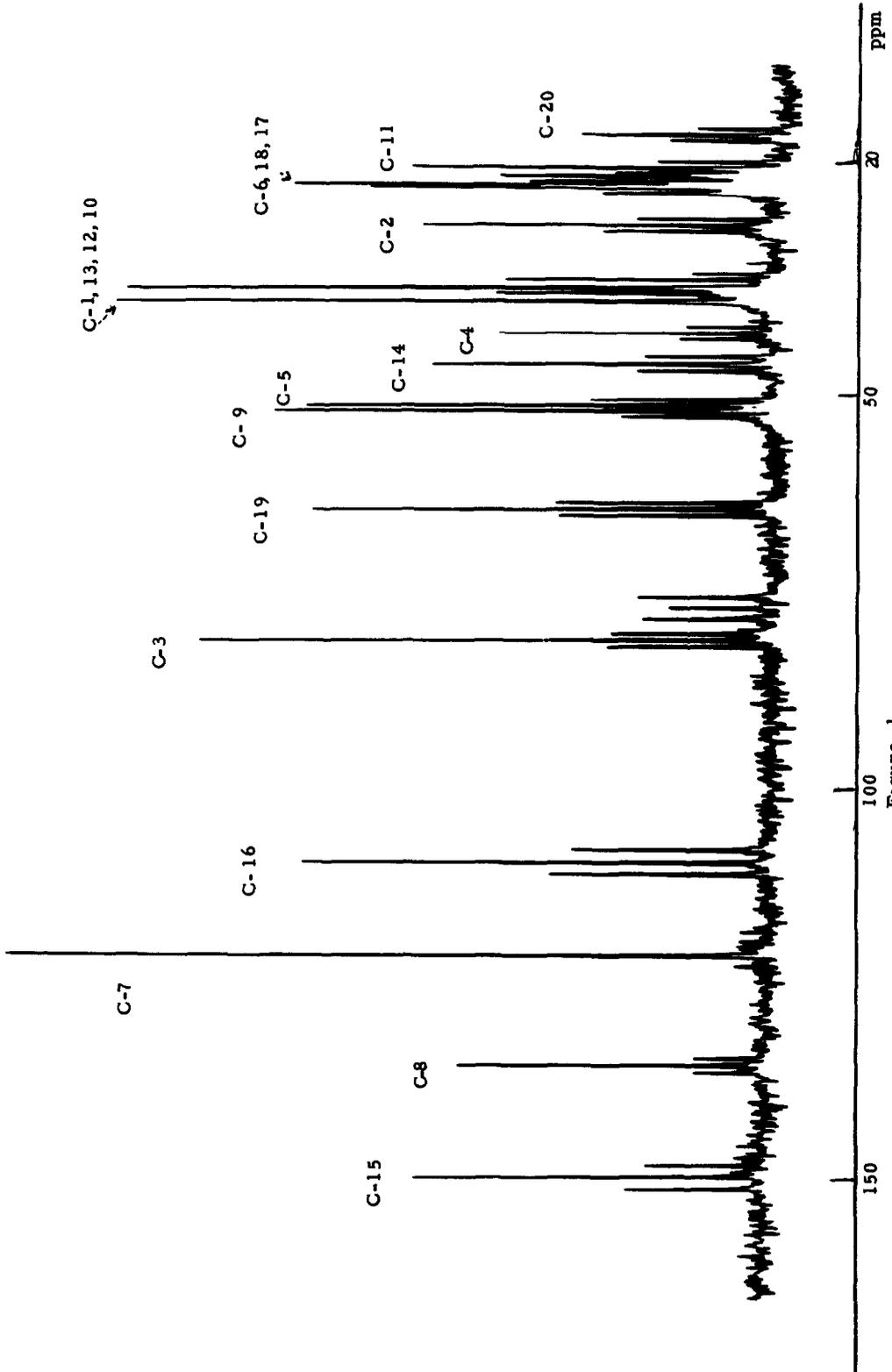
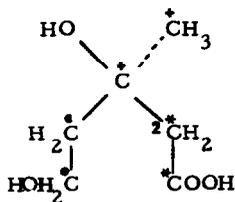
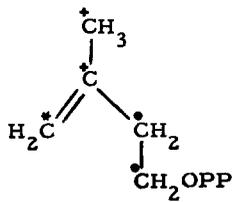
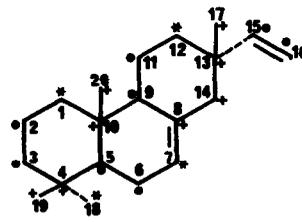


Figure 1

pour les paires d'atomes de carbone qui proviennent de la molécule d'acide acétique doublement marqué - incorporée via l'acide mévalonique 4 - et ne s'observe pas entre les liaisons C-C formées par la condensation des molécules d'acide acétique

Les paires d'atomes de carbone dont on observe un couplage sont indiquées dans la formule 6

456

Seuls C-1, C-7, C-12 et C-18 ne présentent pas de couplage et leurs signaux apparaissent sous forme de singulets. Ces carbones correspondent au C-2 de l'acide mévalonique comme il a été démontré pour plusieurs terpénoïdes à l'aide de l'acide  $[2-^{14}\text{C}]$  mévalonique (7). L'examen des spectres des virescenols montre donc clairement que le groupement axial (C-19) et le groupement équatorial (C-18) correspondent respectivement au méthyle et au C-2 de l'acide mévalonique 4. Des résultats identiques avaient été obtenus pour la rosenonolactone (8) et l'acide gibbèrellique (9) et pour plusieurs triterpènes (10).

Il est à remarquer qu'il suffit d'une seule expérience pour localiser les carbones des terpénoïdes correspondant au méthylène  $\text{sp}^2$  de l'isopentenyl pyrophosphate 5. Il est particulièrement intéressant de souligner que l'individualité des substituants en C-4, dont la détermination était très laborieuse auparavant (10, 11), est si aisément démontrée par la technique d'incorporation de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$  doublement marqué.

Les spectres des produits en solution dans  $\text{CDCl}_3$  ont été mesurés sur un spectromètre F. T. Bruker HX 90E. Les déplacements chimiques sont légèrement inférieurs à ceux obtenus pour les mêmes composés sur un spectromètre différent (2). L'examen des spectres enregistrés en présence de  $\text{Eu}(\text{dpm})_3$  a permis d'attribuer les résonances dues aux carbones C-5 et C-9, signaux non différenciés antérieurement, le C-9 apparaît à champ plus faible que le C-5.

Les constantes de couplage  $^1\text{J}_{13\text{C}-13\text{C}}$  observées sont de 36 Hz entre carbones  $\text{sp}^3$ . Toutefois, elles sont légèrement supérieures (37 Hz) lorsque au moins un de ces carbones est porteur d'un hydroxyle. Entre un carbone de type  $\text{sp}^2$  et un carbone  $\text{sp}^3$   $^1\text{J}$  est de 40 Hz et entre deux carbones éthyléniques de 68,5 Hz. De multiples superpositions de signaux,

même en présence de chélate de terre rare, ne permettent pas toujours une évaluation exacte de la constante de couplage dont la précision est de  $\pm 1$  Hz

Remerciements Néra Cagnoli-Bellavita et Paolo Ceccherelli remercient le C.N.R. italien pour une subvention. Nous remercions vivement M. B. Septe pour les mesures des spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  et le Commissariat de l'Energie Atomique (Saclay) pour une subvention ayant facilité l'achat de  $^{13}\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{CO}_2\text{Na}$ .

#### REFERENCES

- 1 N. Cagnoli-Bellavita, P. Ceccherelli, M. Ribaldi, Z. Baskevitch et J. Polonsky, Gazz. Chim. Ital., **97**, 1344, 1625 (1967); J. Polonsky, Z. Baskevitch, N. Cagnoli-Bellavita et P. Ceccherelli, Chem. Comm., 1404 (1968), *idem*, Bull. Soc. Chim. Fr., 1912 (1970), N. Cagnoli-Bellavita, P. Ceccherelli, M. Ribaldi, J. Polonsky et Z. Baskevitch, Gazz. Chim. Ital., **99**, 1354 (1969), P. Ceccherelli, N. Cagnoli-Bellavita, J. Polonsky et Z. Baskevitch, Tetrahedron, **29**, 449 (1973)
- 2 J. Polonsky, Z. Baskevitch, N. Cagnoli-Bellavita, B.L. Buckwalter et E. Wenkert, J. Am. Chem. Soc., **94**, 4369 (1972).
- 3 H. Seto, T. Sato et H. Yonchara, J. Am. Chem. Soc., **95**, 8461 (1973)
- 4 A.G. McInnes, D.G. Smith, J.A. Walter, L.C. Vining et J.L.C. Wright, Chem. Comm., 282 (1974)
- 5 H. Seto, L.W. Cary et M. Tanabe, J. Antibiot., **27**, 559 (1974)
- 6 250 mg de  $^{13}\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{CO}_2\text{Na}$  (enrichi de 88 %) et 250 mg de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$  non marqué ont été ajoutés à 500 cm<sup>3</sup> de cultures d'Oospora virescens
7. H.J. Nicholas, Biogenesis of Natural Compounds, P. Bernfeld Ed., Pergamon Press, New-York, N.Y., (1967)
8. D. Arigoni, dans Ciba Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Sterols, Churchill, London (1959).
- 9 A.J. Birch, R.W. Rickards, H. Smith, A. Harris et W.B. Whalley, Tetrahedron, **7**, 241, (1959)
10. D. Arigoni, Experientia, **14**, 153 (1958), K.J. Stone, W.R. Roeske et R.B. Clayton, Chem. Comm., 530 (1969), G.P. Moss et S.A. Nicolaidis, Chem. Comm., 1,72 (1969)
- 11 J. Moron et J. Polonsky, Tetr. Lett., 385 (1968), J.F. Grove, J. Chem. Soc. (C), 549 (1969)