

## REDUCTIONS MICROBIOLOGIQUES DE CETONES ETHYLENIQUES

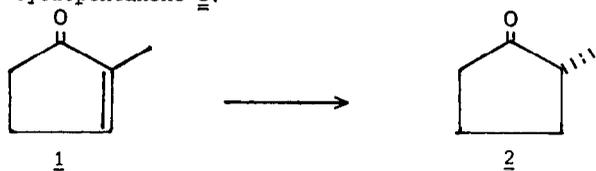
A. Kergomard, M.F. Renard et H. Veschambre

Equipe de Recherche associé au CNRS No. 392, Université de Clermont II - B.P. 45, 63170 AUBIERE

Le champignon inférieur (fungus imperfectus) *Beauveria sulfurescens* (ATCC 7159) effectue de nombreuses hydroxylations sur divers substrats (stéroïdes, amides, azépines, pipéridines) avec une remarquable absence de spécificité (1).

Pour cette raison, nous avons choisi ce microorganisme pour effectuer des hydroxylations de synthons de prostaglandines.

Les premiers essais ont été effectués sur la méthyl-2 cyclopenténone 1 et nous n'avons observé aucune hydroxylation sur ce substrat mais au contraire une réduction de la double liaison conduisant à la R(-) méthyl-2 cyclopentanone 2.

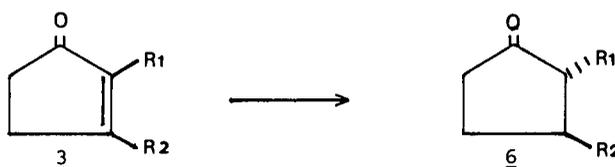


Dans le but de définir le domaine d'application de cette réaction nouvelle nous avons soumis à l'action de *Beauveria sulfurescens* les séries suivantes de substrats :

- 1) des cyclopenténones substituées du type 3
- 2) des cyclohexénones substituées du type 4
- 3) des cétones éthyléniques acycliques du type 5

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les trois tableaux suivants :

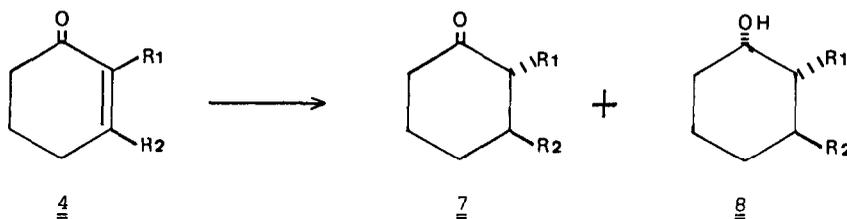
TABLEAU I



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	% de 3	% de 6	(α)	(α) litt.
H	H	0	90		
Me	H	0	90	- 100° (c=0,15)	- 110°,5 (2)
Et	H	95	5	(a)	
H	Me	100	0		
Me	Me	100	0		

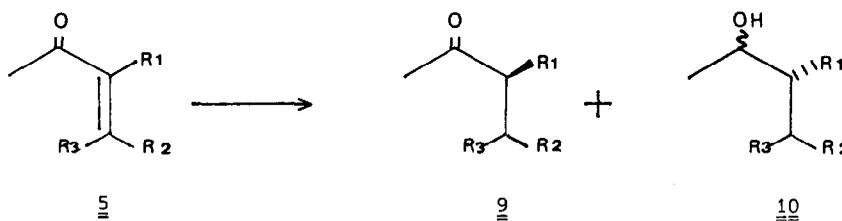
(a) L'éthyl-2 cyclopentanone n'a pas été isolée.

TABLEAU II



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	% de $\underline{4}$	% de $\underline{7}$	( $\alpha$ )	$\alpha$ litt.	% de $\underline{8}$	( $\alpha$ )	( $\alpha$ ) litt.
H	H	0	40			45		
Me	H	0	30	-15,5° (c=0,08)	+16,8° (3)	55	+21,8° (c=0,2)	+24,3° (4)
H	Me	100	0			0		
Me	Me	100	0			0		
Et	H	100	0			0		

TABLEAU III



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	% de $\underline{5}$	% de $\underline{9}$	( $\alpha$ )	( $\alpha$ ) litt.	% de 10	( $\alpha$ )	( $\alpha$ ) litt.
Me	H	H	0	70			20	+ 10° (c=0,07)	+ 11° (5)
H	Me	H	0	75			15		
Me	Me	H	0	80	+ 22°,5 (c=0,1)	+24°,9 (6)	10	+ 15° (c=0,05)	- 11°,5 (7)
Et	Me	H	0	90			0		
H	Me	Me	100	0			0		
Me	Me	Me	100	0			0		

L'examen des trois tableaux montre que les rendements des transformations, lorsqu'elles ont lieu, sont excellents ainsi que la pureté optique des composés actifs obtenus.

La réduction microbiologique des cétones  $\alpha\beta$  éthylénique en cétones saturées est une réaction assez rare. Généralement la réaction se poursuit jusqu'à la formation des alcools saturés (8). Avec *Beauveria sulfurescens* les cyclopenténones conduisent exclusivement aux cyclopentanones alors que les cyclohexénones fournissent un mélange de cétones et d'alcools saturés. On retrouve le même comportement dans l'action de *Beauveria sulfurescens* sur les cyclanones. En effet, les cétones saturées du type 6 demeurent inchangées alors que celle du type 7 sont partiellement réduits en alcools 8. Cette différence de comportement entre les cétones cycliques à 5 ou 6 atomes de carbone peut s'expliquer par des différences de tension interne des cycles. On retrouve cet effet aussi bien dans les réductions chimiques (par  $\text{NaBH}_4$  par exemple) que dans les réductions enzymatiques comme l'ont montré Van Osselaer et Coll. (9).

Dans le cas des cétones éthyléniques acycliques on obtient un mélange de cétones et d'alcools saturés ; l'alcool étant toujours en quantité beaucoup plus faible que la cétone. Dans le cas de cyclohexénones au contraire, c'est l'alcool qui est le composé prépondérant. En outre le carbone asymétrique des cétones saturées aliphatiques a la configuration S alors que celui des cétones saturées cycliques a la configuration R. Les cétones saturées acycliques, contrairement aux cyclohexénones ne subissent aucune réaction par *Beauveria sulfurescens*.

L'encombrement en  $\alpha$  du carbonyle a une grande importance dans les deux séries cycliques. En effet la vitesse de réduction est fortement diminuée lorsqu'on passe de la méthyl-2 à l'éthyl-2 cyclopenténone ; elle devient nulle quand on passe de la méthyl-2 à l'éthyl-2 cyclohexénone.

La réaction ne se produit pas, dans les trois séries étudiées, si un deuxième substituant aliphatique est présent en  $\beta$  du carbonyle. Cette absence de réaction ne se retrouve pas dans les réductions analogues effectuées par d'autres microorganismes, comme les levures qui réduisent la méthyl-3 cyclohexénone (10) ou certaines bactéries qui réduisent les  $\Delta$ -4 ceto-3 stéroïdes (11).

On a ainsi deux éléments d'information sur la stéréochimie de l'attaque enzymatique dans le cas de *Beauveria sulfurescens*.

*Beauveria sulfurescens* était connu uniquement pour ses propriétés hydroxylantes. Dans le cas des stéroïdes, la réaction d'hydroxylation conduit à des résultats différents suivant la quantité d'air qui traverse le milieu (12). Nous avons donc effectué des essais de réduction sur la méthyl-2 cyclopenténone dans plusieurs conditions d'aération. On constate qu'avec une aération de 300 ml/min./l la vitesse de réaction est faible et le rendement en composé réduit mauvais ; par contre avec une aération 10 ml/min./l les résultats sont excellents (voir tableau). Tous les autres essais ont donc été réalisés avec cette aération. On peut proposer comme explication de cette propriété réductrice l'accumulation dans le milieu de coenzyme réduit.

On a ainsi un nouveau réactif biologique de réduction stéréospécifique dont la mise en oeuvre est très simple et dont nous étudions actuellement l'utilisation à d'autres substrats.

Nous donnons ci-dessous la méthode générale utilisée pour réaliser ces transformations microbiologiques ;

Le microorganisme est cultivé 24 heures, à 27°C, sur un milieu nutritif composé de glucose, d'un sel d'ammonium et de divers sels minéraux. Le produit à réduire (0,5 à 1 g) est alors ajouté en solution dans 1 à 2 ml. de diméthylsulfoxyde (DMSO).

On laisse croître le microorganisme pendant 48 heures à 20°C avec une aération de 10 ml/min./l. Après filtration les jus sont saturés avec du sulfate d'ammonium et extraits à l'éther. Après évaporation du solvant on analyse les résidus par chromatographie en phase vapeur et on détermine les rendements après addition d'un étalon interne.

Les produits purs sont isolés par chromatographie sur colonne de silicagel (éluant, pentane/éther 90/10 en volume).

Les pouvoirs rotatoires sont déterminés à 25°C pour la raie J du mercure ( $\lambda = 578$  nm) en solution dans le chloroforme.

*Remerciements* : Au cours de ce travail nous avons bénéficié d'utiles discussions avec P. CRABBE (Grenoble) G. DAUPHIN et J.C. GRAMAIN (Clermont-Ferrand) nous les en remercions très vivement.

#### Bibliographie :

- 1 - K. KIESLICH ; *Synthesis* 120 (1969)
- 2 - J.J. PARTRIDGE, N.K. CHADHA et M.R. VSKOKOVIC  
*J. Amer. Chem. Soc.* 95 532 (1973)
- 3 - J. BARRY, A. HOREAU et H. KAGAN  
*Bull. Soc. Chim.* 989 (1970)
- 4 - R. BACKSTROM et B. SJOBERG  
*Ark. Keml.* 26 549 (1967)
- 5 - B. HALPERN et J. W. WESTLEY  
*Australian J. of Chemistry* 19(8) 1533 (1966)
- 6 - C. DJERASSI et L.E. GELLER  
*J. Amer Chem. Soc.* 81 2789 (1959)
- 7 - R. ROSSI, P. PINO, F. PIACENTI, L. LARDICI et G. DELBINO  
*Gazz. Chim. Ital.* 97(8) 1194 (1967)
- 8 - K. KIESLICH *Microbial Transformations of non steroid cyclic compounds*  
Georg Thiem Publishers Stuttgart p. 17 (1976)
- 9 - T.A. OSSELAER, G.L. LEMIERE, J.A. LEPOIVRE et F.C. ALDERWEIRELDT  
*Bull. Soc. Chim. Belg.* 87(2) 153 (1978)
- 10 - F. BOTTWALT, O. FISCHER et O. WIEDEMANN  
*Liebs. Annal. Chem.* 520 52 (1935)
- 11 - L. MAMOLI  
*Z. Physiol. Chem.* 281 287 (1939)
- 12 - P.D. MEISTER et A. WEINTRAUB  
*U.S. Patent* 2, 877, 162 March 10 (1959).

(Received in France 26 July 1978)