

## CATABOLISME DES STEROIDES CHEZ LES *NOCARDIA*

GÉRARD LEFEBVRE, PIERRE GERMAIN, GUY RAVAL et ROBERT GAY

Laboratoire de Chimie Biologique I, Université de Nancy I, Case officielle no. 140, 54037 Nancy, Cedex, France

(Received 3 February 1974)

**Key Word Index**—*Nocardia*; Actinomycetales; steroids; catabolism; 4-hydroxy 4-cholesten 3-one; 3,5-seco-4-nor-3-keto-5-oic acids; ozonolysis of  $\Delta^4$ , 3-keto steroids.

**Abstract**—*Nocardia restrictus* and *N. corallina* oxidize the A ring of 4-hydroxy-4-cholesten-3-one and a 3,5-seco-4-nor-3-keto-5-oic acid is formed. The enzymes necessary to this reaction are induced and their biosynthesis is suppressed by chloramphenicol. The catabolism of the aliphatic side chain at C-17 involves a cleavage between C-24 and C-25 and the liberation of propionic acid.

**Résumé**—*Nocardia restrictus* et *corallina* oxydent le cycle A de la 4-hydroxy cholest 4-ène 3-one pour mener à un acide stéroïde 3,5-séco 4-nor 3-oxo 5-oïque. Cette oxydation nécessite la présence d'enzymes dont la biosynthèse est induite par les stéroïdes. Cette biosynthèse peut être supprimée par le chloramphénicol. Le catabolisme de la chaîne aliphatique portée par C-17 comporte une rupture entre C-24 et C-25, avec élimination d'acide propionique.

### INTRODUCTION

LE MÉCANISME de la dégradation microbiologique des stéroïdes de la série cholestane ( $C_{27}$ ) n'avait pas encore été complètement élucidé. En effet, la difficulté de cette étude réside dans le fait que les dégradations touchent à la fois le système polycyclique et la chaîne latérale aliphatique sans que l'on sache avec certitude quel est le point d'attaque initiale de la molécule et l'ordre des premières étapes de la dégradation.<sup>1,2</sup> Horvath et Kramli<sup>3</sup> pensaient avoir isolé et identifié de la méthylhéptanone après transformation du cholestérol par *Azotobacter* sp., ce qui correspondrait au départ de toute la chaîne latérale, en une seule fois, après rupture entre C-17 et C-20. Par contre Turfitt<sup>4</sup> annonçait avoir isolé de l'acide isocaproïque après l'action de *Proactinomyces erythropolis* sur le cholestérol; dans ce cas, la rupture aurait lieu entre C-20 et C-22. Par la suite, Stadman *et al.*<sup>5</sup>, ont constaté que des cellules de *Mycobacterium*, incubées en présence de cholestérol marqué au  $^{14}C$ , libéraient du  $CO_2$  radioactif quatre fois plus rapidement à partir de cholestérol marqué en position 4, que quand le marquage était en position 26; ceci conduisait à penser que les dégradations des cycles étaient plus rapides que celles de la chaîne latérale. Mais,

<sup>1</sup> SIH, C. J. and WANG, K. C. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1387.

<sup>2</sup> CAPEK, A., HANC, O. and TADRA, M. (1966) *Microbial Transformations of Steroids*, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.

<sup>3</sup> KRAMLI, A. and HORVATH, J. (1948) *Nature* **162**, 619.

<sup>4</sup> TURFITT, G. E. (1948) *Biochem. J.* **42**, 376.

<sup>5</sup> STADMAN, CHERKES, A. and ANFENSEN, C. B. (1954) *J. Biol. Chem.* **206**, 511.

plus tard, Peterson *et al.*<sup>6</sup> ont observé un résultat inverse avec des *Streptomyces*; les dégradations de cycle étant plus lentes dans leur cas, ces auteurs<sup>7</sup> ont constaté d'autre part l'accumulation d'un métabolite oxydé du cholestérol ayant gardé l'intégrité des cycles, la 4-hydroxy-cholesténone.

Whitmarsh<sup>8</sup> isola du sol des *Nocardia* capables de scinder la chaîne latérale du cholestérol, en présence de 8-hydroxy-quinoléine. Il observa des coupures entre C-22 et C-23 menant avec un faible rendement aux acides  $\Delta^{1,4}$  et  $\Delta^4$  3-oxo, bisnor-choléniques et aussi entre C-17 et C-20 conduisant à la  $\Delta^{1,4}$  et à la  $\Delta^4$ -androstènedione. La coupure entre C-22 et C-23 fut confirmée par la suite par Sih *et al.*<sup>9</sup> et étudiée de façon plus précise par ces auteurs. Le fer étant nécessaire à l'action des hydroxylases responsables de l'ouverture des cycles, ses chélatants inhibent donc ces réactions et permettent l'accumulation d'intermédiaires métaboliques. Les agents chélatants du fer ( $\alpha, \alpha'$ -dipyridyle en particulier) ont alors été utilisés, pour la production d'hormones stéroïdes androgènes, dépourvues de chaîne latérale, par oxydation microbiologique du cholestérol.<sup>10</sup>

Après ces différents travaux, dont les résultats étaient contradictoires, on ne pouvait savoir si la dégradation des cycles précédait celle de la chaîne aliphatique ou vice versa. D'autre part, les mécanismes de dégradation de cette chaîne latérale restaient en grande partie à élucider. Pour ce faire, l'isolement et l'identification des métabolites intermédiaires étaient nécessaires.

La difficulté principale provient du fait que, suivant le type de structure, la plupart des stéroïdes, ou bien ne sont pas catabolisés, ou bien le sont très rapidement sans qu'il y ait accumulation de métabolites intermédiaires. Ainsi, les structures saturées (5 $\alpha$  et 5 $\beta$ -cholestane-3-one) ne sont pas attaquées, par contre les stéroïdes à structure insaturée, du type  $\Delta^5$  3 $\beta$ -ol,  $\Delta^4$  3-oxo ou  $\Delta^{1,4}$  3-oxo, sont dégradés très rapidement, une fois que les enzymes d'oxydation sont induites; comme nous l'avons vu précédemment, on peut éventuellement éviter la dégradation des cycles de la cholesténone en présence d'un inhibiteur d'hydroxylases ( $\alpha, \alpha'$ -dipyridyle), mais, même dans ces conditions, les dégradations de la chaîne latérale restent très rapides et complètes.

Il a été recherché si certaines modifications de structure des cycles permettaient d'obtenir un ralentissement des coupures de la chaîne latérale. Essayant un certain nombre de stéroïdes pouvant être des métabolites intermédiaires éventuels, il a été constaté qu'un stéroïde à cycle A hydroxylé (la 4-hydroxy cholest 4-ène 3-one) que Peterson *et al.*<sup>7</sup> avaient antérieurement isolé dans les produits d'oxydation du cholestérol par des *Streptomyces*, était un substrat convenant pour cette étude. Il a été montré que ce composé était d'abord oxydé en un 3,5-séco-4-nor-céto-acide identique à un produit obtenu antérieurement par Windaus<sup>11</sup> dans les composés d'oxydation de la cholesténone par le permanganate en milieu alcalin. Les séco-acides de ce type peuvent être obtenus aussi par ozonolyse des  $\Delta^4$  3-oxo stéroïdes correspondants.<sup>12</sup> Turfitt<sup>4</sup> puis Stadman *et al.*<sup>5</sup> avaient trouvé aussi ce sécoacide dans les produits d'oxydation du cholestérol, respectivement par *Proactinomyces erythropolis* et *Mycobacterium*. Nous avons constaté que ce séco-acide était dégradé lente-

<sup>6</sup> PETERSON, G. E. and DAVIS, J. R. (1964) *Steroids* **4**, 677.

<sup>7</sup> BROWN, R. L. and PETERSON, G. E. (1966) *J. Gen. Microbiol.* **45**, 441.

<sup>8</sup> WHITMARSH, J. M. (1964) *Biochem. J.* **90**, 23 P.

<sup>9</sup> SIH, C. J., WANG, K. C. and TAI, H. H. (1967) *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 1956.

<sup>10</sup> BREVET JAPONAIS (1966) *Chem. Abs.* **65**, 6262.

<sup>11</sup> WINDAUS, A. (1906) *Ber.* **39**, 2008.

<sup>12</sup> LIEFVRE, G., MATRINGE, H., GERMAIN, P. and GAY, R. (1967) "Ozonisation des  $\Delta^4$ ,3-oxostéroïdes" *J. Chim. Organique*—Orsay (September), France.

ment par attaque de la chaîne latérale, ce qui a permis d'isoler les intermédiaires provenant de la rupture de la chaîne latérale.

## RESULTATS

### *Catabolisme de la 4-hydroxy cholesténone chez les Nocardia*

*Nocardia restrictus* ATCC 14887 est préalablement cultivée sur un milieu au glucose (facteur nutritif limitant la croissance) en présence, éventuellement, d'un stéroïde inducteur (progestérone à 200  $\mu\text{g/ml}$ ). Les cellules sont récoltées après 4 jours, en début de la phase stationnaire de la croissance. Elles sont soumises ensuite à une période de jeûne de 5 hr afin de réduire les réserves endogènes, par agitation à 26°, en aérobiose, dans un tampon phosphate de pH 7,4, contenant du  $\text{MgCl}_2$ . Elles sont ensuite centrifugées et lavées puis remises en suspension dans un tampon identique frais. La suspension, correspondant à 1,7 mg de cellules (en poids sec) est placée dans une fiole de Warburg. Le substrat stéroïde dans l'appendice latéral; il s'agit de  $[\text{C}_4^{14}]$ -4-hydroxy cholesténone finement homogénéisée dans de tampon phosphate contenant du  $\text{FeSO}_4$ , par action des ultrasons. Le stéroïde peut être mis en contact avec les cellules au moment choisi en basculant la fiole. Afin de piéger le  $\text{CO}_2$  formé pendant la respiration, le puits central de la fiole est garni d'une solution méthanolique de hyamine. La respiration des réserves endogènes est mesurée dans un essai parallèle sans substrat. Les inductions enzymatiques sont éventuellement supprimées par le chloramphénicol (100  $\mu\text{g/ml}$ ). La consommation d'oxygène est mesurée à 26° en phase gazeuse constituée d'air.

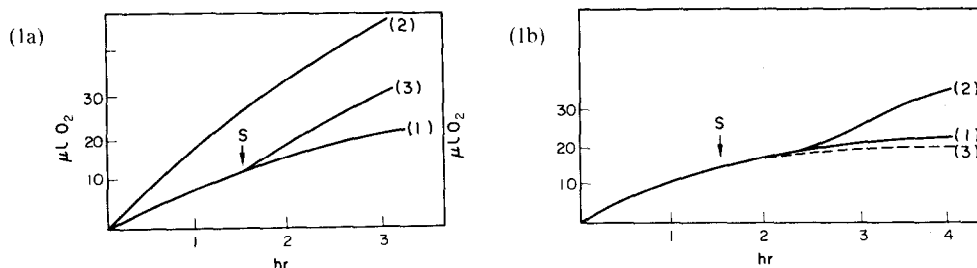


FIG. 1. INFLUENCE DE LA PRÉSENCE DE 4-HYDROXY-CHOLESTÉNONE SUR LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE DE *Nocardia restrictus*.

Fig. 1a. Cellules préalablement induites. Conditions: essai avec 1,7 mg (poids sec) de bactéries et 4 mg de stéroïde à 26°. (1) Sans stéroïde endogène; (2) avec stéroïde dès le temps 0; (3) addition du stéroïde après 1 hr 1/2.

Fig. 1b. Cellules non induites. Conditions: (1) sans stéroïde; respiration endogène; (2) addition de stéroïde après 1 hr 1/2; (3) addition de stéroïde et chloramphénicol après 1 hr 1/2. Conditions identiques aux précédentes; mais avec des cellules non induites.

Les mesures de la consommation d'oxygène sont indiquées dans la Fig. 1. Les résultats suivants apparaissent: Si l'on a pris la précaution de faire jeûner au préalable les cellules pendant 5 hr dans le tampon, on constate que la respiration endogène a suffisamment diminué pour permettre de mesurer l'influence de la présence de stéroïde sur la consommation d'oxygène par les cellules. On voit que le stéroïde est immédiatement oxydé par les cellules qui ont été préalablement induites. Par contre, les cellules non-induites montrent une latence dans l'utilisation de stéroïde; ce délai est nécessaire à la synthèse des enzymes d'oxydation. Cette synthèse peut d'ailleurs être supprimée si on ajoute du chloramphénicol

TABLEAU 1. DISTRIBUTION DE LA RADIOACTIVITÉ PROVENANT DU CARBONE 4 DE LA [ $^{14}\text{C}_4$ ]-4-HYDROXY-CHOLESTÉNONE (2)

Conditions	$\text{CO}_2$	Radioactivité (cpm) (au départ: total = 28 000 cpm)	
		Fraction hydrosoluble	Extrait chloroformique
Cellules induites + (2)- $^{14}\text{C}$	1600	8300	10 800
Cellules non induites + (2)- $^{14}\text{C}$	900	3300	21 200
Cellules non induites + (2)- $^{14}\text{C}$ + chloramphénicol	700	1700	24 000

en même temps que le stéroïde. Ces expériences montrent donc que la 4-hydroxy-cholesténone est oxydée par les *Nocardia* grâce à des enzymes dont la biosynthèse est induite par les stéroïdes.

Après oxydation pendant 2 hr 1/2 de [ $^{14}\text{C}_4$ ]-4-hydroxycholesténone par les cellules à 26° en aérobiose dans l'appareil de Warburg, l'incubation est arrêtée et la suspension est agitée en présence de chloroforme. Après la séparation des différentes phases et leur évaporation à sec, elles sont reprises dans la hyamine et leur radioactivité est mesurée en scintillation liquide. Le Tableau 1 indique les résultats des comptages. La fraction hydrosoluble contient la radioactivité provenant du carbone 4 qui a été incorporée dans les constituants cellulaires; la fraction chloroformique renferme l'excès de 4-hydroxy-cholesténone et les métabolites stéroïdiques.

Le chloramphénicol supprime les inductions enzymatiques lors même de l'incubation. On constate qu'une préinduction des cellules avant l'incubation augmente nettement le métabolisme de l'hydroxy-cholesténone. Cette expérience confirme donc que ce stéroïde est dégradé par des enzymes dont la biosynthèse est induite par les stéroïdes.

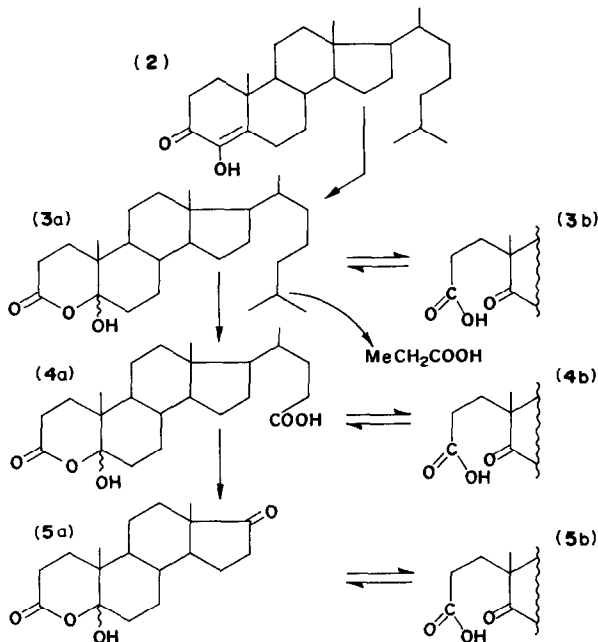
On constate d'autre part, que la plus grande partie de la radioactivité provenant du carbone 4 se retrouve dans la fraction hydrosoluble. Il s'en retrouve relativement peu sous forme de  $\text{CO}_2$  libre. Il est possible, qu'une partie du  $\text{CO}_2$  soit reprise dans le métabolisme intermédiaire et réincorporée dans les constituants cellulaires. Mais, même en tenant compte de ce fait, il semble que la quantité de  $\text{CO}_2$  radioactif produit soit faible. Ceci sera interprété dans la discussion finale.

#### RECHERCHE DES METABOLITES STEROIDIQUES PROVENANT DE LA 4-HYDROXY-CHOLESTÉNONE

L'extrait chloroformique est radiochromatographié sur C.M (voir Experimentale). La 4-hydroxy-cholesténone résiduelle est le seul stéroïde radioactif. On voit apparaître trois métabolites stéroïdiques non marqués, ayant donc perdu le carbone 4. Quand l'incubation est menée avec des cellules non-induites et en présence de chloramphénicol, ils n'apparaissent pas. Ces composés se relèvent aux réactifs des cétones (2,4-dinitrophénylhydrazine; réactif de Zimmermann) et ils possèdent tous une fonction acide: ils sont entièrement extractibles par une solution de carbonate de sodium.

Une incubation semblable aux précédentes mais à plus grande échelle, avec (2) non marquée et les cellules induites a été menée pendant 28 hr. Les métabolites ont été ensuite séparés par chromatographies préparatives avec le système décrit dans l'experimentale.

Seul le produit **3** a pu être obtenu en quantité suffisante pour être analysé et identifié à l'acide 3,5-séco-4-nor-5-oxo cholestan-3-oïque (**3b** Scheme 1). Les résultats de l'analyse concordent avec les données de la littérature (F,  $[\alpha]_D$ , IR, oxime). Ce composé a aussi toutes les caractéristiques du séco-acide obtenu par synthèse, en ozonolysant la cholest 4-ène-3-one.<sup>12</sup>



SCHEME 1. CATABOLISME DE LA 4-HYDROXY-CHOLESTÉNONE.

#### Catabolisme de la chaîne latérale aliphatique

Le séco-acide cholestanique (**3**) a été synthétisé par ozonolyse de la cholesténone (**1**).<sup>12,13</sup> Ce séco-acide est dégradé par les cellules préalablement induites de *Nocardia restrictus* en composés polaires qui ont une chaîne latérale raccourcie. La nature de ces métabolites a été recherchée.

On incube à 26° pendant 48 hr, (**3**) sous forme de sel de sodium avec les cellules (induites). Après acidification à pH 1, les stéroïdes sont extraits au chloroforme; puis on extrait les stéroïdes acides. Ceux-ci sont ensuite séparés par CM préparatives, trois produits apparaissent: (**3**) résiduel ( $R_f$  0,41), (**4**) ( $R_f$  0,17) et (**5**) ( $R_f$  0,28). Ces composés ont le même comportement chromatographique et les mêmes révélations aux réactifs des cétones que les métabolites de la 4-hydroxy-cholesténone. Après désorption de la plaque par le méthanol, on obtient (**4**) qui a été analysé; (**5**) était en quantité trop faible pour être analysé.

Trois recristallisations successives mènent à un produit (de F. constant 175–180°.  $C_{23}H_{36}O_5$ , ce qui correspond à une chaîne latérale possédant cinq carbones.) Il possède deux fonctions acides. Cependant, une des fonctions acides est masquée car le dosage direct, donne une valeur inférieure à la théorie. Ceci a été confirmé par le spectre IR. Celui-ci

<sup>13</sup> TURNER, R. B. (1950) *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 579.

indique que le produit a été isolé sous la forme lactolique (**4a** Scheme 1) dans le cycle A ( $\lambda_{\text{nujol}}^{\text{Max}}$  3250 (O-H), 1750 et 1700 (C=O) 1190 et 1150 (C-O-C de lactone)  $\text{cm}^{-1}$ . Les 3,5-séco-, 4-nor 5-oxo 3-oïque stéroïdes existent souvent sous cette forme tautomère: de nombreux auteurs<sup>14-19</sup> les ont obtenus sous forme de lactol dont le spectre IR est caractéristique.<sup>14</sup>

Pour obtenir ce composé sous sa forme d'acide libre (**4b** Scheme 1) (**4a**) a été traité par un acide fort et l'acide a été extrait à l'éther. Le séco-acide (**4b**) est recristallisé dans le méthanol-eau et montre des caractéristiques identiques au produit obtenu par ozonisation de l'acide  $\Delta^4$  3-oxo cholanique en C-24<sup>12</sup> (F 183–186° produit de synthèse: F 185–188°; IR:  $\lambda_{\text{nujol}}^{\text{Max}}$  2650 (O-H associés de -COOH), 1700 (C=O), 1530 (COO') 1285 (C-O), 1080 et 950  $\text{cm}^{-1}$ . Quand on part du séco-acide cholestanique (**3**) marqué au carbone 14 en position 26 (produit qui a été obtenu après ozonolyse de la [ $^{14}\text{C}_{26}$ ]-cholesténone) aucune radioactivité ne se retrouve dans le métabolite (**4**). L'ensemble de ces résultats montre que la chaîne latérale a été rompue entre C-24 et C-25. La forme sous laquelle se retrouve le résidu éliminé de la chaîne latérale a été recherchée.

L'incubation de (**3**) avec les cellules de *Nocardia restrictus* est répétée dans les conditions décrites précédemment mais avec le séco-acide (**3**) marqué au  $^{14}\text{C}$  en position 26 en présence de propionate de sodium non marqué. A la fin de l'incubation, les acides volatils sont séparés du milieu acidifié par entraînement à la vapeur. Le distillat est ensuite chromatographié sur une colonne de célite;<sup>20</sup> les fractions éluées sont titrées à la soude et une aliquote est comptée en scintillation liquide; 80% de la radioactivité provenant du distillat se retrouve superposée avec le pic de titration de l'acide propionique; celui-ci a aussi été caractérisé sous forme d'un dérivé, le sel de S-benzylthiouronium (F 149–151° Litt.<sup>21</sup> F 152°); après dilution avec 5 fois la quantité du propionate de S-benzylthiouronium de référence, trois recristallisations successives du mélange dans l'eau chaude, ont montré que la cristallisation était homogène puisque les comptages successifs des cristaux restaient constants (successivement 4730, 4420, 4510 cpm pour 0.1 mmol). La coupure de la chaîne latérale entre C-24 et C-25 libère donc de l'acide propionique.

### Elimination totale de la chaîne latérale

Le métabolite **5b** (Scheme 1) formé par dégradation du séco-acide (**3**) ne s'accumule pas dans le milieu. On peut cependant l'accumuler en effectuant l'incubation en présence de  $\alpha,\alpha'$ -dipyridyle. Dans ces conditions, il a pu être purifié par chromatographies préparatives sur plaques et analysé. (F 163–166°;  $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_4$ ; IR:  $\lambda_{\text{nujol}}^{\text{Max}}$  2660, 1710, 1275 et 960  $\text{cm}^{-1}$ .) Il ne possède qu'une seule fonction acide. Il correspond au céto-acide de la série androstanique qui a été obtenu par ozonolyse de l'androstènedione.<sup>12</sup> Il a donc perdu entièrement la chaîne latérale. Cependant, les résidus provenant de celle-ci n'ont pas pu être analysés. En l'absence d' $\alpha,\alpha'$ -dipyridyle dans l'incubation, les cycles sont dégradés et (**5**) disparaît du milieu.

<sup>14</sup> USKOKOVIC, M., DOREMAN, R. and GUT, M. (1958) *J. Org. Chem.* 1947.

<sup>15</sup> DJERASSI, C. (1963) in *Steroid Reactions* p. 482, Holden Day.

<sup>16</sup> BOLT, C. C. (1938) *Rec. Trav. Chim.* **57**, 905.

<sup>17</sup> WEISENBORN, F. L., REMY, D. C. and JACOBS, T. L. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 552.

<sup>18</sup> ATWATER, N. W. and RALLS, J. W. (1960) *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 2011.

<sup>19</sup> CASPI, E., SCHMID, W. and KHAN, B. T. (1962) *Tetrahedron* **18**, 767.

<sup>20</sup> SWIN, H. F. and UTTER, M. F. (1957) in *Methods in Enzymology* (COLOWICK, S. P. et KAPLAN, N. O., eds.) Vol. IV, p. 584, Academic Press, New York.

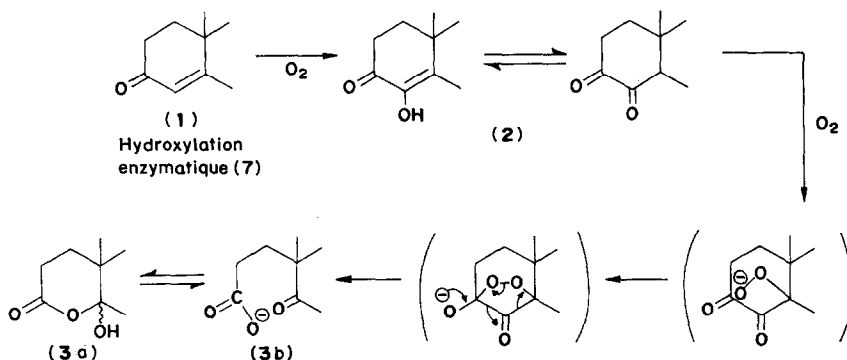
<sup>21</sup> VOGEL, A. F. (1962) *Practical Organic Chemistry* 3ème edn, Wiley, New York.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

La 4-hydroxy-cholesténone est oxydée avec départ du carbone-4 et formation d'un 4-nor 3,5-séco-acide. On peut se poser la question de savoir quel est le mécanisme par lequel s'effectue l'oxydation du cycle A et son ouverture. On retrouve peu de  $\text{CO}_2$  provenant du carbone 4 par rapport à ce qu'on aurait pu attendre si celui-ci était entièrement oxydé sous cette forme. Il est possible qu'une partie du  $\text{CO}_2$  soit réincorporée dans les constituants cellulaires; mais cette explication paraît insatisfaisante. Il est probable qu'initialement le départ du C-4 ne se fait pas sous la forme entièrement oxydée, mais sous une forme moins oxydée telle que CO ou  $\text{HCOOH}$ . Il est difficile de faire la part de la forme chimique gazeuse (autre que le  $\text{CO}_2$ ) qui provient du C-4 car les variations de volume dans la fiole de Warburg dépendent aussi, même après déduction de la respiration endogène, de la quantité d'oxygène qui sert à l'oxydation de la chaîne latérale et qu'on ne peut mesurer indépendamment.

On peut cependant rapprocher le résultat obtenu ici avec ceux de Peterson *et al.*<sup>7</sup>; en effet ces auteurs avaient trouvé que le cholestérol est dégradé par des *Streptomyces* par l'intermédiaire de la 4-hydroxy-cholesténone et que l'oxydation du  $[\text{C}_4^{14}]$ -cholestérol fournissait beaucoup moins de  $\text{CO}_2$  radioactif que celle du  $[\text{C}_{26}^{14}]$ -cholestérol. Dans ces conditions, on pourrait proposer un modèle d'oxygénation du cycle A semblable à l'autooxydation chimique des cétones énolisables.<sup>22-24</sup> Cette réaction a été étudiée sur des cétones polycycliques de structure 4,4'-diméthyl-stéroïde par Ourisson *et al.*<sup>25</sup> en milieu oxygéné et en présence de *t*-butylate de potassium. Ces auteurs ont montré que l'oxydation se fait en deux étapes. En effet l'oxygénation des cétones en présence de *t*-butylate de potassium, introduite par Barton *et al.*<sup>26</sup> mène tout d'abord à des  $\alpha$ -dicétones. Ourisson *et al.*<sup>25</sup> ont montré ensuite que l'oxydation peut se poursuivre en menant aux nor céto-acides correspondants, obtenus sous forme de lactols. On pourrait penser qu'il existe ici des mécanismes enzymatiques fonctionnant sur ce modèle et responsables, après l'hydroxylation en 4 menant à l'4-hydroxy cholesténone (forme énolique de la 3,4-dicétone) de l'oxygénation entraînant l'ouverture du cycle A.

On peut envisager le schéma qui suit (Scheme 2) d'après un mécanisme proposé par Rio *et al.*<sup>24</sup> et repris par Ourisson *et al.*<sup>25</sup>



SCHEME 2. MÉCANISME HYPOTHÉTIQUE D'OXYDATION DU CYCLE A.

<sup>22</sup> DUFRAISSE, C., ETIENNE, A. and RIGAUDY, J. (1948) *Bull. Soc. Chim.* **15**, 804.

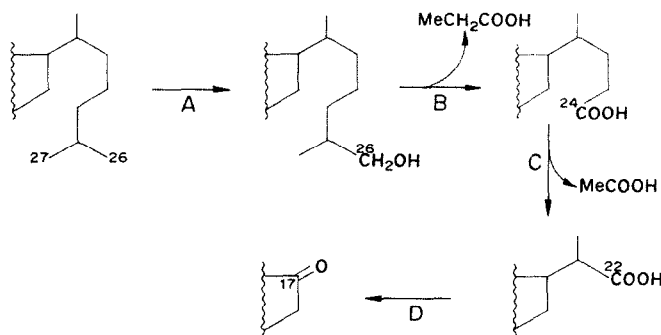
<sup>23</sup> RIGAUDY, J. (1949) *C.R. Acad. Sci.* **228**, 253.

<sup>24</sup> RIO, G., CORNU, P. J. and WAGNER, R. (1961) *Bull. Soc. Chim. France*, 587.

<sup>25</sup> HANNA, R. and OURISSON, G. (1961) *Bull. Soc. Chim. France*, 1945.

<sup>26</sup> BARTON, D. H. R., PRADHAN, S. K., STERWELL, S. and TEMPLETON, J. F. (1960) *J. Chem. Soc.* 255.

Nous avons étudié aussi les dégradations de la chaîne latérale aliphatique. D'après les données de la littérature et nos propres résultats, on peut envisager les mécanismes suivants: dans un premier temps, il pourrait y avoir une  $\omega$ -oxydation de la chaîne hydrocarbonée, sur le méthyle terminal en C-26 (réaction A Scheme 3). En effet Kogan *et al.*<sup>27</sup> ont isolé la 26-hydroxy-cholesténone après action sur la cholesténone d'un *Mycobacterium*, isolé du sol; d'autre part, Schubert *et al.*<sup>28</sup> ont mis en évidence la formation d'esters de stéroïdes hydroxylés dont la fonction alcool est localisée sur le C-26, dans les produits de dégradation du cholestérol par *Mycobacterium smegmatis*.



SCHEME 3. NIVEAUX DE CLIVAGE DE LA CHAÎNE LATÉRALE.

Il est probable que la fonction hydroxyle en 26 est ensuite oxydée en fonction acide. La chaîne aliphatique carboxylique serait finalement catabolisée par une suite de  $\beta$ -oxydations. En effet, le premier clivage observé a lieu entre C-24 et C-25 (réaction B): nous avons isolé un intermédiaire de la série cholanique dont la fonction acide est localisée sur le carbone 24 et mis en évidence comme Sih *et al.*,<sup>29,30</sup> la formation d'acide propionique par les *Nocardia*. L'ensemble de cette voie métabolique serait donc semblable à celle de la formation de la chaîne latérale des acides biliaires à partir du cholestérol chez les mammifères. La deuxième  $\beta$ -oxydation (réaction C) mène à des acides en C-22 (série bis-nor-cholanique). La formation de tels intermédiaires en C-22 par les *Nocardia* avait été indiquée d'abord par Whitmarsh<sup>8</sup> puis confirmée par Sih *et al.*<sup>9</sup> Une dernière  $\beta$ -oxydation (réaction D) aboutit à la formation d'un stéroïde dépourvu de chaîne latérale et oxydé en position 17.<sup>8,9</sup>

Bien qu'aucun auteur n'ait pu observer la formation de l'ensemble de ces métabolites avec le même organisme et à partir du même substrat, on peut cependant estimer que l'on dispose maintenant d'un schéma cohérent du catabolisme de la chaîne aliphatique des stérols.

#### EXPÉRIMENTALE

**Cultures.** Les espèces suivantes d'Actinomycétales, provenant de l'American Type Culture Collection, ont été utilisées: *Nocardia corallina* ATCC 13259; *Nocardia opaca* ATCC 4276; *Nocardia restrictus* ATCC 14887; le milieu de culture contient par l. H<sub>2</sub>O: 1 g d'extrait de boeuf Difco; 1 g d'extrait de levure Difco; 2 g bacto-peptone

<sup>27</sup> ZARETSKAYA, I. L., KOGAN, L. M. (1968) *Tetrahedron* **24**, 1525.

<sup>28</sup> SCHUBERT, K. *et al.* (1969) *Biochim. Biophys. Acta* **176**, 170.

<sup>29</sup> SIH, C. J., TAI, H. H. and TSONG, Y. Y. (1967) *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 1957.

<sup>30</sup> SIH, C. J., TAI, H. H., TSONG, Y. Y., LEE, S. S. and COOMBE, R. G. (1968) *Biochemistry* **7**, 808.



Difco; 5 g de glucose; 0,86 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,24 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 g de  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,001 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  et 0,001 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .

*Synthèses chimiques de stéroïdes. Préparation de la [ $^{14}\text{C}_4$ ]-4-Hydroxycholesténone.* Des échantillons de 4-hydroxycholesténone ont été fournis par le Professeur S. Julia (E.N.S. Chimie, Paris) et Bruno Camerino (Farmitalia, Milan). D'autre part, une petite quantité de [ $^{14}\text{C}_4$ ]-4-hydroxycholesténone a été préparée à partir de [ $^{14}\text{C}_4$ ]-5 $\alpha$ -cholestan-3-one fournie par le Dr. I. Tkatchenko (Thèse, Nancy, 1967). La 5 $\alpha$ -cholestan-3-one a été oxygénée selon Barton *et al.*<sup>31</sup> en présence de *t*-butylate de K.<sup>32</sup> Recristallisée dans MeOH, la 4-hydroxycholesténone a des caractéristiques concordant avec celles de la littérature,<sup>33</sup> ( $F$  150–151°, UV:  $\lambda_{\text{Ethanol}}^{\text{Max}}$  278 nm ( $\epsilon$  13000), IR:  $\lambda_{\text{KBr}}^{\text{Max}}$  2,92; 5,98 et 6,10  $\mu$ ).

*Méthodes d'obtention des 3,5 seco 4-nor ceto-acides.* 1,92 g (5 mmol) de cholesténone sont dissous dans 16 ml ml AcOEt (sec) et 24 ml AcOH. On ozonise à  $-15^\circ$  par un courant d'ozone à 2% dans  $\text{O}_2$ , avec un débit de 250 ml/min. pendant 90 min. L'ozonisation est suivie par chromatographie sur CM de gel de silice, avec l'éluant cyclohexane–AcOEt (7:3); l'ozonisation est arrêtée quand la tache de la cholesténone ( $R_f$  0,7) a disparu; le peroxyde qui se forme a un  $R_f$  de 0,4. Après 30 min d'ozonisation, le peroxyde cristallise peu à peu; jusqu'à former un abondant précipité blanc. A la fin de l'ozonisation, on laisse passer pendant 5 min un courant  $\text{O}_2$  pur, pour éliminer l'excès d'ozone. Aussitôt après cette opération, la suspension froide du peroxyde est filtrée rapidement; les cristaux sont lavés avec 3 ml AcOH froid. Le peroxyde est ensuite placé à l'excipateur sous vide, jusqu'à poids sec. On obtient 1,66 g (65%) de cristaux blancs,  $F$  128–130° (décomposition avec dégagement de gaz).

Le produit provenant de l'ozonisation de la cholesténone en présence de AcOH (1,66 g) est dissous dans 40 ml de NaOH 0,25 N en solution dans EtOH à 80%, contenant 0,1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30 vol. On porte à 70° pendant 15 min, puis on laisse reposer, 1 hr à température ordinaire. Une grande partie de EtOH est éliminée par évaporation sous vide de la moitié de la solution. On reprend par un volume  $\text{H}_2\text{O}$ , puis extrait les produits neutres par deux fois 20 ml  $\text{Et}_2\text{O}$ . La phase aqueuse sodique est acidifiée par HCl conc, jusque pH 1. Le ceto-acide précipité est extrait par 40 ml  $\text{Et}_2\text{O}$ . La solution étherée est lavée ( $\text{H}_2\text{O}$ ) jusqu'à neutralité, séchée ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), puis évaporée sous vide. On obtient 1,35 g de ceto-acide (3b):  $F$  149–152°. Après recristallisation dans le méthanol: 1,25 g,  $F$  152–154° (Litt.<sup>13</sup>: 154–155°). (Analyse:  $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_3$ ; calc: C 77,17; H 10,96 tr: C 77,12; H 10,87.) Les eaux-mères de cristallisation du peroxyde, après évaporation sous vide, sont traitées de la même façon. Après deux recristallisations, dans MeOH, du ceto-acide brut obtenu, on obtient 0,40 g de ceto-acide  $F$ : 151–153°; rendement total en ceto-acide: 79%.<sup>12</sup>

*Caractéristiques du ceto-acide (3b) obtenu* [ $\alpha$ ] $_{\text{D}}^{25}$  + 360 [Litt.<sup>13</sup> + 34°]; IR:  $\lambda_{\text{KBr}}^{\text{Max}}$ : 2650, 1700, 1290, 1080 et 940  $\text{cm}^{-1}$ ; dérivé: 2,4-dinitrophénylhydrazone:  $F$  122–127°.

*Purifications et analyses des stéroïdes: Analyses spectroscopiques.* Les spectres IR ont été effectués avec les spectrophotomètres Perkin–Elmer 137 et 257. Dans le premier cas, les préparations ont été faites dans le nujol ou dans KBr. Dans le deuxième cas, en solution dans les cellules NaCl d'épaisseur 1 mm. Les solvants utilisés étaient les suivants:  $\text{CS}_2$  pour spectroscopie Merck;  $\text{CHCl}_3$  redistillé, puis traité à l'alumine neutre afin d'éliminer les traces d'éthanol. Les spectres UV ont été obtenus avec l'appareil Beckman DK25, dans le cyclohexane pour spectroscopie Merck, traité à l'actigel. Les Radiochromatographies de la 4-hydroxycholesténone et de ses métabolites sont faites sur Kieselgel G avec Benzène-méthanol-acide formique (95:5:0,5). Révélation chimique: par le réactif de Zimmermann (métadinitrobenzène à 2% EtOH, puis KOH alcoolique à 30% EtOH– $\text{H}_2\text{O}$  (1:1); par le mélange sulfo-chromique, suivi d'un chauffage à 100° pendant 10 min, pour les stéroïdes non cétoniques; par le réactif à l'anisaldéhyde ayant la composition suivante: 1 ml d'anisaldéhyde; 2 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 97 ml HOAc.

Après vaporisation du réactif, apparaissent successivement les cétones saturées en tache jaune, les  $\Delta^4$ -cétostéroïdes après chauffage doux et les  $\Delta^1$ – $\Delta^4$ -cétostéroïdes à chauffage fort (110°; 20 min).

*Comptages des stéroïdes radioactifs: Enregistrement de la radioactivité sur les couches minces.* Ils sont effectués avec un lecteur de plaques Berthold LB 2721, muni d'un compteur de Geiger à fenêtre ouverte et traversé d'un flux de méthane. Les conditions d'enregistrement sont en général les suivantes: vitesse de déroulement: 120 mm/hr; distance couche-fenêtre: 1,5 mm; fenêtre ouverte de 1 mm; sensibilité: 30 ou 100 cps (avec une constante de temps de 30 sec). Un intégrateur-enregistreur permet le comptage relatif de chaque tache radioactive, avec soustraction du bruit de fond.

<sup>31</sup> BARTON, D. H. R., PRADHAN, S. K., STERNELL, S. and TEMPLETON, J. F. (1960) *J. Chem. Soc.* 255.

<sup>32</sup> BIELLMANN and RAJIC (1962) *Bull. Soc. Chim.* 441.

<sup>33</sup> FIESER, L. F. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* 74, 729.