

DÉGRADATION BACTÉRIENNE DE L'ACIDE DÉHYDROABIÉTIQUE PAR UN *PSEUDOMONAS* ET UNE *ALCALIGENES**

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—Deux nouvelles souches: *Pseudomonas* sp. et *Alcaligenes Eutrophus* poussant sur l'acide déhydroabiétique **1a** ont été isolées. L'étude du métabolisme a montré que ces deux souches utilisent la même voie: attaque de la position C-7, puis du noyau aromatique suivi du noyau B. L'isolement de l'acide de Ruzicka **11a** comme métabolite est remarquable.

Abstract—Two new strains: *Pseudomonas* sp. and *Alcaligenes Eutrophus* were isolated by aerobic enrichment at 28° in a medium containing dehydroabietic acid **1a** as only source of carbon and energy. Study of isolated intermediates suggests that both species use the same degradative pathway. Attack at C-7 is followed by hydroxylation of the aromatic ring before cleavage of ring B. The outlines of the degradative pathway of dehydroabietic acid by these two species in comparison with *Flavobacterium Resinovorum* are discussed.

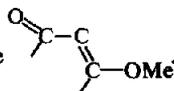
En parallèle avec l'étude du métabolisme de l'acide déhydroabiétique **1a** par le *Flavobacterium resinovorum*,¹ nous avons entrepris des travaux avec deux nouvelles souches qui appartiennent respectivement au genre *Pseudomonas* et *Alcaligenes* et qui utilisent l'acide déhydroabiétique **1a** comme seule source de carbone. La source *Pseudomonas* étudiée ici est différente du *Pseudomonas Resinovorans* qui avait fait l'objet de nos préoccupations.²

Par les mêmes techniques et en utilisant les milieux carencés, comme pour le *Flavobacterium Resinovorum*,¹ nous avons isolé avec les rendements indiqués dans le Tableau 1 sept métabolites: **2a**, **3a**, **4a**, **7a**, **9a**, **10a** et **11a** sous la forme de leurs dérivés méthylés obtenus par action du CH₃N₂ après extraction. Deux produits, les diesters **9b** et **10b**, avaient déjà été isolés lors de la culture du *Pseudomonas Resinovorans*.²

Les données spectroscopiques du produit **3b** sont voisines de celles du produit **12b** isolé à partir de la culture sur l'acide **1a** du *Flavobacterium Resinovorum*:¹ elles indiquent la présence d'un même système aromatique. Le cycle A ne semble pas modifié (ester méthylique). Nous proposons pour ce produit la structure **3b**.

Les produits méthylés **5b** et **6b** sont très voisins. Les spectres IR et UV montrent, à côté d'un ester,

la présence d'une cétone conjuguée



Ceci conduit à penser qu'il s'agit de deux formes éthers d'énol obtenues à partir d'une même β -dicétone. En effet, par hydrolyse acide de **5b** et de **6b**, on obtient le même produit dont le spectre UV est caractéristique d'une β -dicétone cyclique.³ Par ozonisation suivie d'un traitement à l'eau oxygénée en milieu acide et d'une méthylation, les produits **5b** et **6b** donnent le triester **11b** de l'acide de Ruzicka.^{4,5} De ces données découle la structure **4a** (ou ses formes énoliques) pour le métabolite; la configuration absolue, non démontrée, est admise être celle de la formule **4a**, correspondant à celle de l'acide déhydroabiétique **1a**, la configuration relative découle de celle de l'acide de Ruzicka.

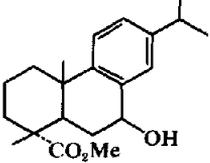
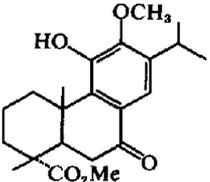
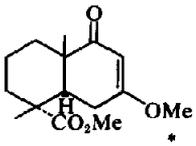
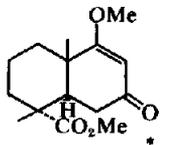
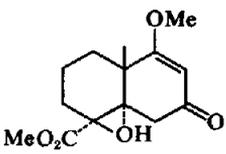
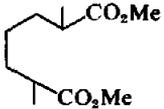
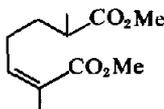
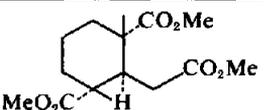
L'ester **8b** a d'après les données spectrales une structure voisine de **5b** et **6b**. Il en diffère d'après le spectre de masse par la présence d'un oxygène. L'inertie du groupe hydroxyle à l'acétylation pyridinée et à l'oxydation selon Jones suggère que ce groupe est un hydroxyle tertiaire: ceci laisse une seule position: C-5. Par suite de la généralité de la rétention de la configuration lors de l'hydroxylation,⁶ on admettra pour l'hydroxyle la configuration α comme indiquée sur la formule **8**.

La structure des esters **2b**, **9b**, **10b** et **11b** a été démontrée par comparaison des données physiques avec celles d'échantillons authentiques.

*Ce travail a été effectué dans le cadre de la RCP n° 93.

†Laboratoire associé au C.N.R.S.

Tableau 1. Tableau récapitulatif des métabolites isolés sous la forme de dérivés méthylés avec les caractéristiques des cultures

	Quant. ADA		Temps de culture (h)	Fe ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , NH ₄ ⁺	Quant. de métabolites recueillis après purification (mg)
	Quant. DMF g/ml	Concent. ADA (%)			
2b 	20/160	0.2	136	—	60
3b 	20/160	0.2	136	—	5
5b 	20/160	0.2	136	—	5
	110/1600	0.05	136	—	110
	20/160	0.2	65	—	6
6b 	20/160	0.2	136	—	4.5
	110/1600	0.05	136	—	50
	20/160	0.2	65	—	
8b 	20/160	0.2	136	—	5
	20/160	0.2	65	—	6
9b 	20/160	0.2	136	—	de 20 à 200 suivant les expériences
	20/160	0.2	65	—	
10b 	20/160	0.2	136	—	de 15 à 160 suivant les expériences
	20/160	0.2	65	—	
11b 	110/1600	0.05	136	—	40

* Isolé également pour *Pseudomonas*.

(-) Carencée.

(+) Non carencée.

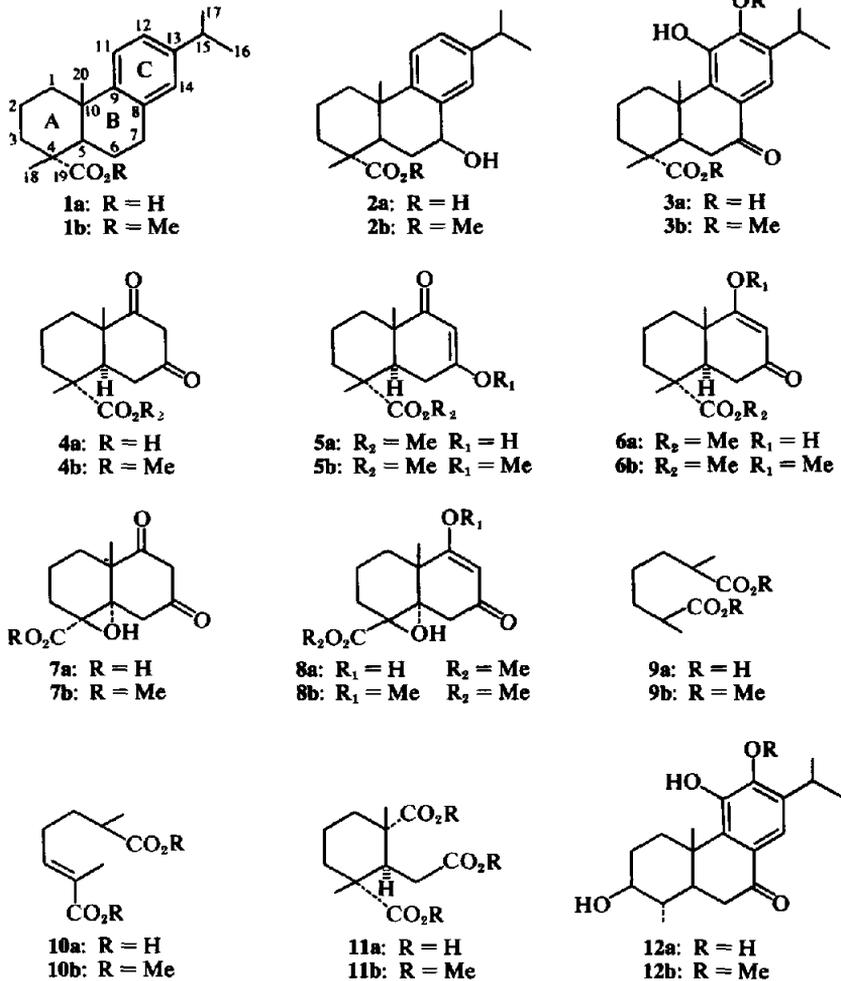


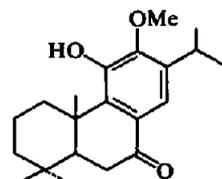
Fig 1.

La structure de ces métabolites étant établie, nous proposons pour ces deux souches le schéma de biodégradation de l'acide déhydroabiétique **1a** (Schéma I). Notons toutefois que les produits **2a**, **3a** et **11a** n'ont pas été isolés de cultures de *Pseudomonas*.

L'oxydation en C-7 constitue la première étape, suivie de celle du noyau aromatique. L'hydroxylation du noyau aromatique pourrait se faire selon le même mécanisme que celle du benzène et du toluène par un *Pseudomonas Putida*: addition réductrice de O₂ sur le système aromatique, donne le diène-diol, qui est ensuite oxydé en diphenol.⁸ (Schéma II).

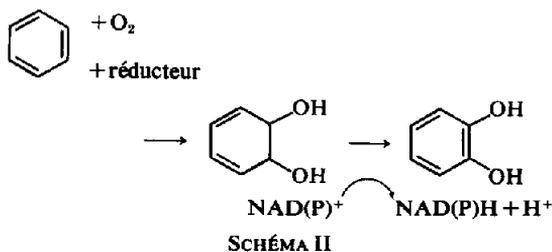
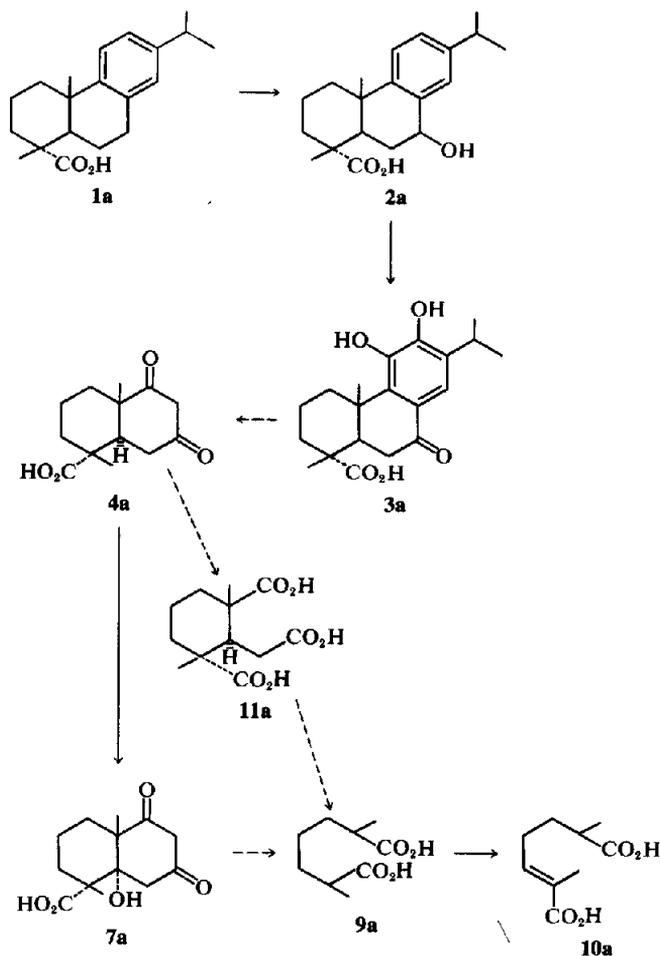
La scission du noyau aromatique qui pourrait se faire par coupure *méta*⁷ avec obtention de l'acide 2-isopropyl malique comme pour le *Flavobacterium Resinovorum*,¹ conduit à la dicétone **4a**. L'hydroxylation de la dicétone **4a** conduit à **7a**. L'ouverture du cycle B (sans préjuger l'exacte séquence

des évènements) conduit à l'acide de Ruzicka **11a**; des oxydations mènent aux diacides **9a** et **10a**. Il est à noter que les deux souches n'oxydent pas l'acide déhydroabiétique **1a** en C-3 à l'opposé du *Flavobacterium Resinovorum*,¹ tous les métabolites isolés possèdent la fonction acide en C-4. La présence de l'acide de Ruzicka qui est obtenu par dégradation oxydante de l'acide abiétique⁴ et qui a servi à l'établissement de la structure des acides diterpéniques, est assez remarquable.



13

Fig 2.



L'isolement sous sa forme méthylée du métabolite 3a de structure voisine de celle du cryptojaponol 13 extrait de la résine de *Cryptomeria Japonica*⁹ pose le problème de l'origine de ce dernier: est-il bien produit par la plante ou bien la résine a-t-elle subi une attaque partielle par une bactérie voisine de celles étudiées ici.

PARTIE EXPERIMENTALE

Isolement des bactéries. Quatorze souches bactériennes ont été isolées par la méthode de culture d'enrichissement sur l'acide déhydroabiétique.¹⁰ Deux ont été retenues pour étude ultérieure: l'une appartenant au genre *Pseudomonas*, l'autre au genre *Alcaligenes*. En

vue d'identification, certains caractères morphologiques et biochimiques des germes isolés ont été établis par des techniques décrites par Stanier *et al.*¹¹

Milieu de culture. La composition du milieu minéral est la suivante en g/l: Na_2HPO_4 : 1.47; KH_2PO_4 : 0.648; NH_4Cl : 1; MgSO_4 : 0.2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.001. Le pH final du milieu est de 7.2. La méthode de culture et les variantes sont les mêmes que celles utilisées pour le *Flavobacterium Resinovorum*.¹

Isolement de 2b. Par le mélange hexane-AcOEt 4:1,

nous éluons l'ester 2b. RMN (CDCl_3), $-\text{CH} \begin{matrix} \text{Me} \\ | \\ \text{Me} \end{matrix}$, $\delta = 1.21$ ppm (6H, d, J 7 Hz); $-\text{Me}$, $\delta = 1.27$ ppm (6H, s); $-\text{CO}_2\text{Me}$, $\delta = 3.65$ ppm (3H, s); $-\text{H}$ benzyl, $\delta = 4.84$ ppm (1H, t, J 7 Hz); $-\text{H}$ arom., $\delta = 7.10$ à 7.33 ppm (3H, m); SM, $M^+ = 330$. F. de l'acétate: 128°.¹²

Isolement de 3b. Par le mélange hexane-AcOEt 85:15, nous éluons l'ester 3b qui prend en masse. F: 194-

196°, RMN (CDCl_3): $-\text{CH} \begin{matrix} \text{Me} \\ | \\ \text{Me} \end{matrix}$, $\delta = 1.24$ ppm (6H, d, J 7 Hz); $-\text{Me}$, $\delta = 1.30$ ppm (3H, s); $-\text{Me}$, $\delta = 1.39$ ppm

(3H, s); $-\text{CO}_2\text{Me}$, $\delta = 3.64$ ppm (3H, s); $-\text{OMe}$, $\delta = 3.79$ ppm (3H, s); $-\text{H}$ phénolique, $\delta = 6.08$ ppm (H, s); $-\text{H}$ aromatique, $\delta = 7.59$ ppm (H, s); IR (CCl_4), 1725, 1680, 1602 cm^{-1} . UV (EtOH), $\lambda_{\text{max}} = 228.5$ nm ($\epsilon = 18,600$); 272 nm ($\epsilon = 10,250$); 326 nm ($\epsilon = 3,300$). $[\alpha]_{\text{D}} = +6^\circ$ ($c = 0.071$, EtOH); DC (EtOH), $\Delta\epsilon_{330} = +0.71$; $\Delta\epsilon_{240} = -1.16$; $\Delta\epsilon_{285} = -1.21$; SM $M^+ = 374$ ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_5$ par haute résolution).

Isolement de 5b. Par le mélange hexane-AcOEt 3:1 à 7:3, nous éluons l'ester 5b, purifié en CPV préparative (SE 30 15%). RMN (CDCl_3): Me, $\delta = 1.09$ ppm (3H, s); Me, $\delta = 1.30$ ppm (3H, s); (CO_2Me , OMe), $\delta = 3.65$ ppm (6H, s); H vinylique, $\delta = 5.18$ ppm (1H, d, J 1 Hz); IR (CCl_4), 1722, 1657, 1612 cm^{-1} (les deux dernières bandes étant de même intensité); UV (EtOH, $\lambda_{\text{max}} = 248$ nm ($\epsilon = 17,000$)); $[\alpha]_{\text{D}} = -59.0^\circ$ ($c = 0.083$, EtOH); DC (EtOH), $\Delta\epsilon_{315} = -0.86$, $\Delta\epsilon_{240} = -2.24$; SM ($M^+ = 266$ (50%); m/e 251 (10%); 234 (6%); 207 (7%); 121 (6%); 98 (100%).

Isolement de 6b. Une élution ultérieure à l'hexane AcOEt 4:1 donne l'ester 6b, purifié en CPV préparative (SE 30 15%). RMN (CDCl_3) Me $\delta = 1.24$ ppm (3H, s) Me $\delta = 1.27$ ppm (3H, s) (CO_2Me , OMe) $\delta = 3.65$ ppm (6H, s) H vinyl. $\delta = 5.19$ ppm (1H, s). IR (CHCl_3) 1724, 1649, 1592 cm^{-1} (les deux dernières bandes étant de même intensité). UV (EtOH) $\lambda_{\text{max}} = 250$ nm ($\epsilon = 21,500$) $[\alpha]_{\text{D}} = +17.7^\circ$ ($c = 0.265$, EtOH). DC (EtOH) $\Delta\epsilon_{300} = +3.10$, $\Delta\epsilon_{285} = -2.14$. SM $M^+ = 266$ (80%); m/e 251 (15%); 207 (28%); 152 (100%); 125 (92%).

Hydrolyse acide de 5b et 6b. A 0.01 mM de produit, nous ajoutons HCl M (0.5 ml). Après agitation pendant 24 h sous azote, un précipité se forme. Le rendement de la réaction est d'environ 50%, le reste étant le produit de départ. Nous obtenons pour les deux éthers d'énol le même produit 4b. F: 179–181°. UV (EtOH) $\lambda_{\text{max}} = 282.5$ nm ($\epsilon = 18,600$) (NaOH 0.1 N) $\lambda_{\text{max}} = 283$ nm ($\epsilon = 23,000$) (HCl 0.1 N) $\lambda_{\text{max}} = 252.5$ nm ($\epsilon = 15,000$) (Hexane) $\lambda_{\text{max}} = 280$ nm ($\epsilon = 50$). $[\alpha]_{\text{D}} = -60.0^\circ$ ($c = 0.038$, EtOH). DC (EtOH) $\Delta\epsilon_{315} = -0.85$; $\Delta\epsilon_{252} = -2.25$; $\Delta\epsilon_{215} = +0.98$ SM $M^+ = 252$.

Ozonisation de 5b et 6b. Dans une solution d'énol 5b ou 6b (8 mg), dans EtOAc (1 ml), nous faisons passer à 0° pendant 2 h un courant d'oxygène à 2% d'ozone. Après élimination de l'excès d'ozone par un courant d'azote, la solution est mise à sec. Au résidu, nous ajoutons de AcOH (0.5 ml), de HCl (2 gouttes) et de l'eau oxygénée à 30% (0.4 ml). La solution est agitée à température ordinaire pendant une nuit, puis chauffée sous reflux 1 h. Après évaporation, le résidu est méthylié avec une solution étherée de CH_2N_2 , puis extrait au benzène. Après lavage à l'eau, puis avec une solution saturée de NaHCO_3 ,

Note: Par commodité pour les différencier, nous attribuons arbitrairement les formules 5b et 6b aux deux éthers d'énol.

*Nous tenons à remercier le Prof. W. Parker qui nous a aimablement fourni un échantillon de l'acide de Ruzicka 11a.

enfin à l'eau, nous récupérons un produit brut (10 mg), purifié en CPV préparative (SE 30 15%). Les deux éthers d'énol donnent le même produit 11b.*

RMN (CDCl_3) $-\text{CH}_3$ $\delta = 1.20$ ppm (6H, s) $-\text{CH}_2-$ $\delta = 2.25$ ppm (2H, d, J 6 Hz) $-\text{CO}_2\text{Me}$ $\delta = 3.63$ ppm (9H, s) IR (CCl_4) 1730, 1437, 1388, 1320, 1240, 1125, 1105 cm^{-1} SM $M^+ = 300$.

Isolement de 8b. Avec l'ester 6b, nous éluons le produit 8b légèrement plus polaire, que nous séparons de 6b par CPV préparative (SE 30 15%). RMN (CDCl_3) Me $\delta = 1.27$ ppm (3H, s) Me $\delta = 1.45$ ppm (3H, s) (CO_2Me , OMe) $\delta = 3.69$ ppm (6H, s) H vinylique $\delta = 5.30$ ppm (1H, s) IR (CCl_4) 1702, 1661, 1618 cm^{-1} (les deux dernières bandes étant de même intensité). UV (EtOH) $\lambda_{\text{max}} = 248$ nm ($\epsilon = 10,500$) $[\alpha]_{\text{D}} = +20.5^\circ$ ($c = 0.161$, EtOH). DC (EtOH) $\Delta\epsilon_{300} = +1.54$; $\Delta\epsilon_{262} = -1.40$ SM $M^+ = 282$; m/e 264 (M-18) ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$ par haute résolution).

Isolement de 9b et 10b. Par le mélange hexane-AcOEt 9:1, nous éluons un mélange de deux esters 9b et 10b que nous séparons en CPV préparative (SE-30 15%). Les données sont en accord avec celles d'échantillon authentique.² Nous n'avons démontré si l'ester 9b, d'activité optique nulle, était méso ou dl.²

Isolement de 11b. Par le mélange hexane-AcOEt 4:1, nous éluons un produit liquide, l'ester de l'acide de Ruzicka 11b, que nous purifions en CPV préparative (SE-30 15%). Toutes les données sont en accord avec celles d'échantillon authentique.^{4,5}

REFERENCES

- J. F. Biellmann, G. Branlant, M. Gero-Robert, M. Poirat, *Tetrahedron* **29**, 1227 (1973)
- J. F. Biellmann, R. Wennig, *Bull. Soc. Chim. France* 1676 (1971)
- A. I. Scott, *Interpretation of the Ultra-Violet Spectra of Natural Products*, p. 69 et 267. Pergamon Press, Oxford (1964)
- L. Ruzicka, W. M. Goldberg, H. W. H. Hyser, C. F. Seidel, *Helv. Chim. Acta* **14**, 545 (1931)
- J. Martin, W. Parker, R. A. Raphael, *J. Chem. Soc.* 348 (1967); *Chem. Comm.* 633 (1965)
- A. J. Polito, C. C. Sweeley, *J. Biol. Chem.* **246**, 4178 (1971); P. Talalay, *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 347 (1965)
- S. Dagley, P. J. Chapman, D. T. Gibson, J. M. Wood, *Nature* **202**, 775 (1964)
- D. T. Gibson, M. Hensley, H. Yoshioka, T. J. Mabry, *Biochemistry* **9**, 1626 (1970); D. T. Gibson, G. E. Cardini, F. C. Maseles, R. E. Kallio, *Ibid.* **9**, 1631 (1970)
- T. Kondo, M. Suda, M. Teijima, *T. Pharm. Soc. Japan* **82**, 1252 (1962)
- M. Robert-Gero, M. Poirat, R. Y. Stanier, *J. Gen. Microbiol.* **57**, 207 (1969)
- R. Y. Stanier, N. J. Palleroni, M. Doudoroff, *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159 (1966)
- R. Wennig, *Thèse de Doctorat d'Etat-ès-Sciences Physiques*, Strasbourg, n° AO 4265 (1970)