STEROIDES CYTOTOXIQUES DE POLYPORUS VERSICOLOR[†]

J. VALISOLALAO, B. LUU,* et G. OURISSON

Université Louis Pasteur, Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles Associé au CNRS, Centre de Neurochimie, 5, rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France

(Received in France 23 December 1981)

Résumé—La Polyporacée européenne *Polyporus versicolor* a une activité cytotoxique; deux constituants actifs en ont été isolés, en pilotant la purification par un test de cytotoxicité sur des cellules d'hépatome cultivées in vitro. Il s'agit de dérivés polyoxygénés de l'ergostérol, caractérisés par le système Δ^7 , 9α –OH.

Abstract—The crude extracts of the European wood-rotting fungus Polyporus versicolor contain cytotoxic principles. Two of these have been isolated by monitoring the purification by tests on hepatoma cells grown in vitro. They are polyoxygenated derivatives of ergosterol, characterized by the partial structure Δ^7 , 9α -OH.

Dans les articles précédents de cette série, nous avons montré l'utilité d'un test rapide de cytotoxicité, conduit sur des cellules tumorales hépatiques de rat cultivées *in vitro* (système HTC), pour la recherche systématique des substances cytotoxiques extraites de végétaux. En particulier, de deux champignons parasites du bois, *Inonotus obliquus* et *Poria cocos* (Polyporacées), tous deux utilisés dans des pharmacopées traditionnelles, nous avions isolé des dérivés hydroxylés de stérols, actifs dans le test HTC.

Nous décrivons maintenant l'isolement de substances nouvelles, des dérivés oxygénés de l'ergostérol, dans une autre Polyporacée, *Polyporus versicolor*. Ce champignon, commun en Europe, ne semble pas avoir été utilisé en médecine populaire. L'extrait chloroformique brut de son mycélium, cultivé sur milieu synthétique, inhibe la croissance des cellules d'hépatomes du système HTC.

La purification de l'extrait nous a permis d'isoler trois fractions cristallisées désignées par P_1 , P_2 , P_3 , puis deux substances inhibitrices de la croissance cellulaire.

Déterminations structurales

Description de P_1 : Le mycélium a été extrait au chloroforme, et la fraction neutre soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice. Le mélange CH_2Cl_2 -MeOH, 94:6 a permis d'éluer la fraction P_1 avec un rendement de $0 \cdot 008\%$. L'analyse en spectrométrie de masse (introduction directe) fait apparaître deux pics moléculaires, respectivement à m/z = 396 et 398, indiquant que P_1 est constitué par un mélange de deux composés. Une analyse en couplage CPG-SM sur le produit de triméthylsilylation permet de séparer les deux composants A et B et d'identifier le premier constituant à l'ergostérol 1 par la comparaison des fragmentations avec celles d'un échantillon authentique.

Le spectre de B présente deux unités de masse de plus par rapport à A. La présence du pic intense à m/z 225 $(M^{+}-Me_{3}SiOH-C_{9}H_{17})$ suggère que B possède une chaîne latérale identique à celle de A. D'autre part, les fragmentations de B comportent les principales carac-



téristiques des Δ^7 -stérols, à savoir^{1,2} la présence du pic moléculaire relativement intense à m/z 470, le pic de base qui apparait à m/z 255 = M⁺-chaîne latérale-Me₃SiOH, et enfin, la présence des pics de fragmentation du cycle D à m/z 213 et 229.

Ces observations, ainsi qu'une comparaison avec le brassicastérol, suggèrent que le deuxième composant de P_1 pourrait être le 5α , 6-dihydro-ergostérol.

Description de P_2 . Le système d'élution CH_2Cl_2 -MeOH, 94:6 a fourni une deuxième fraction contenant essentiellement le composé P_2 (0 · 002%), $F = 254-256^{\circ}C$. Celui-ci donne un dérivé diacétylé, $F = 166-168^{\circ}$, $[\alpha]_D =$ -156°, dont les données spectrales (SM, IR, RMN) correspondent à celles du 5 α -hydroxy-3 β , 6 β -diacétoxyergosta-7, 22-diène 3', ce qui conduit à attribuer à P_2 la

⁺Etude chimique et biochimique de Drogues Chinoises, Partie VIII. Partie VII: Y. Nakatani, G. Ourisson et J. P. Beck, Chem. Pharm. Bull. (Japan) 29, 2261 (1981).

structure du cérévistérol 3. Les points de fusion et pouvoir rotatoire indiqués ci-dessus sont en accord avec cette structure.³

Description de P₃. La fraction éluée par le système CH₂Cl₂-MeOH 85:15 contient la substance P₃ ($0 \cdot 0005\%$ du mycélium sec), F = 225-227°, [α]_D = -141°. En CCM, P₃ se révèle plus polaire que le cérévistérol **3**. Son spectre de masse donne un pic ultime à m/z = 428, qui correspond à la masse d'un déhydro-cérévistérol, mais un tel produit ne pourrait pas avoir une polarité très différente de celle du cérévistérol. Ceci suggère donc que P₃ pourrait différer du cérévistérol en particulier par un hydroxyle supplémentaire, le pic à m/z 428 étant alors le fragment M⁺-H₂O.

L'acétylation de P₃ par le mélange anhydride acétiquepyridine fournit un diacétate: $F = 195-197^{\circ}C$; $[\alpha]_D = -131^{\circ}$; SM m/z 512 (M[†]-H₂O). Son spectre de RMN ¹H fait apparaitre deux protons en α de deux acétates secondaires à 4.95 ppm (1H, dd, J₁ = 5.3Hz; J₂ = 2.3Hz) et 5.14 ppm (1H, m, W_{1/2} = 25Hz) et un proton vinylique à 5.28 ppm, dont les signaux sont respectivement comparables à ceux des protons 6-H, 3-H et 7-H du cérévistérol acétylé 3'.

P₃ se présente ainsi comme un dérivé monohydroxylé du cérévistérol 3, où le groupement hydroxyle supplémentaire occupe nécessairement une position tertiaire. Les sites C-20, C-24 et C-25 sont exclus par le spectre de RMN car chacun des signaux des méthyles portés par ces carbones est resté dédoublé par le proton adjacent. Une substitution 17-OH est également peu probable car l'effet inductif attendu pour une telle substitution sur les méthyles C-18 et C-21 n'est pas observé dans le cas présent.

L'ensemble de ces données implique que les sites C-9 et C-14 sont les seuls possibles. L'observation en RMN 'H du système de doublet de doublets du proton vinylique 7-H, dont le signal est simplifié par rapport au multiplet du proton correspondant du cérévistérol 3, suggère que l'un des sites C-9 ou C-14 porte effectivement le groupement hydroxyle.

Deux arguments militent en faveur de la position C-9. D'une part, le déblindage de 0.05 ppm accusé par le méthyle C-19, comparé au méthyle correspondant du cérévistérol, est imputable à l'effet inductif d'un groupement OH situé en position β de ce méthyle,⁴ en l'occurence en C-9. D'autre part, cet hydroxyle résiste à des conditions dures de triméthylsilylation, ce qui exclut son emplacement sur le site C-14 qui est une position "silylable" comme l'indique le cas de l'ecdysone,⁵ et suggère donc de le placer en C-9. Ce site tertiaire est dissimulé sous la face α du squelette tétracyclique comme le 14 α -OH, mais il est moins accessible parce que plus central par rapport à ce squelette, et plus protégé par des liaisons C-H α , axiales elles aussi (en 1, 5, 7 et 11 α au lieu de 7, 9 et 11 α).

Au composé P₃, nous attribuons donc la structure du 3β , 5α , 6β , 9α -tétrahydroxyergosta-7, 22-diène 4.

Description de P₄. P₄ (0 · 0005% du mycélium sec), de R_f intermédiaire entre P₂ et P₃ sur CCM, constitue l'un des principes cytotoxiques de Polyporus versicolor. Il présente les propriétés physiques suivantes: F = 225-228°; $[\alpha]_D = -64^\circ$; IR cm⁻¹: 3400, groupement hydroxyle; 1670 et 1620, système caractéristique d'une cétone α , β -insaturée dont la présence est confirmée par l'absorption en UV, $\lambda_{max} = 237$ nm ($\epsilon = 11000$); SM m/z 426 (M⁺-H₂O). Le spectre de RMN¹H rapelle ceux des composés P₂ et P₃ décrits plus hauts: 4 · 06 ppm (1H, m, $W_{1/2} = 25Hz$, 3-H axial); 5 · 65 ppm (1H, d, J = 1 · 9Hz, 7-H); 5 · 20 ppm (2H, ABXY, $J_{AB} = 16Hz$, $J_{AX} = J_{BY} =$ 6 · 8Hz, 22- et 23-H); puis dans la région des méthyles, quatre doublets correspondant aux méthyles C-21, C-26, C-27 et C-28 et deux singulets dûs aux méthyles C-18 et C-19.



Ces indications suggèrent fortement que ce composé pourrait être un proche parent de P3 ne présentant pas d'hydroxyle secondaire en C-6 (doublet, et non doublet de doublets, pour H-7). D'autre part, la RMN 13 C de P₄ révèle par la présence des pics à $67 \cdot 2$, $74 \cdot 7$ et 79 · 7 ppm l'existence de deux centres tertiaires porteurs de groupements OH, en plus du carbone secondaire C-3. Les seules possibilités de localisation de ces deux groupements sont les carbones C-5, C-9 et C-14, les centres tertiaires C-17, C-20, C-24 et C-25 étant exclus d'après les valeurs des déplacements chimiques du méthyle angulaire C-18 et des méthyles de la chaîne latérale. Les sites C-9 et C-14 ne peuvent pas être simultanément occupés car le doublet de faible constante de couplage $J = 1 \cdot 9Hz$ observé pour le proton 7-H en RMN 'H implique que celui-ci interagit à longue distance avec l'un ou l'autre des protons 9-H ou 14-H. Par conséquent, le site C-5 porte nécessairement l'un des groupements OH. Nous lui attributions la configuration 5α en raison de l'appartenance probable de P₄ à la famille du cérévistérol, et surtout parce qu'une substitution 5B-OH aurait nettement déplacé le méthyle C-19 vers les champs forts comme dans le cas du produit de synthèse 12 (Schéma 1); or ce phénomène n'est pas observé pour le composé P4. La configuration en C-3 du produit synthétique 12 (3α -OH) a été choisie pour avoir un groupement OH équatorial comme dans le cas du produit $5(3\beta - OH)$.

En ce qui concerne le groupement OH tertiaire restant, il est possible de le placer soit en C-9 comme dans P₃, soit en C-14, conduisant à une structure apparentée à celle des ecdystéroides. Cette dernière éventualité est cependant à exclure car le dérivé 14α -OH 15, préparé selon le Schéma 2, diffère du composé P₄ aussi bien par ses



Schéma 1. α, Acide p. nitroperbenzoïque, HClO₄; β, NBS⁶; γ, Ph₃, HCOOH, DAD⁷; δ-KOH⁸; ε, (i) Br₂, AcOH; (ii) Li₂CO₃, DMF; ζ, SeO₂.



Schéma 2. α , CrO₃, H₂SO₄⁹; β , SeO₂.

propriétés physiques que par son activité physiologique (vide infra).

Ces données permettent de localiser sans ambiguïte le groupement OH en position C-9. Une orientation 9α -OH est compatible avec le déblindage observé pour le méthyle C-19, (δ 1 · 01) par rapport au méthyle correspondant du précurseur 14 (δ 0 · 95). L'incrément de 0 · 06 ppm, plus faible que celui indiqué par Zürcher¹⁰ (0 · 142 ppm) traduit les interactions probables avec les groupements fonctionnels voisins. Enfin, P₄ a été obtenu par oxydation par MnO₂ de P₃, ce qui permet d'établir définitivement sa structure comme étant le 3 β , 5 α , 9 α trihydroxy-ergosta-7, 22-dièn-6-one 16.

Description de P₃. P₅, le deuxième principe cytotoxique de Polyporus versicolor, représente seulement 0.0002% du mycélium sec. Sa polarité est très voisine de celle de P₄ et le composé possède les propriétés physiques suivantes: $F = 178-180^{\circ}C$; $[\alpha]_D = -117^{\circ}$; IR cm⁻¹ 3500 cm⁻¹; SM m/z 442 (M⁺-H₂O). L'examen du spectre de RMN¹H de P₅ permet de le classer de nouveau dans la série du cérévistérol: les doublets des méthyles C-21, C-26, C-27 et C-28 de la chaîne latérale, le système ABXY dû aux protons 22-H et 23-H, le doublet de doublets du proton 7-H, le multiplet du proton 3-H axial (W_{1/2} = 25Hz), sont autant de caractéristiques de cette série que nous retrouvons dans le spectre de P₅. Un singulet intense à 3 · 41 ppm signale la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

La RMN¹³C du composé indique que les centres porteurs de fonctions oxygénées sont au nombre de quatre $(67 \cdot 5; 75 \cdot 2; 78 \cdot 1; 82 \cdot 5)$ qui se répartissent donc en trois centres porteurs de groupements OH et un centre portant le groupement méthoxyle. La multiplicité de ces signaux dans le spectre de pré-émission permet d'attribuer les singulets à $75 \cdot 2$ et $78 \cdot 1$ ppm à des carbones tertiaires et les doublets à $67 \cdot 5$ et $82 \cdot 5$ ppm à des carbones secondaires.

Traité dans des conditions douces d'acétylation, P₅ fournit un dérivé monoacétylé, F = 157-159°, SM m/z 503 (M + 1, CI isobutane). Deux des groupements hydroxyles occupent donc des sites tertiaires. L'un de ces groupements résiste à des conditions fortes de triméthylsilylation, comme dans le cas de P₃. Pour les raisons évoquées ci-dessus, nous déduisons qu'il est placé en position 9 α . Le site C-14 ne peut pas être occupé par le deuxième groupement OH tertiaire car, dans le système de doublet de doublet du proton vinylique 7-H, la constante de faible valeur J₁ = 2 · 3Hz correspond au couplage à longue distance 7-H/14-H, la constante J₂ = 5 · 3 Hz étant attribuable à l'interaction du proton 7-H avec le 6-H équatorial.

Ces données impliquent, d'une part, que le carbone C-5 porte nécessairement le groupement OH avec la configuration probable 5α , et d'autre part, que le carbone C-6 est substitué par le groupement 5β -OMe. L'orientation β de ce dernier est confirmée par le déblindage accusé par le méthyle C-19 qui résonne à champ relativement bas (1.06 ppm).

Par conséquent, la structure de P₅ correspond au 3β , 5α , 9α -trihydroxy- 6β -méthoxyergosta-7, 22-diène 17. Dans ce cas, nous n'avons pas réalisé de corrélation avec les produits apparentés décrits précédement.







Activité biologique

Les tests physiologiques réalisés sur des cellules d'hépatome de rat HTC ont permis d'évaluer l'effet de chaque produit sur la multiplication cellulaire. L'allure des courbes d'activité tracées après une période de trois jours d'incubation (Fig 1) révèle une grande diversité dans les réponses des cellules aux produits. D'après leur activité, es produits peuvent être classés en trois catégories:

(1) Les produits cytotoxiques: ce sont, d'une part les produits naturels P_4 et P_5 , et d'autre part les produits de

synthèse 8 et 12, qui provoquent un arrêt immédiat de la croissance des cellules en provoquant leur lyse. Ceci est prouvé par le fait que nous n'observons pas de cellules mortes révélables au Trypan bleu, mais nous remarquons la formation de débris cellulaires, qui suggère que les cellules affectées ont subi une lyse.

(2) Les produits peu cytotoxiques: ce sont essentiellement les produits intermédiaires 9, 10, 11 et 14, qui inhibent légèrement la multiplication cellulaire.

(3) Les produits inactifs: parmi ceux-ci figurent les deux métabolites P_2 et P_3 , ainsi que les analogues synthétiques 14' et 15.

Ces observations mettent en évidence l'existence d'une série de composés stéroïdiques caractérisés par le système Δ^7 9 α -OH, dont certains ont une activité cytotoxique.

Il est connu que des stéroïdes substitués Δ^7 14 α -OH jouent un rôle de régulateur de la biosynthèse des stérols dans les cellules animales en culture; ils agiraient en réprimant l'activité de la HMGCoA-réductase." Cette régulation de la biosynthèse du mévalonate et des produits dérivés parait importante dans le contrôle de la multiplication des cellules des organismes supérieurs. Les composés 12 et 15 contiennent tous deux le système Δ' 14 α -OH. Ils se comportent cependant très différemment vis-à-vis des cellules HTC: alors que 12 est un inhibiteur de la croissance cellulaire, 15 est dépourvu d'activité cytotoxique. Une différence aussi importante dans les phénomènes observés montre que la présence du système Δ^7 14 α -OH ne constitue pas une condition suffisante pour conférer à la molécule un rôle de régulateur de croissance cellulaire. Inversement, la cytotoxicité manifestée par P₄ semble indiquer que le système Δ 9α -OH est susceptible de renforcer le caractère cyto-



Fig. 1. Viabilité des cellules HTC en présence des substances naturelles et synthétiques (33 µg/ml).

toxique d'un composé. Cette observation est appuyée d'une part par la cytotoxicité très prononcée de P_5 dont la structure comporte ce système, et d'autre part par la perte sensible de l'activité lorsque ce système disparait comme c'est le cas pour les produits **14** et P_2 .

Néanmoins P₃, qui appartient à cette famille de stéroïdes $\Delta^7 9\alpha$ -OH substitués, constitue par son manque d'activité un contre-exemple qui montre qu'il est encore difficile à ce stade d'établir une relation simple entre structure et activité.

CONCLUSION

Diverses méthodes de purification combinées aux tests de cytotoxicité sur les cellules HTC en culture ont permis d'isoler puis de caractériser les métabolites cytotoxiques de Polyporus versicolor.

Ce sont des dérivés hautement fonctionnalisés de l'ergostérol, comportant dans leur structure le système $\Delta^7 9\alpha$ -OH, et certains ont une action inhibitrice sur les cellules HTC.

Ces résultats combinés avec ceux que nous avons antérieurement obtenus à partir d'autres polypores¹² mettent en évidence l'importance de la famille des Polyporacées comme source de substances cytotoxiques, et soulignent le fait que de telles substances peuvent être trouvées aussi bien dans des espèces utilisées comme drogues anticancéreuses (Poria cocos, Inonotus obliquus) que dans des espèces plus banales telles que Polyporus versicolor.

Remerciements--Nous remercions le Dr J. P. Beck et Mme M. T. Hotz pour la culture des cellules, et M. A. Escaut pour la culture du mycélium de *P. versicolor*.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres de RMN ont été enregistrés en général dans le CDCl₃ sur CAMECA 250 et le tétraméthylsilane a été utilisé comme référence interne. Les spectres de masse ont été pris sur un appareil Thomson-CSF THN 208 par une introduction directe. Les couplages CPV-SM ont été effectués avec une colonne capillaire de 25 m de longueur remplie de SE 30 à 1% sur Chromosorb W, couplée au spectromètre de masse LKB 9000 S. Les spectres IR ont été obtenus avec le spectrophotomètre Perkin-Elmer 177, en général dans CHCl₃. Les spectres UV ont été enregistrés avec le spectrophotomètre Cary 118. Les pouvoirs rotatoires [α]_D ont été mesurés sur un polarimètre Perkin-Elmer 141, en général dans CHCl₃ à une concentration 0 · 01 < C < 0 · 3.

Obtention de l'extrait chloroformique de P. versicolor

La culture du mycélium de Polyporus versicolor¹³ a été réalisée à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (Gif-sur-Yvette) dans le service de M. A. Escaut, selon des techniques connues. Le mycélium humide (45 kg, soit 10 kg de mycélium sec) a été soumis à des extractions successives au MeOH et au CH₂Cl₂. L'extrait chloroformique (33 g) a été repris dans 270 ml d'un mélange MeOH/CH₂Cl₂ à 2%. Lorsque la solution a été abandonnée pendant une nuit à 4°, il s'est formé un précipité qu'on élimine par filtration (2.65 g). Le filtrat est concentré, puis chromatographié sur une colonne de silice Merck 60μ à moyenne pression (8 bar), éluée avec un gradient de solvant méthanol-chloroforme.

3β-Triméthylsilyloxyergostérol et 3β-Triméthylsilyloxyergosta-7, 22-diène

Le système MeOH/CH₂Cl₂ 6:94 élue une première fraction P₁. La précipitation à l'acétone de cette fraction fournit un produit qui a été recristallisé dans le méthanol. La triméthylsilylation du produit suivie d'une analyse en couplage CPV-SM permet de séparer deux composants A et B présentant les fragmentations suivantes: A-m/z 468 (M⁺), 378 (M⁺-Me₃SiOH), 363 (M⁺-Me₃SiOH-CH₃), 253 (M⁺-Me₃SiOH-C₉H₁₇). B-m/z 470 (M⁺), 380 (M^{+} -Me₃SiOH), 255 (M^{+} -Me₃SiOH-C₉H₁₇), 229 (M^{+} -Me₃SiOH-C₁₁H₁₉), 215 (M^{-} -Me₃SiOH-C₁₂H₂₁).

3B, 6B-Diacétoxy 5a-hydroxyergosta-7, 22-diène 3'

La fraction P₂ a été également éluée avec le mélange MeOH/CH₂Cl₂ 6:94. Elle contient 620 mg de produit brut qui, repris dans $2 \cdot 5$ ml d'acétone, a fourni un précipité. Celui-ci a été filtré, lavé, puis recristallisé dans le méthanol: F = 254-256° (Litt': 252-255°). On soumet 55 mg du produit à une acétylation douce (1 ml de pyridine et $0 \cdot 5$ ml de Ac₂O à température ambiante pendant 1 nuit). Après une purification sur gel de silice, on obtient 70 mg de produit pur, qui est recristallisé deux fois dans le méthanol. F = 166-168° (Litt³ 168-170°). [α]_D = -156° (C = $0 \cdot 25$, EtOH) (Litt³ - 149°). IR: ν cm⁻¹ 3440, 3550, 1250, 1720, 1650. RMN: $\delta 0 \cdot 59$ (3H, s, 18-Me), $0 \cdot 82$ (3H, d, J = 6, 5Hz, 26-Me), $0 \cdot 83$ (3H, d, J = 6, 5Hz, 27-Me), $0 \cdot 91$ (3H, d, J = 6, 8Hz, 28-Me) $1 \cdot 02$ (3H, d, J = 6, 5Hz, 21-Me), $1 \cdot 07$ (3H, s, 19-Me), $2 \cdot 03$ (3H, s, OCCH₃), $2 \cdot 07$ (3H, s, OCCH₃), $4 \cdot 92$ (1H,

d, J = 4, 4Hz, 6-H), $5 \cdot 14(1H, W_{1/2} = 25Hz, 3-H)$, $5 \cdot 38$ (1H, m, 7-H). SM: m/z 454 (M⁺-AcOH), 436 (M⁺-H₂O-AcOH), 421 (M⁺-H₂O-AcOH-CH₃), 376 (M⁺-H₂O-2AcOH) pic de base, 361 (M⁺-H₂O-2AcOH-CH₃), 251 (M⁺-2AcOH-H₂O-C₉H₁₇).

3B, 6B-Diacétoxy-5a, 9a-dihydroxyergosta-7, 22-diène 4'

La fraction suivante P₃, éluée avec le mélange MeOH/CH₂Cl₂ 15/85 a fourni 50 mg de produit cristallisé. F = 225-227°; $[\alpha]_D = -141°$ (C = 0 · 032; pyridine). L'acétylation de P₃ avec la pyridine et Ac₂O donne un produit cristallisé. F = 195-197°C; $[\alpha]_D = -131°$ (C = 0 · 038; CHCl₃), IR: ν cm⁻¹ 3400, 3580, 1720, 1250. RMN: δ 0 · 60 (3H, s, 18-Me), 0 · 87 (3H, d, J = 6, 5Hz, 26-Me), 0 · 89 (3H, d, J = 6, 5Hz, 27-Me), 0.99 (3H, d, J = 6, 5Hz, 28-Me), 1 · 06 (3H, d, J = 6, 5Hz, 21-Me), 1 · 12 (3H, s, 19-Me), 2 · 04 (3H, s, 0CH₃):

$$2 \cdot 07$$
 (3H, s, OCCH₃), $4 \cdot 95$ (1H, dd, $J_1 = 5.3$ Hz, $J_2 = 2 \cdot 3$ Hz, 6–H).

5 · 14 (1H, $W_{1/2} = 25$ Hz, 3–H). 5 · 28 (1H, dd, $J_1 = 5 \cdot 3$ Hz, $J_2 = 2 \cdot 3$ Hz, 7–H). SM: m/z 512 (M⁺–H₂O), 494 (M⁺–2H₂O); 479 (M⁺–2H₂O–CH₃), 470 (M⁺–AcOH), 452 (M⁺–AcOH–H₂O), 434 (M⁺–AcOH–2H₂O), 410 (M⁺–2AcOH), 392 (M⁺–2AcOH–H₂O), 374 (M⁺–2AcOH–2H₂O), 327 (M⁺–AcOH–H₂O–C₉H₁₇), 267 (M⁺–2AcOH–H₂O–C₉H₁₇), 249 (M⁺–2AcOH–2H₂O–C₉H₁₇).

3B, 5a, 6B-Tristriméthylsilyloxy-9a-hydroxyergosta-7, 22-diène 4"

La triméthylsilylation de P₃ par la N,O-bistriméthylsilylfluoracétamide (BSTFA) à 70° pendant 24h donne un produit qu'on analyse en SM par une introduction directe. SM: m/z 662 (M⁺), 644 (M⁺-H₂O), 629 (M⁺-H₂O-CH₃), 572 (M⁺-Me₃SiOH), 557 (M⁺-Me₃SiOH-CH₃), 554 (M⁺-Me₃SiOH-H₂O), 539 (M⁺-Me₃SiOH-H₂O-CH₃), 482 (M⁺-2Me₃SiOH).

3 β , 5 α , 6 β -Trihydroxycholestane 7

Une solution de cholestérol 6(15 g) dans CH_2CI_2 (500 ml) est traitée à 0°C avec l'acide paranitroperbenzoïque pendant 0 · 5 h. On obtient 17 · 5 g de produit brut qu'on dissout dans 400 ml de THF. A cette solution, est additionné HCIO4 à 25%. Après 2 h de réaction, on élimine le maximum de THF, puis on procède à une extraction habituelle. On obtient 14 · 5 g de 7. F = 223-225°, RMN: $\delta 0 · 75$ (3H, s, 18-Me), 0 · 89 (6H, d, J = 6, 2Hz, 26-et 27-Me), 0 · 93(3H, s, 19-Me), 0 · 97 (3H, d, J = 6 · 5Hz, 21-Me), SM: m/z 420 (M⁺), 402 (M⁺-H₂O), 384 (M⁺-2H₂O), 369 (M⁺-2H₂O-CH₃).

3β, 5α-Dihydroxycholestan-6-one 8

Une solution de 13 g du triol 7 dans 120 ml de dioxane est diluée avec 13 ml d'eau. La solution est traitée à 25°C par 10 g de N-bromosuccinimide. Après 0 · 5 h de réaction à 0°, le produit de réaction est filtré, puis lavé avec CH₃OH à 50%. On obtient $10 \cdot 2 g$ de 8 (Rdt 80%). F = 231-233° (Litt⁶ 232-233°) [α]_D = -43° (C = 0 · 10, CHCl₃). IR: ν cm⁻¹ 3400, 3600, 1710. RMN: δ 0 · 64 (s, 18-Me), $0 \cdot 86$ (d, J = 6, 8Hz, 26- et 27-Me), $0 \cdot 93$ (s, 19-Me), $0 \cdot 96$ (d, J = 6 $\cdot 8Hz$, 21-Me). SM: m/z 418 (M⁺), 400 (M⁺-H₂O), 385 (M⁺-H₂O-CH₃), 382 (M⁺-2H₂O).

3a, 5a-Dihydroxycholestan-6-one 9'

Une solution de 12 g de 8 dans 360 ml de THF est traitée par 19 · 4 g de PPh₃ et 2 · 58 g d'acide formique, puis par une solution de 8 · 85 ml d'azodicarboxylate d'éthyle dans 50 ml de THF. L'évaporation da solvant et la chromatographie sur SiO₂ fournissent 12 · 5 g de 9 (Rdt 98%). RMN: δ 0 · 69 (s, 18-Me), 0 · 84 (d, J = 6, 8Hz, 26- et 27-Me), 0 · 93 (s, 19-Me), 0 · 96 (d, J = 6, 8Hz, 21-Me), 5 · 50 (m, $W_{1/2} = 7 \cdot 5Hz$, 3-H), SM: m/z 446 (M⁺), 428 (M⁺-H₂O), 400 (M⁺-HCOOH), 382 (M⁺-HCOOH-H₂O), 367 (M⁺-HCOOH-H₂O-CH₃).

La saponification de 50 mg du formiate 9 par une solution méthanolique à 2% de potasse fournit 27 · 5 mg de céto-diol 9'. F = 192-194°, $[a]_D = -12°$ (C = 0 · 15; CHCl₃). IR (KBr): 3200, 3400, 1710. RMN: δ 0 · 64 (s, 18-Me), 0 · 81 (d, J = 6 · 7Hz, 26- et 27-Me), 0 · 91 (s, 19-Me), 0 · 93 (d, J = 6 · 7Hz, 21-Me), 4 · 3 (m, $W_{1/2} = 7 \cdot 5Hz$, 3-H). SM: m/z 418 (M⁺); 400 (M⁺-H₂O), 382 (M⁺-2H₂O), 367 (M⁺-2H₂O-CH₃).

3a, 5_B-Dihydroxycholestan-6-one 10

Une solution de 6 g du formiate 9 dans 350 ml de méthanol est traitée sous argon avec 35 g de potasse sous reflux pendant 15 h. L'extraction suivie de chromatographie sur SiO₂ fournit 4 · 5 g de 10 (Rdt 75%). F = 117-119°. IR: ν cm⁻¹ 3480, 3610, 1710. RMN: 8 0 · 65 (s, 18-Me), 0 · 70 (s, 19-Me), 0 · 87 (d, J = 6 · 8Hz, 26- et 27-Me), 0 · 92 (d, J = 6 · 8Hz, 21-Me), 3 · 97 (m, W_{1/2} = 20Hz, 3-H). SM: m/z 418 (M⁺), 400 (M⁺-H₂O), 385 (M⁺-H₂O-CH₃), 382 (M⁺-2H₂O).

3a-Acétoxy-5\beta-hydroxy-cholest-7-en-6-one 11

Une solution de $1 \cdot 78$ g 10' dans 25 ml d'AcOH est traitée par $0 \cdot 192$ ml de Br₂ dans 3 ml d'AcOH. L'extraction fournit $1 \cdot 86$ g de bromocétone qu'on dissout dans 14 mL de DMF. Après l'addition de $1 \cdot 5$ g de Li₂CO₃ le milieu réactionnel est chauffé sous reflux pendant 15 min; l'extraction suivie de chromato-graphie sur SiO₂ fournit 264 mg de 11'. UV: λ_{max} (EtOH) 252 nm ($\epsilon = 14300$). IR: ν cm⁻¹ 3500, 1240, 1730, 1620, 1670. RMN: δ $0 \cdot 60$ (s, 18-Me), $0 \cdot 82$ (s, 19-Me), $0 \cdot 86$ (d, J = $6 \cdot 8$ Hz, 26- et 27-Me), $0 \cdot 92$ (d, J = $6 \cdot 8$ Hz, 21-Me), $1 \cdot 98$ (s, OCCH₃), $5 \cdot 11$

(m, 3–H), SM: m/z 458 (M⁺), 398 (M⁺–AcOH), 380 (M⁺–AcOH–H₂O).

3a-Acétoxy-5B, 14a-dihydroxycholest-7-en-6-one 12'

Une solution de 60 mg de 11' dans 4 ml de dioxane est traitée à 65° avec 250 mg de SeO₂ pendant une nuit. Après une filtration sur Célite et des lavages à l'eau et KCN 5%, on obtient 50 mg de 12' (Rdt 80%). F = 153-155°. UV: λ_{max} (EtOH) 246 nm (ϵ = 8900). IR: $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3500, 3600, 1250, 1730, 1620, 1680. RMN: $\delta 0 \cdot 71$ (s, 18-Me), 0 · 86 (s, 19-Me), 0 · 90 (d, J = 6 · 8Hz, 26- et 27-Me), 0 · 96 (d, J = 6 · 8Hz, 21-Me), 5 · 17 (m, 3-H), 5 · 97 (d, J = 3Hz, 7-H). SM: m/z 474 (M⁺), 456 (M⁺-H₂O), 414 (M⁺-AcOH), 396 (M⁺-AcOH-H₂O).

3a, 5b, 14a-Trihydroxy-cholest-7-en-6-one 12

On chauffe sous reflux et sous argon pendant 15 min, une solution de 50 mg de 12 dans 12 ml de MeOH et 28 mg de K_2CO_3 dans 0 · 5 ml d'eau. On obtient 34 mg de 12 (Rdt 75%). F = 204-205 · 5°. [α]_D = 125° (C = 0 · 32, CHCl₃). UV: λ _{max}(EtOH) 245 nm (ϵ = 9100), RMN: δ 0 · 81 (s, 18-Me), 0 · 83 (s, 19-Me), 0 · 88 (d, J = 6 · 8Hz, 26- et 27-Me), 0 · 95 (d, J = 6 · 8Hz, 21-Me), 4 · 04 (m, 3-H), 5 · 4: (s, 7-H). SM: m/z 432 (M⁺), 4 14 (M⁺-H₂O), 399 (M⁺-H₂O-CH₃), 396 (M⁺-2H₂O), 283 (M⁺-2H₂O-C₈H₁₇).

3B-Acétoxy-5 a-hydroxy-ergosta-7, 22-dièn-6-one 14'

Une suspension de 3.5 g d'acétate d'ergostéryle 13 dans 100 ml AcOH est traitée pendant une nuit par une solution de 2.4 g de CrO₃ dans 14 ml AcOH. F = 257-261° (Litt⁹ 264°). IR: ν cm⁻¹ 3580, 3400, 1720, 1660, 1620 et 1240. UV: λ_{max} (CHCl₃) 255 nm (ϵ = 12500). RMN: δ 0.60 (s, 18-Me), 0.82 (d, J = 7Hz, 26-Me), $0 \cdot 83$ (d, J = 7Hz, 27-Me), $0 \cdot 91$ (d, J = 6, $\cdot 8Hz$, 28-Me), $0 \cdot 95$ (s, 19-Me), $1 \cdot 02$ (d, $J = 6 \cdot 5Hz$, 21-Me), $5 \cdot 10$ (m, 3-H); $5 \cdot 64$ (t-assymétrique, 7-H). SM: m/z 470 (M⁺), 452 (M⁺-H₂O), 437 (M⁺-H₂O-CH₃), 410 (M⁺-AcOH), 392 (M⁺-AcOH-H₂O), 337 (M⁺-AcOH-H₂O-CH₃), 267 (M⁺-C₉H₁₇-H₂O-AcOH).

3β, 5α-Dihydroxy-ergosta-7, 22-dièn-6-one 14⁹

L'hydrolyse par K₂CO₃ de 14^e fournit 14. IR: $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3600, 3400 et 1660. RMN: δ 0.60 (s. 18-Me), 0.82 (d, J = 7Hz, 26-Me), 0.83 (d, J = 7Hz, 27-Me), 0.91 (d, J = 7Hz, 28-Me), 0.95 (s. 19-Me), 1.02 (d, J = 6Hz, 21-Me), 4.03 (m, 3-H), 5.63 (7-H).

3B-Acétoxy-5a, 14a-dihydroxy-ergosta-7, 22-dièn-6-one 15'

Une solution de $1 \cdot 05$ g de 14' dans 100 ml de dioxane est traitée par $2 \cdot 8$ g de SeO₂ à 60-70° pendant $1 \cdot 5$ h. Après une filtration sur Célite et des lavages à l'eau, et KCN 5%, on obtient 15'. (Rdt 80%). F = 282-284°. $[\alpha]_D = +62^\circ$ (c = $0 \cdot 61$; Py).

RMN: $\delta 0.68$ (s, 18–Me), 0.85 (d, J = 6.7Hz, 26–Me), 0.86 (d, J = 6.7Hz, 27–Me), 0.94 (d, J = 6.8Hz, 28–Me), 0.97 (s, 19–Me), 1.03 (d, J = 6.7Hz, 21–Me), 2.07 (s, OCCH₃), 5.90 (d,

$J = 2 \cdot 7H_2, 7-H$).

SM: m/z 486 (M⁺), 468 (M⁺-H₂O), 453 (M⁺-H₂O-CH₃), 450 (M⁺-2H₂O), 408 (M⁺-H₂O-AcOH), 390 (M⁺2H₂O-AcOH).

3B, 5a, 14a-Trihydroxy-ergosta-7, 22-dien-6-one 15.

On traite à 80°, pendant 3 h, une solution de 100 mg de 15' dans 29 ml de MeOH, par une solution de $67 \cdot 5$ mg de K_2CO_3 dans 2 ml d'eau. Le mélange réactionnel est ensuite versé dans l'eau et le pH ramené à 7 par 2 lavages à l'eau. 60 mg de 15 est obtenu par filtration. F = 267-269°. [α]_D = 65° (C = 0 · 76, CHCl₃). IR (KBr): $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3350, 1620, 1670. UV: λ_{max} (EtOH) 242 nm ($\epsilon = 14500$). RMN: 0 · 68 (s, 18-Me), 0 · 92(d, J = 6 · 6, 6Hz, 26-Me), 0.84 (d, J = 6 · 6Hz, 27-Me), 0 · 92(d, J = 6 · 6Hz, 28-Me), 0.94 (s, 19-Me), 1 · 02 (d, J = 6 · 2Hz, 21-Me), 3 · 93 (m, 3-H), 5 · 81 (d, J = 2 · 5Hz, 7-H). SM: m/z 444 (M⁺), 426 (M⁺-H₂O), 411 (M⁺-H₂O-CH₃), 408 (M⁺-2H₂O), 393 (M⁺-2H₂O-CH₃), 390 (M⁺-3H₂O).

Oxydation du tétrol 4 par le dioxyde de manganèse

A une solution du tétrol 4 (7 mg) dans un mélange de 10 ml de chlorure de méthylène et 3 ml de THF, on ajoute 200 mg de MnO_2 . La réaction est effectuée à température ambiante, sous agitation magnétique. Au bout de 2 h, le milieu réactionnel est filtré sur Célite, et la solution obtenue est évaporée à sec sous pression réduite. Après une purification sur une colonne de gel de silice, on obtient 4 · 5 mg de la cétone conjuguée 16, dont les caractéristiques physiques et spectrales coïncident avec celles du produit naturel P4 décrit ci-dessous.

La fraction cytotoxique éluée au mélange MeOH/CH₂Cl₂ 6:94 a été soumise à trois chromatographies successives sur silice fine $40-60 \mu$. Cette série de purifications a permis d'obtenir deux produits homogènes de polarité voisine:

3β, 5a, 9a-Trihydroxy-ergosta-7, 22-dièn-6-one 16.

Le produit le moins polaire P₄ est aussi le constituant mineur de la fraction active: $F = 225-228^{\circ}$. $[\alpha]_D = -64^{\circ}$ (c = 0.056, CHCl₃). IR: νcm^{-1} 3400, 3590, 1620, 1670. UV: λ_{max} (EtCH) 237 nm ($\epsilon = 1000$). RMN: δ 0.61 (s, 18-Me), 0.82 (d, J = 6.8Hz, 26-Me), 0.83 (d, J = 6.8Hz, 27-Me), 0.91 (d, J = 6.8Hz, 28-Me), 1.01 (s, 19-Me), 1.02 (d, J = 6.5Hz, 21-Me), 4.06 (m, 3-H), 5.65 (d, J = 1, 9Hz, 7-H). SM: m/z 426 (M²-H₂O), 408 (M²-2H₂O), 390 (M²-3H₂O), 300 (M²-H₂O-C₉H₁₈), 282 (M²-2H₂O-C₉H₁₈).

3B, 5a, 9a-Trihydroxy-6B-méthoxyergosta-7, 22-diène 17

Le plus polaire des deux produits, P₅, possède les caractéristiques physiques et spectrales suivantes:

 $F = 178-180^{\circ}$. $[\alpha]_D = -117^{\circ}$ (c = 0 · 75, CHCl₃).

RMN: $\delta 0.61$ (3H, s, 18-Me), 0.81 (3H, d, J = 6.8Hz, 26-Me), 0.84 (3H, d, J = 6.8Hz, 27-Me), 0.92 (3H, d, J = 6.8Hz, 28-Me), 1.02 (3H, d, J = 6.4Hz, 21-Me), 1.06 (3H, s, 19-Me), 3.23 (1H, dd, $J_1 = 5.3Hz$, $J_2 = 2.3Hz$, 6-H), 3.41 (3H, s, O-CH₃), 3.66 (1H, m, 3-H), 5.48 (1H, dd, $J_1 = 5.3Hz$, $J_2 = 2.3Hz$,

7-H). SM: m/z 442 (M[±]-H₂O), 424 (M[±]-2H₂O), 410 (M[±]-MeOH-H₂O), 409 (M[±]-2H₂O-CH₃), 392 (M[±]-MeOH-2H₂O), 285 (M[±]-MeOH-H₂O-C₉H₁₇), 267 (M[±]-MeOH-2H₂O-C₉H₁₇).

3β-Acétoxy-5α, 9α-dihydroxy-6β-méthoxyergosta-7, 22-diène 17' L'acétylation (Ac₂O, Py) de P₅ fournit 17'.

 $\begin{array}{c} F = 157 - 159^\circ. \ \text{RMN:} \quad \delta \quad 0 \cdot 61 \quad (3H, \ s, \ 18 - Me), \ 0 \cdot 83 \quad (3H, \ d, \\ J = 6 \cdot 8Hz, 26 - Me), \ 0 \cdot 84 \quad (3H, \ d, \ J = 6 \cdot 8Hz, 27 - Me) \quad 0 \cdot 93 \quad (3H, \ d, \\ J = 6 \cdot 8Hz, 28 - Me), \ 1 \cdot 02 \quad (3H, \ d, \ J = 6 \cdot 5Hz, 21 - Me), \ 1 \cdot 08 \quad (3H, \ s, \\ 19 - Me), \ 2 \cdot 05 \quad (3H, \ s, \ OCCH_3), \ 3 \cdot 4 \quad (O-CH_3), \ 5 \cdot 18 \quad (1H, \ m, \ 3 - H). \\ \end{array}$

SM (CI, Isobutane): m/z 503 (MH⁺), 485 (MH⁺-H₂O), 467 (MH⁺-2H₂O), 453 (MH⁺-H₂O-MeOH), 435 (MH⁺-2H₂O-MeOH), 425 (MH⁺-H₂O-AcOH), 407 (MH⁺-2H₂O-AcOH), 375 (MH⁺-2H₂O-AcOH-MeOH).

3β, 5α-Bistriméthylsilyloxy-6β-méthoxy-9α-hydroxyergosta-7, 22diène 17"

La triméthylsilylation de P₅ par le BSTFA à 80°C pendant 24 h donne un produit qu'on analyse par spectrométrie de masse par une introduction directe:

SM: m/z 604 (M⁺), 586 (M⁺-H₂O), 571 (M^{*}-H₂O-CH₃), 572 (M⁺-MeOH); 514 (M⁺-Me₃SiOH); 499 (M⁺-Me₃SiOH-CH₃); 482 (M⁺-Me₃SiOH-MeOH); 424 (M⁺-2Me₃SiOH); 409 (M⁺-Me₃SiOH-CH₃), 392 (M⁺-2Me₃SiOH-MeOH).

BIBLIOGRAPHIE

- ¹D. M. Orcutt et B. Richardson, Steroids 16, 429 (1970).
- ²B. A. Knights, J. Gas Chrom. 5, 273 (1967).
- ³P. Ceccherelli, R. Fringuelli, G. F. Madruzza et M. Ribaldi, Phytochemistry 14, 1434 (1975).
- W. Arnold, W. Meister et G. Englert, Helv. Chim. Acta 57, 1559 (1974).
- ⁵C. Hetru, M. Lagueux, B. Luu et J. A. Hoffmann, *Life Sci.* 22, 2141 (1978).
- ⁶L. F. Fieser et S. Rajagopalan, J. Am. Chem. Soc. 71, 3938 (1949). ⁷A. K. Boog, B. Lei, W. A. W. C.
- ⁷A. K. Bose, B. Lal, W. A. Hoffman et M. S. Manhas, Tetrahedron Letters 1619 (1973).
- ⁸Y. Mazur et M. Nussim, Tetrahedron Letters 817 (1961).
- ⁹D. H. R. Barton et C. H. Robinson, J. Chem. Soc. 111, 3045 (1954).
- ¹⁰R. F. Zürcher, Helv. Chim. Acta 46, 2054 (1963).
- ¹¹G. J. Schroepfer, R. A. Pascal et A. A. Kandutsch, *Experientia* 36, 518 (1980).
- ¹²J. Valisolalao, B. Luu, J. P. Beck et G. Ourisson, Bull. Soc. Chim. France 473 (1980).
- ¹³G. Fahraeus et B. Reinhammar, Acta Chem. Scand. 21, 2367 (1967).