

## Antigénicité et pouvoir immunogène des toxines extraites des venins d'Elapidae et d'Hydrophiidae

par P. BOQUET, Y. IZARD, C. DUMAREY et J. DÉTRAIT,  
Institut Pasteur, F-92 Garches (France).

Peu après la découverte des propriétés immunogènes de la sécrétion venimeuse des ophidiens, l'expérience démontra que le sérum des animaux auxquels on injecte, par la voie sous cutanée, le venin de serpents appartenant à une même espèce non seulement neutralise spécifiquement ce venin mais aussi atténue ou parfois même prévient les symptômes de l'intoxication produite par la morsure de serpents d'espèces différentes. L'étude des symptômes de l'envenimation devait simultanément conduire à distinguer plusieurs catégories de venins: ceux d'Elapidae et d'Hydrophiidae étant décrits comme des poisons du système nerveux et ceux des Viperidae et des Crotalidae comme des sécrétions capables de provoquer un choc, des hémorragies, des oedèmes et la nécrose des tissus envenimés. Sans doute cette distinction devait-elle être considérée ultérieurement comme un schéma très simplifié. Elle faisait apparaître néanmoins que des venins élaborés par des serpents appartenant à des familles, des genres et des espèces différentes produisent parfois les mêmes effets et conduisait à penser que ces venins contiennent vraisemblablement des composants identiques ou de constitution très voisine. Des recherches plus précises démontrèrent alors que l'immunisation d'un animal par des injections répétées d'un venin sollicite la synthèse d'anticorps capables de se combiner aux toxines et aux enzymes de ce venin et à divers constituants homologues d'autres venins. On s'efforça dès lors d'obtenir ces substances à l'état pur afin d'en préciser non seulement les caractères chimiques et physiques mais encore les propriétés physio-pathologiques et immunologiques. Indépendamment des recherches développées par les biochimistes, CHRISTENSEN<sup>1</sup>, dès 1958, avait décelé par un procédé immunologique la présence de 3 toxines antigéniquement différentes dans le venin d'un Elapidae: *Naja nivea*. C'est en dissociant l'antigène de l'anticorps du précipité formé dans les mélanges, en proportions différentes, du venin et de l'immunsérum spécifique que CHRISTENSEN obtint ce résultat.

De très nombreuses protéines toxiques, ont été récemment extraites des venins de serpents et plus particulièrement de ceux des Elapidae et des Hydrophiidae. En raison de la très grande sensibilité des réactions immunologiques dont la spécificité est étroitement liée à la composition chimique et à la structure des antigènes nous avons tenté d'établir une classification sérologique de ces protéines. Nos essais ont porté sur l'étude de 18 d'entre elles dont nous

disposons. Les résultats de ces expériences permettent de répartir ces 18 protéines dans trois groupes<sup>2</sup>.

Dans le premier groupe, ou groupe I, sont réunies des toxines dont chaque molécule est constituée par une chaîne de 61 à 62 résidus d'acides aminés dont les replis sont maintenus par 4 ponts disulfures. Ces toxines sont des protéines basiques qui possèdent la propriété de se fixer sur les récepteurs cholinergiques des terminaisons nerveuses<sup>3,4</sup>.

Le groupe II comporte des protéines dont la constitution est voisine de celle des précédentes protéines mais qui s'en distinguent cependant par leurs propriétés physio-pathologiques. Ce sont des agents modificateurs de la perméabilité des membranes cellulaires<sup>5</sup>. Elles perturbent le cycle du calcium dans le tissu musculaire<sup>6</sup> et provoquent in vivo des troubles du rythme cardiaque d'où leur nom de cardiotoxines. Quant aux protéines du groupe III elles sont représentées par des molécules composées de 71 à 74 acides aminés disposés également en une seule chaîne mais elles sont caractérisées par la présence de 10 ponts disulfures. Comme les protéines du groupe I, celles du groupe III possèdent une affinité spécifique pour les récepteurs cholinergiques de la cellule nerveuse<sup>7</sup>.

Nous rappelons dans le Tableau I la composition chimique des toxines  $\alpha$  du venin de *Naja nigricollis*<sup>8,9</sup>,  $\gamma$  du même venin<sup>10,11</sup> et celle de la bungarotoxine  $\alpha$  du venin de *Bungarus multicinctus*<sup>12</sup> qui appartiennent respectivement aux groupes sérologiques I, II et III. On remarquera qu'en dépit d'analogies de structure résultant de la disposition de 4 ponts disulfures, peu de résidus d'acides aminés sont communs aux 3 toxines des groupes I, II et III.

<sup>1</sup> P. A. CHRISTENSEN, South African Inst. Med. Res., Johannesburg 1956, vol. 1, p. 129.

<sup>2</sup> P. BOQUET, Y. IZARD et A. M. RONSSERAY, C. r. Acad. Sci., Paris 271, Ser. D, 1456 (1970).

<sup>3</sup> F. TAZIEFF-DEPIERRE et J. PIERRE, C. r. Acad. Sci., Paris 263, Ser. D, 1785 (1966).

<sup>4</sup> J. L. BOURGEOIS, S. TSUJI, P. BOQUET, J. PILLOT, A. RYTER et J. P. CHANGEUX, FEBS Lett. 16, 92 (1971).

<sup>5</sup> P. BOQUET JR., C. r. Acad. Sci., Paris 271, Ser. D, 2422 (1970).

<sup>6</sup> F. TAZIEFF-DEPIERRE, M. CZASKA et C. LOWAGIE, C. r. Acad. Sci., Paris 268, Ser. II, 2511 (1969).

<sup>7</sup> C. C. CHANG et C. Y. LEE, Archs int. Pharmacodyn., 144, 241 (1963).

<sup>8</sup> E. KARLSSON, D. EAKER et J. PORATH, Biochim. biophys. Acta 127, 505 (1966).

<sup>9</sup> D. EAKER et J. PORATH, Japan J. Microbiol. 11, 353 (1967).

<sup>10</sup> Y. IZARD, M. BOQUET, A. M. RONSSERAY et P. BOQUET, C. r. Acad. Sci., Paris 269, Ser. D, 96 (1969).

<sup>11</sup> E. KARLSSON and D. EAKER, communication personnelle.

<sup>12</sup> D. MEBS, K. NARITA, S. IWANAGA, Y. SAMEJIMA et C. Y. LEE, Biochim. biophys. Res. Commun. 44, 741 (1971).

Tableau I. Toxines appartenant aux groupes sérologiques I, II et III

I. <i>N. nigricollis</i> <i>tox. α.</i>	H-Leu-Glu-Cys-His-Asn-Gln-Gln-Ser-Ser-Gln-Pro-Pro-Thr-Thr-Lys-Thr-Cys-Pro-Gly-Glu-Thr-Asn-Cys-Tyr-Lys-Lys-Val-Trp-Arg-Asp-His-Arg-Gly-Thr-Ile- <sup>(30)</sup>
II. <i>N. nigricollis</i> 14 (γ) <sup>a)</sup>	H-Leu-Lys-Cys-Asn-Gln-Leu-Ile-Pro-Pro-Phe-Trp-Lys-Thr-Cys-Pro-Lys-Gly-Lys-Asn-Leu-Cys-Tyr-Lys-Met-Thr-Met-Arg-Ala-Ala-Pro-Met-Val-Pro-Val-Lys- <sup>(30)</sup>
III. <i>B. multinctus</i> <i>α bungarotoxine</i> <sup>13</sup>	H-Ile-Val-Cys-His-Thr-Thr-Ala-Thr-Ile-Pro-Ser-Ser-Ala-Val-Thr-Cys-Pro-Pro-Gly-Glu-Asn-Leu-Cys-Tyr-Arg-Lys-Met-Trp-Cys-Asp-Ala-Phe-Cys-Ser-Ser- <sup>(30)</sup>
<i>N. nigricollis</i> <i>tox. α.</i>	Ile-Glu-Arg-Gly-Cys-Gly-Cys-Pro-Thr-Val-Lys-Pro-Gly-Ile-Lys-Leu-Asn-Cys-Cys-Thr-Thr-Asn-Lys-Cys-Asn-Asn-OH <sup>(60) (61)</sup> (I)
<i>N. nigricollis</i> 14 (γ).	Arg-Gly-Cys-Ile-Asp-Val-Cys-Pro-Lys-Ser-Ser-Leu-Leu-Ile-Lys-Tyr-Met-Cys-Cys-Asn-Thr-Asp-Lys-Cys-Asn-OH <sup>(50)</sup> (II)
<i>α Bungarotoxine</i>	Arg-Gly-Lys-Val-Val-Glu-Leu-Gly-Cys-Ala-Ala-Thr-Cys-Pro-Ser-Lys-Lys-Pro-Tyr-Glu-Glu-Val-Thr-Cys-Cys-Ser-Thr-Asp-Lys-Cys-Asn-His-Pro-Pro-Lys-Arg- <sup>(60) (70)</sup>
	Gln-Pro-Gly-OH <sup>(74)</sup> (III)

Italique = Séquences communes aux toxines α et γ (*N. nigricollis*).

Mi-gras = Séquences et ponts S. S. communs aux 3 toxines.

<sup>a)</sup> E. KARLSSON et D. EAKER, communication personnelle.

Tableau II. Toxines appartenant au groupe sérologique I

1. <i>N. nigricollis. tox. α.</i> <sup>9</sup>	H-Leu-Glu-Cys-His-Asn-Gln-Gln-Ser-Ser-Gln-Pro-Pro-Thr-Thr-Lys-Thr-Cys-Pro-Gly-Glu-Thr-Thr-Asp-Cys-Tyr-Lys-Lys-Val-Trp-Arg-Asp-His-Arg-Gly-Thr-Ile-Ile-Glu- <sup>(70)</sup>
2. <i>N. hajie tox. α.</i> <sup>18</sup>	Gln-Arg- Ser-Thr- Tyr-Arg- Thr-Ile-Ile- Phe- Ser- Gln- Asn- Arg- Glu-Ser-Glu-Val
3. <i>N. naja atra</i> Cobrotoxin <sup>14</sup>	Thr-Thr-Gly-Ser-Gly-Arg- Lys-Thr-Pro-Ser-Ser-Glu-Ser-Asn- Gln- Ser- Glu-Ile-Asn- Lys-Leu-Ser- Glu-Ile-Asn- Pro- Thr- Ser- Glu-Val
4. <i>L. semifasciata</i> Erabutoxine «a» <sup>15</sup>	1 Arg-Gly-Cys-Gly-Cys-Pro-Thr-Val-Lys-Pro-Gly-Ile-Lys-Leu-Asn-Cys-Cys-Thr-Thr-Asn-Lys-Cys-Asn-Asn-OH 2 Lys-Glu-Ile-Asn- 3 Asn-Glu-Ile-Asn-Arg 4 Thr-Pro-Lys-Leu-Ser-Glu-Ser-Glu-Val

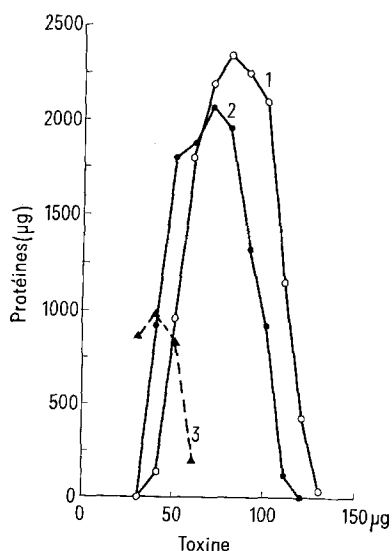
Si nous comparons, au contraire, la composition de 4 toxines du groupe sérologique I prises pour exemple: *N. nigricollis*  $\alpha$ , *N. haje*  $\alpha$ , *cobrotoxine*, *erabutoxine* « $\alpha$ » nous constatons que celles-ci sont de constitution très proche et ne diffèrent que par un petit nombre de résidus d'acides aminés (Tableau II). Cependant plus ce nombre d'acides aminés est grand moins un sérum équin de référence antivenin de *Naja nigricollis* précipite ces toxines ainsi qu'en témoignent les résultats d'une épreuve de précipitation quantitative représentés par les courbes de la Figure. Dans les conditions de cette expérience le précipité apparu dans les mélanges d'immunsérum et d'erabutoxine était indosable. La présence de déterminants antigéniques communs à cette toxine et aux trois autres toxines a pu être démontré par la technique de précipitation selon OUCHTERLONY<sup>16</sup> et par l'extraction de l'immunsérum de référence antivenin de *N. nigricollis* d'anticorps capables de réagir non seulement sur la toxine  $\alpha$  du venin de *Naja nigricollis* mais aussi sur l'erabutoxine « $\alpha$ » du venin de *Laticauda semifasciata*<sup>17</sup>.

Les propriétés neutralisantes des sérums antivenimeux obtenus en injectant le venin tel quel aux animaux d'expérience ont conduit à conclure que les toxines de faibles poids moléculaires actuellement connues sont immunogènes. Néanmoins il convenait de démontrer que ces substances possèdent la propriété de solliciter la production d'anticorps lorsqu'on les administre dans les mêmes conditions à l'état pur, c'est-à-dire privées de toutes les protéines du venin auxquelles on pourrait attribuer le rôle d'un «support» capable de leur conférer l'immunogénicité. Pendant longtemps on a admis que les protéines, dont le poids moléculaire est inférieur à 10.000, sont dépourvues de

pouvoir immunogène. Cette opinion a été infirmée par la suite mais l'expérience a démontré que les protéines de faible poids moléculaire sont en général peu immunogènes. Tel est le cas de la protéine  $\alpha$  du venin de *Naja nigricollis* lorsqu'elle est injectée à doses non mortelles au lapin pendant plusieurs semaines dans les conditions que nous avons définies<sup>18,19</sup>. Dans cet ordre de faits, nous avons constaté que la toxine  $\alpha$  marquée par le tritium<sup>20</sup> puis injectée sous la peau de souris de 18 à 20 g est rapidement éliminée par les reins de l'animal, en partie sous la forme d'un produit précipitable par le sérum antivenin de *N. nigricollis*. Ce fait conduit à penser qu'une fraction importante de la toxine injectée échappe aux mécanismes responsables de la synthèse des anticorps.

Le pouvoir immunogène d'une protéine est sous la dépendance de sa structure chimique et de son état physique. Dans cet ordre de faits, DREISSER<sup>21</sup> a démontré que l'immunoglobuline bovine G, en solution, crée un état de tolérance immunologique lorsqu'on l'injecte à la souris par la voie péritonéale mais que la même substance, sous la forme d'aggrégats, sollicite la production d'anticorps. Selon ANDERER et SCHLUMBERGER<sup>22</sup>, d'autre part, l'injection intraveineuse de ribonucléase telle quelle n'est pas suivie d'une synthèse importante d'anticorps spécifiques. Au contraire, l'injection de la même substance à l'état de polymères accroît sensiblement cette synthèse. Fondant nos expériences sur ces observations nous avons étudié le pouvoir immunogène de monomères et de polymères obtenus en traitant la toxine  $\alpha$  du venin de *Naja nigricollis* par la formaldéhyde<sup>19</sup> et par la glutaraldehyde<sup>23</sup>.

Le toxoïde soluble que nous avons obtenu en ajoutant la formaldéhyde à la protéine  $\alpha$  dans les proportions respectives de  $1,47 \times 10^{-4} M$  et de  $3,8 \times 10^{-2} M$  puis en maintenant pendant 8 jours à 37°C ce mélange tamponné par des phosphates à pH 7,3 contient plusieurs populations moléculaires que nous avons isolées par des filtrations successives sur Séphadex G50. Les fractions III, II et I correspondent respectivement à des monomères, des dimères et à une population hétérogène de polymères formés de 3 à 10 molécules. Les poids moléculaires des 3 fractions ont



Précipitation quantitative faite au moyen d'un sérum équin antivenin de *Naja nigricollis*. 1. Toxine  $\alpha$  du venin de *Naja nigricollis*. 2. Toxine  $\alpha$  du venin de *Naja haje*. 3. Cobrotoxine du venin de *Naja naja atra*.

<sup>13</sup> D. P. BOTES et D. J. STRYDOM, J. biol. Chem. 244, 4147 (1969).

<sup>14</sup> C. C. YANG, H. G. YANG et J. S. HUANG, Biochim. biophys. Acta 188, 65 (1969).

<sup>15</sup> S. SATO et N. TAMIYA, Biochem. J. 122, 453 (1971).

<sup>16</sup> O. OUCHTERLONY, Acta path. microbiol. scand. 26, 507 (1949).

<sup>17</sup> J. DETRAIT et P. BOQUET, C. r. Acad. Sci., Paris 274, Ser. D, 1765 (1972).

<sup>18</sup> C. DUMAREY, Ann. Inst. Pasteur 121, 675 (1971).

<sup>19</sup> C. DUMAREY et P. BOQUET, C. r. Acad. Sci. 275, Ser. D, 3053 (1972).

<sup>20</sup> A. MENEZ, J. L. MORGAT, P. FROMAGEOT, P. BOQUET et J. P. CHANGEUX, FEBS Lett. 17, 333 (1971).

<sup>21</sup> D. W. DREISSER, Immunology 5, 378 (1962).

<sup>22</sup> F. A. ANDERER et H. D. SCHLUMBERGER, Immunochemistry 6, 1 (1969).

<sup>23</sup> C. DUMAREY et P. BOQUET, expériences inédites.

été déterminés, d'une part, par une filtration sur Séphadex, en comparant le volume d'élution de chacune des fractions à celui de protéines prises pour échantillons de référence, et, d'autre part, par ultracentrifugation.

Injecté à des lapins, tel quel, ou incorporé à du mélange de Freund ce toxoïde  $\alpha$ , sous la forme de molécules monomères ou de polymères composés de 3 à 10 unités, est immunogène. Les résultats de cette expérience sont groupés dans le Tableau III. Au contraire, l'emploi, dans les mêmes conditions, d'une protéine  $\alpha$  insoluble, hautement polymérisée par l'addition de formaldéhyde dans la proportion  $1,47 \times 10^{-4} M$  pour  $3,8 \times 10^{-2} M$  de protéine, ou de glutaraldéhyde (Koch-Light à 25%) à raison de  $1,47 \mu l$ ,  $7,17 \mu l$  et  $40 \mu l$  par ml de toxine (le séjour de ces derniers mélanges à  $18-20^\circ$  ne dépassant pas 1 h) est demeuré sans effet. Dans l'état actuel des expériences, nous pensons que ces polymères ont subi des modifications telles que leurs propriétés immunologiques ont été profondément altérées. Dans le même ordre de faits, en injectant à des lapins un toxoïde soluble obtenu en traitant la cobrotoxine du venin de *Naja naja atra* par le thio-isocyanate de fluorescéine CHANG et YANG<sup>24</sup> puis CHANG<sup>25</sup> ont recueilli un sérum précipitant et neutralisant la cobrotoxine.

Le problème de la nature des anticorps spécifiques des toxines de faible poids moléculaire isolées des venins d'Elapidae et d'Hydrophiidae demeurerait à résoudre. Disposant de quantités insuffisantes de sérum de lapins pour entreprendre une expérience d'extraction de ces anticorps, nous avons eu recours à l'emploi du sérum équin de référence antivenin de *Naja nigricollis*<sup>17</sup>. La toxine  $\alpha$  a été fixée d'une manière covalente sur le Sépharose 4B (Pharmacia) activé par le bromure de cyanogène selon la méthode décrite par AXEN et PORATH<sup>26</sup>. La suspension fut ensuite mise en contact avec l'immunsérum antivenin de *Naja nigricollis*. Le complexe formé d'antigène  $\alpha$  et d'anticorps fut alors dissocié par l'addition d'une solution de chlorure de magnésium (4 M) puis filtré sur «Buchner».

Tableau III. Nombre de  $DL_{100}$ <sup>a</sup> (souris de 18–20 g/veine) neutralisées par 1 ml d'immunsérum de lapin

Nature de l'antigène <sup>b</sup>	Délai entre la 1re injection et la saignée (jours)				Dose totale d'antigène injectée (mg)
	52	86	122	136	
Toxine $\alpha$	<7	7	14	13	0,4
Toxoïde $\alpha$ (soluble tel quel)	45	72	100	40	1,9
Fraction I (polymères)	34	90	175	93	1,9
Fraction III (monomères)	55	80	125	70	1,9

<sup>a</sup>  $DL_{100}$ , dose létale 100%.

<sup>b</sup> L'antigène a toujours été associé au mélange de Freund.

Le filtrat après avoir été dialysé contre une solution de chlorure de sodium (0,15 M) fut additionné de glycine. On réduisit ensuite par évaporation son volume au volume initial. La solution obtenue formait un seul arc au contact du venin de *Naja nigricollis* lorsqu'on la soumettait à l'épreuve de la précipitation suivant OUCHTERLONY<sup>16</sup> et à l'analyse immuno-électrophorétique<sup>27</sup>.

A poids égal de protéines, la fraction purifiée contenait 32 fois plus d'anticorps spécifiques de la toxine  $\alpha$  que le sérum tel quel. Le rendement était de l'ordre de 70%. Les anticorps ainsi isolés appartiennent au groupe des globulines IgT comme l'a démontré l'identification faite au moyen d'un immunsérum de chèvre anti-globulines IgT de cheval.

Par le même procédé, en fixant l'erabutoxine «a» du venin de *Laticauda semifasciata* sur le Sépharose, nous avons extrait du sérum anti-venin de *Naja nigricollis* des populations d'anticorps qui précipitent la toxine  $\alpha$  du venin de *Naja nigricollis* confirmant ainsi l'existence d'une parenté immunologique entre les deux toxines.

En résumé, l'isolement à l'état pur à partir des venins de serpents de protéines douées d'activités physiologiques diverses, permettra d'entreprendre une analyse précise de leurs propriétés antigéniques et immunogènes. Ainsi, à l'actuelle classification de ces toxines qui n'est fondée sur aucun critère, pourra utilement être substituée une classification sérologique. D'autre part, l'emploi des méthodes qui font appel à la chromatographie d'affinité conduira à isoler des immunsérums antivenimeux des populations d'anticorps spécifiques de déterminants antigéniques communs à plusieurs toxines. Les résultats obtenus auront pour conséquence d'étendre le domaine de notre connaissance des relations qui unissent la structure des antigènes et la spécificité des anticorps.

**Summary.** In this article the results are reported of recent experiments concerning the antigenicity and the immunogenic properties of some basic toxic proteins recently extracted from snake venoms. A serological classification of these substances is proposed. 3 groups have now been determined. As most of the low molecular weight proteins (< 10.000) the immunogenicity of the  $\alpha$  toxin of *Naja nigricollis*, taken as an example, is poor. The influence of polymerization of this toxin, and the adjuvant effect of the Freund mixture on the production of specific antibodies, are described. By affinity chromatography, using Sepharose 4B as a carrier, antibodies against this toxin were separated

<sup>24</sup> C. C. CHANG et C. Y. YANG, J. Immunol. 102, 1437 (1969).

<sup>25</sup> C. C. CHANG, J. Biochem. 67, 343 (1970).

<sup>26</sup> R. AXEN et J. PORATH, Nature, Lond. 214, 1302 (1967).

<sup>27</sup> P. GRABAR et C. E. WILLIAMS, Biochim. biophys. Acta 10, 193 (1953).

from the other proteins of the anti *Naja nigricollis* horse immune-serum. They belong to the IgT immunoglobulins. By the same technique, when erabutoxin 'a' from *Laticauda semifasciata* is covalently linked to the Sepharose, antibodies reacting with both this toxin

and the  $\alpha$  toxin were separated from the same immune-serum. This confirms that an immunological relationship exists between the  $\alpha$  toxin of an Elapidae: *Naja nigricollis*, and the erabutoxin 'a' of an Hydrophiidae *Laticauda semifasciata*.

## SPECIALIA

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces brèves communications. – Für die Kurzmitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed in the authors' brief reports. – Ответственность за короткие сообщения несёт исключительно автор. – El responsable de los informes reducidos, está el autor.

### Constituents of Labiatae XIX<sup>1</sup>. Structure of Galdosol, a New Diterpene from *Salvia canariensis* L.

In previous papers we reported the isolation of the 3 new triterpenes, anagadiol, nivadiol and  $\alpha$ -amyradienyl acetate, from *Salvia broussonetii* Benth.<sup>2-4</sup>. Continuing our investigations on the Labiatae endemic to the Canary Isles, we have studied *Salvia canariensis* L., collected near Arucas (Gran Canaria) in spring. From the aerial part we have isolated the new diterpene galdosol (I) as a powder which would not crystallise. It has IR absorptions indicative of hydroxyl,  $\gamma$ -lactone and keto functions (3350, 1780 and 1700  $\text{cm}^{-1}$  in  $\text{CHCl}_3$ ). Its NMR spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 60 MHz) displays singlets at  $\tau$  2.35 (1H, aromatic) 5.35 (1H, geminal to the lactone oxygen) and 7.60 (H-5), in addition to signals between 8.80 and 9.10 corresponding to 4 methyl groups.

Mild acetylation of I gave the diacetate II, white needles from MeOH, m.p. 223–224°,  $[\alpha]_D^{25} + 62^\circ$  (2.1%,  $\text{CHCl}_3$ );  $M^+$  428; analysis, found: C 67.21; H 6.50.  $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_7$  requires: C 67.28; H 6.59%. Structure II was established on the basis of the following considerations: a broad IR-absorption at 1780  $\text{cm}^{-1}$  (in KBr) is attributed to the carbonyl groups of the acetate and  $\gamma$ -lactone functions, while the bands at 1700 and 1605  $\text{cm}^{-1}$  are due to the system  $\text{Ph}-\text{C}=\text{O}$ . The NMR-spectrum ( $\text{CDCl}_3$ ) presents a one-proton singlet at  $\tau$  2.02 assigned to the aromatic H-14 conjugated with the keto group at C-7. The signals of the H-6 ( $\tau$  5.26) and H-5 (7.52) appear as singlets which indicates the existence of an angle of about 90° between these protons. Further signals correspond to the H-15 ( $\tau$  7.04 m), 2 acetate (7.68, 7.76, s) and 4 methyl groups (8.73, 8.85, 8.96 and 9.02).

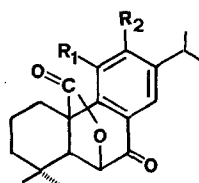
Structure I was confirmed as follows: reduction of II with Zn in HOAc to the ketoacid III and subsequent methylation with  $\text{CH}_3\text{N}_2$  gave IV, m.p. 146–150° (fine

white druses from light petroleum/n-hexane) which in the IR ( $\text{CHCl}_3$ ) presents absorptions at 2870, 1605 (aromatic), 1775, 1240 (OAc), 1720 (ester) and 1685 ( $\text{Ph}-\text{C}=\text{O}$ ). The NMR-spectrum ( $\text{CDCl}_3$ ) displays singlets at  $\tau$  1.96 (1H, aromatic), 6.46 (3H, OMe), 7.72 (6H, OAc) and a 1-proton multiplet at 7.02 (H-15). This compound proved to be identical (mixed m.p., TLC, IR- and NMR-spectra) with the oxidation product obtained by LINDE from carnosic acid<sup>5</sup>.

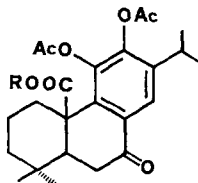
**Résumé.** Le nouveau diterpène galdosol (I) a été isolé de la *Salvia canariensis* L. et sa structure déterminée comme 7-oxo-11,12-dihydroxy-8,11,13-abiétratrién-20,6-olide.

A. G. GONZÁLEZ, B. M. FRAGA, J. G. LUIS and  
A. G. RAVELO<sup>6</sup>

Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, Instituto de Investigaciones Químicas, C.S.I.C., Tenerife (Spain), 15 June 1973.



- I  $R_1 = R_2 = \text{OH}$   
II  $R_1 = R_2 = \text{OAc}$



- III  $R = \text{H}$   
IV  $R = \text{CH}_3$

<sup>1</sup> For Part XVIII see A. G. GONZÁLEZ, J. L. BRETÓN and C. R. FANGUNDO, An. Quím., in press (1973).

<sup>2</sup> A. G. GONZÁLEZ, J. L. BRETÓN and B. M. FRAGA, Chem. Commun. 1971, 567.

<sup>3</sup> A. G. GONZÁLEZ, J. L. BRETÓN and B. M. FRAGA, An. Quím. 68, 709 (1972).

<sup>4</sup> A. G. GONZÁLEZ, B. M. FRAGA and A. G. RAVELO, An. Quím. 68, 1433 (1972).

<sup>5</sup> H. LINDE, Helv. chim. Acta 47, 1234 (1964).

<sup>6</sup> Acknowledgments. The authors thank Dr. H. LINDE (Universität Basel) for the sample of compound IV and Dr. W. WILDPRET (Departamento de Botánica, Universidad de La Laguna) for classifying the plant. This work was realized within the Programme of Chemistry 1971 conceded by the Foundation Juan March.