

Sur les substances cardiotoniques de la scille maritime (*Scilla maritima* L.).

Par ARTHUR STOLL, Bâle¹

Introduction. De la longue série des recherches sur les glucosides cardiotoniques que nous avons commencées il y a plus de 30 ans, et qui ont porté depuis lors sur un assez grand nombre de plantes des genres de la scille², de la digitale³, du Strophanthus⁴, du Periploca⁵, de la Coronilla⁶, nous avons choisi comme sujet de cet exposé l'étude de la scille maritime. Et ceci pour différentes raisons. C'est à la base du problème que nous avons dû nous attaquer, puisqu'au début de nos recherches on ne savait même pas encore à quelle classe de substances la scille maritime devait son action sur le cœur. En effet, en ce qui concerne l'isolement et les formules de constitution des substances actives de cette drogue, nous sommes restés jusqu'à aujourd'hui pour ainsi dire seuls, fait certainement rare, car maintenant au contraire on reçoit souvent de l'aide d'autres laboratoires, dès qu'il s'agit de recherches promettant d'être intéressantes.

Au reste, les recherches sur les substances cardiotoniques de la scille maritime ont fourni des résultats qui n'ont pas de l'intérêt que pour cette seule plante, mais qui sont aussi importants dans une série de cas concernant l'isolement et la connaissance chimique d'autres substances cardiotoniques, comme nous le verrons au cours de cet exposé. Une autre raison de parler de la scille maritime est, que ces derniers temps on est parvenu à éliminer les incertitudes qui régnent encore au sujet de la structure du principal glucoside de la scille maritime, le *scillarène A*, et en outre à élucider complètement la structure d'un autre glucoside de la même plante, le scilliglaucoside.

La scille maritime, *Scilla maritima* L. ou *Urginea maritima* BAKER, appartient aux liliacées et croît principalement dans les pays méditerranéens. Dans l'antiquité, on connaissait déjà les propriétés curatives de la scille. Les études historiques de SCHEER et SIGERIST⁷

¹ D'après une conférence donnée à l'occasion de la séance commune des sections de Nancy, Strasbourg et Mulhouse de la Société chimique de France et de la Société chimique de Bâle, le 14 novembre 1953 à Bâle.

² Les publications sur les glucosides de la scille maritime seront citées plus loin en détail.

³ A. STOLL et W. KREIS, Helv. chim. Acta 16, 1049, 1390 (1933); 17, 592 (1934); 18, 120 (1935); 35, 1318 (1952). — A. STOLL et J. RENZ, Helv. chim. Acta 35, 1310 (1952) — A. STOLL, A. VON WARTBURG et W. KREIS, Helv. chim. Acta 35, 1324 (1952).

⁴ A. STOLL, J. RENZ et W. KREIS, Helv. chim. Acta 20, 1484 (1937).

⁵ A. STOLL et J. RENZ, Helv. chim. Acta 22, 1193 (1939).

⁶ A. STOLL, A. PEREIRA et J. RENZ, Helv. chim. Acta 32, 293 (1949); 33, 1637 (1950).

⁷ H. SCHEER et E. SIGERIST, Schweiz. med. Wschr. 57, 1168 (1927).

font état du fait que les Egyptiens avaient érigé un temple en l'honneur de la scille. En Grèce, PYTHAGORE et plus tard THÉOPHRASTE, disciple d'ARISTOTE, attribuaient à cette plante des vertus thérapeutiques importantes: Elle favorisait la croissance et possédait des effets antiparasitaires et antiinfectieux. Dans l'antiquité, l'action diurétique de la scille était déjà connue et utilisée dans le traitement de la rétention urinaire.

Une des formules médicales les plus anciennes figurant sur un papyrus datant de 3500 ans, contient une prescription dans laquelle la scille est indiquée. La Figure 1 montre une coupure de ce papyrus avec la recette suivante:

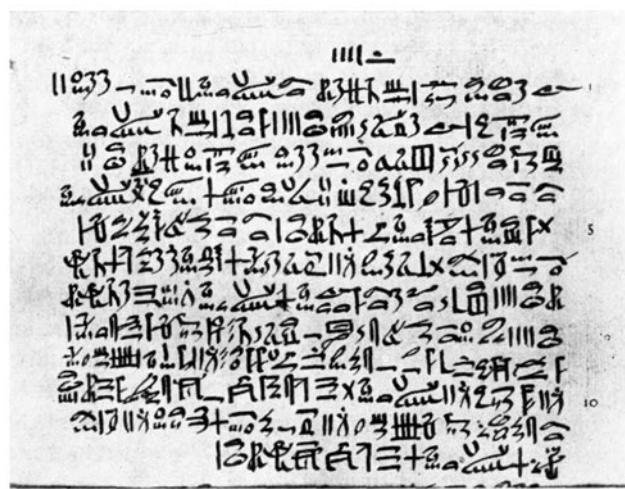


Fig. 1. Papyrus Ebers.

«Un autre remède pour «chasser» les maladies du cœur:

farine de dattes	$\frac{1}{4}$	bière douce	$\frac{1}{3}$
scille maritime	$\frac{1}{32}$	tehebu	$\frac{1}{2}$
amamu	$\frac{1}{3}$		

faire cuire, puis filtrer. A prendre pendant 4 jours.»

La plus ancienne image connue est un dessin très expressif de la scille maritime qui provient d'un manuscrit de DIOSCORIDE, du VI^e siècle (Fig. 2).

Plus près de nous, c'est VAN SWIETEN¹ en particulier qui au milieu du XVIII^e siècle a attiré l'attention sur l'importance de la scille dans le traitement de l'hydro-pisie dont on sait qu'elle résulte souvent d'une insuffi-

¹ G. L. B. VAN SWIETEN, *Commentaria in Hermanni Boerhave Aphorismos de cognoscendis et curandis Morbis*, vol. 4 (1764).

sance cardiaque. VAN SWIETEN utilisait déjà la drogue fraîche qu'il avait trouvée spécialement active. Mais lorsque WILLIAM WITHERING¹, médecin écossais, introduisit en 1785 la digitale dans le traitement des maladies du cœur, la scille passa à l'arrière-plan, malgré la découverte de HOLMES² que la scille agissait aussi sur le cœur.

En dépit du fait que la scille figurait toujours depuis les plus anciennes notes dans les codes pharmaceutiques, sous forme, il est vrai, de préparations galéniques peu actives, il fallut attendre jusqu'en 1918 pour que l'attention se reporte sur elle. Un médecin allemand, MENDEL³, employait dans de nombreuses affections cardiaques une préparation de scille séchée, sans toutefois obtenir des résultats entièrement convaincants, car le séchage faisait perdre à la drogue une partie de ses substances actives. C'est ainsi que MARKWALDER⁴ put prouver que l'activité des préparations galéniques de scille pouvait varier de plusieurs fois cent pour-cent.

Il est évident que la préparation à l'état pur de principes actifs d'une drogue trouvant une application thérapeutique, élargit non seulement les connaissances scientifiques mais sert aussi à des buts pratiques. Seul un produit pur permet de préparer des médicaments de composition constante, assurant une action toujours égale et mettant à la disposition de la thérapeutique un remède indépendant des variations dues à la décomposition de bien des drogues. C'est en tenant compte de ce point de vue que nous avons commencé nos recherches sur les substances actives de la scille maritime⁵. Il n'y a pas de doute que les recherches entreprises jusque là pour préparer à l'état pur les substances actives de la scille avaient échoué, parce que ces substances en raison de leur instabilité avaient été déjà détruites au cours du séchage et des manipulations.

Isolement des glucosides de la scille maritime. Il faut insister tout spécialement sur l'importance qu'il y a d'utiliser des matières premières aussi fraîches que possible où les substances actives se trouvent à l'état natif. Le séchage, la fragmentation des drogues, l'extraction ou la purification ont été exécutés en prenant toutes les mesures de protection utiles. Les actions enzymatiques étaient éliminées afin d'empêcher la dégradation des substances actives.

Même si nous supposions que l'action de la scille sur le cœur était due, comme pour la digitale, à la présence de glucosides, il manquait cependant les belles et caractéristiques réactions colorées des glucosides de la digitale qui dépendent principalement de leur teneur

en digitoxose. Par la suite, nous fûmes donc obligés de continuer l'extraction et la purification des substances actives au moyen des tests de toxicité sur la grenouille, jusqu'à ce que nous ayons trouvé une réaction colorée caractéristique de la scille, soit la réaction de LIEBERMANN. Nous avons trouvé, en effet, que l'action des extraits de scille est proportionnelle à l'intensité de la coloration que les préparations de scille donnent avec l'anhydride acétique plus l'acide sulfurique concentré dans la réaction colorée de LIEBERMANN. C'est ainsi qu'un extrait de scille préalablement bien purifié donne d'abord une coloration rouge intense qui passe rapidement de bleu à vert-bleu.



Fig. 2. La plus ancienne image de la scille maritime.

La méthode finale qui a été mise au point pour préparer le glucoside principal de la scille maritime blanche, le scillarène A, consiste essentiellement dans les opérations suivantes: Les bulbes frais sont fragmentés, tout en les traitant par des sels qui précipitent les protéines, tel que le sulfate d'ammonium. Cela permet, d'une part, d'éliminer l'action des enzymes et, d'autre part, d'obtenir la coagulation des substances mucilagineuses. Dans la drogue, les glucosides se trouvent à l'état de tannoïdes et sont traités par l'ester acétique. Puis on fait agir de l'acétate de plomb pour éliminer les tanins, et l'on obtient ainsi un glucoside bien purifié. Si cette préparation est riche en scillarène A, il n'est alors pas difficile par une méthode de cristallisation appropriée de l'obtenir sous forme de très beaux cristaux purs. Dans une drogue de bonne qualité, le scillarène A constitue la majeure partie des glucosides totaux de la scille maritime blanche.

Après avoir laissé assez longtemps la préparation de scille en contact avec de l'ester acétique, mais sans addition de sel, nous avons obtenu une substance glucosidique cristallisant particulièrement bien et que nous avons prise, au début, pour du scillarène A. Mais l'hydrolyse montra qu'elle était plus pauvre en sucre.

¹ W. WITHERING, *An Account of the Foxglove and some of its Medical Use, etc.* (Birmingham 1785).

² E. M. HOLMES, *Pharmac. J. a. Transact.* 21, 233 (1890).

³ F. MENDEL, *Ther. Gegenw.* 1918, 16.

⁴ J. MARKWALDER, *Schweiz. med. Wschr.* 52, 560 (1922); *Klin. Wschr.* 1, 212 (1922).

⁵ A. STOLL, E. SUTER, W. KREIS, B. B. BUSSEMAKER et A. HOFMANN, *Helv. chim. Acta* 16, 703 (1933).

En laissant en contact le scillarène A avec la substance de la scille, une molécule de glucose se sépare du scillarène A, grâce à la présence d'un enzyme associé au glucoside dans la scille, et que nous avons nommé la scillarénase. C'est alors que la proscillaridine A, qui ne contient plus de glucose, prenait naissance.

Autrefois, on avait bien émis l'hypothèse que des enzymes de scission glucosidique pouvaient se trouver dans la drogue en même temps que les glucosides cardiotoniques¹; cependant, aucune preuve, soit analytique, soit de préparation, n'avait jamais été apportée en faveur de cette notion. Mais ce qui s'était produit maintenant pour la première fois, c'est la scission incontestable du scillarène A en proscillaridine A et en glucose par un enzyme spécifique. Il est prouvé que tous les glucosides cardiotoniques purs connus jusqu'en 1930 – à l'exception de l'ouabaïne et précisément du scillarène A – sont des produits artificiels provenant des glucosides natifs correspondants, par scission enzymatique d'une molécule de glucose, par exemple la digitoxine, la gitoxine, la digoxine, la k-strophanthine-β, etc. Dans ces dernières dizaines d'années, la dégradation successive des glucosides cardiotoniques rendue possible par les enzymes, a pris toujours plus d'importance aussi dans d'autres laboratoires. Elle permet, comme nous le verrons encore plus loin, de parvenir dans certains cas à des stades de dégradation impossibles à atteindre avec des méthodes chimiques. D'autre part, par une inhibition systématique de l'action enzymatique, on est arrivé à isoler toute une série de glucosides cardiotoniques natifs jusqu'ici inconnus et suivant leur intérêt de les introduire en thérapeutique.

Les eaux-mères du scillarène A contiennent le scillarène B qui est constitué par tout un mélange de glucosides également très actifs. Nous ne sommes

parvenus que récemment¹ à démembrer le scillarène B en différents glucosides homogènes à l'aide de colonnes de séparation constituées par du linters de coton ou de terre d'infusoires. Cette méthode nous a permis de préparer à partir du totum scillarène B huit nouveaux glucosides cristallisés à l'état de pureté et de les étudier au point de vue physique et chimique.

La scille rouge. Cette espèce constitue un domaine de recherche pour lui-même. Elle se différencie extérieurement de la scille blanche, dont la pulpe est blanche ou légèrement jaunâtre et seule l'enveloppe brune, par le fait que la pulpe de la scille rouge est d'une teinte rouge-brun intense et son enveloppe brun-rouge foncé. Entre les deux se trouvent les formes intermédiaires.

La scille rouge est extrêmement toxique pour les rats et autres rongeurs, aussi est-elle utilisée depuis longtemps comme produit de dératisation. Le rapport existant entre la coloration rouge du bulbe et l'action毒ique faisait toujours penser que c'était la matière colorante elle-même qui était toxique. Mais c'était une erreur. Nous avons réussi à obtenir de la scille rouge et avec un bon rendement un glucoside pur et cristallisé, auquel nous avons donné le nom de scilliroside². Il possède une forte action sur le cœur, mais aussi une grande toxicité pour les rongeurs. D'après la méthode de KÄRBER, la dose létale moyenne du scilliroside pour le rat mâle est de 0,7 mg/kg, pour la femelle de 0,43 mg/kg. En revanche, ces animaux se montrent tout particulièrement résistants aux glucosides de la scille blanche, dont ils peuvent tolérer une dose 200 fois plus forte que celle du scilliroside.

Dans le Tableau N° I sont réunis tous les glucosides de la scille actuellement isolés à l'état pur ainsi que quelques données se rapportant à leurs propriétés physiques.

¹ Voir par exemple M. PERROT et A. GORIS, Bull. acad. Méd. (3^e S.) 62, 97 (1909).

¹ A. STOLL et W. KREIS, Helv. chim. Acta 34, 1431 (1951).

² A. STOLL et J. RENZ, Helv. chim. Acta 25, 43 (1942).

Tableau I. Glucosides cardiotoniques de *Scilla maritima* L.

Glucoside	Formule brute	$[\alpha]_D^{20}$ dans le méthanol	Point de fusion (appareil de KOFLER ¹)
Proscillaridine A	$C_{30}H_{42}O_8$	– 83°	215–218°
Scillarène A	$C_{36}H_{52}O_{13}$	– 74°	230–240° ² 270–273° ³
Glucoscillarène A	$C_{42}H_{62}O_{18}$	– 66°	228–232°
Scilliphéoside	$C_{30}H_{42}O_9$ ⁴	– 74°	249–252°
Glucoscilliphéoside	$C_{36}H_{52}O_{14}$ ⁴	– 68°	269–270°
Scillicroptoside		– 48°	202–205°
Scilliglaucoside	$C_{30}H_{40}O_{10}$ ^{4,5}	+ 106°	164–166°
Scillicyanoside	$C_{32}H_{42}O_{12}$ ^{4,5}	+ 104°	221–222°
Scillicoeloside	$C_{30}H_{40}(42)O_{11}$ ⁴	+ 97°	165–167°
Scillazuroside	$C_{30}H_{40}O_{11}$ ⁴	+ 131°	179–182°
Scilliroside ⁶	$C_{32}H_{44}O_{12}$	– 59,0–59,7°	168–170° décomposition à 200°

¹ Points de décomposition.

² Cristallisé dans l'alcool dilué.

³ Cristallisé dans l'alcool à 85%.

⁴ Formules provisoires.

⁵ Ce composé contient un acétyle.

⁶ De la variété rouge.

Figure 3 montre les cristallisations des glucosides cardiotoniques isolés de la scille blanche et indique les solvants dans lesquels elles ont été obtenues.

Comme nous l'avons déjà vu, le scillarène A constitue pour la plus grande partie, dans quelques drogues même les deux tiers, des glucosides totaux de la scille blanche. Le scilliroside domine dans la scille rouge, tandis que les neuf autres glucosides sont nettement moins abondants. Nous supposons que dans les eaux-mères il existe encore d'autres glucosides cardiotoniques qui n'ont pas été isolés jusqu'ici. Mais le Tableau N° I montre déjà que la scille, tout en tenant compte de certains éléments structurels dont nous parlerons plus loin, donne un si grand nombre de glucosides cardiotoniques comme il n'a jamais été possible d'en trouver dans aucune autre plante.

Les recherches chimiques des glucosides de la scille se sont faites dans deux domaines: Celui des aglucones et celui de la chaîne des sucres. Notre exposé tiendra compte de cette division naturelle, et nous commençons d'abord par les aglucones, puis nous passerons aux sucres.

La structure des aglucones. WIELAND et WINDAUS, grâce à leurs études fondamentales sur les stéroïdes et les acides biliaires, ont posé les bases des recherches ultérieures sur les hormones sexuelles, cortico-surrénales, sur la vitamine D, de nombreuses saponines ainsi que des aglucones des glucosides cardiotoniques, qui tous appartiennent à la grande classe des stéroïdes.

Lorsqu'au début de 1930 on connut la formule du cyclo-pentano-perhydro-phénanthrène comme squelette de base de ces dérivés, on avait fait de nets progrès dans la connaissance des aglucones des glucosides cardiotoniques. On avait, en effet, la possibilité de transformer par dégradation les glucosides cardiotoniques en des dérivés déjà connus et de faire des déductions sur leur structure. Par exemple, on put alors déterminer la place de groupes fonctionnels spécifiques dans le squelette du cyclo-pentano-perhydro-phénanthrène.

Sous ce rapport, les glucosides de la scille ou leurs aglucones ont fourni d'intéressants exemples, et l'on a découvert des relations étroites entre les stéroïdes du règne végétal et du règne animal. En voici quelques

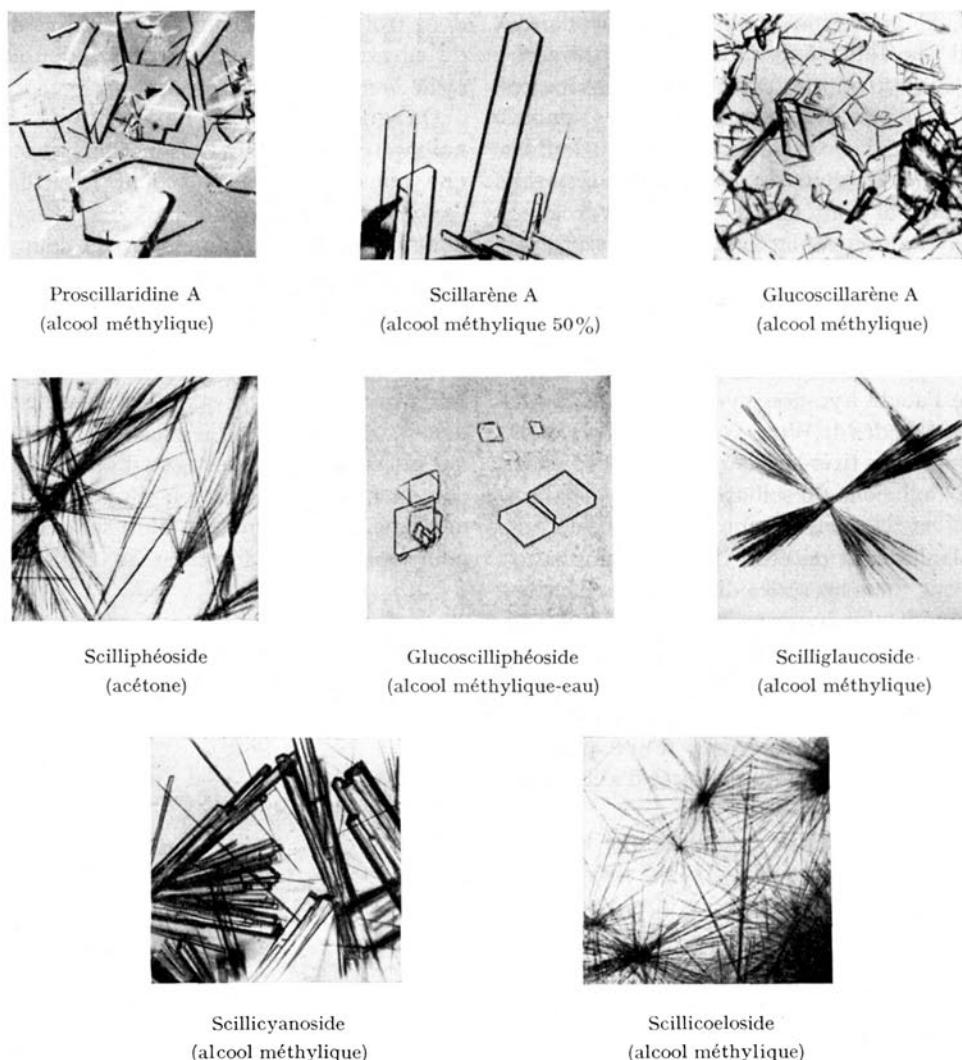
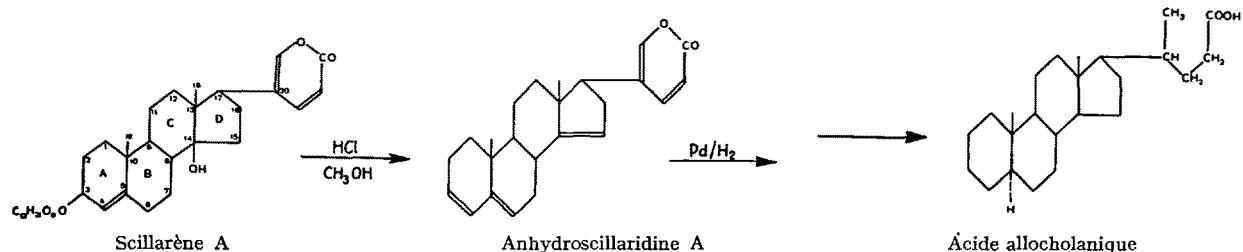


Fig. 3.

exemples qui, en même temps, ont permis d'éclaircir la constitution des aglucones de quelques glucosides de la scille. Nous parlerons d'abord de la transformation du scillarène A en acide allocholanique¹. La manière de formuler la constitution s'éloigne du développement historique en ce sens, que la formule valable et utilisée aujourd'hui diffère de celle autrefois hypothétique par la position de l'ibile la douaison du noyau.



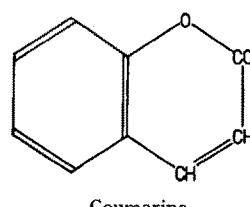
A l'aide d'acide chlorhydrique dans du méthanol on sépare le groupe des sucres du scillarène A, placé en position 3. Par élimination des groupes hydroxyles en position 3 et 14, sous forme de deux molécules d'eau, deux nouvelles doubles liaisons se forment entre 3 et 4 et 14 et 15, et en même temps la double liaison initiale 4-5 se déplace en 5-6 sous formation d'anhydrosicillaridine A. Si l'on soumet cette dernière à une réduction catalytique par l'hydrogène, toutes les doubles liaisons de la molécule, c'est-à-dire les trois doubles liaisons du noyau et les deux doubles liaisons du cycle lactonique hexagonal sont saturées par l'hydrogène. En majeure partie le cycle lactonique est ouvert par réduction, si bien qu'il y a formation d'un acide carboxylique complètement saturé avec une chaîne latérale ouverte. Heureusement que cet acide carboxylique s'est révélé être identique à l'acide allocholanique, que l'on obtient de l'acide hydro-désoxy-cholique de la bile de porc par les méthodes de WINDAUS² et de WIELAND³. On fut alors à même de tirer les conclusions directes sur la structure de l'aglucone du scillarène A, en se basant sur la formule et la constitution déjà connues de l'acide allocholanique, et on était d'autant plus autorisé à le faire, que dans les séries de réactions décrites chaque changement plus important de la molécule, en particulier toute modification dans le noyau carbonique, était soigneusement évité. On a donc été à même de prouver de la manière la plus simple l'étroite parenté entre deux classes de corps, d'une part les aglucones des glucosides cardiotoniques et d'autre part les acides biliaires.

Il ressort des considérations suivantes que le cycle lactonique hexagonal est caractérisé par deux doubles liaisons. Contrairement aux aglucones des glucosides

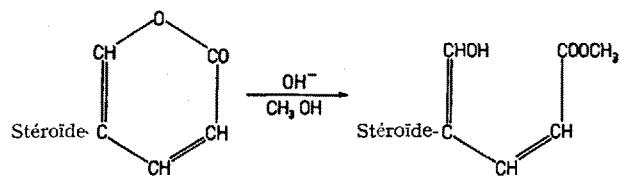
digitaliques et strophanthiques possédant 23 atomes de carbone, la scillaridine A en a 24. En identifiant le produit obtenu à partir de l'anhydro-sicillaridine A, lors de la réduction totale par scission réductrice du cycle lactonique avec l'acide allo-cholanique, dont la chaîne latérale possède cinq atomes de carbone, il résulte forcément que le cycle lactonique ne peut être qu'hexagonal. Par détermination précise de son

poids moléculaire¹ nous avons par ailleurs établi que la scillaridine A, comme l'acide allocholanique, est caractérisée par 24 atomes de carbone, ce qui, jusqu'ici, n'était pas absolument certain. Lors de l'hydrogénéation catalytique six molécules d'hydrogène sont utilisées, dont trois pour la saturation des trois doubles liaisons du noyau, deux pour les deux doubles liaisons du cycle lactonique et une pour ouvrir le cycle.

On ignorait jusqu'ici l'existence d'un cycle hexagonal avec deux doubles liaisons dans les stéroïdes. Avant que nous l'ayons établi pour le scillarène A, nous l'avons donc recherché dans des exemples analogues dont l'un nous fut donné dans la coumarine qui, lors de la scission par des alcalis dans le méthanol, se comporte exactement comme le scillarène A². Le cycle lactonique est scindé, et le groupe carboxyle qui se forme est estérifié. Mais cet ester est encore fortement acide, on peut le titrer et il donne des dérivés acylés. On doit, par conséquent, le considérer comme un énol, ce qui est en accord aussi avec d'autres transformations, par exemple la formation d'un éther avec le diazométhane ou la formation d'un sel de potassium. C'est pourquoi il faut formuler le cycle lactonique des



Coumarine



¹ A. STOLL, A. HOFMANN et W. KREIS, Helv. chim. Acta 17, 1334 (1934). — A. STOLL, A. HOFMANN et A. HELFENSTEIN, Helv. chim. Acta 18, 644 (1935).

² A. WINDAUS et A. BOHNE, Ann. Chem. 433, 278 (1923).

³ H. WIELAND, E. DANE, C. MARTIUS, W. GUMLICH et G. HESSE, Z. physiol. Chem. 215, 15 (1938).

¹ A. STOLL, A. HOFMANN et J. PEYER, Helv. chim. Acta 18, 1247 (1935).

² A. STOLL et A. HOFMANN, Helv. chim. Acta 18, 82 (1935).

glucosides de la scille de manière analogue à la coumarine, ceci toutefois à l'état libre, en liaison avec le squelette stéroïde à l'atome de carbone 17.

Cette même formule, à savoir le cycle lactonique hexagonal doublement non saturé, a été admise une année plus tard par WIELAND et ses collaborateurs¹ et TSCHESCHE et OFFE² pour les venins de crapauds. Comme dans les glucosides de la scille et les venins de crapauds, il semble être responsable de l'action cardiaque. Si l'on procède à sa scission, l'effet cardiaque est entièrement supprimé. La réduction des doubles liaisons a pour conséquence la diminution de l'effet cardiaque à un pourcentage minime. Le cycle lactonique hexagonal avec deux doubles liaisons n'existe pas seulement dans les glucosides cardiotoniques de la scille, mais il a été prouvé depuis aussi dans l'hellébrine, isolée par W. KARRER³, la désglucohellébrine, préparée par SCHMUTZ⁴, la rubelline et la transvaaline, toutes les deux isolées par LOUW⁵, et dans les glucosides des bulbes de *Bowiea volubilis*, isolés et étudiés par KATZ⁶ et par TSCHESCHE⁷. Tous les glucosides de la

¹ H. WIELAND, G. HESSE et R. HÜTTEL, Ann. Chem. 524, 203 (1936).

² R. TSCHESCHE et H. A. OFFE, Ber. dtsch. chem. Ges. 69, 2361 (1936).

³ W. KARRER, Festschrift E. C. BARELL (Verlag Reinhardt AG., Basel 1936), p. 243; Helv. chim. Acta 26, 1353 (1943).

⁴ J. SCHMUTZ, Pharm. Acta Helv. 22, 273 (1947).

⁵ P. G. J. LOUW, South African Ind. Chemist 3, 109 (1949); C. 1950, I, 875.

⁶ A. KATZ, Helv. chim. Acta 33, 1420 (1950); 36, 1344 (1953).

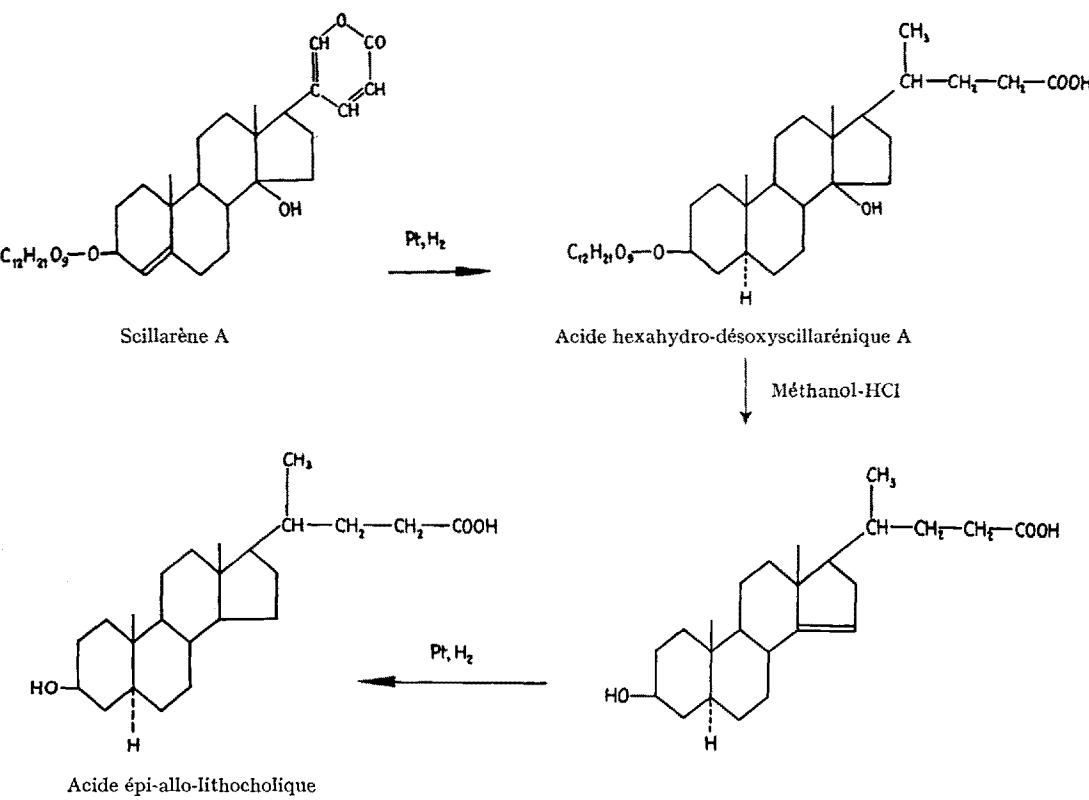
⁷ R. TSCHESCHE et K. SELLHORN, Ber. dtsch. chem. Ges. 86, 54 (1953).

scille rouge et de la scille blanche connus à ce jour possèdent ce cycle hexagonal.

Dans la formule de constitution du scillarène A déterminée en transformant l'anhydro-scillardin A en acide allocholanique, les positions de l'hydroxyle qui porte le sucre et de la double liaison voisine étaient encore incertaines. La recherche de la position de l'hydroxyle fut plus difficile, parce que le scillarène A, lors de son hydrolyse, perd en même temps l'hydroxyle qui en est porteur sous formation d'une nouvelle double liaison. La position de la chaîne des sucres, du scilla-biose, constitué par du rhamnose et du glucose, a été d'abord admise en position 5. Mais par la méthode suivante on est parvenu à établir que le sucre est lié à un hydroxyle en C3¹.

Lors de l'hydrogénéation du glucoside non saponifié, le scillarène A lui-même, se forment par saturation de trois doubles liaisons (deux dans le cycle lactonique, une dans le noyau), l'un à côté de l'autre un acide monobasique, l'acide hexahydro-désoxyscillarénique A et une lactone neutre, l'hexahydro-scillarène A qui ne nous intéresse pas ici. Le traitement de l'acide par de l'acide chlorhydrique dans l'alcool absolu réalise l'élimination du sucre, où cependant l'hydroxyle qui le porte est conservé, parce que l'influence de la double liaison voisine est supprimée par son hydrogénéation. C'est uniquement l'élimination de l'hydroxyle tertiaire en C14 qui aboutit à une double liaison. Si cet acide est hydrogéné à fond par réduction catalytique au platine,

¹ A. STOLL et J. RENZ, Helv. chim. Acta 24, 1380 (1941).



il se forme alors un mélange d'acides stéroïsomères, desquels on a pu isoler l'acide épi-allo-litho-cholique (acide 3- β -oxy-allocholanique). Nous avons préparé l'ester méthylique de l'acide obtenu à partir du scillarène A et son acétate et avons pu déterminer l'identité avec les dérivés correspondants, réalisés à partir de l'acide hydro-désoxy-cholique d'après le procédé de WIELAND¹.

Grâce à l'identité des deux acides 3- β -oxy-allocholaniques et leur différenciation du reste des autres acides litho-choliques stéroïsomères, on a pu, pour le scillarène A, déterminer en même temps la configuration cis de l'hydroxyle en C3 porteur des sucres par rapport au groupe méthyle en C10. Nous reviendrons plus loin sur ce point.

Jusqu'à ces derniers temps, dans le scillarène A, la position de la double liaison voisine de l'hydroxyle en C3 était encore indéterminée. Ainsi que nous l'avons déjà vu, l'hydroxyle porteur des sucres en position 3 avait été éliminé du noyau par hydrolyse acide avec élimination d'eau et formation d'une nouvelle double liaison. La scillarénase et les autres enzymes glucosidatrices séparaient bien le glucose terminal du scillarène A, mais n'attaquaient pas la liaison entre l'aglucone et le rhamnose. Toutefois, nous sommes parvenus finalement par des procédés enzymatiques à scinder cette liaison, tout en conservant l'hydroxyle en C3², grâce au fait que par culture et repiquage sur milieu de culture contenant du rhamnose au lieu de glucose, nous avions réussi à obtenir une souche de penicillium accoutumée au rhamnose comme unique source de carbone, et l'avions obligée à former un système enzymatique adapté. Cet enzyme élimina de la proscillaridine A le reste de rhamnose, en conservant le groupe hydroxyle en C3, et forma facilement l'aglucone primaire, auquel nous avons donné le nom de scillarénine.

Ainsi que nous nous y attendions, son spectre ultra-violet est pratiquement identique à celui du scillarène A (voir Fig. 4 et 5). Seul le maximum caractéristique pour le cycle lactonique se manifeste à 300 m μ et log ϵ = 3,72. Pour la scillaridine A, par contre, on observe encore un autre maximum à 230 m μ et le log ϵ = 4,23 qui est caractéristique de deux doubles liaisons conjuguées distribuées sur deux noyaux.

Par oxydation de la scillarénine avec de l'acide chromique ou du butylate tertiaire d'aluminium, d'après la méthode d'OPPENAUER, on obtient la cétone en position 3, le scillarénone, qui possède deux maxima d'absorption dans l'ultra-violet, l'un à 300 m μ et l'autre à 240 m μ et le log ϵ = 4,25. Le premier maximum correspond au cycle lactonique hexagonal à deux doubles liaisons, le second se rapporte à un groupe-

ment cétonique non saturé en α - β , c'est-à-dire que la double liaison du scillarénone se situe immédiatement à côté du groupe cétonique entre les positions 4 et 5. Mais il restait à prouver si c'était également le cas dans la scillarénine et le scillarène A lui-même; car au cours de l'oxydation, cette double liaison pourrait se déplacer du cycle B dans le cycle A.

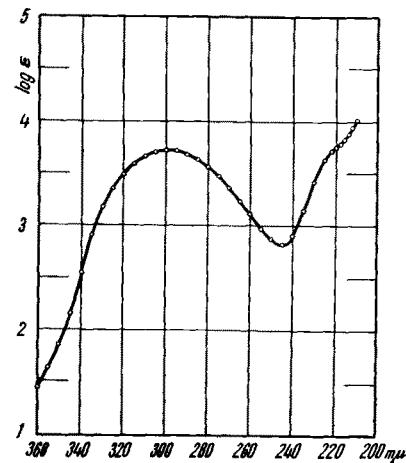


Fig. 4. Spectre ultra-violet du Scillarène A.

C'est pourquoi nous avons eu recours à un artifice et avons de nouveau utilisé un enzyme fongique, qui non seulement scinde le radical glucidique du scillarène A

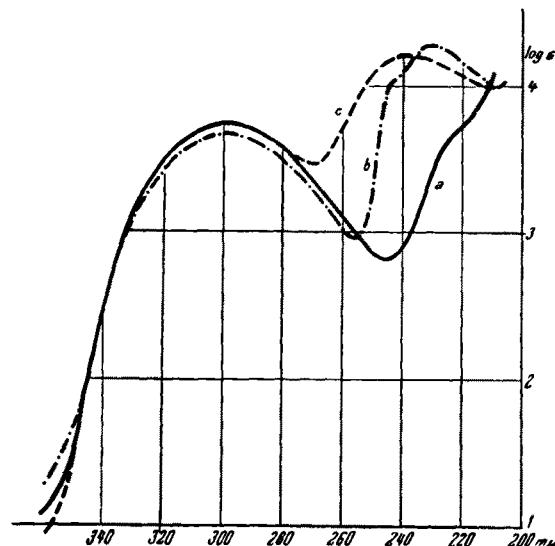


Fig. 5. Spectres ultra-violets. Scillarénine (a), Scillaridine A (b) et Scillarénone (c) dans l'alcool absolu.

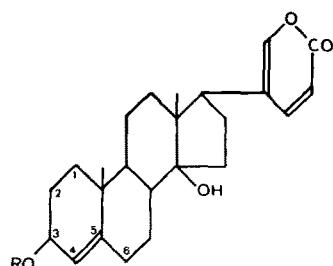
ou de la proscillaridine A et dégage le groupe hydroxyle en C3, mais oxyde en même temps ce groupe et le transforme en groupe cétonique¹. De telles oxydations du squelette des stéroïdes ont été effectuées ces derniers temps, et en effet, nous avons obtenu la cétone

¹ H. WIELAND, E. DANE, C. MARTIUS, W. GUMLICH et G. HESSE, Z. physiol. Chem. 215, 15 (1933).

² A. STOLL, J. RENZ et A. BRACK, Helv. chim. Acta 34, 2301 (1951).

¹ A. STOLL, J. RENZ et A. BRACK, Helv. chim. Acta 35, 1934 (1952).

scillarénone par voie enzymatique, en quantité appréciable. Le produit était identique à la cétone obtenue par oxydation à partir de la scillarénine. Si on réussissait alors à transformer le scillarénone par réduction en scillarénine, en tenant compte de la possibilité de la formation d'isomères cis, trans, on prouvait ainsi le voisinage immédiat de la double liaison et du groupe hydroxyle en C3; la double liaison devait alors se trouver en position 4-5. Ceci fut confirmé par la réduction du scillarénone par l'isopropylate d'aluminium d'après MEERWEIN-PONNDORF, qui en effet fournit surtout un produit en tout point identique à la scillarénine d'origine naturelle.



$R = H$: Scillarénine $R = \text{Rhamnose}$: Proscillaridine A
 $R = \text{Rhamnose-Glucose}$ (= Scillabiose): Scillarène A
 $R = \text{Rhamnose-Glucose-Glucose}$ (= Scillatriose): Glucoscellarène A

La scillarénine ne pouvant pas être précipitée par la digitonine, bien que le groupe hydroxyle en C3 soit en position β , la séparation du scillarénone ne put être effectuée par l'intermédiaire du digitonide. Mais la chromatographie sur oxyde d'aluminium permet de séparer une fois de la cétone non modifiée et, enfin, une préparation de scillarénine identique à la scillarénine obtenue par dégradation enzymatique à partir de la proscillaridine A. Ainsi il est prouvé que la double liaison du noyau est en position 4⁴, et nous sommes en mesure de formuler la constitution du glucoside principal de la scille maritime, le scillarène A, dans tous ses détails et dans la disposition spatiale de ses substituants.

Cet exemple montre que les recherches de structure et de configuration exigent souvent un travail de plusieurs années et le développement de nouvelles méthodes pour élucider les derniers points douteux de

la constitution d'une substance naturelle. Il est intéressant de noter que le scillarénone a aussi une forte action sur le cœur, qui n'est guère moins forte que celle du glucoside scillarène A. Le tableau suivant montre les glucosides dérivant de la scillarénine, l'aglucone initial, et qui ont été découverts dans la scille maritime.

Récemment, REICHSTEIN¹ et ses collaborateurs sont parvenus à constater que la transvaaline, extraite de l'*Urginea rubella*, est identique au scillarène A.

Les recherches² destinées à éclaircir la constitution du raticide, le scilliroside, sont bien plus compliquées que celles qui viennent justement d'être décrites pour fixer la structure du scillarène A. Elles ne sont pas encore terminées. Toutefois, la formule suivante que nous comparons à celle du scillarène A, montre l'analogie existante entre les deux glucosides, ainsi que des différences paraissant insignifiantes mais qui, en définitive, conditionnent leur action différente.

Par analogie et d'après les résultats de nombreuses recherches, nous pouvons considérer que les points suivants sont acquis:

- 1° Un groupe hydroxyle, porteur dans le glucoside d'une molécule de glucose, est fixé en C3;
- 2° Un hydroxyle tertiaire est fixé en C14;
- 3° Un cycle lactonique hexagonal, porteur de deux doubles liaisons, est fixé en C17.

Il n'est pas certain, mais probable, que:

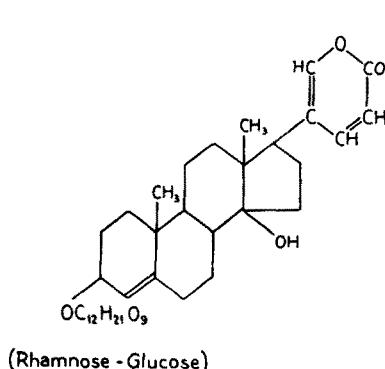
- 1° Une double liaison, difficile à hydrogénier, se trouve dans le noyau, entre C8 et C9;
- 2° Un hydroxyle est rattaché à C12;
- 3° Un groupe acétoxy, qui est très probablement responsable de l'activité raticide, est fixé au cycle lactonique en position α par rapport au groupe carbonyle.

Actuellement, nous cherchons encore à éliminer les points douteux de la formule que nous avons indiquée pour le scilliroside.

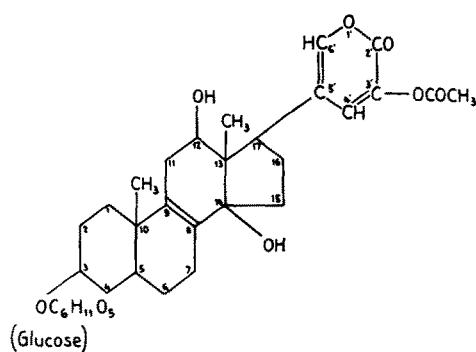
Nous traitons ici plus en détail la structure d'un glucoside de la scille, qui a été complètement élucidée

¹ P. ZOLLER et CH. TAMM, Helv. chim. Acta 36, 1744 (1953).

² A. STOLL et J. RENZ, Helv. chim. Acta 25, 377 (1942). — A. STOLL, J. RENZ et A. HELFENSTEIN, Helv. chim. Acta 26, 648 (1943).



Scillarène A

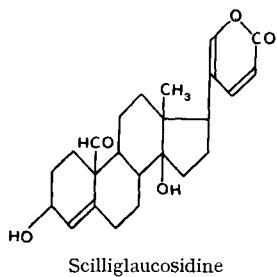


Scilliroside

ces tout derniers temps. Nous avons déjà mentionné plus haut le procédé fastidieux de fractionnement du mélange très compliqué des glucosides secondaires de la scille maritime¹ qui nous avait fourni le précieux produit de départ, le scilliglaucoside.

Nous nous contentons de la démonstration suivante basée sur un choix de réactions et d'observations particulièrement concluantes, empruntées à un travail qui a été publié ailleurs².

Bien que le scilliglaucoside ne contienne comme sucre qu'une molécule de glucose, aucun enzyme n'a pu scinder l'aglucone et le sucre. Un acide opère facilement cette hydrolyse, mais le produit de réaction n'est pas homogène. Suivant les conditions dans lesquelles l'essai est réalisé, on obtient l'aglucone primaire, la scilliglaucosidine, en quantités variables, ainsi que différents produits secondaires amorphes ou cristallisés, un d'eux correspondant à l'anhydro-scilliglaucosidine³. Pour la scilliglaucosidine, nous avons pu établir la formule de structure suivante⁴:



Scilliglaucosidine

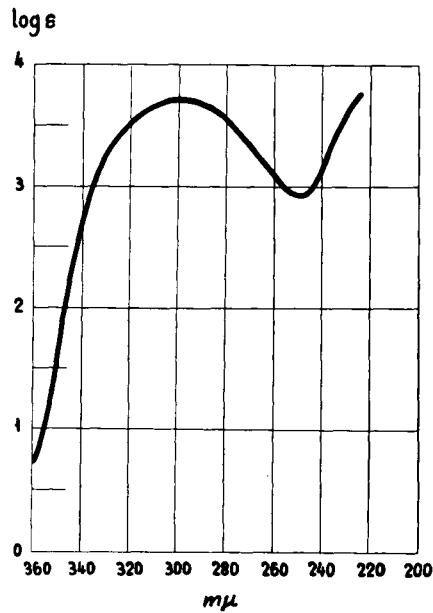
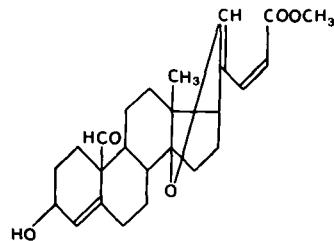


Fig. 6. Spectre ultra-violet de la scilliglaucosidine.

La formule brute montre déjà que l'aglucone du scilliglaucoside, la scilliglaucosidine, possède cinq

atomes d'oxygène. Deux font partie du cycle lactonique hexagonal, porteur de deux doubles liaisons, qui est caractérisé dans le spectre ultra-violet par un maximum vers $300\text{ m}\mu$. Ce maximum est typique pour le scillarène A et ses dérivés, comme nous l'avons vu précédemment. La scilliglaucosidine contient encore un groupe hydroxyle qui peut être acylé. Comme le scilliglaucoside lui-même ne contient que quatre groupes hydroxyles acylables, ils font tous partie du reste de sucre. C'est l'hydrolyse qui a dû libérer ce groupe hydroxyle acylable de l'aglucone. Ce groupe est donc bloqué par le sucre dans le glucoside. Il est fixé en C3 comme dans tous les aglucones des produits cardioactifs examinés jusqu'à présent. D'après le pouvoir rotatoire de la scilliglaucosidine et de plusieurs de ses dérivés et d'après l'effet cardiaque intense du scilliglaucoside, il faut admettre que cet hydroxyle en C3 possède la configuration β . Un autre atome d'oxygène est fixé sous forme d'hydroxyle tertiaire, comme le montre déjà la détermination de l'hydrogène actif par la méthode de ZEREWITINOFF. La scilliglaucosidine réagit en présence de potasse caustique méthanolique d'une façon analogue au scillarène A et à la scillaridine A. Ceci revient à dire que le cycle lactonique est saponifié et que le groupe carboxyle ainsi libéré est estérifié. L'acidification du produit de réaction a pour effet de former, par un pont d'oxygène, un nouveau cycle entre le groupe hydroxyle tertiaire et l'hydroxyle énolique du cycle lactonique avec formation d'ester méthylique de l'acide isoscilliglaucosidinique (voir formule suivante).



Ester méthylique de l'acide isoscilliglaucosidinique.

Cette réaction permet d'abord d'élucider la structure et la position de l'anneau lactonique et de constater encore que l'hydroxyle tertiaire est fixé en C14 et que ces deux substituants enfin possèdent la même configuration spatiale. Le 5^e oxygène doit appartenir à un groupe carbonyle, puisque le glucoside acétyle ainsi que son aglucone réagissent avec l'hydroxylamine avec formation des oximes correspondants. Comme l'acétyl-scilliglaucosidine aussi bien que le tétraacétyl-scilliglaucoside sont transformés en acide au cours de l'oxydation par l'acide chromique et que le cycle lactonique est conservé, le groupe carbonyle doit être un aldéhyde. Par analogie avec la strophantidine, l'hellébrigénine et la corotoxigénine, il doit être fixé en C10. Cet aldéhyde est réduit par la méthode de MEERWEIN-PONNDORF en alcool primaire. Déjà les réactions

¹ A. STOLL et W. KREIS, Helv. chim. Acta **34**, 1431 (1951).

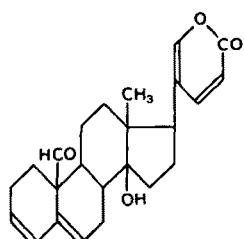
² A. STOLL, A. VON WARTBURG et J. RENZ, Helv. chim. Acta **36**, 1531 (1953).

³ A. STOLL, W. KREIS et A. VON WARTBURG, Helv. chim. Acta **35**, 2495 (1952).

⁴ A. STOLL, A. VON WARTBURG et J. RENZ, Helv. chim. Acta **36**, 1531 (1953).

que nous venons de décrire permettent de déterminer les fonctions de ces cinq atomes d'oxygène qui se présentent sous forme de deux groupes hydroxyles, un groupe aldéhydique et un cycle lactonique.

L'hydrogénéation catalytique de la scilliglaucosidine a prouvé que cette substance possède, en plus des deux doubles liaisons de son cycle lactonique, encore une autre double liaison. Les recherches suivantes ont montré que cette double liaison est située entre C4 et C5 comme dans la scillarénine. Par hydrolyse du scilliglaucoside, il se forme, à côté d'un aglucone intact et ainsi que nous l'avons signalé, un composé monoanhydre qui contient encore un atome d'hydrogène actif, mais plus aucun groupe hydroxyle pouvant être acyclé, comme le montre la formule suivante.



$\Delta^{3,5}$ -3-Anhydro-scilliglaucosidine

Il ressort du spectre dans l'ultra-violet de ce composé (Fig. 7) que le groupe hydroxyle en C3 a été éliminé avec formation d'un système diène. Le maximum, qui se trouve à $227 \text{ m}\mu$, est caractéristique pour les $\Delta^{3,5}$ stéroïdes; il parle en faveur de la présence de deux doubles liaisons dans deux cycles voisins. Si la double liaison du noyau de la scilliglaucosidine est située entre C5 et C6 comme dans la cholestérine, ou entre C5 et C4 comme dans la scillarénine, l'oxydation de l'hydroxyle fixé en C3 devrait donner une cétone $\alpha\beta$ non saturée. Celle-ci se caractérise par un maximum à $242 \text{ m}\mu$ du spectre ultra-violet.

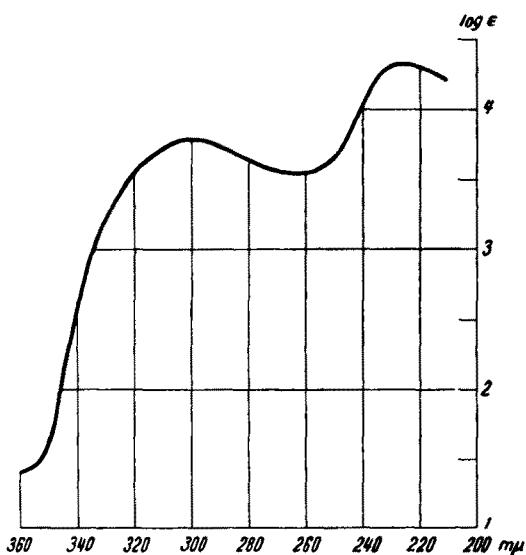
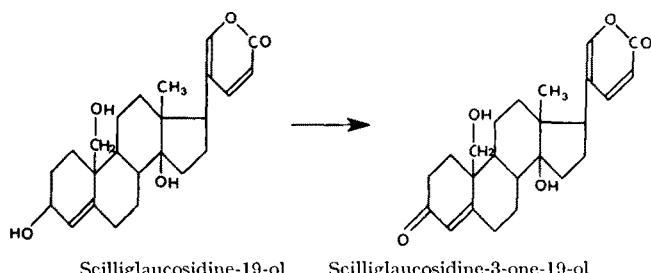


Fig. 7. Spectre ultra-violet de la $\Delta^{3,5}$ -3-anhydro-scilliglaucosidine dans l'alcool.

Pour empêcher des réactions secondaires indésirables du groupe aldéhyde, nous avons oxydé partiellement dans une solution de toluène le scilliglaucosidine-19-ol (formule) en scilliglaucosidine-3-one-19-ol (formule) avec de l'isopropylate d'aluminium et de la cyclohexanone, sans protection préalable du groupe alcool primaire.



Scilliglaucosidine-19-ol Scilliglaucosidine-3-one-19-ol

Le spectre dans l'ultra-violet montre nettement, à côté du maximum dû au cycle lactonique se trouvant à $300 \text{ m}\mu$, celui dû au groupement cétonique non saturé en $\alpha\beta$ à $242 \text{ m}\mu$ (Fig. 8).

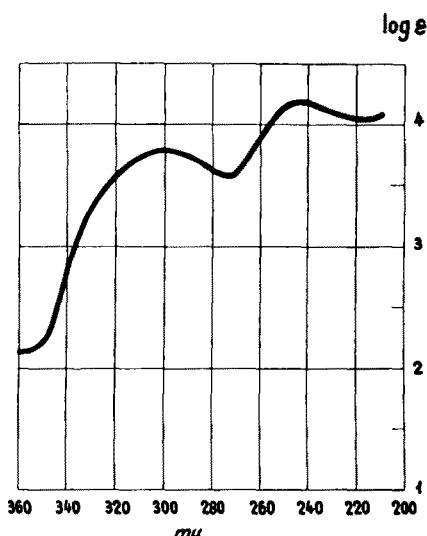


Fig. 8. Spectre ultra-violet de la scilliglaucosidine-3-one-19-ol.

Si l'on calcule les différences du pouvoir rotatoire moléculaire qui apparaissent au passage des 3-oxy- aux 3-cétostéroïdes et que l'on compare les valeurs obtenues pour les stéroïdes Δ^4 et Δ^5 avec celles des dérivés correspondants de la scilliglaucosidine, il apparaît que la double liaison de la scilliglaucosidine doit être placée entre C4 et C5, c'est-à-dire comme dans la scillarénine (Tableau II).

Il existe cependant certaines différences entre la scillarénine et la scilliglaucosidine. C'est ainsi que la réaction de ROSENHEIM avec l'acide trichloracétique, qui est positive pour le scillarène A et la scillarénine, est négative dans les mêmes conditions d'expérience pour la scilliglaucosidine.

A part cela, le groupe hydroxyle de la scilliglaucosidine en C3 s'élimine beaucoup plus difficilement que

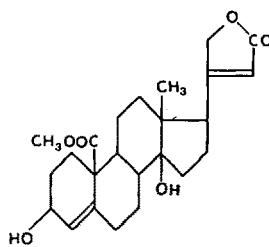
Tableau II. Différences du pouvoir rotatoire moléculaire dues au passage des alcools en cétones

Composé	$[M]_D$	$\Delta [M]_D$
Semicarbazone de la scilliglaucosidine-(19)	+ 260° (M)	
Semicarbazone de la scilliglaucosidine-3-one-(19)	+ 508° (M)	+ 248°
Scilliglaucosidine-19-ol	- 52° (M)	+ 211°
Scilliglaucosidine-3-one-19-ol	+ 159° (M)	
Scillarénine	+ 65° (C)	+ 187°
Scillarénone	+ 252° (C)	
Δ^4 -Cholestène-3 β -ol.	+ 170° (B)	+ 172°
Δ^4 -Cholestène-3-one	+ 342° (C)	
Δ^4 -Cholestène-3 α -ol.	+ 467° (B)	- 125°
Δ^4 -Cholestène-3-one	+ 342° (C)	
Cholestérine (Δ^6 -Cholestène-3 β -ol)	- 151° (C)	+ 493°
Δ^4 -Chlestène-3-one	+ 342° (C)	
Epicholestérine (Δ^5 -Chlestène-3 α -ol)	- 145° (C)	
Δ^4 -Chlestène-3-one	+ 342° (C)	+ 487°

M = méthanol; C = chloroforme; B = benzène.

celui de la scillarénine. Pour cette dernière substance, cette réaction se déroule si facilement qu'il est pratiquement impossible d'obtenir de la scillarénine intacte par hydrolyse du scillarène A avec un acide. D'autre part la scilliglaucosidine ne se distingue de la scillarénine que par la présence en C10 d'un groupe aldéhyde à la place du groupe méthyle. Les différences que l'on observe dans le comportement chimique de ces deux substances ne peuvent être dues qu'à ce seul détail de structure.

Pour pouvoir prouver, sur une substance modèle, l'influence d'un substituant contenant de l'oxygène en C10 sur le groupe hydroxyle et sur la double liaison du cycle A, nous avons préparé, à partir de la strophantidine, un 3- β -oxy- Δ^4 -stéroïde, porteur d'un groupe carboxyle en C10¹. Ce composé, l'ester méthylique du 19-acide- Δ^4 -5-anhydro-strophantidinique, a un comportement très semblable à celui de la scilliglaucosidine. Ceci est valable aussi bien pour l'élimination du groupe hydroxyle en C3 que pour la réaction colorée de ROSENHEIM².



Ester méthylique du 19-acide- Δ^4 -5-anhydro-strophantidinique

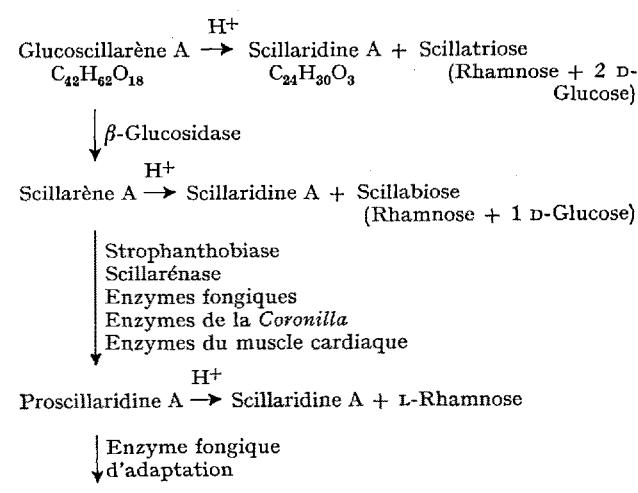
La différence de comportement entre la scillarénine et la scilliglaucosidine qui possède comme celui-ci une double liaison en position α par rapport à l'hydroxyle

en C3, a trouvé son explication par l'étude de la substance modèle obtenue par synthèse partielle. Ainsi se trouvent levés les derniers doutes qui planaient sur l'exactitude de la formule structurale de la scilliglaucosidine que nous avons indiquée plus haut.

La fraction glucidique des glucosides de la scille

Aussi diverse que se montre la scille maritime dans la production des aglucones, aussi modeste se révèle-t-elle en ce qui concerne les sucres qui sont liés aux aglucones. Le glucose et le méthyl-pentose rhamnose sont les uniques sucres qui aient été trouvés jusqu'ici dans les glucosides de la scille. Les deux tableaux (III et IV) rassemblent les équations de scission¹; on peut en déduire également les rapports des glucosides avec le même aglucone.

Tableau III. Les glucosides du groupe de Scillarène A



¹ A. STOLL, A. VON WARTBURG et J. RENZ, Helv. chim. Acta 36, 1557 (1953).

² A. STOLL, A. VON WARTBURG et J. RENZ, Helv. chim. Acta 36, 1565 (1953).

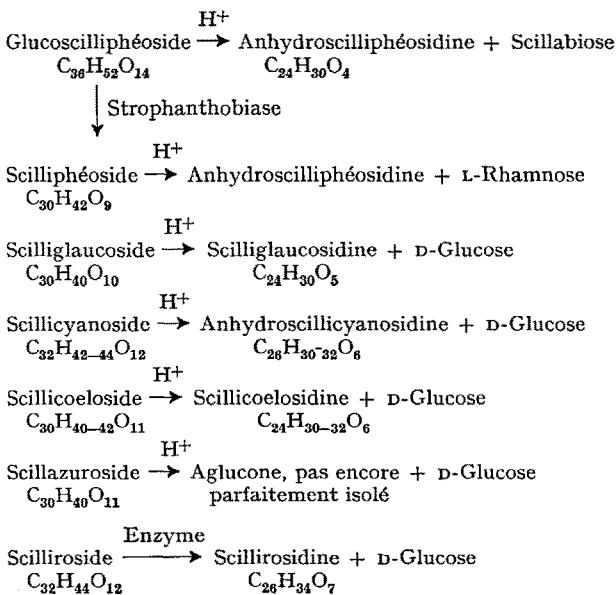
1 A. STOLL, W. KREIS et A. VON WARTBURG, Helv. chim. Acta 35, 2495 (1952).

Le glucoside le plus riche en sucres est le gluco-scillarène A. Par hydrolyse acide il donne la scillaridine A et le scillatriose, qui se compose d'une molécule de rhamnose et de deux molécules de D-glucose. Le scillatriose est un des rares trisaccharides qui ait été trouvé jusqu'ici dans la nature et qui ait pu être cristallisé.

Par action de la β -glucosidase, le gluco-scillarène A peut être dégradé en scillarène A d'où, par hydrolyse acide, on isole le scillabiose composé de rhamnose et de glucose. En faisant agir des enzymes spécifiques, par exemple la scillarénase, le scillarène A est scindé en glucose et proscillaridine A, qui, de son côté, est séparée par des acides en scillaridine A et en rhamnose. Comme nous l'avons mentionné, l'hydroxyle en position 3 portant la chaîne glucidique est éliminé en formant une double liaison. Mais nous avons réussi, grâce à un enzyme adapté, à scinder la proscillaridine A en l'aglucone primaire, la scillarénine, et en rhamnose tout en conservant le groupe hydroxyle en C3.

Tableau IV

Glucosides qui accompagnent le glucoside principal, le scillarène A



Le gluco-scillarène A et le scillarène A mis à part, il n'y a plus que le gluco-scilliphéoside qui contienne encore plus d'un sucre, sous forme de scillabiose, dans le reste glucidique. Sous l'action de la strophantobiase il est transformé, par élimination d'une molécule de glucose, en scilliphéoside ne contenant plus que le rhamnose. Il faut également mentionner que, lors de la scission acide du gluco-scilliphéoside et du scilliphéoside, un groupe hydroxyle est éliminé avec le sucre, il s'agit probablement de l'hydroxyle portant la chaîne glucidique. Les autres glucosides isolés jusqu'à présent de la scille maritime, le scilliglaucoside, le scillicyanoside, le scillicoeloside, le scillazurosido et le scilliroside ne contiennent qu'une molécule de glucose

en fait de reste glucidique. Comme nous verrons plus loin, ce n'est que grâce à des enzymes étrangers qu'il a été possible de transformer le scilliroside en aglucone intact, la scillirosidine, et en D-glucose¹.

A ce propos, nous allons examiner rapidement l'emploi d'enzymes étrangers, c'est-à-dire d'enzymes n'étant pas associés aux glucosides dans la nature, mais qui, ces derniers temps, nous ont rendu de précieux services pour séparer de l'aglucone le reste glucidique.

Au cours de nos recherches sur les substances cardiotoniques des semences de *Coronilla glauca* nous avons trouvé un système enzymatique permettant de rompre facilement la liaison entre le glucose et l'aglucone¹, tandis que c'étaient justement les glucosides dont l'aglucone porte un glucose qui, lors de la scission acide, nous opposaient de grandes et quelquefois d'insurmontables difficultés. Ainsi le scilliroside a pu être scindé facilement en glucose et en scillirosidine au moyen d'enzymes tirés des semences de *Coronilla*¹. Le même effet fut obtenu par des enzymes tirés des semences de luzerne (*Medicago sativa L.*)¹, bien que les semences de luzerne ainsi que les autres parties de la plante ne contiennent aucun glucoside cardiotonique. Nous avons également trouvé dans un grand nombre de champignons inférieurs du groupe des hyphomycètes et même dans le champignon de l'ergot de seigle, le *Claviceps purpurea*, des systèmes enzymatiques capables de scinder le glucose contenu dans des glucosides cardiotoniques². Des extraits d'organes animaux, tels que le rein, le foie, la rate et le cœur, peuvent également séparer du glucose de différents glucosides cardiotoniques, particulièrement de ceux qui sont employés en thérapeutique³. Il est assez remarquable que le myocarde, au niveau duquel agissent les glucosides, possède un système enzymatique séparant le glucose, contrairement aux muscles du squelette. Les glucosides de la scille maritime, contenant le cycle lactonique hexagonal à deux doubles liaisons, se laissent dégrader plus facilement par des enzymes étrangers que les glucosides de la digitale et du strophanthus contenant le cycle lactonique pentagonal à une seule double liaison. Le scilliroside, dont la scission acide ne peut être effectuée sans la destruction de l'aglucone, convenait très bien aux expériences avec les systèmes enzymatiques mentionnés.

En revanche, de tous ces systèmes enzymatiques, aucun n'était capable d'attaquer la liaison entre l'aglucone et le rhamnose dans le scillarène A et la proscillaridine A. C'est pourquoi nous avons eu l'idée de cultiver sur des milieux nutritifs, ne contenant en guise de source de carbone que du rhamnose au lieu de glucose, une souche de penicillium particulièrement

¹ A. STOLL et J. RENZ, Helv. chim. Acta 33, 286 (1950).

² A. STOLL, J. RENZ et A. BRACK, Helv. chim. Acta 34, 397 (1951).

³ A. STOLL et J. RENZ, Helv. chim. Acta 34, 782 (1951).

appropriée et cultivée auparavant dans un milieu contenant du glucose, afin de l'accoutumer au rhamnose¹.

Au début, le champignon 889, espèce de penicillium du groupe *asymmetrica divaricata*, ne se développa que difficilement sur le bouillon de culture qui, à part la peptone, ne contenait que 2% de rhamnose. Mais déjà après le deuxième repiquage sur les mêmes bouillons de culture il se développa plus abondamment et après cinq générations montra une bonne croissance. Après plusieurs autres repiquages sur des bouillons de culture contenant du rhamnose, on examina séparément la solution nutritive et le mycélium du point de vue de leur pouvoir de scission enzymatique sur les glucosides. C'est surtout la solution nutritive qui s'avéra capable de séparer du rhamnose de la proscillaridine et de libérer pour la première fois l'aglucone primaire, la scillarénine.

Dans le cas de cette faculté acquise de scinder un rhamnoside il ne s'agit pas d'une sélection mutative, mais plutôt de la formation d'un enzyme adapté, car la souche de champignons conserve intact son pouvoir de scinder les glucosides contenant du glucose et perd son pouvoir de scission sur les rhamnosides déjà après deux repiquages sur des milieux nutritifs contenant du glucose. Avec l'adaptation au rhamnose, comme source de carbone, le champignon a acquis la faculté de former un enzyme capable de scinder un rhamnoside.

Pharmacologie et clinique des substances cardiotoniques de la scille maritime. L'efficacité des glucosides cardiotoniques est déterminée aujourd'hui en général par comparaison avec la méthode de HATCHER, qui consiste en une

infusion intraveineuse lente (par exemple 1 cm³ par minute d'une solution diluée du glucoside à 1:50000) à des chats jusqu'à arrêt du cœur. C'est en fait une détermination de la toxicité, mais, comme elle s'effectue chez l'animal entier et qu'elle est très facilement reproducible, elle fournit cependant, sur l'action cardiaque et circulatoire des glucosides, des indications permettant d'entreprendre des essais cliniques.

Nous avons rassemblé dans les Tableaux V et VI la toxicité des glucosides cardiotoniques à lactones hexa- et pentacycliques – toxicité déterminée selon HATCHER –, et les avons classés en groupes de même aglucone, et ordonnés suivant la teneur décroissante en sucres. Le glucoside figurant au début d'un groupe est, par conséquent, le plus riche en sucres, tandis que la dernière ligne désigne l'aglucone du groupe. Dans la deuxième colonne du tableau sont indiqués les sucres contenus dans les glucosides, dans la troisième les poids moléculaires (P.M.). La quatrième colonne indique les doses-chat de HATCHER, exprimées en milligrammes par kilogrammes, qui suffisent pour provoquer l'arrêt du cœur. La cinquième colonne contient l'inverse des valeurs des doses HATCHER et désigne la toxicité spécifique. Ces chiffres indiquent en kilogrammes le poids théorique d'un chat que tuerait l'infusion intraveineuse de 1 mg de substance. Dans la sixième colonne, on a rapporté les doses de HATCHER aux millimoles par kilogramme $\times 10^3$ de chat. Nous désignons sous le nom de «toxicité moléculaire» (colonne 7) la valeur qu'on obtient en multipliant la toxicité spécifique par le poids moléculaire $\times 10^{-3}$. Cette valeur signifie donc le poids théorique en kilogrammes d'un chat que tuerait l'infusion intraveineuse de 1 millimole $\times 10^{-3}$ de substance.

¹ A. STOLL, J. RENZ et A. BRACK, Helv. chim. chim. Acta 34, 2301 (1951).

Tableau V. Toxicité de quelques glucosides et de leurs aglucones à lactone hexacyclique

1	2	3	4	5	6	7
	Sucres	P.M.	mg/kg	Toxicité spéc.	Millim./kg $\times 10^3$	Toxicité mol.
Glucoscillarène A ¹	2 D-glucose 1 L-rhamnose	855	0,172	5,8	0,201	5,0
Scillarène A ¹	1 D-glucose 1 L-rhamnose	673	0,145	6,9	0,215	4,6
Proscillaridine A ¹	1 L-rhamnose	531	0,157	6,4	0,295	3,4
Scillarénine ²	0	384	0,125	8,0	0,326	3,1
Glucoscilliphéoside ¹	1 D-glucose 1 L-rhamnose	709	0,111	9,0	0,155	6,5
Scilliphéoside ¹	1 L-rhamnose	547	0,087	11,5	0,159	6,3
Scilliroside ³	1 D-glucose	621	0,120	8,3	0,194	5,2
Scillirosidine ³	0	459	0,057	17,5	0,124	8,1
Scilliglaucoside ⁴	1 D-glucose	561	0,069	14,5	0,123	8,1
Scilliglaucosidine ⁴	0	399	0,064	15,6	0,161	6,2
Hellébrane ⁵	1 D-glucose 1 L-rhamnose	725	0,104	9,6	0,142	7,0
Désglucohellébrane ⁵	1 L-rhamnose	563	0,087	11,5	0,155	6,5
Hellébrigénine ⁵	0	416	0,077	13,0	0,185	5,4

¹ A. STOLL et W. KREIS, Helv. chim. Acta 34, 1431 (1951).

² A. STOLL, J. RENZ et A. BRACK, Helv. chim. Acta 34, 2301 (1951).

³ A. STOLL et J. RENZ, Helv. chim. Acta 33, 286 (1950).

⁴ A. STOLL, A. von WARTBURG et J. RENZ, Helv. chim. Acta 36, 1531 (1953).

⁵ J. SCHMUTZ, Helv. chim. Acta 32, 1442 (1949).

Tableau VI. Toxicité de quelques glucosides et de leurs aglucones à lactone pentacyclique

I	2	3	4	5	6	7
	Sucres	P.M.	mg/kg	Toxicité spéc.	Millim./kg × 10³	Toxicité mol.
Lanatoside A ¹	1 D-glucose 3 D-digitoxose	969	0,380	2,62	0,3926	2,56
Désacétyllanatoside A ²	1 D-glucose 3 D-digitoxose	927	0,337	2,98	0,364	2,75
Acétyldigitoxine- α ³	3 D-digitoxose	807	0,447	2,24	0,55	1,84
Digitoxine ¹	3 D-digitoxose	765	0,420	2,39	0,4597	2,18
Digitoxigénine ¹	0	374	0,424	2,4	1,134	0,88
Lanatoside B ¹	1 D-glucose 3 D-digitoxose	985	0,403	2,49	0,4065	2,46
Désacétyllanatoside B ²	1 D-glucose 3 D-digitoxose	943	0,369	2,72	0,39	2,57
Acétylgitoxine- α ⁴	3 D-digitoxose	823	0,525	1,91	0,635	1,57
Gitoxine ¹	3 D-digitoxose	781	0,727	1,37	0,932	1,07
Gitoxigénine ¹	0	390	1,850	0,54	4,7437	0,212
Lanatoside C ¹	1 D-glucose 3 D-digitoxose	985	0,280	3,58	0,2856	3,51
Désacétyllanatoside C ²	1 D-glucose 3 D-digitoxose	943	0,228	4,40	0,241	4,15
Acétyldigoxine- α ⁵	3 D-digitoxose	823	0,36	2,78	0,435	2,30
Acétyldigoxine- β ⁵	3 D-digitoxose	823	0,375	2,68	0,455	2,20
Digoxine ¹	3 D-digitoxose	781	0,280	3,58	0,3590	2,80
Digoxigénine ¹	0	390	0,253	3,96	0,6487	1,55
k-Strophanthoside ⁶	2 D-glucose 1 D-cymarose	872	0,126	7,9	0,144	6,9
k-Strophanthine- β ⁶	1 D-glucose 1 D-cymarose	710	0,120	8,3	0,169	5,9
Cymarine ⁶	1 D-cymarose	548	0,111	9,0	0,202	4,9
Strophanthidine ⁶	0	404	0,274	3,6	0,678	1,47
Chéirotoxine ⁷	1 D-glucose 1 D-lyxose	699	0,1185	8,4	0,17	5,9
Désglucochéirotoxine ⁸	1 D-lyxose	537	0,0964	10,4	0,18	5,6
Strophanthidine ⁶	0	404	0,274	3,6	0,678	1,47
Convalloside ⁹	1 D-glucose 1 L-rhamnose	713	0,215	4,6	0,300	3,3
Convallatoxine ¹⁰	1 L-rhamnose	551	0,079	12,6	0,143	7,0
Strophanthidine ⁶	0	404	0,274	3,6	0,678	1,47

¹ E. ROTHLIN, Schweiz. med. Wschr. 70, 577 (1940).² A. STOLL et W. KREIS, Helv. chim. Acta 16, 1890 (1933).³ A. STOLL et W. KREIS, Helv. chim. Acta 35, 1818 (1952).⁴ A. STOLL et W. KREIS, Helv. chim. Acta 35, 1834 (1952).⁵ A. STOLL et W. KREIS, Helv. chim. Acta 17, 592 (1934).⁶ E. ROTHLIN, Münch. med. Wschr. 1939, 762.⁷ H. SCHWARZ, A. KATZ et T. REICHSTEIN, Pharm. Acta Helv. 21, 250 (1947).⁸ K. K. CHEN, F. G. HENDERSON et R. C. ANDERSON, J. Pharmacol. exp. Ther. 103, 420 (1951).⁹ J. SCHMUTZ et T. REICHSTEIN, Pharm. Acta Helv. 22, 359 (1947).¹⁰ K. K. CHEN, Ann. Rev. Physiol. 7, 677 (1945).

Si l'on compare les tableaux V et VI, il apparaît immédiatement que les glucosides et aglucones porteurs d'une lactone hexacyclique à deux doubles liaisons sont, en général, nettement plus actifs que ceux qui contiennent une lactone pentacyclique à double liaison unique. Ainsi, les glucosides qui dérivent de la digitoxigénine, dans le groupe du lanatoside A, ont une toxicité spécifique comprise entre 2,24 et 2,98, tandis que les valeurs correspondantes dans le groupe du scillarène A se situent entre 5,8 et 8. De même, les valeurs de la toxicité moléculaire vont pour le groupe du lanatoside A de 0,88 (digitoxigénine) à 2,75 (désacétyllanatoside A), tandis qu'elles se trouvent réparties de 3,1 (scillarénine) à 5,0 (glucoscillarène A) dans le groupe du scillarène A.

C'est donc parmi les glucosides de la scille maritime que se rencontrent les substances cardiotoniques les

plus actives qu'on ait trouvées jusqu'à ce jour dans la nature, par exemple le scilliglaucoside, d'une toxicité spécifique de 14,5 et d'une toxicité moléculaire de 8,1. Par scission du glucose dans la molécule du scilliroside se forme la scillirosidine, qui ne contient plus de sucre : elle se distingue par une dose HATCHER de 0,057 mg/kg, une toxicité spécifique de 17,5 et une toxicité moléculaire de 8,1.

L'élimination du sucre dans les familles des glucosides à lactone pentacyclique provoque, au contraire, fréquemment une forte diminution de l'activité. Par exemple, la scission des trois molécules de digitoxose de la digitoxine cause une chute de la toxicité moléculaire de 2,18 à 0,88. L'élimination des molécules de digitoxose de la gitoxine ramène la toxicité spécifique de 1,37 à 0,54 et la toxicité moléculaire, de 1,07 à 0,212, soit environ un cinquième de sa valeur primitive. Dans le

groupe du k-strophanthoside, la toxicité moléculaire diminue progressivement de 6,9 pour le glucoside le plus riche en sucres à 1,47 pour l'aglucone, c'est-à-dire la strophanthidine, en passant par les valeurs 5,9 pour la k-strophanthine- β et 4,9 pour la cymarine. On peut observer une diminution semblable dans le groupe de la chérotoxine.

Comme nous l'avons mentionné, la régression de la toxicité moléculaire par diminution de la teneur en sucres est beaucoup plus faible pour les glucosides à lactone hexacyclique. On constate même que la toxicité moléculaire augmente du scilliroside à la scillirosidine, passant en effet de 5,2 à 8,1. La toxicité spécifique augmente sans exception pour les glucosides de la scille maritime ainsi que pour le groupe de l'hellébrine, en même temps que baisse la teneur en sucres, de sorte que les aglucones présentent toujours les valeurs les plus élevées.

On peut en conclure que la lactone hexacyclique à deux doubles liaisons joue un rôle beaucoup plus important pour l'activité cardiotonique que la lactone pentacyclique à double liaison unique des glucosides de la Digitale proprement dite et de leurs parents, par exemple les glucosides du Strophanthus.

A ce propos, nous nous permettons de rappeler que les venins de crapauds, la bufotaline par exemple, qui ne contiennent pas de chaîne glucidique, mais des cycles lactoniques hexagonaux non-saturés, fournissent des valeurs de toxicité d'importance analogue à celle des aglucones des glucosides de la scille, dans la méthode de perfusion selon HATCHER. Là encore, nous voyons l'importance du cycle lactonique hexagonal à deux doubles liaisons conditionnant la forte action sur le cœur.

En ce qui concerne l'*emploi clinique des glucosides cardiotoniques*, tandis qu'on dispose pour ceux de la Digitale et du Strophanthus d'une expérience approfondie s'étendant sur plusieurs décades, de tous les glucosides à lactone hexacyclique à deux doubles liaisons, seuls ceux de la scille blanche ont fait l'objet d'une étude étendue au lit du malade. La préparation employée à cet usage, le Scillarène, contient la totalité des glucosides cardiotoniques de la scille maritime, parmi lesquels le scillarène A prédomine, toutefois, au point de vue quantitatif. Comme, d'une part, les préparations destinées à l'usage clinique sont standardisées selon la méthode de HATCHER et que, d'autre part, les glucosides qui accompagnent le scillarène A ont une action de même nature que lui, on peut considérer le Scillarène du commerce, aux points de vue qualitatif et quantitatif, comme un médicament d'activité constante.

Sur le Scillarène nous possédons donc déjà une expérience clinique s'étendant sur quelques dizaines d'années, tandis que les essais cliniques avec l'un ou l'autre des aglucones primaires n'ont pu être entrepris que maintenant, c'est-à-dire depuis qu'ils ont été obtenus.

L'effet comparé de la préparation de scille maritime

montre qu'il est presqu'aussi rapide que celui de la strophanthine, mais le Scillarène a encore l'avantage de pouvoir être administré par voie gastrique.

L'action du Scillarène sur la fonction rénale mérite d'être mentionnée spécialement, car il augmente la diurèse de manière frappante, comparée à celle due aux autres glucosides. En effet, l'excrétion d'eau, de sel et de substances azotées est considérable et ne s'explique pas seulement par une amélioration de la fonction cardiaque, mais encore par une influence directe sur le rein. L'emploi du Scillarène comme diurétique azoturique a donc une importance toute particulière dans les maladies rénales proprement dites avec rétention urinaire et œdèmes. En ce qui concerne son effet sur l'excrétion urinaire, il dépasse même la théobromine. Seuls les diurétiques mercuriels se montrent supérieurs, en certains cas, au Scillarène. Par ailleurs, on connaît des cas dans lesquels le Scillarène fut efficace, tandis que les diurétiques mercuriels échouèrent. Cette propriété du Scillarène a fait ses preuves dans des néphropathies d'origines diverses.

D'autre part, le Scillarène n'est pas indiqué dans les insuffisances cardiaques tachycardiques, pour lesquelles on a recours à des glucosides à effet bradycardique, comme la digitoxine et ses dérivés, par exemple l'acetyl-digitoxine.

Selon des travaux récents, le Scillarène s'est révélé supérieur aux glucosides du Strophanthus dans la sténose mitrale, l'insuffisance aortique, l'insuffisance ventriculaire droite consécutive à la stase dans la circulation pulmonaire, puis dans l'angine de poitrine avec insuffisance myocardique ou coronaire, surtout parce qu'il est mieux toléré et provoque moins de symptômes secondaires, tels que troubles angineux, extrasystoles, fibrillations auriculaires et palpitations. Le Scillarène s'est encore montré très précieux dans les maladies de cœur chroniques et dans les insuffisances chez le vieillard, à la place du Strophanthus intraveineux, grâce à son efficacité par voie gastrique.

Ces quelques brèves informations sur l'usage des préparations de la scille maritime en médecine moderne confirment l'emploi et le grand cas que faisaient les anciens Egyptiens de la scille maritime comme médicament. Les produits purs et exactement dosables ont permis aux pharmacologues et aux cliniciens de délimiter certains domaines d'indications pour les produits de la Digitale et du Strophanthus employés plus généralement, et de montrer dans quelles indications la scille maritime est avantageuse. La diversité d'action réside, ainsi que nous l'avons montré, dans les différences de la constitution chimique et surtout dans celles de la structure du cycle lactonique.

Le cycle lactonique hexagonal avec deux doubles liaisons a été découvert d'abord dans le scillarène A, mais par la suite, également dans d'autres glucosides cardiotoniques d'origine végétale et dans les venins de crapauds.

L'exemple du scillaren A a permis de démontrer, par la voie la plus courte, la proche parenté des aglucones des glucosides cardiotoniques et des acides biliaires. La découverte d'enzymes spécifiques dans la scille maritime a rendu possible, d'une part la dégradation par étapes, et d'autre part la séparation d'une série de glucosides initiaux par inhibition de l'action enzymatique. Ce n'est que récemment qu'on a trouvé que les aglucones initiaux à cycle lactonique hexagonal non saturé exercent comme les venins de crapauds une forte action sur le cœur et ouvrent peut-être de nouvelles perspectives dans le traitement des cardiopathies.

La préparation à l'état de pureté et les recherches sur les substances cardiotoniques de la scille maritime ont d'un côté enrichi et approfondi nos connaissances de la structure de cette importante et intéressante classe des stéroïdes, et de l'autre, permis à la médecine moderne d'utiliser cette très ancienne drogue médicinale qui était presque tombée dans l'oubli.

Summary

After a short historical survey of the uses of *Scilla maritima* (*Urginea maritima*), a description is given of a special process of extraction which enables the initial cardioactive glycosides of squill to be isolated from the fresh drug in a pure state. The principal glycoside obtained is scillaren A, a homogeneous crystalline substance, while the mother liquors contain a glycosidal complex which can be separated by chromatography into eight different, homogeneous crystalline glycosides, viz. glucoscillaren A, glucoscilliphaeosid, scilliphaeosid, scillicoelosid, scillicyanosid, scilliglaucosid, scillazurosid and scilliakryptosid. The active principle of red squill is scillirosid, a rat poison; this has likewise been obtained in a pure crystalline condition.

The aglycones of the squill glycosides are characterized by the presence of a lactone ring of the cumulin type containing two double bonds, since they behave in a similar manner to cumarin when treated with alcoholic alkalies. This lactone ring creates a fundamental distinction between the squill glycosides and the glycosides of digitalis and strophanthus; its presence in scillaren A and its nature were first recognized by STOLL *et al.* Other workers then showed that the same lactone ring is also present in the toad poisons and later it was found in the glycosides of *Helleborus*, *Urginea rubella* and *Bovaea volubilis*.

On catalytic hydrogenation the cumulin ring behaves as an enol-lactone ring and undergoes reductive cleavage yielding a saturated desoxy-acid. By a straightforward reaction, anhydroscillarin A is converted in this way to allocholanic acid, while scillaren A itself yields epallo-lithocholic acid. In this manner it was possible to

effect for the first time the elegant conversion of a cardiac glycoside to a steroid without loss of a carbon atom, and thus to clarify the structure of scillarenin, the aglycone of scillaren A.

A constitutional formula for scillirosid is proposed and it is highly probable that this corresponds to the actual conditions.

Scilliglaucosid differs from scillarenin only in the presence of an aldehyde group at C 10 in place of the angular methyl group.

The sugar residue of glucoscillaren A is made up of two D-glucose residues and one L-rhamnose residue. In the case of scillaren A and of glucoscilliphaeosid, the sugar residue consists of one molecule of L-rhamnose and one molecule of D-glucose. Proscillarin A and scilliphaeosid consist only of the aglycone and one molecule of L-rhamnose. All the remaining squill glycosides contain only a single molecule of D-glucose as sugar fraction.

Acid cleavage of glucoscillaren A yields scillatriose, while scillaren A and scilliphaeosid yield scillabiose; the remaining glycosides being monosides yield either L-rhamnose or D-glucose. Except in the case of scilli-glaucosid and scillicoelosid, however, the aglycones cannot be obtained intact.

The terminal glucose molecules can be split off enzymatically: strophantobiase converts glucoscillaren A to proscillarin A and glucoscilliphaeosid to scilliphaeosid. The enzyme β -glucosidase from emulsin splits off D-glucose from glucoscillaren A leaving scillaren A which, in turn, is converted by scillarenase to proscillarin A.

All these enzymes leave the glycosidal linkage between the aglycone and the glucose intact. On the other hand, enzymes obtained from the seeds of *Coronilla glauca* and from lucernes (*Medicago sativa L.*) are also capable of breaking this linkage e.g. in scillirosid.

Numerous lower fungi belonging to the group of hyphomycetes contain enzymes which also catalyze this cleavage. Similar enzymes are found in ergot and in extracts of animal organs, such as the kidney, liver, spleen and heart muscle.

If penicillium strain 889 (Penicillium spec., group Asymmetrica, Divaricata) is grown on a medium containing L-rhamnose as a source of carbon, it produces an adaptive enzyme which splits proscillarin A into L-rhamnose and scillarenin.

In the last part of the paper, the toxicities of the various squill glycosides and aglycones are compared with one another and with the glycosides of digitalis and strophanthus. The concepts of specific and molar toxicities are introduced and defined. The six-membered lactone ring with two double bonds present in the squill glycosides is of greater importance for the cardiac activity than the butenolid ring, since degradation to the aglycones results in a much smaller decrease in molar toxicity in the case of the squill glycosides than in the case of the glycosides of digitalis and strophanthus.

The paper concludes with a note on the clinical applications of the squill glycosides.