

DÉGRADATION BACTÉRIENNE DE L'ACIDE DÉHYDROABIÉTIQUE PAR *FLAVOBACTERIUM RESINOVORUM**

J. F. BIELLMANN et G. BRANLANT

Laboratoire de Chimie Organique Biologique, Institut de Chimie, 1 rue Blaise Pascal, Université Louis Pasteur, 67-Strasbourg†

et

M. GERO-ROBERT et M. POIRET

Laboratoire d'Enzymologie du C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette

(Received in France 31 August 1972; Received in the UK for publication 12 December 1972)

Résumé—La dégradation de l'acide déhydroabiétique **1a** utilisé comme seule source de carbone par le *Flavobacterium Resinovorum* a été étudiée dans des milieux carencés ou en présence d'un inhibiteur. L'isolement d'un diphenol dicétonique **6a** sous la forme de son éther méthylique, est remarquable. L'originalité de ce genre: attaque préalable en C-3 avant dégradation du système cyclique, est confirmée. La structure des métabolites est établie à partir de données physiques et de corrélation chimique pour quelques-uns d'entre eux.

Abstract—*Flavobacterium Resinovorum* was grown on dehydroabietic acid **1a** as sole carbon and energy source. Slowly growing cultures were obtained either by omission of nitrogen, Fe^{2+} and Mg^{2+} ions or in the presence of an inhibitor (α,α' -dipyridyle). Under these conditions, different intermediates of the metabolic pathway were accumulated. Diphenol diketone **6a** has been isolated. The unique behaviour of bacterial attack at C-3 before the degradation of the cyclic system is confirmed.

Dans un travail précédent,¹ nous avons montré que la dégradation de l'acide déhydroabiétique **1a** (ADA) par le *Flavobacterium Resinovorum* donnait trois produits **2**, **3a** et **4a**. Nous en avons déduit un schéma possible de dégradation Schéma I. L'attaque en C-3 qui semble précéder l'attaque du

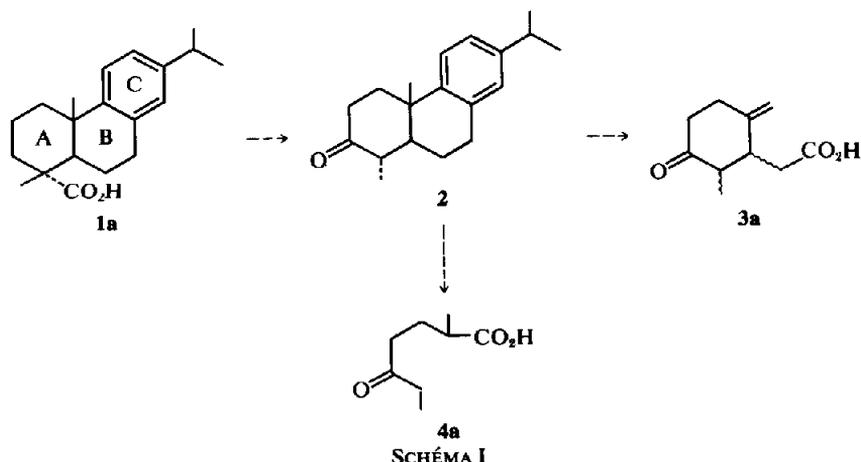
noyau C est caractéristique de ce genre. Le faible nombre de métabolites isolés et l'originalité de la dégradation nous a semblé une justification suffisante pour approfondir l'étude du métabolisme du *Flavobacterium Resinovorum*.

Afin d'isoler d'autres métabolites, nous avons modifié les conditions de culture, notamment nous avons carencé le milieu partiellement ou complètement en ions fer, magnésium ou ammonium, ou nous avons ajouté un inhibiteur l' α,α' -dipyridyle.‡ Afin de faciliter la séparation des produits, nous méthylons par du CH_2N_2 . Nous

*Ce travail a été effectué dans le cadre de la RCP No. 93.

†Laboratoire associé au CNRS.

‡Dans les conditions de culture employées ici, nous n'avons pas détecté la cétoné **2**.



avons ainsi isolé huit métabolites **3a**, **4a**, **5a**, **6a**, **7a**, **8a**, **9a** et **10a** sous la forme de leurs dérivés méthylés **b**. Les variations du rendement des différents métabolites, suivant les conditions de culture, sont indiquées sur le Tableau 2. D'abord, nous discuterons l'établissement de la structure des métabolites, puis nous compléterons le schéma de dégradation de l'acide déhydroabiétique **1a** par le *Flavobacterium Resinovorum*.

La structure de **5b** découle des données suivantes: le spectre de RMN met en évidence la présence d'un méthylène, d'un hydroxyle et d'un ester méthylique. L'oxydation selon Jones donne une cétone identique à la cétone **3b**, pour laquelle une corrélation de structure avait été faite.¹ Il s'agit donc de l'hydroxy-ester insaturé **5b**. La

configuration absolue et relative des trois centres d'asymétrie n'est pas établie.

Le pic moléculaire du spectre de masse du produit **6b** est à 316. Un tel poids moléculaire laisse supposer un squelette carboné peu différent de celui de l'acide déhydroabiétique **1a**. D'après le spectre IR, le produit **6b** serait une dicétone, dont une est conjuguée; la présence de cette dernière est confirmée par le spectre d'absorption UV proche d'une acétophénone *ortho* ou *meta* hydroxylée.² Ainsi le cryptojaponol **18b**³ de structure voisine de **6b** présente un spectre d'absorption UV semblable. Le spectre de RMN est en accord avec la présence de cette acétophénone: un seul proton aromatique, un proton phénolique et un méthoxyle (Tableau 1). Le déblindage du proton

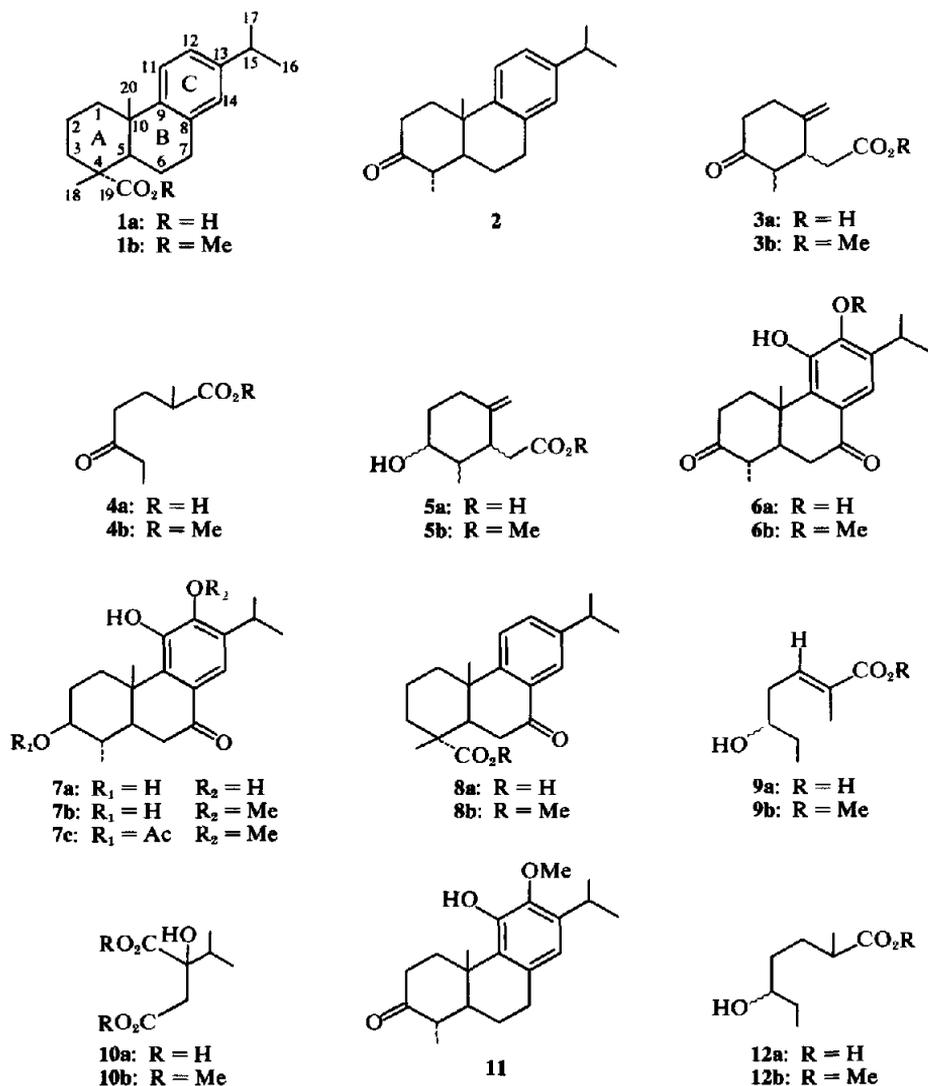


Fig 1.

Tableau 1. Données RMN*

Composés	C-20 Me	Me en C-4	C-3 H	isopropyl	C ₁₁ OH	C ₁₂ OMe	C ₁₄
1b	1.18	1.26		d, 1.20 J 7			
2	1.35	d, 1.11 J 6		d, 1.22 J 7			
17	1.30	d, 1.21 J 7.5		d, 1.22 J 7			
6b	1.57	d, 1.11 J 6		d,d 1.23 J 7, J 1	6.33	3.80	7.61
7b	1.35	d, 1.07 J 5	m vers 3.10	d,d 1.24 J 7, J 1	6.11	3.80	7.60
7c	1.29	d, 0.95 J 5.5	m 4.40	d, 1.25 J 7		3.77	7.92
8b	1.33	1.25		d, 1.24 J 7			7.83
11	1.43	d, 1.12 J 6		d, 1.21 J 7	6.05	3.75	6.48
13a	1.12	d, 1.07 J 5.5	m 3.10	d, 1.22 J 7			
13b	1.13	d, 0.94 J 5.5	m 4.42	d, 1.22 J 7			
14a	1.08	d, 1.04 J 5.5	3.84	d, 1.22 J 7			
14b	1.10	d, 0.93 J 5.5	W _{1/2} 5 Hz 5.00	d, 1.23 J 7			
15a	1.16	d, 0.98 J 7.5	W _{1/2} 4 Hz m 3.66	d, 1.21 J 7			
15b	1.18	d, 0.97 J 7	m 4.85	d, 1.23 J 7			
16a	1.16	d, 0.99 J 7.5	3.83	d, 1.22 J 7			
16b	1.17	d, 1.03	W _{1/2} 5 Hz 4.86	d, 1.23 J 7			
			W _{1/2} 5 Hz				

*Solvant: CDCl₃; déplacement chimique référence TMS exprimé en ppm, couplage en Hz.

aromatique ($\delta = 7.61$ ppm), comparé à celui de l'acétophénone **8b** ($\delta = 7.83$ ppm) est en accord avec la position C-14 pour ce proton. Seule reste à déterminer la position du groupe O-méthyl. La méthylation par le CH₂N₂ du déméthyl cryptojaponol **18a**^{3,4} conduit à un seul produit: le cryptojaponol **18b** dont la structure a été démontrée.⁴ En conséquence, le carbone C-11 porte l'hydroxyle et le C-12 le méthoxyle. Le déplacement chimique du signal correspondant au groupe méthyle C-20 ($\delta = 1.57$ ppm) comparé à celui du métabolite **7b** ($\delta = 1.35$ ppm) laisse deux positions possibles pour le groupe carbonyle non conjugué C-1 ou C-3; l'échange dans l'eau lourde-acide met en évidence six positions échangeables: 5 hydrogènes énoïques et 1 phénolique. Le doublet du méthyle en C-4 se transforme dans le spectre de RMN en un singulet à $\delta = 1.10$ ppm. L'hydrogénolyse de la cétone en C-7 dans **6b** en présence de Pd/C actif⁵ donne un produit **11** dont le spectre de RMN et le dichroïsme circulaire, comparés à la cétone **2**, sont en accord avec la stéréochimie α du méthyle en C-4 et la position en C-3 de la cétone.

L'ensemble de ces arguments est en accord avec la structure **6b** pour ce produit, mais ne la démontre pas en toute rigueur. Toutefois en tenant compte de la structure du produit de départ, la structure **6b** est très raisonnable.

La structure de **7b** découle des données chimiques et spectroscopiques suivantes: le spectre UV indique la présence du même chromophore aromatique que pour **6b**. Les spectres IR et de masse sont en accord avec la présence d'un hydroxyle. L'oxydation selon Jones de **7b** donne quantitativement **6b**. Le carbone C-3 porte donc

l'hydroxyle. Les déplacements en RMN du proton en C-3 et du méthyle en C-4 de **7b** et **7c**, voisins de ceux de **13a** et **13b**, permettent d'attribuer la stéréochimie α du H en C-3 et α du Me en C-4. Les épimères **14a**, **14b**, **15a**, **15b**, **16a** et **16b** présentent pour ces protons des signaux de forme caractéristique, à des déplacements chimiques bien différents (Tableau 1). La variation de la constante de couplage entre les protons du méthyle en C-4 et l'hydrogène en C-4 est remarquable. J 5.5 pour Me α et J 7 à 7.5 pour Me β .

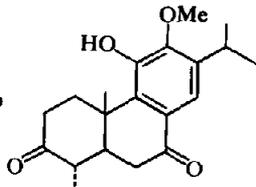
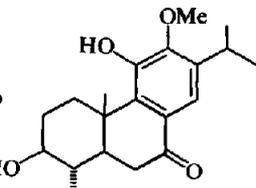
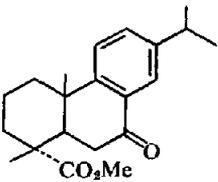
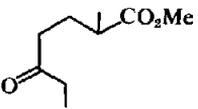
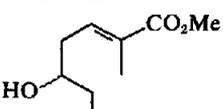
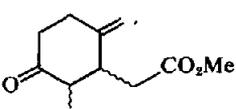
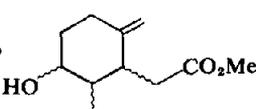
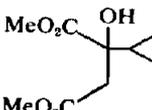
La structure des produits **3b**, **4b** et **8b** a été démontrée par comparaison des spectres de masse et de RMN, avec ceux d'échantillons authentiques.¹ Connaissant le pouvoir rotatoire limite de la cétone **4b**,¹ nous déduisons la pureté optique du métabolite: 58%. La valeur relativement faible, de cette pureté optique, peut s'expliquer par une racémisation en cours d'isolement, ou plutôt par la présence d'une racémase.

Les données spectroscopiques de **9b** sont en accord avec la présence d'un ester α,β -insaturé et d'un alcool. L'hydrogénation catalytique de **9b**, suivie de l'oxydation donne un céto-ester identique au produit **4b**.¹ Ceci établit la structure de **9b**.

Pour le produit **10b** la présence de deux fonctions esters, d'un hydroxyle tertiaire et d'un groupe isopropyle est déduite de ses spectres de RMN, de SM et IR. La saponification de **10b** donne le diacide **10a** dont les données spectroscopiques sont en accord avec celles du produit synthétique.⁵ Le diacide **10a** isolé ici est optiquement actif. La configuration absolue de l'acide 2-isopropyl malique ne semble pas avoir été établie.

L'isolement et l'établissement de la structure

Tableau 2. Tableau récapitulatif des métabolites isolés sous la forme de dérivé méthylé avec les caractéristiques des cultures

	Quant. ADA		Temps de culture (h)	Fe ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , NH ₄ ⁺	Quant. de métabolites recueillie après purification. (mg)
	Quant. DMF g/ml	Concent. ADA %			
 6b	10/80	0.1	38	—	40
 7b	10/80	0.1	38	—	20
 8b	20/160	0.2	120	±*	5
 4b	20/160	0.2	48	+	10
	120/1600	0.06	136	—	350
 9b	120/1600	0.06	136	—	80
 3b	120/1600	0.06	136	—	40
 5b	120/1600	0.06	136	—	140
 10b	120/1600	0.06	136	—	100

* Après 3 hr, addition de α, α' -dipyridyle (1.5 mM).

(–) culture carencée, (+) culture non carencée, (±) carencés à moitié en élément.

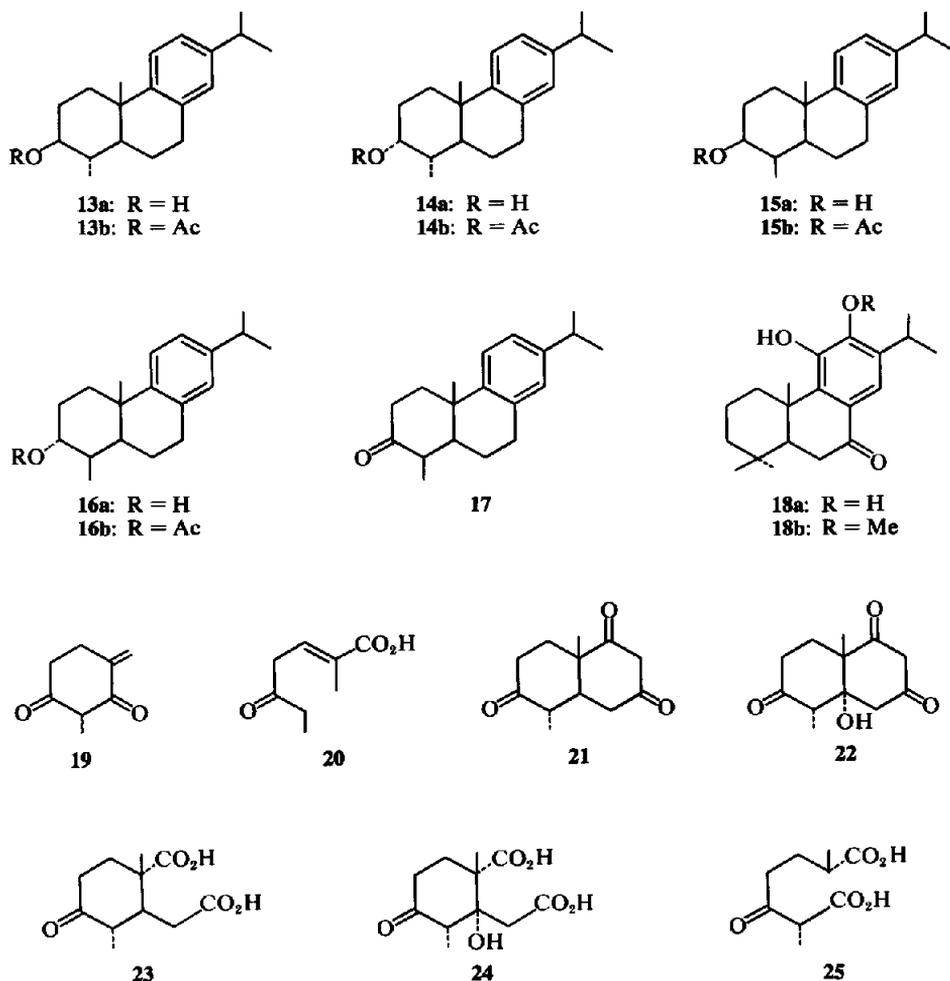


Fig 2.

de ces nouveaux métabolites permettent de compléter le schéma de biodégradation de l'acide déhydroabiétique 1a.¹ (Schéma II).

L'oxydation en C-3 et C-7 précède l'oxydation du noyau aromatique.^{6,7} Mais nous ne savons pas si l'oxydation en C-7 précède celle en C-3 ou inversement.

L'oxydation du noyau aromatique conduit ensuite à la dicétone 6a. La position exacte de l'alcool 7a dans le schéma de dégradation est difficile à déterminer. Lors de la scission du noyau aromatique, on obtiendrait l'acide 2-isopropyl malique 10a et les acides 3a et 5a.

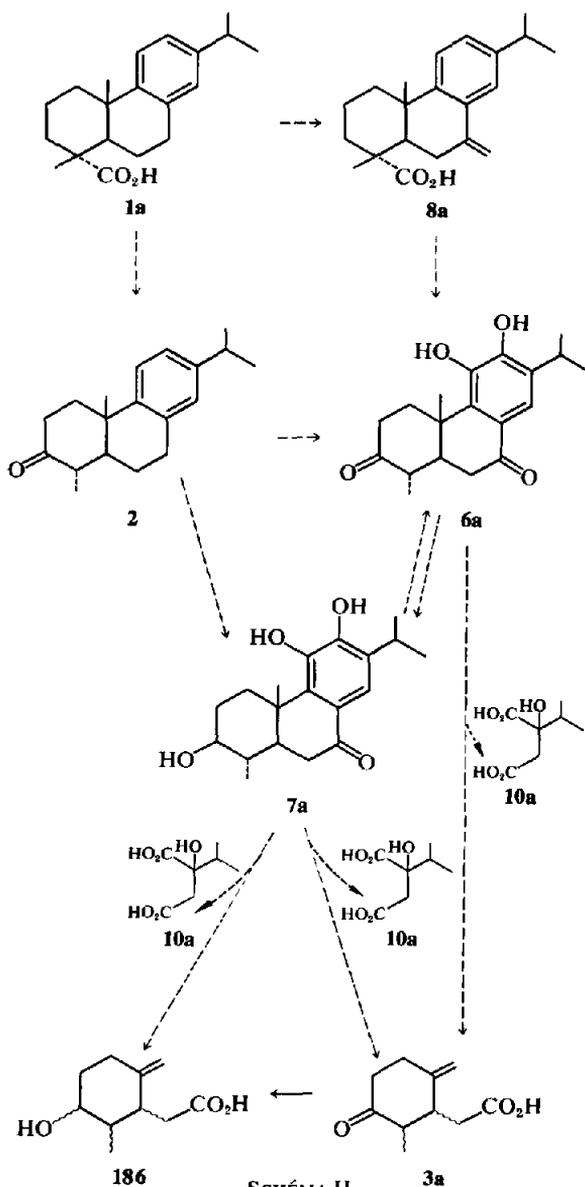
Après hydroxylation en C-5 de 3a, puis oxydation, on obtiendrait l'intermédiaire 19 (Schéma II). L'ouverture du cycle, puis l'isomérisation de la double liaison donneraient l'intermédiaire 20. La réduction de la cétone et de la double liaison de 20 conduiraient respectivement à l'alcool 9a et à la cétone 4a.

En nous inspirant du schéma de biodégradation des souches appartenant au genre *Pseudomonas* et *Alcaligenes* (voir publication suivante), nous préférons proposer un autre schéma de dégradation expliquant la formation de 4a et 9a (Schéma III). Ce schéma évite en particulier l'isomérisation de la double liaison, et la réduction de la double liaison pour obtenir respectivement 9a et 4a.

Après la coupure du noyau aromatique, on obtiendrait les intermédiaires 21 et 22. La dégradation de 21 et 22 conduirait aux diacides 23 et 24, puis 25, 4a et 9a en plusieurs étapes: oxydation, réduction, r etroaldolisation et décarboxylation.

L'isolement de l'acide 2-isopropyl malique 10a semble indiquer que la coupure du noyau aromatique de l'acide déhydroabiétique 1a se fait par coupure *méta*.⁸ (Schéma III').

Cependant l'acide 2-isopropyl malique 10a, étant un précurseur de la leucine,⁵ il n'est pas



prouvé que cet acide provient directement du noyau aromatique de l'acide déhydroabiétique 1a.

PARTIE EXPERIMENTALE

Procédé de culture

Milieu minéral. La solution saline servant à la préparation du milieu est ainsi composée (g/l): Na_2HPO_4 : 2.82 g; KH_2PO_4 : 2.72 g; NH_4Cl : 1 g; MgSO_4 : 0.2 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.005 g. Le pH final du milieu est de 6.8.

Méthode de culture. La source de carbone, l'acide déhydroabiétique 1a, est solubilisée dans la N,N-diméthyl formamide (DMF) (1 g/8 ml) stérilisée à l'autoclave à 120° pendant 20 min, puis ajoutée au milieu minéral à la concentration de 0.1%. Les bactéries sont cultivées à

27° dans un fermenteur type "Biolafitte": agitation 600 t/mn, débit d'air 41/h. Nous suivons la croissance des bactéries par lecture de la densité optique à 660 nm dans de EtOH à 50%. Les cultures sont arrêtées à la fin de la phase exponentielle. Les cellules sont alors éliminées par centrifugation à froid. Le surnageant est concentré par évaporation sous vide à 40°. Après acidification à pH 3.5 nous extrayons à EtOAc.

Variantes. La croissance des bactéries sur l'acide déhydroabiétique 1a est assez rapide (temps de génération 2h). Pour ralentir le métabolisme et provoquer l'accumulation d'intermédiaires, nous carençons, suivant les cas, le milieu partiellement ou totalement en Fe^{++} , Mg^{++} , NH_4^+ ; ou nous ajoutons un inhibiteur 1', α '-dipyridyle. Suivant les métabolites que nous désirons isoler, nous faisons varier la durée d'incubation.

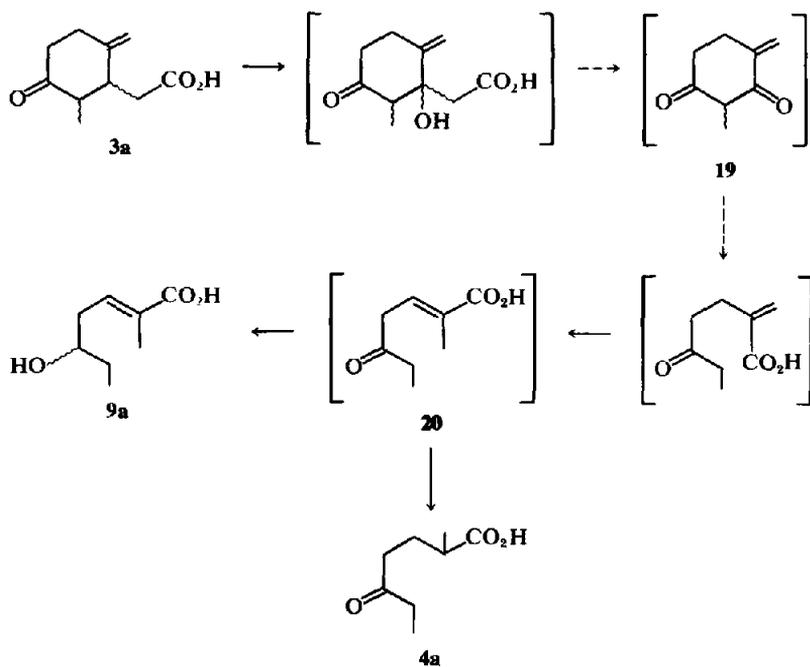


SCHÉMA II'

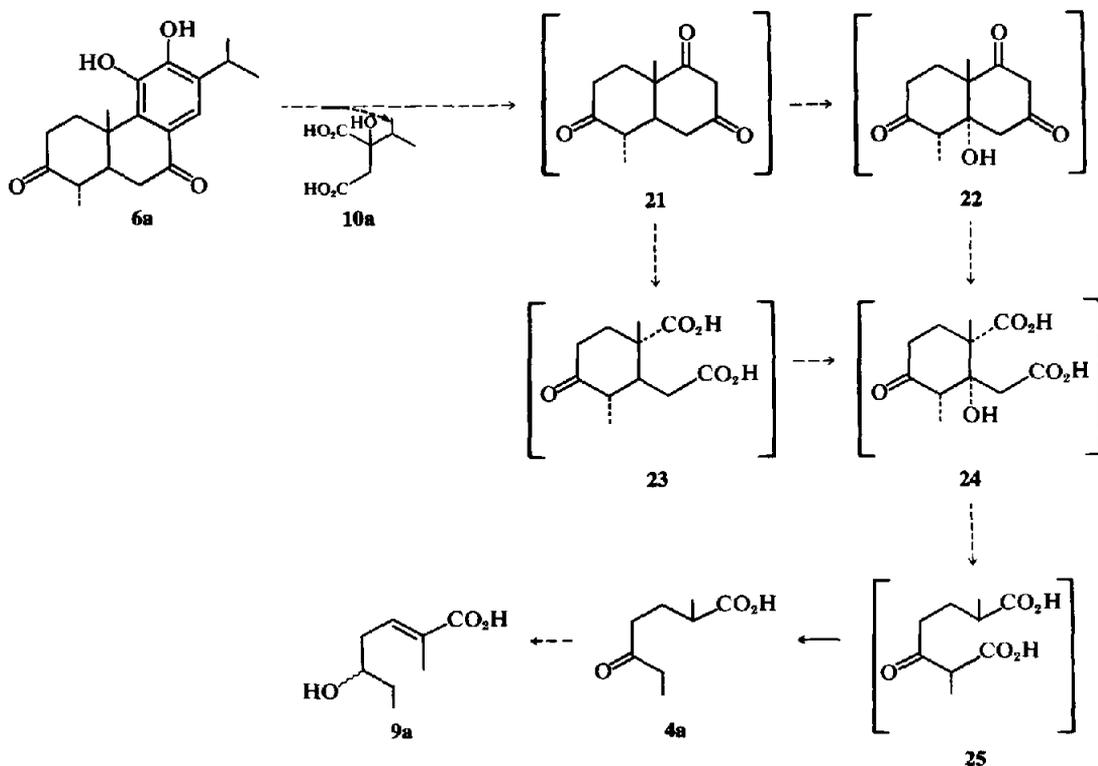


SCHÉMA III

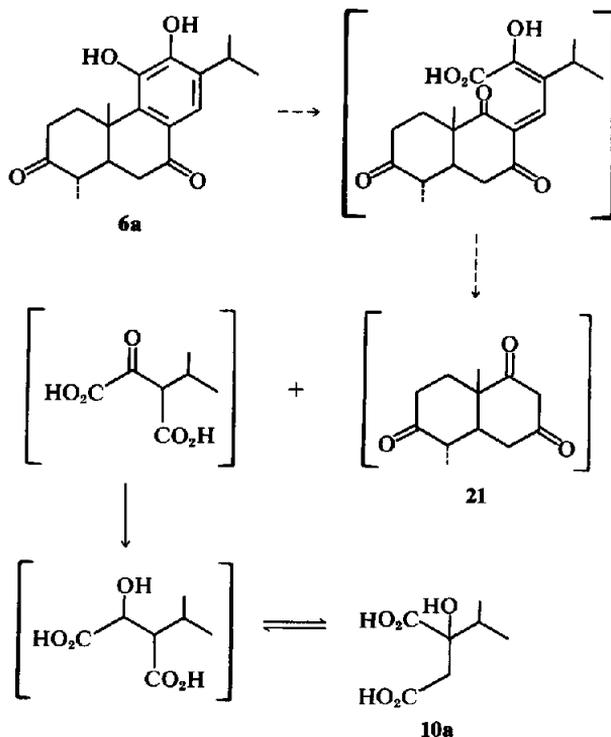


SCHÉMA III'

Isolement des métabolites. L'extrait brut en solution étherée, est traité par un excès de CH_2N_2 . Une première chromatographie sur colonne de silice (élution EtOAc, 50 fois le poids du produit brut) élimine les produits qui ne migrent pas. Une deuxième chromatographie sur colonne de silice (30 fois le poids) donne une assez bonne séparation. Chaque fraction est analysée en chromatographie en phase vapeur analytique (CPV) pour être ultérieurement séparée en CPV préparative.

Isolement de 3b. Par le mélange hexane-AcOEt 85:15, nous éluons la cétone **3b** RMN (CDCl_3) $\text{H}-\text{C}-\text{CH}_3$: $\{\delta = 0.90 \text{ ppm (d, } J \text{ 6.5 Hz)}, \delta = 1.18 \text{ ppm (d, } J \text{ 6.5 Hz)}\}$ 3H; CO_2CH_3 : $\{\delta = 3.68 \text{ ppm (s)}, \delta = 3.70 \text{ ppm (s)}\}$ 3H; $\text{C}=\text{CH}_2$: $\{\delta = 4.92 \text{ ppm}, \delta = 5.00 \text{ ppm}\}$ 2H. IR (CHCl_3): 1740, 1715, 1645 cm^{-1} ; UV (EtOH): $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon = 60$); SM: $M^+ = 196$.

Isolement de 5b. Par le mélange hexane-AcOEt 7:3, nous éluons l'alcool **5b**. RMN (CDCl_3), CH_3 : $\delta = 1.05 \text{ ppm}$ (3H, d élargi); $\{-\text{CH}_2-, \text{CH}-, -\text{OH}\}$: $\delta = 1.2$

à 3.0 ppm (9H); $\begin{matrix} \text{H} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{HO} \end{matrix}$: $\delta = 3.2 \text{ à } 3.7 \text{ ppm}$ (1H, m);

CO_2CH_3 : $\delta = 3.67 \text{ ppm}$ (3H, s); $\text{C}=\text{CH}_2$: $\{\delta = 4.62 \text{ ppm}, \delta = 4.75 \text{ ppm}\}$ (2H). IR (CHCl_3): 3600, 3400, 1722, 1645 cm^{-1} ; SM: $M^+ = 198$; *m/e* 196, 180; éther de triméthyl silane $M^+ = 270$.

Oxydation de 5b. A l'alcool **5b** (10 mg) dissous dans l'acétone (3 ml), nous ajoutons goutte à goutte du réactif de Jones, selon la recette habituelle. Après extraction à l'éther, on récupère un produit (9 mg) identifié à **3b** par comparaison des spectres de RMN, IR et SM.

Isolement de 4b. Par le mélange hexane-AcOEt 85:15, nous éluons la cétone **4b** identifiée par comparaison des spectres de RMN, IR et SM avec un

échantillon authentique. RMN (CDCl_3), CH_3-CH : $\delta = 1.00 \text{ ppm}$ (3H, t, 7 Hz); CH_2-CH : $\delta = 1.14 \text{ ppm}$ (3H, d, J 7 Hz); $-\text{CH}_2-\text{CH}-$: $\delta = 1.5 \text{ à } 1.88 \text{ ppm}$ (3H, m); $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-$: $\delta = 2.08 \text{ à } 2.58 \text{ ppm}$ (4H, m); $-\text{CO}_2\text{CH}_3$: $\delta = 3.66 \text{ ppm}$ (3H, s). IR (CHCl_3): 1735, 1720 cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}} = -13.8^\circ$ ($c = 0.46 \text{ EtOH}$); SM: $M^+ = 172$.

Isolement de 6b. Par le mélange hexane-AcOEt 3:1, nous éluons la dicétone **6b** recristallisé dans hexane-AcOEt (longues aiguilles blanches). F: 220-222°. RMN: Tableau 1. IR (CHCl_3): 3505, 1708, 1678, 1602 cm^{-1} ; UV (EtOH): $\lambda_{\text{max}} = 228.5 \text{ nm}$ ($\epsilon = 16000$); $\lambda_{\text{max}} = 273 \text{ nm}$ ($\epsilon = 9000$); $\lambda_{\text{max}} = 316 \text{ nm}$ ($\epsilon = 3500$); (NaOH 0.1 N): $\lambda_{\text{max}} = 255.5 \text{ nm}$ ($\epsilon = 29000$); $\lambda_{\text{max}} = 296 \text{ nm}$ ($\epsilon = 7000$); $\lambda_{\text{max}} = 377 \text{ nm}$ ($\epsilon = 4300$). $[\alpha]_{\text{D}} = +52.8^\circ$ ($c = 0.46 \text{ EtOH}$); DC (EtOH): $\Delta\epsilon_{337} = +0.29$; SM: $M^+ = 330$ (formule $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ par haute résolution).

Réduction de 6b. La dicétone **6b** (24 mg) dissoute dans de EtOH (16 ml) est hydrogénée en présence de Pd/C 10% actif (16 mg). Après filtration et évaporation du solvant, nous récupérons un mélange (23 mg) séparé en CPV préparative. Nous isolons la cétone **11** (6 mg). RMN: Tableau 1; IR (CCl_4): 3470, 3313, 1706, 1610 cm^{-1} ; UV (EtOH): $\lambda_{\text{max}} = 279 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1300$); $\lambda_{\text{max}} = 273 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1300$); DC (Dioxanne): $\Delta\epsilon_{288} = +0.98$; SM: $M^+ = 316$.

Echange. A la dicétone **6b** (25 mg) dissoute dans CDCl_3 (0.6 ml), nous ajoutons une solution à 37% de DCl dans D_2O (120 mg) dans un tube de RMN. On fait passer un faible débit d'azote afin d'agiter la solution. Nous suivons l'échange en prenant régulièrement le spectre de RMN. Après 4 hr, nous arrêtons l'échange. Après lavage rapide à l'eau (le D phénolique s'échange alors) nous obtenons un produit cristallisé.

Le spectre de masse donne les taux d'incorporation suivants: M: 330 (1%); 331 (6.5%); 332 (20%); 333 (38.6%); 334 (30%); 335 (4.3%); 336 (0%).

Isolement de 7b. Par le mélange hexane-AcOEt 3:2, nous éluons l'hydroxy-cétone **7b** recristallisée dans le CHCl_3 . F: 234.5-235.5°; RMN: Tableau 1; IR (KBr): 3500-3300, 1676, 1595 cm^{-1} ; UV (EtOH): λ_{max} = 229 nm (ϵ = 10500); λ_{max} = 272.5 nm (ϵ = 6100); λ_{max} = 317 nm (ϵ = 2000). $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +48.6° (c = 0.475 EtOH); DC (EtOH): $\Delta\epsilon_{337}$ = +0.59; SM: M^+ = 332 ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ par haute résolution).

Obtention de 7c. Par acétylation pyridinée (2 ml d'Ac₂O, 2 gouttes de pyridine, 15 hr) de l'hydroxy-cétone **7b** (20 mg), nous obtenons l'acétate **7c** (20 mg). RMN: Tableau 1; IR (CHCl_3): 1768, 1722, 1680, 1596 cm^{-1} ; UV (EtOH): λ_{max} = 265 nm (ϵ = 13000); SM: M^+ = 416.

Oxydation de 7b. A l'hydroxy-cétone **7b** (5 mg) dissoute dans l'acétone (2 ml), nous ajoutons goutte à goutte du réactif de Jones, selon la recette habituelle. Après addition d'eau, le produit réactionnel précipite. Le produit est identifié à la cétone **6b** par comparaison des spectres IR et de masse, et son point de fusion.

Isolement de 8b. Par le mélange hexane-AcOEt 9:1, nous éluons la cétone **8b**. F: 52-54°; RMN: Tableau 1; IR (CHCl_3): 1735, 1700, 1610 cm^{-1} ; UV (EtOH): λ_{max} = 254 nm (ϵ = 9000); λ_{max} = 300 nm (ϵ = 1700); SM: M^+ = 328.

Isolement de 9b. Par le mélange hexane-AcOEt 3:1, nous éluons l'ester insaturé **9b**. RMN (CDCl_3): —Me: δ = 0.98 ppm (3H, t, *J* 7 Hz); —CH₂—Me: δ =

1.47 ppm (2H, m); —OH: δ = 1.82 ppm (1H, s); Me—C—

δ = 1.85 ppm (3H, d, *J* 1 Hz); —CH₂—: δ = 2.35 ppm

(2H, t, 7 Hz); HO—C—: δ = 3.71 ppm (1H, m);

CO₂Me: δ = 3.73 ppm (3H, s);

δ = 6.83

ppm (1H, t, d, *J* 7 Hz, *J* 1.5 Hz). IR (CHCl_3): 3600-3500,

1700, 1647 cm^{-1} ; UV (EtOH): λ_{max} = 217.5 nm (ϵ = 30000); $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = 0° (c = 0.225 EtOH); SM: éther de triméthyl silyle M^+ = 244 (172 + 72).

Réduction de 9b. L'ester **9b** (25 mg) dissous dans de EtOH (6 ml) est hydrogéné en présence de Pd/C 10% actif (5 mg). Après filtration et évaporation du solvant, nous récupérons un produit liquide **12b**. RMN (CDCl_3) Me: δ = 0.93 ppm (3H, t, 7 Hz); Me: δ = 1.18 ppm (3H,

d, 7 Hz); >CH—: δ = 2.45 ppm (1H, m); >CH—OH:

δ = 3.53 ppm (1H, m); —CO₂Me: δ = 3.68 ppm (3H, s);

SM: *m/e* 156 M^+ - 18 éther de triméthyl silyle; *m/e* 231 (M^+ - 15).

Oxydation de 12b. A l'alcool **12b** (10 mg) dissous dans l'acétone (2 ml), nous ajoutons goutte à goutte du réactif de Jones selon la recette habituelle. Nous récupérons un produit identifié à la cétone **4b** par comparaison des spectres IR, SM et temps de rétention en CPV analytique (SE-30 15%).

Isolement de 10b. Par le mélange hexane-AcOEt 85:15, nous éluons le diester **10b**. RMN (CDCl_3) Me: δ = 0.88 ppm (3H, d, 6-7 Hz); Me: δ = 0.97 ppm

(3H, d, 6-7 Hz); —CH₂—: δ = 2.81 ppm (2H, s); —CO₂Me: δ = 3.66 ppm (3H, s); —CO₂Me: δ = 3.80 ppm (3H, s). IR (CHCl_3): 3500, 1730 cm^{-1} ; SM: éther de triméthyl silyle *m/e* = 261 (204 + 72 - 15).

Hydrolyse de 10b. Au diester **10b** (30 mg) dissous dans 4 ml EtOH, on ajoute KOH (20 mg). On chauffe sous reflux pendant 24 hr. Après extraction, en continu à l'éther, on récupère le diacide **10a** (25 mg), recristallisé dans l'éther de pétrole. F: 152-154° (lit.³ F: 146-147°) (racémique). RMN (D_2O), Me: δ = 0.87 ppm (3H, d, *J* 2.6 Hz); Me: δ = 0.98 ppm (3H, d, *J* 2.6 Hz); CH₂: δ = 2.90 ppm (2H, d, *J* 3-8 Hz). Lit. RMN (D_2O , TMS réf. externe). Me: δ = 1.19 ppm (3H, d, *J* 2.6 Hz); Me: δ = 1.30 ppm (3H, d, *J* 2-6 Hz); CH₂: δ = 3.22 ppm (2H, d, *J* 3-8 Hz). IR (KBr): 3400, 1740 cm^{-1} lit. IR (KBr): 3400, 1740 cm^{-1} . $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -3.0° (\mp 0.5) (c = 0.026, MeOH à 1% dans l'eau).

Préparation de 3 α -acétoxy-18-Nor(4 α -H) abiéto-8, 11,13 triène (16b).^{1,9} Par acétylation pyridinée (1 ml d'Ac₂O, 1 goutte de Pyridine, 15 hr) de l'alcool **16a** (21 mg), nous isolons l'acétate **16b** (22 mg). SM: M^+ = 314 (15%); *m/e* 299 (1.5%); 254 (13.5%); 239 (100%). (Calc. C₂₁H₃₀O₂: C, 80.21; H, 9.62. Tr.: C, 79.44; H, 9.32%).

Préparation de 18-Nor(4 α -H) abiéto-8,11,13 triène-3-one (17). A l'alcool **16a** (270 mg), nous ajoutons du Na₂Cr₂O₇ (150 mg) dissous dans AcOH (3 ml) et de NaOAc (100 mg). On laisse à température ordinaire pendant 4 hr. Le produit brut est extrait à l'éther. Par chromatographie sur gel de silice (30 g), nous récupérons la cétone **17** cristallisé (182 mg; élution par 7% AcOEt/93% hexane), solvant de recristallisation hexane-AcOEt. F: 72-74°. RMN: Tableau 1. SM: M^+ = 270 (49%); *m/e* 255 (100%); 213 (50%); (Calc. C₁₉H₂₈O: C, 84.40; H, 9.62. Tr.: C, 84.37; H, 9.46%).

Préparation de 3 β -hydroxy-18-Nor(4 α -H) abiéto-8,11, 13 triène 15a. A la cétone **17** (33 mg) dissoute dans EtOH (5 ml), nous ajoutons du NaBH₄ (8 mg). On agite 1 hr. Après évaporation et extraction à l'éther, nous isolons l'alcool **15a** (30 mg). RMN: Tableau 1. SM: M^+ = 272 (49%); *m/e* 257 (56%); 239 (100%).

Préparation de 3 β -acétoxy-18-Nor(4 α -H) abiéto-8,11, 13 triène (15b). Par acétylation pyridinée (2 ml d'Ac₂O, 2 gouttes de pyridine, 15 hr) de l'alcool **15a** (32 mg), nous obtenons l'acétate **15b** (32 mg). RMN: Tableau 1. SM: M^+ = 314 (24%); *m/e* 299 (15%); 254 (6%); 239 (100%). (Calc. C₂₁H₃₀O₂: C, 80.21; H, 9.62. Tr.: C, 80.36; H, 9.78%).

Préparation de 19-Nor(4 β -H) abiéto-8,11,13 triène-3-one (2). A la cétone **17** (133 mg) dissoute dans EtOH (15 ml), nous ajoutons de NaOH (140 mg). On chauffe à reflux pendant 5 hr. Après extraction à l'éther, nous chromatographions sur gel de silice (40 g). Par le mélange hexane-AcOEt 93:7, nous éluons la cétone **2** (95 mg). RMN: Tableau 1. SM: M^+ = 270 (39%); *m/e* 255 (100%); 213 (29%).

Préparation de 3 β -hydroxy- et 3 α -hydroxy 19-Nor(4 β -H) abiéto-8,11,13 triène (13a et 14a). A la cétone **2** (64 mg) dissoute dans EtOH (10 ml), nous ajoutons du NaBH₄ (15 mg). On agite 1 hr. Après évaporation et extraction à l'éther, nous isolons un mélange d'alcool **13a**, **14a** (63 mg). Par chromatographie sur gel de silice (30 g) nous éluons l'alcool α **14a** (12 mg hexane-AcOEt 85:15). RMN: Tableau 1. SM: M^+ = 272 (29%); *m/e* 257 (24%); 239 (100%). Une élution ultérieure à l'hexane-AcOEt 83:17 fournit l'alcool β **13a** (46 mg). RMN: Tableau 1. SM: M^+ = 272 (49%); *m/e* 257 (80%); 239 (100%).

Préparation de 3 β -acétoxy et 3 α -acétoxy 19-Nor(4 β -H) abiéto-8,11,13 triène (13b et 14b). Par acétylation pyridinée (2 ml d'Ac₂O, 2 gouttes de pyridine, 15 hr) de l'alcool 13a (46 mg), nous isolons l'acétate β 13b (46 mg). F: 102-104°; RMN: Tableau 1. SM: M⁺ = 314 (24%); m/e 299 (14%); 139 (100%). (Calc. C₂₁H₃₀O₂: C, 80.21; H, 9.62. Tr.: C, 80.13; H, 9.63%). Par acétylation pyridinée (1 ml d'Ac₂O, 1 goutte de pyridine, 15 hr) de l'alcool 14a (12 mg), nous obtenons l'acétate α 14b RMN: Tableau 1; SM: M⁺ = 314 (15%); m/e 299 (6%); 254 (2%); 239 (100%). (Calc. C₂₁H₃₀O₂: C, 80.21; H, 9.62. Tr.: C, 80.21; H, 9.63%).

REFERENCES

¹J. F. Biellmann, R. Wennig, *Bull. Soc. Chim. France*, 1676 (1971).

²L. Doub, J. M. Vandenbelt, *J. Am. Chem. Soc.* 71, 2414 (1949).

³T. Kondo, M. Suda, M. Teshima, *T. Pharm. Soc. Japan* 82, 1252 (1962).

⁴E. Wenkert, J. D. McChesney, D. J. Watts, *J. Org. Chem.* 35, 2422 (1970).

⁵G. Jungwirth, S. R. Gross, P. Margolin, H. E. Umbarger, *Biochemistry* 2, 1 (1963).

⁶D. R. Brannon, H. Boaz, J. Mabe, D. R. Horton, B. J. Wiley, *Chem. Comm.* 681 (1968); *J. Org. Chem.* 33, 4462 (1968).

⁷A. S. Levinson, B. C. Carter, M. L. Taylor, *Chem. Comm.* 1344 (1968).

⁸S. Dagley, P. J. Chapman, D. T. Gibson, J. M. Wood, *Nature*, 202, 775 (1964).

⁹J. W. Huffman, *J. Org. Chem.* 35, 478 (1970).