

144. Lucibufagines. Partie III¹⁾. Oxo-11- et oxo-12-bufalines, stéroïdes défensifs des lamproies *Photinus ignitus* et *P. marginellus* (*Coleoptera: Lampyridae*)

par Michel Goetz, David F. Wiemer, Le Roy W. Haynes, Jerrold Meinwald et Thomas Eisner

Department of Chemistry et Section of Neurobiology and Behavior, Cornell University,
Ithaca, New York 14853, U.S.A.

(18.IV.79)

Lucibufagins. Part III¹⁾. 11-Oxo- and 12-oxo-bufalins, defensive steroids from the fireflies
Photinus ignitus and *P. marginellus* (*Coleoptera: Lampyridae*)

Summary

Four lucibufagins (**4**, **8**, **9** and **10**), defensive bufadienolides from the fireflies *Photinus ignitus* and *P. marginellus* (*Coleoptera: Lampyridae*), have been isolated and are characterized by spectroscopic means.

1. Introduction. - Dans une note préliminaire [2], nous avons signalé la présence, dans les lamproies *Photinus ignitus* et *P. marginellus* (*Coleoptera: Lampyridae*), d'une série de lucibufagines, substances défensives servant à protéger ces insectes de certains de leurs prédateurs. Une étude plus approfondie de ces lamproies nous a permis d'isoler quatre nouveaux bufadienolides (**A-D**) responsables de cette activité biologique; nous en décrivons ici la détermination de structure.

2. Résultats. - 2.1. *Isolement des composés.* L'extraction des insectes est réalisée à 0° par l'emploi successif de l'hexane, du chlorure de méthylène et du méthanol. L'extrait au CH₂Cl₂, seul actif dans les tests biologiques (décrits en détail dans [2]), est chromatographié sur colonne de silicagel. Les composés **A-D** sont encore purifiés par chromatographie sur couches épaisses de silicagel et filtration sur gel de *Sephadex* (voir partie expérimentale). Les deux espèces *P. ignitus* et *P. marginellus* contiennent les quatre mêmes bufadienolides (l'identité a été établie par CCM., HPLC. et SM.). Au total, 2800 lamproies ont fourni 105 mg du mélange de composés actifs.

2.2. *Détermination des structures.* - *Composé A.* Comme nous l'avons déjà décrit, un examen sommaire des données spectrales pour **A** permet de déterminer la structure de base **1** [2]. Nous donnons ici le résultat de l'étude approfondie.

Parmi les 26 signaux qui apparaissent dans le spectre ¹³C-RMN., on note a) les cinq atomes de carbone correspondants au groupe α-pyrone entre 115,6 et 161,9 ppm; b) les deux groupes méthyle angulaires du stéroïde à 16,6 et 17,2 ppm; c) un groupe acétoxy (21,4 et 169,2 ppm); d) une fonction cétonique à 212,9 ppm;

¹⁾ Communication no. 63 de la série 'Defense Mechanisms of Arthropods'. Pour no. 62, voir [1].

e) quatre atomes de carbone porteurs de fonction oxygénée (71,3, 73,2, 73,5 et 85,0 ppm), dont deux atomes de carbone tertiaires et deux atomes de carbone secondaires.

Le spectre de masse de **A** présente le pic de base à m/e 43 (perte du groupe acétyle) et l'ion moléculaire à m/e 474; on discerne en plus des fragments typiques à m/e 123, 135 et 136 (caractéristiques de bufadiénolides sans fonction oxygénée en C(15), C(16) et C(17), et à m/e 191 et 204. Ces derniers correspondent aux ions **2** et **3** identifiés par spectrographie de masse à haute résolution [3] et placent la fonction cétonique en C(12) et un hydroxyle tertiaire en C(14).

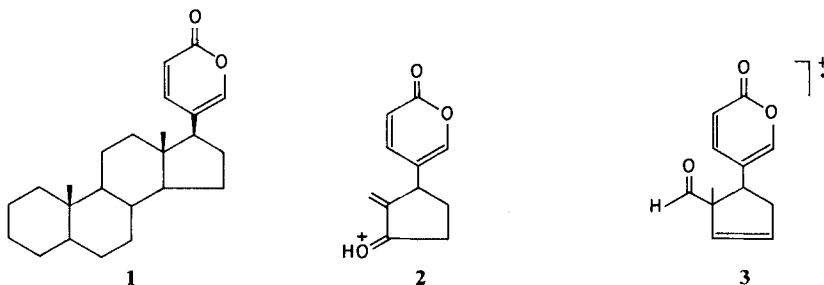
L'examen détaillé du spectre $^1\text{H-RMN}$, permet de compléter la structure du composé **A**. Un proton géminale à un oxygène apparaît à 4,40 ppm sous forme de $d \times d$ ($J = 10,5$ et $3,5$ Hz) qui se transforme en d ($J = 10,5$ Hz) lors de l'addition de D_2O . Ce schéma simple de couplage place un groupe hydroxyle en C(11); la valeur élevée de J entraîne une interaction axial-axial entre H-C(9) et H-C(11), ce qui précise la configuration α pour le groupe hydroxyle.

Le dernier groupe hydroxyle tertiaire doit nécessairement se trouver en 5β : les positions 9 et 17 sont exclues, et le placement d'une fonction oxygénée en 5α ou 8β aurait pour effet de déblinder les groupes méthyle angulaires [4], ce qui n'est pas observé.

Le groupe acétoxy secondaire est situé en 3β ; le proton géminale à cette fonction apparaît à 5,28 ppm comme c'est le cas pour tous les acétoxy- 3β -hydroxy- 5β -bufadiénolides connus [4].

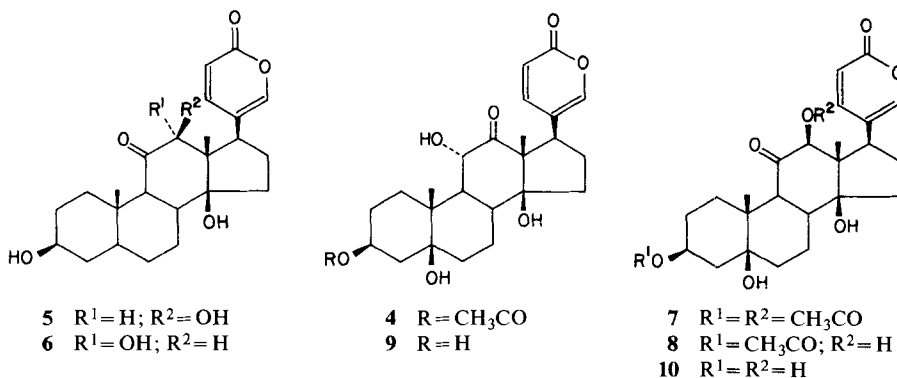
Enfin, le signal à 4,12 ppm ($d \times d$, $J = 9$ et 6 Hz) peut être attribué au proton 17α comme cela a déjà été observé dans le cas de la sarverogénine, un oxo-12-cardénolide [5].

La vérification finale de la structure de **A** est apportée par le calcul du déplacement chimique des groupes méthyle angulaires d'après les règles de *Gsell & Tamm* [4]: 3 H-C(18) calculé 0,95, trouvé 0,96 ppm; 3 H-C(19) calculé 1,20, trouvé 1,21 ppm.



A est par conséquent l'oxo-12-*O*-acétyl- 3β -dihydroxy- $5\beta,11\alpha$ -bufaline, représentée par la formule **4**.

Composé B. De toute évidence, ce composé présente de nombreuses analogies avec **4**. Le poids moléculaire, déterminé par SM., est de 474. **B** contient 26 atomes de carbone, dont le même groupement α -pyrone, une cétone et un groupe acétoxy. D'importantes différences apparaissent cependant: a) le déplacement chimique de



C(18) est maintenant de 10,3 ppm; b) les protons de ce groupe méthyle angulaire se trouvent à 0,56 ppm; c) le proton 17a semble être déplacé à 2,52 ppm; d) le signal du proton 11 β a disparu; il est remplacé par un *d* à 3,90 ppm, qui devient *s* par addition de D₂O.

L'examen attentif de ces données permet de déduire que **B** ne diffère de **4** que par l'inversion des fonctions en C(11) et C(12). Ce schéma d'oxydation a du reste déjà été rencontré dans le cas de deux autres bufadienolides, la bufarenogine **5** et la ψ -bufarenogine **6** [6] [7]. La configuration du groupe hydroxyle en C(12) de **B** a été déterminée par l'enregistrement du spectre ¹H-RMN. du dérivé acétylé **7**. Les déplacements chimiques des protons du groupe méthyle angulaire C(18) (0,59 ppm), du proton 12a (4,81 ppm) et des protons de l'acétyle 12 β (2,19 ppm) correspondent de près aux valeurs indiquées pour **5** acétylé [6] [7] et non à celles pour **6** acétylé [6].

Le composé **B** est donc l'oxo-11-*O*-acetyl-3 β -dihydroxy-5 β ,12 β -bufaline (formule **8**).

Composé C. Le poids moléculaire, déterminé par SM., est de 432. Parmi les 24 atomes de carbone directement observés dans le spectre ¹³C-RMN., 19 se trouvent à moins de 0,4 ppm des signaux correspondants dans le spectre de **4**. C(3) a subi un déplacement important vers les hauts champs et se trouve maintenant à 67,3 ppm. Dans le spectre ¹H-RMN., le proton 3a apparaît à 4,16 ppm (soit à 1,12 ppm de moins que dans **4**). Ces données indiquent que **C** est le dérivé désacétylé de **4**. Il est du reste identique (CCM., HPLC., SM.) au composé obtenu par aminolyse de **4** (voir partie expérimentale). Enfin, l'acétylation de **4** et de **C** fournit le même dérivé diacétylé. Par conséquent, **C** est l'oxo-12-dihydroxy-5 β ,11a-bufaline (formule **9**).

Composé D. Les données spectrales correspondent de près à celles pour le composé **8**; des différences apparaissent cependant en ce qui concerne la position 3. **D** est identique au produit d'aminolyse de **8** et l'on obtient le même dérivé diacétylé **7** en traitant **8** et **D** par l'anhydride acétique en présence de pyridine. **D** est donc l'oxo-11-dihydroxy-5 β ,12 β -bufaline (représentée par la formule **10**).

Conclusion. - Ce mémoire décrit les structures des premiers bufadienolides à être mis en évidence chez les invertébrés; ce sont des nouvelles substances

naturelles. Bien que les proportions de **4**, **8**, **9** et **10** varient selon l'espèce, ils sont présents dans *P. ignitus* et *P. marginellus*, à la fois chez les mâles et les femelles. Nous avons également pu mettre des bufadienolides en évidence chez d'autres lampyres; il faut cependant noter que la quantité et la nature de ces composés varient selon l'espèce étudiée. Un compte rendu détaillé de la biochimie comparative de ces bufadienolides fera l'objet d'une prochaine communication.

Les auteurs expriment leur reconnaissance au *Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique* pour l'octroi d'une bourse de relèvement (à *M. G.*) ainsi qu'aux *National Institutes of Health* pour leur soutien financier (bourse no. CA 05646 à *D. W.* et bourses no. AI 12020 et AI 02908). Ils remercient également le *National Science Foundation* (bourse no. PCM-77-15914) et le *Fonds NYC* 191406 (Hatch).

Partie expérimentale

1. *Origines des insectes.* *Photinus ignitus* et *P. marginellus* proviennent des environs d'Ithaca, N.Y. (été 1978).

2. *Isolement, purification et analyse des composés.* Les insectes sont extraits à froid successivement par l'hexane, le CH_2Cl_2 et le méthanol (0,3 ml/insecte, 24 h, 2 fois chaque solvant). L'extrait au CH_2Cl_2 est chromatographié sur colonne de silicagel (hexane/THF de 9:1 à 2:3); les fractions sont purifiées par CCM. de silicagel à l'échelle préparative ($\text{Me}_2\text{CO}/\text{CHCl}_3/\text{Hex}$ 1:1:1 ou $\text{Me}_2\text{CO}/\text{CHCl}_3$ 1:2) et filtration sur gel de *Sephadex* LH20 (MeOH). Les solvants pour l'analyse par CCM. de silicagel sont: $\text{CHCl}_3/\text{Me}_2\text{CO}$ 2:1; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 7:8:8 (phase inférieure); $\text{AcOEt}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 40:4:3. Les analyses par HPLC. sont effectuées avec un appareil *Waters* 6000 (détecteur UV. *Waters* 440) sur colonne de μ -Porasil (Hex/THF 1:1) et colonne de μ -Bondapak C_{18} (MeOH/ H_2O 3:2).

Quantités isolées:

1100 *P. ignitus* (mâles) ont donné 8 mg de **4**, 21 mg de **8**, 6 mg de **9** et 4 mg de **10**;
600 *P. ignitus* (femelles) ont donné 6 mg de **4**, 11 mg de **8**, 5 mg de **9** et 3 mg de **10**;
950 *P. marginellus* (mâles) ont donné 5 mg de **4**, 3 mg de **8**, 22 mg de **9** et 3 mg de **10**;
150 *P. marginellus* (femelles) ont donné 2 mg de **4**, 1 mg de **8**, 4 mg de **9** et 1 mg de **10**.

3. *Techniques spectroscopiques.* Les spectres UV. ont été enregistrés sur un spectrophotomètre *Beckman* DB-G (λ_{max} en nm, ϵ en parenthèses), les spectres IR. sur un appareil *Perkin-Elmer* 257 (bandes en cm^{-1}), les ^1H -RMN. sur un instrument *Varian* EM-390 (90 MHz, dans CDCl_3 , ppm par rapport au TMS pris comme référence interne), les spectres ^{13}C -RMN. sur un appareil *Varian* CFT-20 (ppm par rapport au TMS, avec CDCl_3 comme référence interne) et les spectres de masse sur un instrument *Finnigan* 3300 (m/e , intensité relative entre parenthèses).

4. *Aminolyse.* La solution de 5 mg de composé acétylé dans 2 ml de méthanol est refroidie à -10° , saturée de NH_3 , progressivement ramenée à température ambiante et agitée pendant 5 h. Le déroulement de la réaction est suivi par HPLC.

5. *Données analytiques.* - *Composé 4.* F. 151-153°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +40,5$ ($c=0,81$, solvant). - UV.: 298 (5500). - IR.: 3560, 3440, 1740-1710, 1640, 1540, 1270, 1230. - ^1H -RMN.: 7,72 ($d \times d$, $J=9,5$ et 2,5 Hz, 1 H); 7,40 (d , $J=2,5$ Hz, 1 H); 6,30 (d , $J=9,5$ Hz, 1 H); 5,28 (large, 1 H); 4,40 ($d \times d$, $J=10,5$ et 3,5 Hz, 1 H); après addition de D_2O : d , $J=10,5$ Hz); 4,12 ($d \times d$, $J=9$ et 6 Hz, 1 H); 3,89 (d , $J=3,5$ Hz, 1 H; échange avec D_2O); 2,12 (s, 3 H); 1,21 (s, 3 H); 0,96 (s, 3 H); 1,25-2,25 (m, 18 H). - ^{13}C -RMN. (CDCl_3): 212,9 (s), 169,2 (s), 161,9 (s), 150,1 (d), 146,4 (d), 120,4 (s), 115,6 (d), 85,0 (s), 73,5 (s), 73,2 (d), 71,3 (d), 61,5 (s), 43,6 (s), 42,0 (d), 40,8 (d), 38,7 (d), 35,3 (t), 33,9 (t), 32,6 (t), 27,7 (t), 26,8 (t), 25,1 (t), 23,7 (t), 21,4 (qa), 17,2 (qa), 16,6 (qa). - SM. (IE., 70 eV): 474 (7, M^+), 456 (4), 438 (6), 414 (6), 396 (5), 378 (10), 354 (8), 350 (5), 221 (7), 214 (11), 204 (17), 201 (3), 191 (17), 175 (15), 147 (21), 136 (11), 135 (10), 123 (13), 43 (100). - SM. (IC., CH_4): 475 (54, $M^+ + 1$).

Composé 8. F. 164-166°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +29,7$ ($c=0,95$, solvant). - ^1H -RMN.: 7,71 ($d \times d$, $J=9,5$ et 2,5 Hz, 1 H); 7,37 (d , $J=2,5$ Hz, 1 H); 6,25 (d , $J=9,5$ Hz, 1 H); 5,27 (large, 1 H); 3,90 (d , $J=3,5$ Hz, 1 H); après addition de D_2O : s); 3,48 (large, 1 H; échange avec D_2O); 2,52 (large $d \times d$, 1 H); 2,10 (s, 3 H); 1,23 (s, 3 H); 0,56 (s, 3 H); 1,25-2,35 (m, 18 H). - ^{13}C -RMN. (CDCl_3): 210,0 (s), 169,2 (s), 162,1 (s), 150,0

(*d*), 146,4 (*d*), 121,3 (*s*), 115,1 (*d*), 83,1 (*s*), 79,3 (*d*), 72,3 (*s*), 70,3 (*d*), 59,2 (*s*), 47,4 (*s*), 46,2 (*d*), 42,8 (*d*), 39,6 (*d*), 35,0 (*t*), 33,5 (*t*), 33,1 (*t*), 27,9 (*t*), 24,9 (*t*), 24,7 (*t*), 24,5 (*t*), 21,3 (*qa*), 16,9 (*qa*), 10,3 (*qa*). - SM. (IE., 70 eV): 474 (3, M^+), 456 (2), 438 (4), 414 (3), 396 (6), 378 (10), 353 (14), 229 (5), 214 (12), 204 (2), 201 (8), 191 (18), 175 (20), 174 (11), 147 (18), 136 (7), 135 (10), 123 (20), 43 (100). - SM. (IC., CH_4): 475 (41, $M^+ + 1$).

Composé 9. F. 158-160°, $[\alpha]_D^{20} = +40,9$ ($c=1,30$, solvant). - $^1\text{H-RMN.}$: 7,77 ($d \times d$, $J=9,5$ et 2,5 Hz, 1 H); 7,40 (d , $J=2,5$ Hz, 1 H); 6,31 (d , $J=9,5$ Hz, 1 H); 4,40 ($d \times d$, $J=10,5$ et 3,5 Hz, 1 H; après addition de D_2O : d , $J=10,5$ Hz); 4,16 (large, 1 H); 4,12 ($d \times d$, $J=9$ et 6 Hz, 1 H); 3,80 (large, 1 H; échange avec D_2O); 1,20 (*s*, 3 H); 0,96 (*s*, 3 H); 1,20-2,30 (*m*, 19 H). - $^{13}\text{C-RMN.}$ ($\text{CDCl}_2/\text{CD}_3\text{OD}$, 9:1): 212,8 (*s*), 162,3 (*s*), 149,8 (*d*), 146,8 (*d*), 120,8 (*s*), 115,2 (*d*), 84,8 (*s*), 74,6 (*s*), 73,1 (*d*), 67,3 (*d*), 61,4 (*s*), 42,4 (*d*), 41,5 (*s*), 40,5 (*d*), 38,4 (*d*), 36,1 (*t*), 33,8 (*t*), 31,4 (*t*), 27,4 (*t*), 27,2 (*t*), 25,5 (*t*), 23,4 (*t*), 17,0 (*qa*), 16,5 (*qa*). - SM. (IE., 70 eV): 432 (4, M^+), 414 (2), 396 (6), 371 (2), 353 (4), 214 (5), 204 (100), 201 (4), 191 (10), 175 (5), 161 (8), 136 (2), 135 (6), 123 (12), 121 (19), 67 (20), 55 (43), 43 (48). - SM. (IC., CH_4): 433 (29, $M^+ + 1$).

Composé 10. F. 193-194°, $[\alpha]_D^{20} = +31,0$ ($c=0,58$, solvant). - $^1\text{H-RMN.}$: 7,74 ($d \times d$, $J=9,5$ et 2,5 Hz, 1 H); 7,40 (d , $J=2,5$ Hz, 1 H); 6,25 (d , $J=9,5$ Hz, 1 H); 4,15 (large, 1 H); 3,93 (d , $J=3$ Hz, 1 H; après addition de D_2O : *s*); 3,60 (large, 1 H; échange avec D_2O); 2,57 ($d \times d$, large, 1 H); 1,25 (*s*, 3 H); 0,56 (*s*, 3 H); 1,20-2,40 (*m*, 19 H). - $^{13}\text{C-RMN.}$ ($\text{CDCl}_2/\text{CD}_3\text{OD}$ 9:1): 209,8 (*s*), 162,4 (*s*), 150,0 (*d*), 146,7 (*d*), 121,5 (*s*), 115,0 (*d*), 83,1 (*s*), 79,1 (*d*), 72,0 (*s*), 67,4 (*d*), 59,1 (*s*), 47,7 (*s*), 46,5 (*d*), 43,0 (*d*), 39,7 (*d*), 36,9 (*t*), 33,6 (*t*), 33,0 (*t*), 28,0 (*t*), 27,4 (*t*), 24,8 (*t*), 24,4 (*t*), 17,0 (*qa*), 10,4 (*qa*). - SM. (IE., 70 eV): 432 (8, M^+), 414 (6), 396 (6), 372 (3), 354 (10), 204 (2), 201 (5), 191 (18), 136 (4), 135 (8), 123 (16), 67 (100), 43 (55). - SM. (IC., CH_4): 433 (38, $M^+ + 1$).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] B. Roach, K. Dodge, D. Aneshansley, D. Wiemer, J. Meinwald & T. Eisner, *Coleopterists Bulletin* (sous presse).
- [2] T. Eisner, D. Wiemer, L. Haynes & J. Meinwald, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75, 905 (1978).
- [3] P. Brown, Y. Kamano & G. Pettit, *Org. Mass Spectrometry* 6, 47 (1971).
- [4] L. Gsell & C. Tamm, *Helv.* 52, 551 (1969).
- [5] H. Fuhrer, R. Zürcher & T. Reichstein, *Helv.* 52, 616 (1969).
- [6] K. Huber, H. Linde & K. Meyer, *Helv.* 50, 1994 (1967).
- [7] S. Spengel, H. Linde & K. Meyer, *Helv.* 56, 2827 (1973).