

TRANSFORMATIONS MICROBIOLOGIQUES—3

APPROCHE DE LA TOPOLOGIE DU SITE HYDROXYLANT DE *BEAUVERIA SULFURESCENS*

A. ARCHELAS, R. FURSTOSS* et B. WAEGELL

Laboratoire de Stéréochimie, L.A. 109, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Aix-Marseille III, rue Henri Poincaré, 13397 Marseille Cédex 13, France

et

J. LE PETIT et L. DEVEZE,

Laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Aix-Marseille III, rue Henri Poincaré 13397 Marseille Cédex 13 France

(Received in France 8 December 1982)

Résumé—L'hydroxylation de divers amides ou lactames bi ou tricycliques pontés, la détermination de la configuration absolue des alcools obtenus sous forme optiquement active, ainsi qu'une approche, basée sur ces configurations absolues, de la topologie du site hydroxylant de *Beauveria sulfurens*, sont décrites.

Abstract—Hydroxylation of some bi- or tricyclic amides or lactams, the determination of the absolute configuration of the alcohols obtained and the topology of the hydroxylating site of *Beauveria sulfurens* based on these absolute configurations, are discussed.

L'utilisation de molécules à structure rigide comme "sonde moléculaire" constitue l'une des méthodes pouvant permettre la visualisation de la topologie du site actif d'enzymes impliquées dans la bioconversion de molécules organiques. C'est ainsi, par exemple, qu'a été construit le "diamond lattice model" décrivant le site actif de l'alcool deshydrogénase de foie de cheval (HLADH),¹ ou qu'ont été proposés divers schémas permettant par exemple d'illustrer les sélectivités observées lors de l'hydroxylation d'androstanes² ou de la réduction de cétones girochirales.³

L'intérêt majeur de ces approches réside dans le fait qu'elles permettent d'effectuer des prévisions quant à la régio-, la stéréo- et (éventuellement), l'énantiosélectivité de la bioconversion d'un substrat donné.

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à la biohydroxylation d'atomes de carbone non activés d'amides bi ou tri-cycliques pontés par le champignon *Beauveria sulfurens* (ATCC 7159). Ce champignon était précédemment répertorié sous le nom de *Sporotrichum sulfurens*. Nos résultats préliminaires ont été publiés précédemment,^{4,5} et nous décrivons dans cet article une approche de la topologie du site hydroxylant impliqué dans ces biohydroxylation.

L'hydroxylation de nombreux substrats par *Beauveria sulfurens* a été décrite par Fonken et collaborateurs.⁶ Sur la base de leurs résultats ces auteurs ont été conduits, dans le but de rationaliser les régiosélectivités observées, à proposer plusieurs approches de la topologie du site actif de l'enzyme responsable de ces hydroxylation.^{7,8a,9} Ces approches sont basées sur deux hypothèses: (a) l'interaction enzyme-substrat a lieu au niveau d'un atome du substrat riche en électrons, en l'occurrence l'atome d'oxygène de la fonction amide; (b) les molécules de substrat conservent leur conformation la plus stable au niveau du site actif pendant la réaction d'hydroxylation.

Ces hypothèses conduisent les auteurs à estimer que l'hydroxylation a lieu sur un atome de carbone situé à une distance d'environ 5.5 Å de l'atome d'oxygène de la

fonction amide. Cependant, par suite de la nature généralement flexible des modèles étudiés et de l'existence de rotamères (non inter-convertibles à température ambiante)¹⁰ au niveau de la fonction amide, cette estimation reste relativement ambiguë. C'est pourquoi nous avons cherché, dans le but de permettre une meilleure prévision de la sélectivité de ces hydroxylation, à affiner cette étude et à préciser un certain nombre de paramètres impliqués dans ces transformations.

Dans ce but, nous nous sommes proposés; (a) d'éliminer les facteurs d'incertitude précédemment cités, en sélectionnant des modèles à structure rigide, ce qui permet une meilleure estimation de la distance de l'atome d'oxygène au site d'hydroxylation; (b) d'étudier l'influence de la localisation de la fonction carbonyle, dans le squelette carboné, sur la régiosélectivité de l'hydroxylation; (c) et d'examiner l'énantiosélectivité de ces hydroxylation. En effet, trois des squelettes retenus possèdent une structure asymétrique. Il était donc intéressant d'examiner dans quelle mesure il serait possible de réaliser des réactions énantiosélectives et, si tel était le cas, de déterminer la configuration absolue de l'énantiomère le plus facilement hydroxylé. Ceci devrait permettre de préciser la topologie du site actif de l'enzyme impliquée.

RESULTATS

Synthèse des produits de départ

Les lactames **21**, **25** et les amides **23**, **29** ont été synthétisés selon les schémas réactionnels indiqués au schéma 1. La N-benzylaza-4, brenanone **21** est obtenue par une suite de réactions du type "one pot" à partir de l'endo-2, carboxybicyclo[2.2.1]heptanone-6 **1** qui est transformée successivement en ester méthylique **2**, en imine puis en aminoester qui cyclise spontanément pour conduire à **21**. L'amide **23** est synthétisé à partir de l'endo-2, N-méthylcarboxamide bicyclo[2.2.1]heptène-5 **3**, réduit en amine **4** par réaction avec l'hydru de lithium aluminium, puis hydrogéné sur platine pour conduire à **5**. La cyclisation de Hofmann-Loeffler-Freitag de la N-chloramine correspondante **6** conduit à l'amine tri-

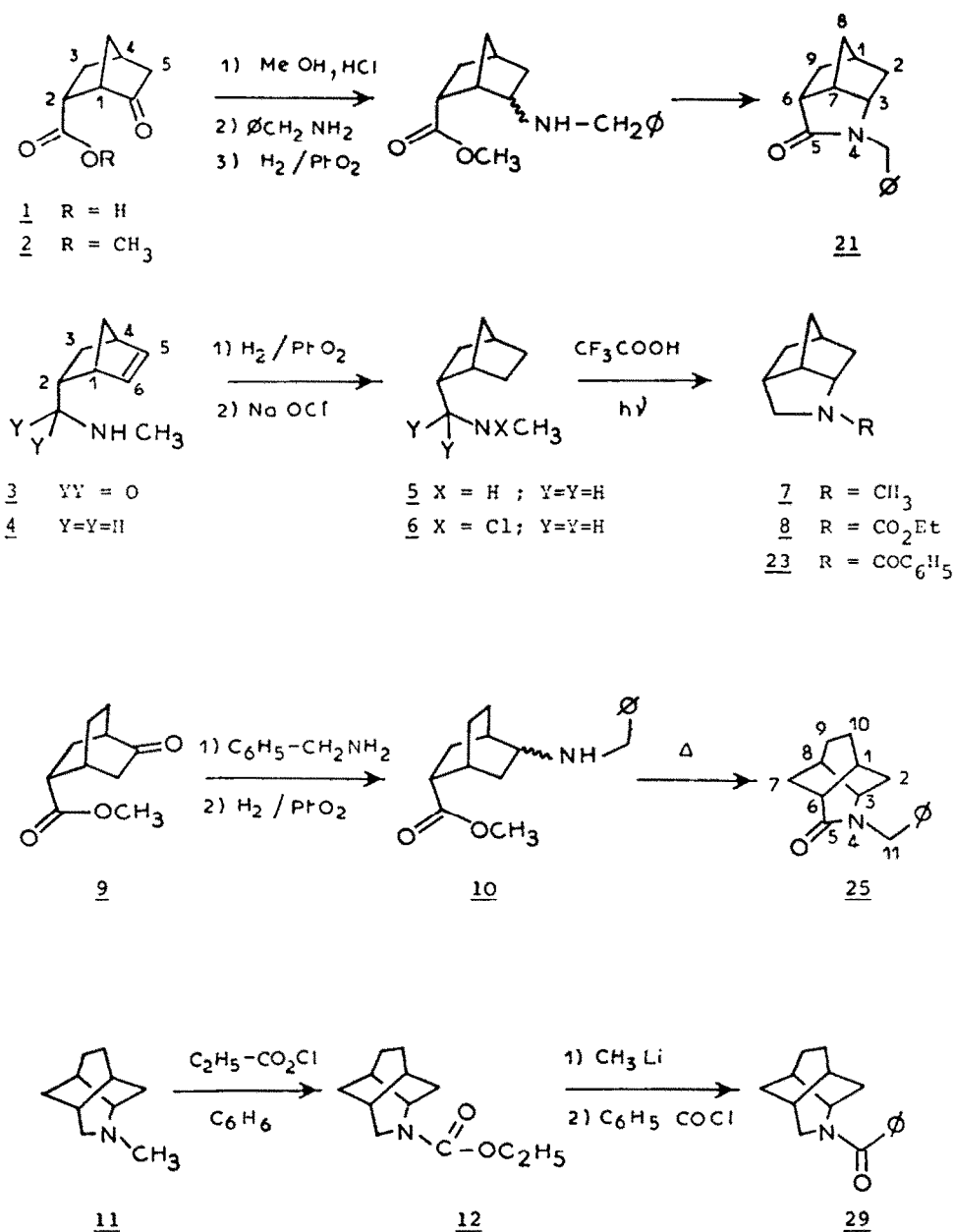


Schéma 1.

cyclique N-méthylée **7**, transformée en benzamide **23** par l'intermédiaire de l'uréthane **8**.

Un schéma réactionnel similaire à celui utilisé lors de la synthèse de **21** permet d'obtenir le lactame **25** à partir de l'endo-2, carbométhoxybicyclo[2.2.2]octanone-5 **9**. Cependant la cyclisation de l'aminoester intermédiaire **10** nécessite une pyrolyse. Enfin, le N-benzoylazatwistane **29** est synthétisé à partir du N-méthylazatwistane **11** par l'intermédiaire de l'uréthane **12**. Les lactames **13** et **17** ainsi que l'amide **15** (Schéma 2) ont été synthétisés selon des schémas classiques à partir de substrats dont la préparation a été décrite dans la littérature (voir Partie Expérimentale). La synthèse et la biohydroxylation de l'amide **19** ont été étudiées par Fonken et collaborateurs.⁸⁶

Biohydroxylations

La nature, les rendements et le pouvoir rotatoire des divers produits formés lors de la biohydroxylation de ces molécules, sont indiqués au tableau A, et leurs structures sont représentées dans le Schéma 2. (Sur ce schéma, il n'est pas tenu compte des configurations absolues des produits hydroxylés optiquement actifs.) Celles-ci ont été établies sur la base de l'analyse détaillée de leurs spectres RMN ¹H à 250 MHz et ¹³C et ont été confirmées chimiquement (*vide infra*). L'analyse détaillée des spectres RMN ¹³C de ces composés, qui sera publiée par ailleurs, confirme l'unicité des produits décrits.

Ces résultats nécessitent un certain nombre de commentaires. Il faut remarquer en particulier que: (a) Dans la plupart des cas, l'alcool obtenu constitue le produit

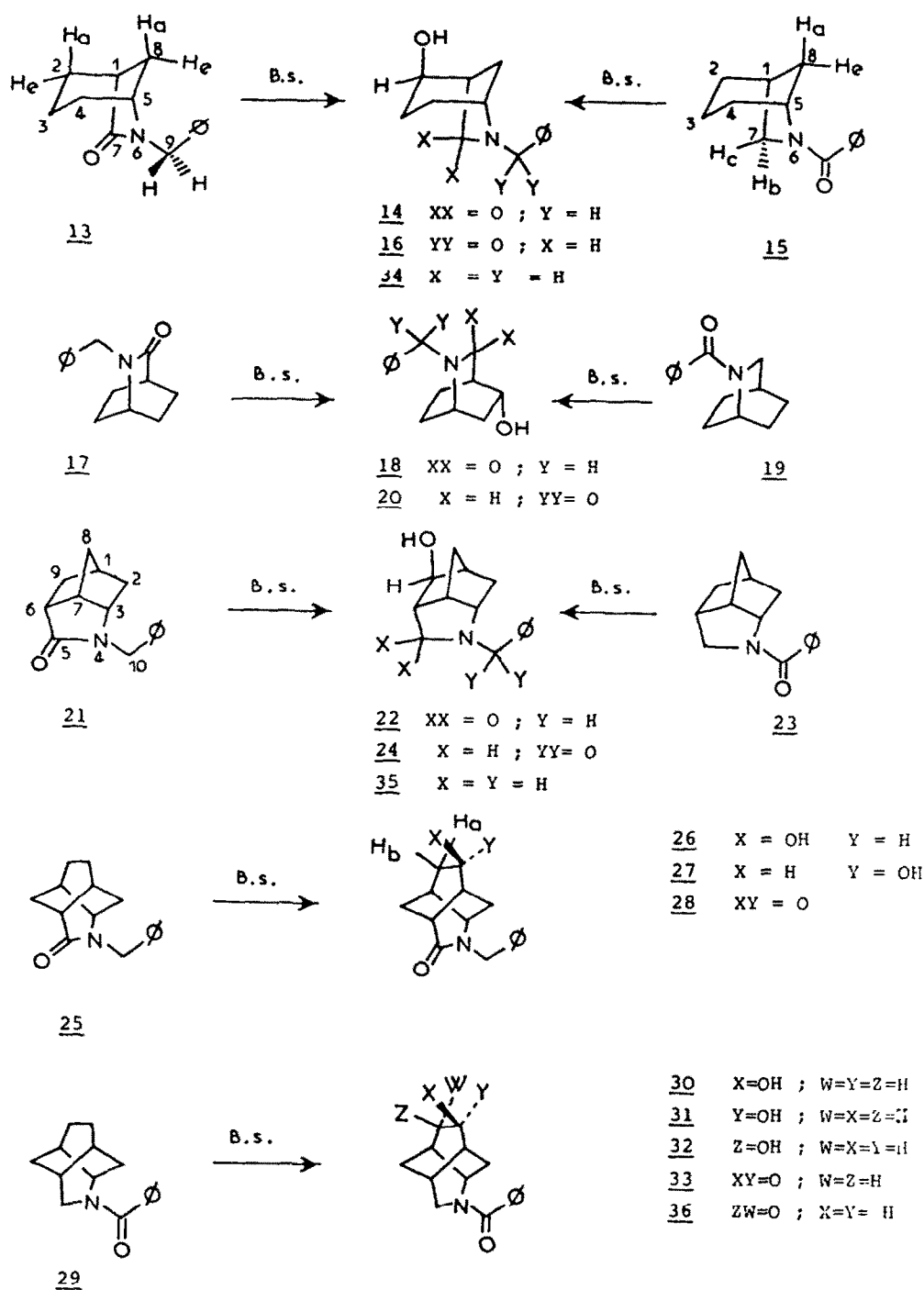


Schéma 2.

unique de la réaction. Seuls, les dérivés **25** et **29** de l'aza-4 twistane conduisent à un mélange de plusieurs composés; (b) Dans le cas de la bioconversion des lactames, les alcools obtenus sont optiquement actifs, alors que les amides conduisent à des alcools racémiques. Cette énantiosélectivité est confirmée par le fait que les lactames **13** et **21** récupérés sont optiquement actifs. Cependant il est vraisemblable que les lactames hydroxylés ainsi obtenus ne sont pas optiquement purs. Nous avons, par exemple, constaté que, par recristallisations successives de **14**, on obtient des cristaux dont

les spectres IR et ^1H RMN sont parfaitement identiques, mais dont les points de fusion sont nettement différents $F = 124^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = 0$; et $F = 154^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -23.9^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3). Divers essais visant à déterminer la pureté optique de ces composés à l'aide de complexes chiraux de terres rares¹¹ ou du réactif de Mosher¹² sont restés infructueux. Ces essais ont été effectués en utilisant le chlorure de l'acide α -méthoxy α -trifluorométhyl phényl acétique. Le spectre RMN du fluor ne comportant qu'une seule raie, il ne nous a pas été possible de conclure quant à la pureté optique du produit. (c) Le bilan massique élevé

Tableau A. Produits obtenus par bioconversion

substrat de départ	13	15	17	19 [*]	21	23	25			29			
Produit	14	16	18	20	22	24	26	27	28	30	31	32	33
Rendements %	45	50	17,5	40	20	53	52	28	11	53	26	9	4
$[\alpha]_D^{22^\circ}$ CHCl ₃	-11°	0°	+0,8°	0°	+7° [*]	0°	+17°7	+34°2	+25°	0°	0°	0°	0°
c g/100 cm ³	1,60	1,5	0,75	-	1,15	1,75	1,35	1,80	2,87	1,72	-	-	-
% substrat récupéré	30	49	61	16	69	-	5			4			
Bilan massique	75	99	79	62	89	-	96			96			

* : Produit obtenu après 20 heures de culture (voir Tableau B)

• : voir référence 9b

de ces biotransformations permet d'éliminer l'hypothèse d'une dégradation énantiosélective de l'un des antipodes optiques. Le lactame 21 constitue cependant un cas particulier à cet égard. En effet, lors de cette hydroxylation, le signe du pouvoir rotatoire de 22 varie en fonction du temps de bioconversion. De plus, le bilan massique de la transformation devient largement déficitaire. C'est pourquoi nous avons étudié l'évolution du rendement de la transformation en fonction du temps de contact substrat/champignon ainsi que celle de l'activité optique du produit hydroxylé. Les résultats obtenus sont portés dans le Tableau B.

On constate que le rendement maximum est atteint après un temps de contact de 65 heures tandis que le signe du pouvoir rotatoire s'inverse avec le temps. Ces résultats conduisent à penser que la réaction d'hydroxylation de ce lactame est énantiosélective, mais que l'énantiomère formé en excès (dextrogyre) est métabolisé rapidement, ce qui provoque une inversion du signe de l'activité optique et une perte de produit. (d) Afin de confirmer les structures attribuées aux produits de ces biohydroxylations, nous avons vérifié que la réduction par l'hydrure de lithium et

d'aluminium des amides 14 et 16 conduit à la même amine 34, et que celle de 22 et de 24 mène effectivement à 35 (Schéma 2). De même, l'oxydation des alcools 26 et 27 conduit à la cétone 28 et celle des alcools 30 et 31 fournit la cétone 33, ces deux cétones étant identiques à celles formées par bioconversion. L'oxydation de 32 conduit par contre à une cétone différente 36.

Détermination des configurations absolues

Comme nous l'avons souligné précédemment, les alcools formés par hydroxylation des lactames 13, 17, 21 et 25 sont optiquement actifs, ce qui démontre l'énantiosélectivité de l'enzyme hydroxylant. Nous avons établi la configuration absolue de ces lactames hydroxylés par des études de dichroïsme circulaire et confirmé les résultats obtenus soit par la méthode Horeau† soit par comparaison avec des résultats décrits dans la littérature.

Les études de dichroïsme circulaire effectuées par Schellman et collaborateurs^{13,14} ont permis à ces auteurs de proposer une règle empirique spécifique aux amides, qui ne s'applique cependant pas aux lactames à sept chaînons pour lesquels une autre règle a été élaborée.¹⁵ Nous avons vérifié que les effets Cotton négatifs observés pour la transition $n \rightarrow \pi^*$ de la (+)-(3S)-azatricyclo[4.3.1.0^{3,7}]décanone-5 37 et de la (-)-(3S)-aza-4 twistanone-5 38 (Schéma 3), de configuration absolues connues,^{16,17} sont en accord avec la règle de Schellman. Ces

† Nous remercions très vivement Monsieur le Prof. Horeau qui a bien voulu effectuer la détermination de ces configurations absolues dans son laboratoire.

Tableau B. Evolution de la bioconversion de 21

Δ t	0h	20h	40h	65h	90h
$[\alpha]_D^{22^\circ}$ (CHCl ₃)	—	+7°	+4°	-1,2°	-2,5°
Rdt en produit hydroxylé	0	20%	28%	50%	31%
% de substrat restant	100%	69%	50%	19%	0°

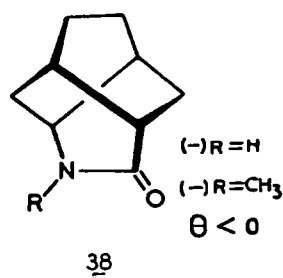
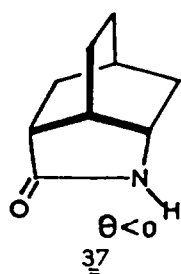
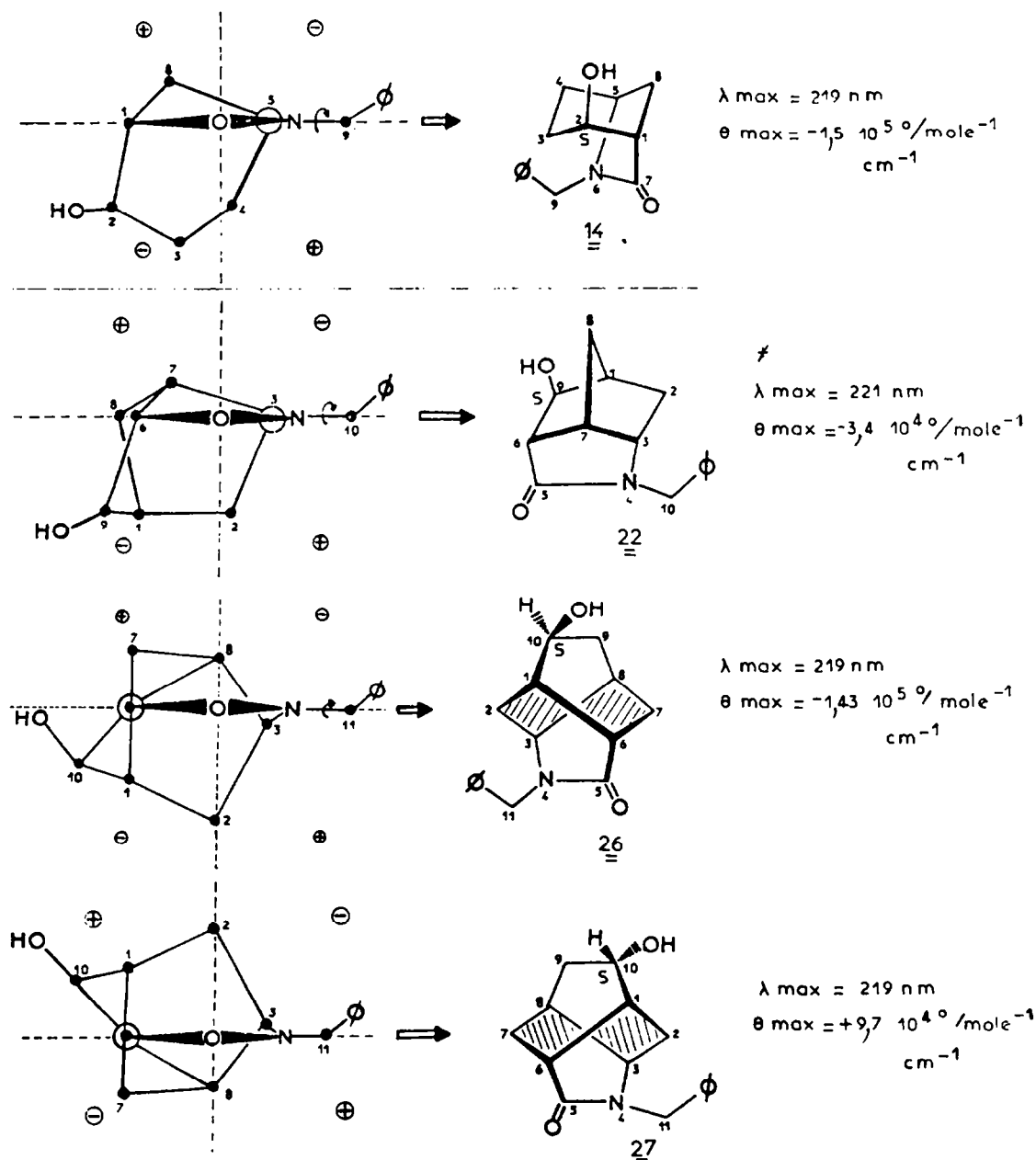


Schéma 3. Configurations absolues et effets Cotton de 37 et 38.



†La mesure de l'effet Cotton a été effectuée pour un composé correspondant à un temps de réaction de 20h.

Schéma 4. Positionnement des lactames 14, 22, 26 et 27 dans le système de quadrants de Schellman et attribution de leurs configurations absolues.

molécules présentant une similarité de structure évidente avec les lactames que nous étudions, il nous paraît légitime d'utiliser cette règle.

Le signe des effets Cotton observés pour **14**, **22**, **26** et **27** conduit à positionner ces molécules selon les projections représentées sur le Schéma 4 et donc d'en déduire les configurations absolues. Sans que cela ne puisse pour l'instant constituer une règle générale, il est intéressant de constater que tous les alcools formés présentent une configuration absolue S.

L'utilisation de la méthode de Horeau¹⁸ d'une part, et l'application de la règle des sphères de Sznatzke¹⁹ d'autre part, permettent de confirmer ces configurations absolues.

En effet, la mesure du signe du pouvoir rotatoire de l'acide α -phénylbutyrique résiduel après estérification de **14** et de **26**, permet de conclure que ces deux alcools possèdent une configuration absolue S, ce qui concorde parfaitement avec celles attribuées sur la base du dichroïsme circulaire. Par contre, cette méthode n'a pas permis de confirmer la configuration absolue de **22**. Cependant, l'application de la règle des sphères de Sznatzke permet de prévoir que l'introduction d'une fonction alcool sur le squelette de l'un des énantiomères des lactames **21** et **25** (dans une position dite "quatrième sphère"), qui ne modifie aucunement la chiralité intrinsèque du squelette carboné de ces molécules, ne peut provoquer un changement de signe de l'effet Cotton lié à ces énantiomères. Par exemple, en ce qui concerne les composés du type aza-4 twistanone-5, l'effet Cotton provient d'une part de la chiralité intrinsèque du chromophore (amide non coplanaire)²⁰ et, d'autre part, de la chiralité du squelette (hélicité M ou P). Tichy et collaborateurs ont montré que ces deux types de chiralité conduisent à des effets Cotton de même signe et additifs.¹⁶ L'introduction d'un groupement hydroxyle sur un atome de carbone relativement éloigné du chromophore (quatrième sphère) ne peut donc modifier le signe de l'effet Cotton d'un énantiomère particulier.

Ces diverses observations confirment les configurations absolues que nous avons attribuées précédemment à **22**, **26** et **27** sur la base des règles de Schellman.

DISCUSSION

L'analyse des résultats que nous venons de décrire permet d'obtenir diverses informations sur les types de sélectivité observés et de proposer, sur la base de ces observations, une approche de la topologie du site hydroxylant.

Sélectivités

Régiosélectivité. L'hypothèse émise par Fonken et collaborateurs, selon laquelle l'hydroxylation se ferait préférentiellement sur un atome de carbone situé à environ 5.5 Å de l'oxygène de la fonction carbonyle n'est pas vérifiée dans le cas des lactames. L'examen des modèles de Dreiding montre que cette distance n'est respectivement que de 3.3, 3.4 et 3.3 Å dans les lactames **14**, **18** et **22**. Ceci est d'autant plus surprenant que, dans chacun de ces composés, il existe des atomes de carbone plus éloignés de l'atome d'oxygène et dont la distance à cet atome est plus proche des 5.5 Å (± 1 Å) préconisés. Il semble donc que l'utilisation de cette distance comme base de prévision de la régiosélectivité ne soit pas justifiée. Par contre, si l'on considère la distance atome d'azote-carbone hydroxylé, on observe que, dans nos composés, sa valeur moyenne est de 3.4 ± 0.6 Å. Cette

valeur se retrouve d'ailleurs pour les amides étudiés par Fonken où elle est de 3.5 ± 0.7 Å. Le domaine de distance limite au delà duquel l'hydroxylation est peu probable est donc nettement plus resserré lorsque l'on considère comme origine l'atome d'azote au lieu de l'atome d'oxygène. C'est pourquoi nous proposons de tenir compte plutôt de cette valeur pour effectuer des prévisions quant au site d'hydroxylation. Ceci présente de plus l'avantage d'éliminer les ambiguïtés dues à l'existence de rotamères quand le groupement carbonyle n'est pas intracyclique et de permettre la mesure des distances N \leftrightarrow C hydroxylé indépendamment de la position du groupement carbonyle sur le squelette.

Énantiosélectivité. Nos résultats montrent que, l'hydroxylation ayant lieu sur le même atome de carbone quel que soit le type de substrat (amide ou lactame), la régiosélectivité est indépendante de la localisation de la fonction carbonyle. On pourrait alors être tenté de conclure que cette fonction n'intervient pas lors du positionnement du substrat sur le site actif. En fait, cette conclusion serait erronée. En effet, nous avons signalé précédemment que l'hydroxylation des amides conduit à des alcools racémiques, alors que ceux obtenus à partir des lactames sont optiquement actifs. Étant donné que l'unique différence entre ces modèles est la position "interne" ou "externe" de la fonction carbonyle sur le squelette carboné, il est évident que cette fonction intervient lors du positionnement du substrat au niveau du site hydroxylant. L'énantiosélectivité observée doit donc être liée à une différence géométrique entre ces deux types de substrat, en l'occurrence au fait qu'il n'existe pas de rotamère dans le cas des lactames. Afin de visualiser l'interaction enzyme-substrat, nous avons cherché à représenter le positionnement spatial de nos amides dans un système du type quadrant. Cette représentation, explicitée dans le cas de l'amide **15** (Schéma 5), suppose (a) que la fonction amide est toujours placée dans une position identique: atome d'azote au centre, éclipsé par le carbone porteur de la fonction carbonyle, atome d'oxygène vers le bas, (b) que la réaction d'hydroxylation a lieu à partir d'un sous-site situé dans une région bien déterminée de l'espace (représentée par une flèche) (stéréosélectivité, vide infra).

La projection de l'un des énantiomères de **15** selon ce système conduit à la Fig. 39, dont l'encombrement dans l'espace peut être visualisé par "l'enveloppe" A. Le rotamère de ce même énantiomère conduira donc à une représentation qui résulte d'une rotation de 180° autour de la liaison C \rightarrow N pour conduire à C. Chacun des rotamères de **15** possédant un énantiomère, l'encombrement stérique de celui-ci sera représenté par l'image de A ou C par rapport à un plan, c'est-à-dire B et D. L'ensemble des schémas ABCD représente donc la totalité des configurations spatiales qui existent pour **15**. On s'aperçoit alors que, pour chacun des énantiomères de **15**, il existe un rotamère dont la partie volumineuse du squelette sera plus proche du sous-site hydroxylant et sera donc plus facilement hydroxylée, ce qui conduira à un mélange racémique. Par contre, l'inexistence de rotamères dans le cas des lactames ne conduira qu'à un unique positionnement possible pour chacun des énantiomères. Seul l'un des énantiomères pourra alors subir l'hydroxylation, ce qui fournira des alcools optiquement actifs.

Stéréosélectivité. L'obtention stéréospécifique d'un seul alcool lors de l'hydroxylation suggère que cette réaction a lieu à partir d'une région bien déterminée de

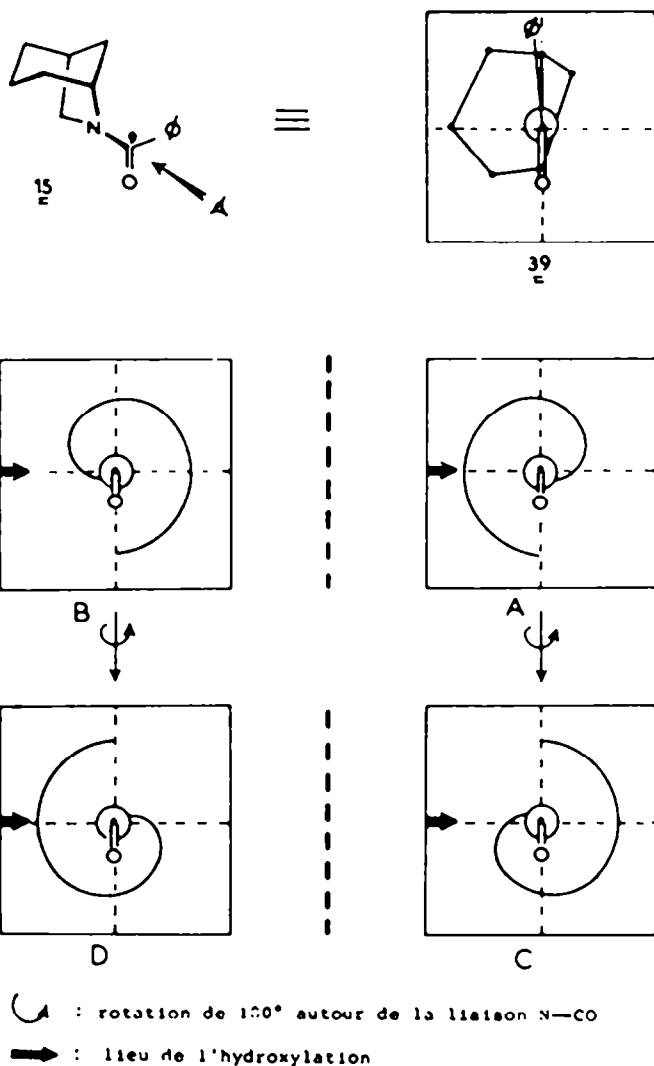


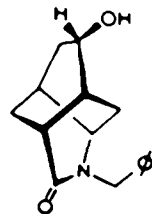
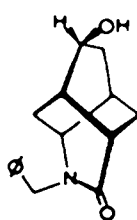
Schéma 5

l'espace. L'obtention des deux épimères 26 et 27 de l'aza-4 twistanone-5 25 semble cependant infirmer cette hypothèse. En fait ce manque de stéréospécificité n'est qu'apparent. En effet, les configurations absolues des deux alcools sont représentées sur le Schéma 6; on constate que—les squelettes carbonés de ces alcools présentent des hélicités opposées—la configuration absolue de l'atome de carbone hydroxylé est S dans les deux cas. Ces composés sont donc des diastéréoisomères dont l'obtention peut s'expliquer en supposant que, au niveau du site actif, chacun des énantiomères de 25 est positionné de manière identique, puis hydroxylé de façon stéréosélective. On observe donc dans ce cas une sélectivité de réaction (stéréosélectivité) et pas de sélectivité de substrat (énantiosélectivité).

Topologie du site actif

L'une des approches de la topologie du site actif proposée par Fonken et collaborateurs a conduit ces auteurs à utiliser un modèle du type quadrant et à

tats obtenus à partir de la N-benzoyl trans-décahydroquinoléine n'a cependant pas pu être confirmé par l'étude d'autres molécules. C'est pourquoi, nous avons cherché à déterminer si nos résultats confirment cette proposition. La représentation des configurations absolues des lactames hydroxylés 14, 22, 26 et 27 selon le système utilisé par Fonken, est illustrée dans le Schéma 7. On observe que, conformément à la proposition de ces auteurs, la partie volumineuse des squelettes carbonés est effectivement située dans le quadrant U.R.



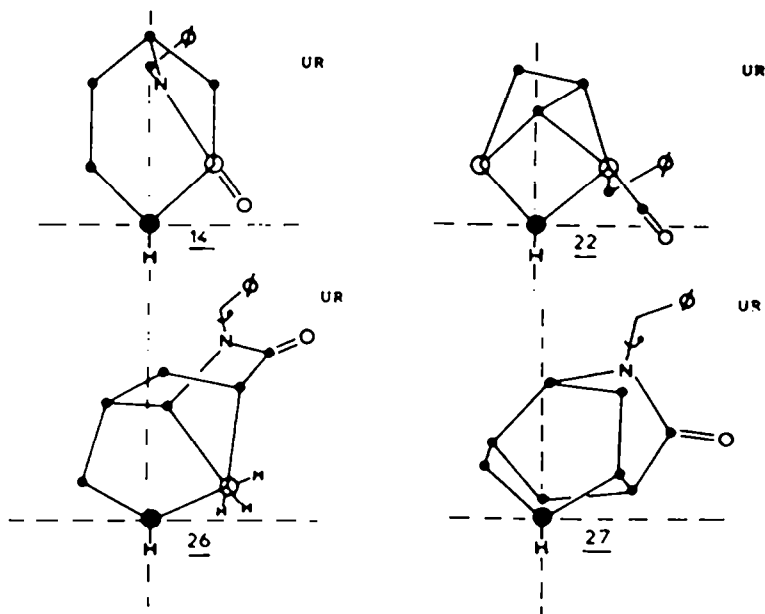


Schéma 7 Positionnement de 14, 22, 26 et 27 dans le système des quadrants de Fonken

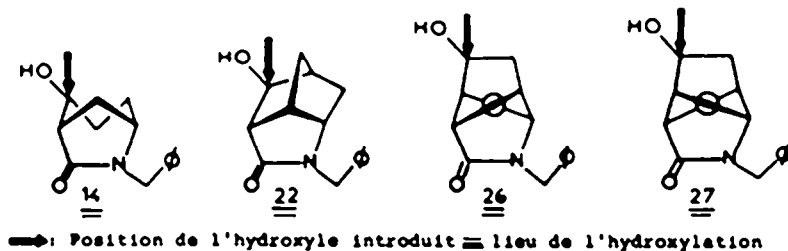


Schéma 8 Approche de la topologie du site actif de l'enzyme hydroxylante

Cependant, étant basée sur le produit final de la réaction (l'alcool), cette représentation ne permet que très difficilement d'effectuer des prévisions quant à la régiosélectivité de l'hydroxylation. L'examen de nos

Cette représentation est d'ailleurs extrapolable aux dérivés du type amide, si l'on considère que—c'est l'atome d'azote qui sert d'origine aux mesures de distance (il faut donc conserver sa position inchangée)—

plantation de cette fonction d'un côté ou de l'autre de l'atome d'azote.

CONCLUSION

En conclusion nous avons, au cours de cette étude défini un certain nombre de critères géométriques impliqués dans les réactions d'hydroxylation effectuées par *Beauveria sulfurescens*. Ces critères, obtenus grâce à l'étude de divers substrats à structure rigide comme sonde moléculaire, devraient permettre d'effectuer dorénavant des prévisions quant à la régio, la stéréo et l'énantiosélectivité de ces hydroxylations. Nous avons en particulier précisé le rôle primordial joué par la fonction amide lors du positionnement du substrat sur le site actif de l'enzyme, et souligné le fait que la position de la fonction carbonyle n'est pas déterminante à elle seule. D'autre part, nous avons constaté que la rigidité du squelette carboné peut conduire, dans certains cas, à une résolution enzymatique d'un mélange racémique, ce qui est relativement rare.²¹ Enfin, et sous réserve que les hydroxylations observées soient réalisées par un système enzymatique unique, nous avons proposé un schéma qui permet de visualiser la topologie du site hydroxylant et d'affiner les prévisions de sélectivité. Nous poursuivons actuellement cette étude afin d'explorer les possibilités synthétiques offertes par ces techniques de fonctionnalisation spécifique d'atomes de carbone non activés et l'influence de divers facteurs (stéréochimiques par exemple) sur la régiosélectivité de ces hydroxylations.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres infrarouge ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 297 en solution dans le chloroforme avec des cellules en chlorure de sodium. Les spectres RMN ¹H ont été enregistrés sur des appareils Varian XL 100 et CAMECA à 250 MHz, avec le tétraméthyl silane comme référence interne et le deutérochloroforme comme solvant. Dans les données de RMN des produits, les lettres m, s, d, t, q, dd, etc... signifient respectivement multiplet, singulet, doublet, triplet, quadruplet, doublet de doublet, etc... Les spectres RMN ¹³C ont été enregistrés sur un appareil Varian FT 80, avec le tétraméthyl silane comme référence interne et le deutérochloroforme comme solvant. Les spectres de masse ont été obtenus sur un appareil Varian MAT 311. Les points de fusion ont été relevés sur un banc Koffler ou avec un microscope Reichert à platine chauffante. Les chromatographies en phase vapeur ont été effectuées sur un appareil Intersmat IGC 120 ML ayant un détecteur à conductibilité thermique en utilisant l'hydrogène comme gaz vecteur. Nous avons utilisé une colonne de 3 mètres par 1/8 pouce; SE 30 10%. Les chromatographies sur couches minces analytiques ont été faites sur gel de silice F 254; 0.2 mm (MERCK) sauf indication contraire. Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un polarimètre Perkin-Elmer 241 MC. Les mesures de dichroïsme ont été réalisées sur un appareil Jobin-Yvon Dichrographe III, avec le méthanol absolu comme solvant. Les analyses élémentaires ont été effectuées au service de microanalyse du Département de Chimie Organique de la Faculté des Sciences de Marseille.

Synthèse de la N-benzyl aza-6 bicyclo[3.2.1]octanone-7 13

La synthèse de l'aza-6 bicyclo[3.2.1]octanone-7 a été décrite précédemment.²² Son dérivé N-benzylé 13 est obtenu par réaction, à reflux pendant 2 h 30 min, de 4 g (32 mmole) de ce lactame avec 4 g d'hydruure de sodium (50%) (lavé plusieurs fois à l'éther de pétrole par décantation) dans 150 ml de toluène anhydre. Après refroidissement on additionne 3.8 ml (32 mmole) de bromure de benzyle. On porte à reflux pendant 2 h. Après hydrolyse avec un minimum d'eau suivie d'une extraction au chlorure de méthylène, la phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée. Le résidu est distillé pour donner 5.8 g de N-benzyl aza-6 bicy-

clo[3.2.1]octanone-7 13 qui cristallise peu à peu. Rdt = 85%. Eb_{atm} = 119°.

Une purification plus poussée de 13 est obtenue par passage sur une colonne de silice avec une élution hexane/éther de polarité croissante. $R_f = 0.65$ éther/MeOH (90-10). IR = 1680 cm⁻¹ ν (C=O) amide. RMN ¹H (250 MHz): δ ppm = 7.30 (m, 5H); 4.99 (d, 1H), (H_a, J_{gem} = 15 Hz); 3.95 (d, 1H) (H_b, J_{gem} = 15 Hz); 3.55 (t, 1H) (H₃); 2.56 (t mal défini, 1H) (H₁); 2.16 (m, 1H) (H_{6a}); 1.90 (m, 1H) (H_{2a}); 1.70 (m, 1H) (H_{6b}); 1.4-1.65 (m, 5H). $M^+ = 215$ m/e: 91(100), 173(49), 186(28), 215(56). Masse exacte: trouvée 215.1310, exp 215.1317 C₁₄H₁₇NO. Analyse: trouvé (calculé) C: 78.32 (78.10); H: 7.97 (7.96); N: 6.29 (6.51)%.

Synthèse du N-benzoyl aza-6 bicyclo[3.2.1]octane 15

Dans un tricol muni d'une agitation mécanique, on place 0.8 g (21 mmole) d'hydruure de lithium aluminium en suspension dans 15 ml de tétrahydrofurane anhydre. On additionne lentement 1.9 g (15.2 mmole) d'aza-6 bicyclo[3.2.1]octanone-7 dissoute dans 10 ml de tétrahydrofurane sec. On porte à reflux pendant 16 h. L'hydrolyse du mélange réactionnel libère l'amine correspondante qui n'est pas isolée car elle se carbonate au contact de l'air. Pour obtenir le composé 15 on additionne 30 ml de benzène, distille le tétrahydrofurane et additionne successivement 2.3 ml (16.7 mmole) de triéthylamine et 1.8 ml (15.2 mmole) de chlorure de benzoyle en solution dans 10 ml de benzène. Après une agitation de 1 h 30 min, on lave deux fois avec HCl-1N et une fois à l'eau. La phase organique est agitée une nuit avec 15 ml de KOH-5N afin d'éliminer le chlorure de benzoyle en excès. Après lavage à l'eau, séchage sur sulfate de magnésium, l'évaporation du solvant permet d'obtenir 2.5 g de solide brut.

Ce produit brut est purifié par passage sur colonne de silice avec une élution hexane/éther de polarité croissante. On obtient 2.25 g d'amide 15. Rdt = 68%. F = 88°. $R_f = 0.71$ éther/MeOH (90-10). IR = 1680 cm⁻¹ ν (C=O) amide. RMN ¹H (250 MHz): δ ppm = 7.35 (m, 5H); 4.52 (t, 0.4H) et 3.90 (t, 0.6H) (H_a, J_{H-H_{6a}} = 5 Hz, J_{H₃-H₄} = 5 Hz); 3.68 (dd, 0.6H) et 3.45 (dd, 0.4H) (H₆, J_{gem} = 11 Hz, J_{H₇-H₁} = 6 Hz); 3.55 (d, 0.6H) et 3.18 (d, 0.4H) (H₇, J_{gem} = 11 Hz); 2.48 (m, 0.6H) et 2.36 (m, 0.4H) (H₁); 1.2-2.3 (m, 8H). Le dédoublement de ces signaux correspond à l'existence de deux rotamères (non interchangeables à température ordinaire) de la fonction amide. Masse $M^+ = 215$, m/e: 77(30), 105(100), 172(35), 215(28). Masse exacte: calculée: 215.1310, C₁₄H₁₇NO expérimentale: 215.1317. Analyse: C₁₄H₁₇NO% trouvé (calculé): C 78.06 (78.10); H 7.55 (7.96); N 6.87 (6.51).

Préparation de la N-benzyl aza-2 bicyclo[2.2.2]octanone-3 17

La méthode utilisée est la même que celle décrite pour la préparation de 13. L'hydrogénation de 40 g d'acide para-amino-benzoïque donne 14.5 g d'acide amino-4 cyclohexane carboxylique. Rdt = 34%. La pyrolyse de cet amino-acide permet d'obtenir 8 g d'aza-2 bicyclo[2.2.2]octanone-3. Rdt = 63%. IR = 3440 cm⁻¹ ν (N-H); 1670 cm⁻¹ ν (C=O) amide. RMN ¹H δ ppm: 1.5 à 1.9 (m, 8H); 2.5 (m, 1H); 3.65 (m, 1H); 8.1 (s, 1H). Ce lactame (2 g, 16 mmole) est benzylé suivant le mode opératoire employé pour la synthèse de 13 et conduit à 3.42 g d'un solide blanc 17 (Rdt = 99%), purifié par passage sur une colonne de silice avec une élution hexane/éther de polarité croissante suivie d'une sublimation (110°/0.05 mm). F: 92°. $R_f = 0.65$ éther/MeOH (90-10); IR = 1650 cm⁻¹ ν (C=O) amide; RMN ¹H (250 MHz): δ ppm = 7.24 (m, 5H); 4.51 (s, 2H) (H₉); 3.45 (m, 1H) (H₁); 2.61 (m, 1H) (H₄) et 1.4-1.9 (m, 8H). Masse $M^+ = 215$ m/e: 91(100), 105(24), 124(27), 159(26), 186(31), 187(26), 215(100), 216(18). Masse exacte: calculée C₁₄H₁₇NO: 215.1310; trouvée 215.1309. Analyse: C₁₄H₁₇NO% trouvé (calculé): C 78.02 (78.10); H 7.57 (7.96); N 6.73 (6.51).

Synthèse de la N-benzyl aza-4 brendanone-5 21

Ce lactame est obtenu par réaction de 1.9 g (12.3 mmole) d'endocarboxy-2 bicyclo[2.2.1]heptanone-6 ¹²⁻²³ dans 20 ml de MeOH/HCl (2% en poids) anhydre. Après addition de 2 g de tamis moléculaire 4 Å on porte à reflux pendant 5 h puis on laisse refroidir. On additionne à la solution précédente 1.8 g (16.8 mmole)

de benzylamine en solution dans 5 ml de MeOH/HCl (2%) sec. On laisse à température ambiante pendant 70 h en agitant à la main de temps en temps. Le tamis moléculaire est éliminé par filtration puis on réalise une hydrogénation à pression atmosphérique en présence d'oxyde de platine (150 mg). Après filtration de catalyseur et évaporation du solvant, on traite le résidu successivement par HCl (3N), NaOH (3N) et H₂O. Après séchage sur sulfate de magnésium et évaporation du solvant, on obtient 2.1 g de lactame 21 (Rdt = 75%). Une purification plus poussée est réalisée par passage sur une colonne de silice avec une élution éther/méthanol (2%). On obtient ainsi 1.75 g de produit pur sous forme d'un liquide incolore. Rdt = 62.5%. IR = 1680 cm⁻¹ ν (C=O) lactame. RMN ¹H (250 MHz): δppm = 7.25 (m, 5H); 4.80 (d, 1H) (H_{10a}, J_{gem} = 15 Hz); 3.95 (d, 1H) (H_{10b}, J_{gem} = 15 Hz); 3.46 (dd, 1H) (H₃, J_{H3-H2a10} = 8 Hz; J_{H3-H7} = 5.5 Hz); 2.92 (1H, m) (H₇); 2.46 (m, 1H) (H₆, J_{H6-H7a10} = 10.5 Hz; J_{H6-H7} = 5 Hz); 2.40 (m, 1H) (H₁); 1.85 (m, 1H) (H_{7a10}, J_{gem} = 13 Hz; J_{H7a10-H6} = 10.5 Hz; J_{H7a10-H1} = 4 Hz; J_{H7a10-H2a10} = 2.5 Hz); 1.58 (d, 1H) (H_{2a10}, J_{gem} = 13 Hz); 1.47 (m, 2H) (H_a); 1.42 (m, 1H) (H_{2a10}) et 1.18 (d, 1H) (H_{2endo}, J_{gem} = 13 Hz). Masse: M⁺ = 227 m/e: 91(97); 106(52); 227(100). Masse exacte C₁₅H₁₇NO calculée: 227.1310 expérimentale 227.1310. Analyse: C₁₅H₁₇NO% trouvé (calculé): C 79.12 (79.26); H 8.32 (7.54) N 6.17 (6.16).

Synthèse du N-benzoyl aza-4 brendane 23

A 7 g (184 mmole) d'hydruure de lithium aluminium en suspension dans 100 ml de THF anhydre on additionne lentement 16.8 g (111.2 mmole) de N-méthylbicyclo[2.2.1]heptène-5 carboxamide-2-endo 3^{re} en solution dans 100 ml de THF anhydre. On porte à reflux pendant 13 h puis on hydrolyse en ajoutant successivement 7 ml d'eau, 21 ml de NaOH 15% et 7 ml d'eau. On laisse sous agitation pendant 15 mn puis le précipité blanc est filtré, il est lavé plusieurs fois avec du THF bouillant, et les phases organiques sont séchées sur sulfate de magnésium. Par évaporation du solvant, on obtient 14.89 g d'amine brute 4 qui est purifiée par distillation. Rdt = 78%. Eb_{15 mm} = 72°. IR = 3060 cm⁻¹ ν (HC=CH). RMN ¹H: δppm = 0.54 (dt, 1H); 1 à 2.35 (m, 7H); 2.42 (s, 3H); 2.85 (m, 2H); 6.04 (m, 2H).

Cette amine éthylique (11.89g) en solution dans 150 ml d'éthanol est hydrogénée sur oxyde de platine (450 mg) à pression atmosphérique. On obtient après distillation 11.71 g d'amine saturée 5. Rdt = 97%. Eb_{15 mm} = 77°. IR = 2950 cm⁻¹ ν (C-H). RMN ¹H: δppm = 0.5 à 2 (m, 10H); 2.18 (m, 2H); 2.44 (s, 3H); 2.53 (d, 2H).

La N-chloramine 6 correspondante²⁷ est obtenue par réaction de 1.7 g de cette amine, en solution dans 10 ml de chlorure de méthylène, avec 25 ml d'hypochlorite de sodium (1.41 M). On agite vigoureusement cette solution à l'obscurité pendant 1 h 45 min, à température ambiante. Après décantation on extrait la phase aqueuse au chlorure de méthylène. Les phases organiques sont réunies puis lavées à l'eau et séchées sur sulfate de magnésium. On évapore sous vide le solvant sans chauffer et on obtient 2.08 g de N-chloramine 6.

Cette N-chloramine (2g, 11.5 mmole) est ajoutée goutte à goutte à 20 ml d'acide trifluoroacétique refroidis préalablement par un bain de glace-sel. Cette solution est transférée dans un tube en quartz, purgée soigneusement à l'azote puis irradiée par la lumière ultraviolette d'une lampe Hanovia de 150 W. Après deux heures d'irradiation un test iodométrique montre que la N-chloramine a totalement disparu. On distille alors l'acide à pression atmosphérique puis sous vide. Après addition de 20 ml de méthanol au résidu de distillation, on neutralise l'acide résiduel par K₂CO₃ jusqu'à ce que la solution soit basique (mise à reflux pendant 5 h). Après refroidissement, on distille le méthanol à pression atmosphérique et on reprend le résidu avec un minimum d'eau. Cette phase aqueuse est extraite à l'éther, puis la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium. Après évaporation du solvant on obtient 1.23 g d'amine brute 7. La distillation de ces 1.23 g permet d'obtenir 1.14 g d'amine pure. Rdt = 68%. Eb_{10 mm} = 58°. IR: 2950 cm⁻¹ ν (C-H). RMN ¹H: δppm = 2.4 (s, 3H) N-CH₃ 0.94 à 1.14 (d, 1H); 1.24 à 1.41 (m, 4H); 1.60 à 2.65 (m, 5H); 2.4 (s, 3H); 2.95 à 3.26 (m, 2H).

Préparation de l'uréthane 8

A 3.4 g d'amine 7 (24.8 mmole) en solution dans 70 ml de benzène anhydre, on additionne goutte à goutte 8.3 g (76.5 mmole) de chloroformate d'éthyle. On porte à reflux pendant deux heures. On hydrolyse avec un minimum d'eau. La phase organique est décantée puis séchée sur sulfate de magnésium. Après évaporation du solvant, le résidu est distillé pour donner 3.91 g d'uréthane 8. Rdt = 80.8%. Eb_{2 mm} = 91°. IR = 1680 cm⁻¹ ν (C=O) uréthane. RMN ¹H: δppm = 0.9 à 2.4 (m, 8H); 1.22 (t, 3H); 2.55 (dd, 1H); 3.3 (m, 2H); 4.1 (q, 2H); 4.1 (m, 1H).

Préparation de l'amide 23

Dans un ballon de 100 ml surmonté d'un réfrigérant et muni d'une agitation magnétique, sous atmosphère d'azote, on place 20 ml (32 mmole) de méthyl lithium (1.6 M dans l'éther). On refroidit à -15° puis on additionne très lentement 3 g (15.4 mmole) d'uréthane 8. On laisse revenir à température ambiante pendant 30 min. La température est ramenée à -10° avant d'hydrolyser avec 0.64 ml d'eau. On additionne lentement 2.37 g (16.9 mmole) de chlorure de benzoyle en solution dans 5 ml de tétrahydrofurane et on porte à reflux pendant 2 h. Après addition de 5 ml de potasse 5 N et filtration du précipité la phase organique est décantée et la phase aqueuse est extraite par de l'éther. Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium. L'évaporation du solvant donne 3.8 g de liquide jaune. Ce produit brut est purifié par passage sur une colonne de silice avec une élution hexane/éther de polarité croissante suivi d'une distillation au four tubulaire (0.2 mm, 130°). On obtient ainsi 2.5 g d'amide 23 pure. Rdt = 71%. IR = 1615 cm⁻¹ ν (C=O) amide. RMN ¹H (250 MHz): δppm = 7.50 (m, 5H); 4.42 (dd, 0.4H) et 3.90 (dd, 0.6 H) (H₃, J_{H3-H2a10} = 8.5 Hz; J_{H3-H7} = 5 Hz); 3.80 (dd, 0.6H) et 3.58 (dd, 0.4H) (H_{5a}, J_{gem} = 10 Hz; J_{H5a-H6} = 6 Hz); 3.56 (d, 0.6H) et 3.20 (d, 0.4H) (H_{5b}, J_{gem} = 10 Hz); 2.64 (dd large, 1H) (H₇); 2.50 (m, 0.6H) et 2.40 (m, 0.4H) (H_a); 2.26 (m, 1H) (H₁); 2.00 (m, 1H) (H_{7a10}); 1.54 (d large, 1H) (H_{2endo}, J_{gem} = 10 Hz); 1.40 (d large, 2H) (H_a); 1.20 (d large, 0.6H) et 1.00 (d large, 0.4H) (H_{2endo}, J_{gem} = 12.5 Hz). Masse: M⁺ = 227 m/e: 77(35), 105(100), 227(28). Masse exacte: calculée: 227.1310 C₁₅H₁₇NO trouvée 227.1312.

Préparation de la N-benzyl aza-4 twistanone-5 25

On place dans un ballon tricol de 100 ml bien sec 3 g (16.5 mmole) d'endocarbométhoxy-2 bicyclo[2.2.2]octanone-5²⁸ et 2.1 g (19.6 mmole) de benzylamine en solution dans 40 ml de méthanol anhydre. On ajoute 8 g de tamis moléculaire 4 Å et on laisse à température ambiante pendant 40 h en agitant à la main de temps en temps. La solution méthanolique précédente est filtrée. On lave le tamis moléculaire avec 20 ml de méthanol sec. On réalise ensuite une hydrogénation (2 h) à pression atmosphérique en présence d'oxyde de platine (250 mg). La filtration du catalyseur suivie de l'évaporation du solvant permet d'obtenir 4.69 g de liquide brut. Ce liquide est acidifié par 20 ml d'HCl (3N). L'extraction de cette phase aqueuse par l'éther permet d'éliminer le céto ester résiduel. On rend cette phase aqueuse fortement basique par addition de soude (10N) puis on l'extrait avec de l'éther (5 fois 30 ml). Le séchage sur sulfate de magnésium suivi de l'évaporation du solvant donne 3.67 g de produit brut. La benzyl amine en excès est éliminée par distillation sous vide. On obtient 2.72 g d'amine ester 10 brut. IR = 1745 cm⁻¹ ν (C=O) ester. RMN ¹H: δppm = 1 à 3 (m, 13H); 3.66 (s, 3H); 3.74 (s, 2H); 7.3 (m, 5H).

Le lactame 25 est obtenu par pyrolyse (230° pendant 45 min) de 10. Le résidu obtenu est acidifié par 3N-HCl. On extrait trois fois à l'éther. La phase étherée est lavée successivement avec H₂O, NaHCO₃ et H₂O. On sèche sur sulfate de magnésium. L'évaporation du solvant permet d'obtenir 1.35 g de lactame 25 cristallisé. Rdt global = 31%. IR = 1655 cm⁻¹ ν (C=O) lactame. RMN ¹H (250 MHz) δppm = 7.28 (m, 5H); 5.00 (d, 1H) (H_{11a}, J_{gem} = 15 Hz); 4.04 (d, 1H) (H_{11b}, J_{gem} = 15 Hz); 3.46 (t, 1H) (H₃, J_{H3-H2a10} = 5 Hz; J_{H3-H7} = 5 Hz); 2.74 (t, 1H) (H₆, J_{H6-H7a10} = 5.5 Hz; J_{H6-H1} = 5.5 Hz); 2.05 (m, 1H) (H₁); 1.90 (m, 1H) (H_a); 1.85 (dd, 1H) (H_{7a10}, J_{gem} = 11 Hz; J_{H7a10-H6} = 5.5 Hz); 1.75 (dd, 1H) (H_{2a10}, J_{gem} = 13 Hz; J_{H2a10-H3} = 5 Hz); 1.40-1.74 (m, 5H); 1.36 (dd, 1H) (H_{2endo}, J_{gem} = 12.5 Hz; J_{2endo-H1} = 6 Hz). Masse M⁺ =

241 m/e = 91(100, 108(22), 199(28), 241(66). Masse exacte: calculée 241.1466 $C_{14}H_{19}NO$ trouvée 241.1466. Analyse: $C_{14}H_{19}NO\%$ trouvé (calculé): C 79.31 (79.63); H 7.84 (7.94); N 5.70 (5.80). F = 51°.

Synthèse du N-benzoyl aza-4 twistane 29

Préparation de l'uréthane 12. A 760 mg (5.03 mmole) d'amine 11²⁹ en solution dans 15 ml de benzène anhydre, on additionne goutte à goutte 1.63 g (15 mmole) de chloroformate d'éthyle. On porte à reflux pendant deux heures. Après hydrolyse avec un minimum d'eau suivie d'une décantation du benzène, celui-ci est séché sur sulfate de magnésium. L'évaporation du solvant permet d'obtenir 981 mg de produit attendu 12. Rdt = 93%. IR = 1680 cm^{-1} ν (C=O). RMN 1H δ ppm = 1.3 (t, 3H); 1.2-2.3 (m, 11H); 3.1-3.7 (m, 2H); 4.1 (q, 2H); 4.1 (m, 1H). Analyse $C_{12}H_{19}NO_2$ trouvé (calculé) C 68.38 (68.86); H 9.05 (9.15); N 6.87 (6.69)%.

Préparation de l'amide 29. On utilise le même mode opératoire que pour la synthèse de l'amide 23 à partir de l'uréthane 8. 890 mg (4.26 mmole) d'uréthane 12 sont additionnés à 5.6 ml de méthyl lithium en solution étherée (1.6 M). Après hydrolyse, addition de 0.65 g (4.69 mmole) de chlorure de benzoyle et traitement par la potasse on obtient 1.02 g de liquide brut. La purification de ce produit est réalisée par passage sur une colonne de silice avec une élution hexane/éther de polarité croissante. On obtient 710 mg de solide blanc qui peuvent être recristallisés dans le cyclohexane. Rdt = 69% F = 97°. IR = 1615 cm^{-1} ν (C=O) amide. RMN 1H (250 MHz): δ ppm = 7.41 (m, 5H); 4.60 (t, 0.25 H) et 3.73 (t, 0.75 H) H_3 , $J_{H_3-H_4} = 6$ Hz, $J_{H_3-H_{20,21}} = 6$ Hz); 3.82 (dd, 0.75 H) et 3.20 (dd, 0.25 H) ($H_{4,6}$, $J_{gem} = 12$ Hz, $J_{H_{4,6}-H_3} = 4$ Hz); 3.60 (d, 0.25 H) et 3.44 (d, 0.75 H) ($H_{30,6}$, $J_{gem} = 12$ Hz), 2.35 (dd élargi, 0.25 H) (H_6); 2.18 (m, 1H) (H_6); 1.4-2.3 (m, 9.5H) et 1.26 (dd, 0.25 H) ($H_{20,21}$, $J_{gem} = 12$ Hz; $J_{H_{20,21}-H_1} = 6$ Hz). Masse $M^+ = 241$, m/e: 77(29), 105(100), 241(43). Masse exacte: calculée 241.1466 $C_{14}H_{19}NO$; trouvée 241.1474. Analyse % trouvé (calculé) C 79.63 (79.63); H 7.91 (7.94); N 5.70 (5.80).

Reactions de biotransformation

Partie microbiologique. Nature du milieu nutritif. Nous avons utilisé successivement deux types de milieu de culture dont les compositions sont pour 1 l.: milieu A: 15 g d'extrait de malt DIFCO; 5 g de glucose; 5 g de phytone; milieu B: 20 g de corn steep liquide; 10 g de glucose. Le pH de ces milieux est ajusté à 4.85 par addition de 2N-NaOH.

Conservation de la souche. La souche *Beauveria sulfurescens* ATCC 7159 a été conservée par ensemencement périodique (2 mois) soit sur le milieu A soit sur le milieu B, ces milieux étant solidifiés par 15 g/l de gélose DIFCO.

Culture agitée. Le milieu de culture dont la composition (A ou B) est indiquée ci-dessus est réparti à raison de 200 ml par erlenmeyer de 1 l., ou de 800 ml par erlenmeyer de 3 l. Dans le premier cas, l'agitation est obtenue sur une table à mouvement rotatif (250 rpm), dans le deuxième cas sur une table à agitation va et vient. Dans toutes les expériences les substrats ont été introduits à raison de 350 mg/l de milieu en solution dans un minimum d'éthanol. L'introduction a été faite après 48 h de préculture. La température d'incubation était de 30°.

Filtration. Le mycélium est séparé par filtration sur papier filtre ordinaire et lavé avec de l'eau.

Extraction. Dans le cas du milieu A, le filtrat est extrait en continu avec du chloroforme. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Dans le cas du milieu B, le filtrat est extrait en continu avec du chloroforme; avant d'être séchée sur $MgSO_4$ et concentrée la phase organique est lavée avec une solution acide (HCl, 3N) puis une solution basique (NaOH, 3N).

Temps de contact. Milieu A, dans 6 fioles de 1 l. contenant chacune 200 ml de milieu de culture on ajoute 70 mg de substrat 13 dissous dans un minimum d'alcool. On met à incuber. L'avancement de la réaction est suivi par CPV en effectuant l'extraction d'une fiole toutes les 24 h. Le temps de contact moyen utilisé dans le cas du milieu de culture A est de 90 h. Milieu B, le temps de contact moyen utilisé dans ce cas est de 72 h.

Réactions d'hydroxylation. Les biotransformations sont effectuées suivant les conditions décrites dans la partie microbiologique expérimentale. Les biotransformations des substrats 13, 15, 17, 23, 29 ont été effectuées dans le milieu de culture A, seuls les substrats 21 et 25 ont été transformés dans le milieu de culture B.

Après extraction au chloroforme le nombre de produits hydroxylés (ou oxydés) est déterminé par chromatographie liquide haute performance à l'aide d'une colonne de gel de silice (Merck 5 μ m, 12 cm) avec comme éluant un mélange heptane/EtOH (10%) (détection ultraviolette 254 nm). Le produit brut d'extraction est ensuite purifié par passage sur une colonne de gel de silice (40-63 μ m, Merck) avec comme éluant un mélange d'hexane/isopropanol ou EtOH de polarité croissante. Lorsque la biotransformation d'un substrat conduit à un mélange de produits hydroxylés (ou oxydés), ces produits sont séparés sur une colonne prête à l'emploi: 10400 LOBAR LiChroprep Si60 (40-63 μ m) (éluant: hexane/EtOH ou éther/EtOH).

Biotransformation de 13

A partir de 280 mg de 13 on obtient après extraction 395 mg de produit brut. Une chromatographie liquide sur colonne de silice permet d'obtenir 91.7 mg du produit de départ non transformé pur à 90% et 159 mg de produit hydroxylé 14 pur à 85% (Rdt = 45%). Le produit de départ non transformé est purifié par sublimation (80°, 10 mm Hg) ($[\alpha]_D^{25} = +7.9$ $CHCl_3$, C = 0.75). Des recristallisations successives dans le benzène de 14 donne un composé 14a. L'évaporation du benzène provenant des filtrats obtenus lors de la recristallisation de 14 donne un composé 14b qui est purifié par recristallisation dans un mélange benzène-cyclohexane. $R_f = 0.57$ éther/MeOH (90-10). IR = 3620 cm^{-1} ν (O-H); 1680 cm^{-1} ν (C=O) lactame. 14a: F = 154° ($[\alpha]_D^{25} = 23.9^\circ$ (c = 1, $CHCl_3$); 14b: F = 124° ($[\alpha]_D^{25} = 0$).

Le spectre RMN 1H à 250 MHz de 14 a été décrit précédemment.⁴ Masse: $M^+ = 231$ m/e: 91(100), 95(27), 173(58), 231(31). Masse exacte: calculée 231.1259 $C_{14}H_{17}NO_2$ trouvée 231.1265. Analyse: trouvé (calculé pour $C_{14}H_{17}NO_2$) C 71.93 (72.70); H 7.43 (7.41); N 5.93 (6.06)%.

Biotransformation de 15

A partir de 400 mg de 15 on obtient après extraction au chloroforme 505 mg de produit brut. Ce mélange est séparé comme précédemment par chromatographie liquide. On obtient successivement 154 mg de produit de départ non transformé pur à 80% puis 34 mg d'un produit de structure non déterminée et enfin 267 mg d'un composé hydroxylé 16 pur à 80%. Ce produit hydroxylé est purifié par recristallisation dans un mélange benzène-cyclohexane. Rdt = 50%. F = 128-131°. $R_f = 0.42$ Ether/MeOH (90-10). IR = 3620 cm^{-1} ν (O-H); 1650 cm^{-1} ν (C=O) amide. Le spectre RMN 1H à 250 MHz de 16 a été décrit précédemment.⁴ Masse: $M^+ = 231$ m/e: 77(30), 105(100), 172(26), 231(11). Masse exacte: calculée: 231.1259 $C_{14}H_{17}NO_2$ expérimentale: 231.1254. Analyse % trouvé (calculé pour $C_{14}H_{17}NO_2$) C 72.01 (72.70); H 7.29 (7.41); N 6.81 (6.06)%.

Biotransformation de 17

A partir de 420 mg de substrat on obtient après biotransformation 527 mg de produit brut. Ce mélange est séparé comme précédemment par chromatographie liquide. On obtient 322 mg du produit de départ non transformé pur à 80% et 99 mg d'un composé hydroxylé 18 pur à 80%. Ce composé est purifié par sublimation (120°, 0.4 mm Hg). Rdt = 17.5%. F = 132-135°. $R_f = 0.51$ Ether/MeOH (90-10). IR = 3600 cm^{-1} ν (O-H); 1665 cm^{-1} ν (C=O) lactame. Le spectre RMN 1H à 250 MHz de 18 a été décrit précédemment.⁴ Masse: $M^+ = 231$ m/e: 18(21), 23(20), 91(100), 106(20), 159(21), 186(19), 231(77). Masse exacte: calculée: 231.1259 $C_{14}H_{17}NO_2$; expérimentale: 231.1256. Analyse trouvé (calculé pour $C_{14}H_{17}NO_2$): C 72.02 (72.70); H 7.28 (7.41); N 5.76 (6.06)%.

Biotransformation de 21

Ce substrat a été transformé par *Beauveria sulfurescens* dans le milieu de culture B. Une étude de l'influence du temps de réaction a été effectuée pour ce substrat. Dans tous les cas on

obtient après passage sur une colonne de silice (éluant: hexane/EtOH 5%) un solide blanc **22**. $F = 142^\circ$. IR = 3350 cm^{-1} ν (OH), 1675 cm^{-1} ν (C=O) lactame. Le spectre ^1H à 250 MHz de **22** a été décrit précédemment.⁵ Masse $M^+ = 243\text{ m/e}$: 91(100), 106(28), 186(17), 243(58). Masse exacte calculée: 243.1259 $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ expérimentale 243.1241. Analyse % trouvé (calculé pour $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_2$): C 74.24 (74.05); H 7.12 (7.04); N 5.50 (5.76)%.

Lactame **21** récupéré: $[\alpha]_D^{25} = -1.9$ (CHCl_3 , $c = 6$) dans le cas d'une bioconversion de 20 h.

Biotransformation de 25

Ce substrat a été transformé par *Beauveria sulfurescens* dans le milieu de culture B. A partir de 840 mg de **25** on obtient après extraction et lavage 915 mg de produit brut. Plusieurs chromatographies sur gel de silice permettent d'isoler les composés suivants 36 mg de lactame de départ non transformé; 91 mg de cétone **28**. Rdt: 11%. IR = 1735 cm^{-1} ν (C=O) cétone 1665 cm^{-1} ν (C=O) lactame; 433 mg d'alcool **26**. Rdt = 52%. $F = 107-108^\circ$. IR = 3380 cm^{-1} ν (O-H); 1660 cm^{-1} ν (C=O) lactame. Le spectre RMN ^1H à 250 MHz de **26** a été décrit précédemment.⁵ Masse $M^+ = 257\text{ m/e}$: 91(100), 186(78), 257(20). Masse exacte: calculée 257.1415 $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ expérimentale 257.1411. Analyse trouvé (calculé): C 74.61 (74.68); H 7.60 (7.44); N 5.36 (5.44)%. 233 mg d'alcool **27**, Rdt = 28%. IR = 3400 cm^{-1} ν (OH); 1660 cm^{-1} ν (C=O) lactame. Le spectre RMN ^1H à 250 MHz de **27** a été décrit précédemment.⁵ Masse $M^+ = 257\text{ m/e}$: 91(100), 186(82), 257(22). Masse exacte: calculée 257.1415 $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ expérimentale 257.1411. Analyse % trouvé (calculé): C 74.70 (74.68); H 7.66 (7.44); N 5.50 (5.44).

Biotransformation de 23

On obtient dans ce cas un solide blanc **24** avec un rendement de 53%. $F = 102-104^\circ$. IR = 3400 cm^{-1} ν (OH); 1615 cm^{-1} ν (C=O) amide. Le spectre ^1H à 250 MHz de **24** a été décrit précédemment.⁵ Masse $M^+ = 243\text{ m/e}$: 243(100), 105(100), 243(28). Masse exacte calculée: 243.1259 $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_2$ expérimentale 243.1258. Analyse % trouvé (calculée pour $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_2$): C 74.64 (74.05); H 7.72 (7.04); N 5.42 (5.76)%.

Biotransformation de 29

La biotransformation de 780 mg de **29** par *Beauveria sulfurescens* permet d'obtenir après extraction au chloroforme 1.05 g de produit brut. Plusieurs chromatographies sur gel de silice permettent d'isoler les produits suivants (par ordre de polarité croissante): 42 mg de substrat non transformé; 39 mg de cétone **33**, Rdt = 4%. IR = 1730 cm^{-1} ν (C=O) cétone; 1615 cm^{-1} ν (C=O) lactame. Le spectre ^1H à 250 MHz de **33** a été décrit précédemment.⁵ Masse $M^+ = 255\text{ m/e}$: 77(27), 105(100), 255(28). Masse exacte: calculée 255.1259 $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ expérimentale 255.1246. 74 mg d'alcool **32**, Rdt = 9%. $F = 176-185^\circ$. IR = 3400 cm^{-1} ν (OH); 1610 cm^{-1} ν (C=O) amide. Le spectre ^1H à 250 MHz de **32** a été décrit précédemment.⁵ Masse $M^+ = 257\text{ m/e}$: 57(19), 77(32), 105(100), 256(17), 257(19). Masse exacte: calculée 257.1415 $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ expérimentale 257.1423. Analyse: trouvée (calculé): C 74.32 (74.68); H 7.12 (7.44); N 5.72 (5.44)%. 440 mg d'amide hydroxylé **30**, Rdt = 53%. $F = 153^\circ$ (recristallisé dans le benzène). IR = 3420 cm^{-1} ν (OH); 1615 cm^{-1} ν (C=O) amide. Le spectre ^1H à 250 MHz de **30** a été décrit précédemment.⁵ Masse $M^+ = 257\text{ m/e}$: 77(44), 105(100), 257(24). Masse exacte: calculée 257.1415 $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ expérimentale 257.1411. Analyse: % trouvé (calculé): C 74.32 (74.68); H 7.53 (7.44); N 5.34 (5.44)%. $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_2$: 216 mg de lactame hydroxylé **31**, Rdt = 26%. $F = 158-159^\circ$ (recristallisé dans cyclohexane/benzène). IR = 3420 cm^{-1} ν (O-H); 1615 cm^{-1} ν (C=O) amide. Le spectre ^1H à 250 MHz de **31** a été décrit précédemment.⁵ Masse $M^+ = 257\text{ m/e}$: 77(28), 105(100), 257(34). Masse exacte: calculée 257.1415 $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ expérimentale 257.1415. Analyse trouvé (calculé): C 74.86 (74.68); H 7.67 (7.44); N 5.73 (5.58).

Réduction de 14

A 76.5 mg de lactame hydroxylé **14** en suspension dans 4 ml de THF anhydre on ajoute 200 mg d'hydruide de lithium aluminium. On porte à reflux pendant une nuit. On hydrolyse. Le précipité est lavé plusieurs fois avec du THF chaud. La phase organique

est lavée avec 10 ml de HCl (1.5 N). On extrait 3 fois cette phase acide avec de l'éther. On ajoute de la soude concentrée (10N) dans la phase aqueuse jusqu'à obtenir un pH basique. On extrait cette phase aqueuse à l'éther. Après lavage à l'eau de la solution étherée et séchage sur MgSO_4 on chasse le solvant sous vide. On obtient 41 mg d'hydroxy amine **34** brute. Ce composé peut être purifié par sublimation (70° ; 0.3 mm Hg). $F = 67-74^\circ$. IR = pas de bande ν (C=O) amide, 3620 cm^{-1} ν (O-H). RMN ^1H 250 MHz δ ppm = 1.4 à 1.7 (m, 4H); 1.80 à 2.20 (m, 1H); 2.15 (m, 1H); 2.60 (d, 1H); 2.90 (dd, 1H); 3.10 (m, 1H); 3.92 (m, 3H); 7.30 (m, 5H). Masse $M^+ = 217\text{ m/e}$: 91(77), 158(100), 159(14), 217(11). Masse exacte: calculée: 217.1466 $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}$ expérimentale 217.1464. Analyse % trouvé (calculé): C 77.06 (77.38); H 8.58 (8.81); N 6.39 (6.45) $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}$.

Réduction de 16

Les conditions opératoires sont les mêmes que pour la réduction de **14**. A partir de 110 mg de **16** non purifié on obtient 48 mg d'hydroxylamine **34** brute. Caractéristiques spectrales: voir réduction de **14**.

Réduction de 22

A partir de 100 mg de **22** on obtient après réduction et lavage 57 mg d'amine hydroxylée **35**. IR = 3380 cm^{-1} ν (O-H), pas de bande ν (C=O) lactame. RMN ^1H 250 MHz δ ppm = 7.30 (m, 5H); 3.72 (d, 1H) (H_{10a} , $J_{\text{gem}} = 13\text{ Hz}$); 3.64 (d, 1H) (H_{10b} , $J_{\text{gem}} = 13\text{ Hz}$); 3.50 (s, 1H) ($\text{H}_{9\text{endo}}$); 3.26 (m, 1H) (H_3); 3.08 (dd, 1H) (H_{5a} , $J_{\text{gem}} = 10.5\text{ Hz}$, $\text{H}_{3\text{exo-H6}} = 7\text{ Hz}$); 2.58 (t large, 1H) (H_7); 2.50 (d, 1H) (H_{5b} , $J_{\text{gem}} = 10.5\text{ Hz}$); 2.06 (m, 2H) (H_4 et H_6); 1.85 (d, 1H) (H_{1a} , $J_{\text{gem}} = 11\text{ Hz}$); 1.32 (d, 1H) (H_{1b} , $J_{\text{gem}} = 11\text{ Hz}$) et 1.25 (m, 2H) (H_2). Masse $M^+ = 229\text{ m/e}$: 91(100), 170(67), 171(70), 172(20), 229(39).

Réduction de 24

A partir de 140 mg d'amide hydroxylé **24** on obtient après réduction par LiAlH_4 71 mg d'amine hydroxylée **35** liquide. Caractéristiques spectrales: voir réduction de **22**.

Oxydation de 27

On ajoute à 40 mg d'alcool **27**, en solution dans 0.3 ml de chlorure de méthylène anhydre, 52 mg de chlorochromate de pyridinium (réactif de Corey). On agite pendant 2 h à température ambiante puis on filtre sur une petite colonne de florisil. On obtient après évaporation du solvant 35 mg de cétone **28**. Les R_f donnés pour les produits d'oxydation ont été mesurés sur plaque de silice Si 60 $15\text{ }\mu\text{m}$ à zone de concentration (Merck) avec comme éluant un mélange d'heptane/isopropanol (1%). $R_f = 0.77$. IR = 1730 cm^{-1} ν (C=O) cétone; 1670 cm^{-1} ν (C=O) lactame.

Oxydation de 26

Les conditions opératoires sont les mêmes que pour l'oxydation de **27**. A partir de 10 mg de **26** on obtient 7 mg de cétone **28**. $R_f = 0.77$. IR = spectre identique à celui du produit obtenu par oxydation de **27**.

Oxydation de 30

L'oxydation de 60 mg d'alcool **30** permet d'obtenir 51 mg de cétone **33**. $R_f = 0.60$. IR = 1730 cm^{-1} ν (C=O) cétone; 1620 cm^{-1} ν (C=O) amide.

Oxydation de 31

L'oxydation de 80 mg de **31** permet d'obtenir 74 mg de cétone **33**. $R_f = 0.60$. IR = spectre identique à celui du produit obtenu par oxydation de **30**.

Oxydation de 32

L'oxydation par le chlorochromate de pyridinium de 20 mg d'alcool **32** permet d'obtenir 16 mg de cétone **36**. $R_f = 0.70$. IR = 1730 cm^{-1} ν (C=O) cétone; 1620 cm^{-1} ν (C=O) amide.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **9**, 119 (1964); J. M. H. Graves, A. Clark et H. J. Ringold, *Biochemistry* **4**, 2655 (1965); J. B. Jones et J. F. Beck, *Application of Biochemical Systems in Organic*

- Chemistry (Edited by J. B. Jones, C. J. Sih et D. Perlman), p. 297. Wiley Interscience, New York (1976).
- ²E. H. R. Jones, *Pure Appl. Chem.* **33**, 39 (1973).
- ³M. Nakazaki, H. Chikamatsu, K. Naemura et M. Asao, *J. Org. Chem.* **45**, 4432 (1980).
- ⁴R. Furstoss, A. Archelas, B. Waegell, J. Le Petit et L. Devezé, *Tetrahedron Letters* 451 (1980).
- ⁵R. Furstoss, A. Archelas, B. Waegell, J. Le Petit et L. Devezé, *Ibid.* 445 (1981).
- ⁶G. S. Fonken et R. A. Johnson, *Chemical Oxidation with Microorganisms*. Dekker, New York (1972).
- ⁷R. A. Johnson, M. E. Herr, H. C. Murray, et L. M. Reineke, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 4880 (1971).
- ⁸R. A. Johnson, M. E. Herr, H. C. Murray, et G. S. Fonken, *J. Org. Chem.*, **33**, 3217 (1968); ⁹R. A. Johnson, M. E. Herr, H. C. Murray, L. M. Reineke et G. S. Fonken *Ibid.* 3195 (1968).
- ¹⁰R. A. Johnson, *Oxidation in Organic Chemistry* (Edited by W. S. Trahanovsky), p. 131 New York (1978).
- ¹¹S. Patai (Ed.) *Chemistry of Amides*. p. 7. Wiley-Interscience, New York (1970).
- ¹²K. A. Kime et R. E. Sievers, *Aldrichimica Acta* **10**, 54 (1977).
- ¹³J. A. Dale et H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 512 (1973).
- ¹⁴B. J. Litman et J. A. Schellman, *J. Phys. Chem.* **69**, 978 (1965).
- ¹⁵J. A. Schellman, *Acc. Chem. Res.* **1**, 144 (1968).
- ¹⁶H. Ogura, H. Takayanagi, K. Furuhashi, *J. Chem. Soc. Perkin I* 665 (1976).
- ¹⁷K. Blaha, P. Malon, M. Tichy, I. Fric, R. Usha, S. Ramakumar et K. Venkatesan, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **43**, 3241 (1978).
- ¹⁸P. Malon, I. Fric, M. Tichy et K. Blaha, *Ibid.* **42**, 3104 (1977).
- ¹⁹A. Horeau, *Stereochemistry, Fundamentals and Methods* (Edited by H. B. Kagan), Vol. 3, p. 51. Georg Thieme, Stuttgart (1977).
- ²⁰M. Legrand et M. J. Rougier, *Ibid.* Vol. 2 (1977).
- ²¹I. Fric, P. Malon, M. Tichy et K. Blaha, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **42**, 678 (1977).
- ²²A. Fischli, *Modern Synthetic Methods* (Edited by R. Scheffol), Vol. 2, p. 296. Otto Salle Verlag (1980).
- ²³F. R. Hewgill et P. R. Jefferies, *J. Chem. Soc.* 2767 (1955).
- ²⁴J. Sauer, J. Kredel, *Tetrahedron Letters* 731 (1966).
- ²⁵R. W. Iles, W. S. Worall, *J. Org. Chem.* **26**, 5233 (1961).
- ²⁶S. Bekmann, H. Geiger, *Chem. Ber.* **94**, 48 (1961).
- ²⁷P. Mackiewicz, R. Furstoss, B. Waegell, R. Cote et J. Lessard, *J. Org. Chem.* **43**, 3746 (1978).
- ²⁸R. Tadayoni, J. Lacrampe, A. Heumann, R. Furstoss et B. Waegell, *Tetrahedron Letters* 735 (1975).
- ²⁹R. A. Lee, *Ibid.* 3333 (1973).
- ³⁰R. Furstoss et B. Waegell, *Ibid.* 365 (1976).