

INCORPORATION DU DESMOSTEROL-3-³H DANS LES STEROLS DU TABAC *Nicotiana tabacum*

A.ALCAIDE, M.DEVYS et M.BARBIER

*Institut de Chimie des Substances Naturelles,
C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette, France*

Received 9 May 1969

The propionate of 3-³H desmosterol has been applied to the leaves of the tobacco *Nicotiana tabacum* Wisconsin. Radioactivity is incorporated into cholesterol and campesterol with a yield of about 0.5%; the C₂₉ sterols are not labelled in this experiment.

1. Introduction

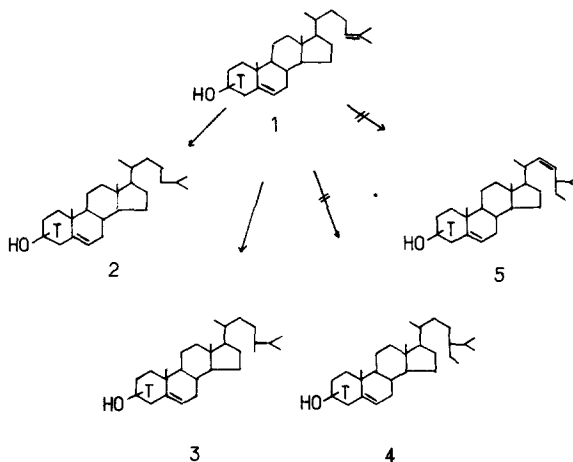
A la suite d'expériences effectuées *in vitro* et *in vivo* dans divers laboratoires, on sait que la biosynthèse par les plantes supérieures des stérols en C₂₇, C₂₈ et C₂₉ est possible à partir d'alcools triterpéniques (lanostérol ou cycloarténol) [1-4]. Les essais que nous avons réalisés *in vivo* avec la feuille du tabac *Nicotiana tabacum* ont montré que le méthylène-24 dihydrolanostérol subit une seconde méthylation et conduit aux phytostérols C₂₉ [5] *. Par contre, le méthylène-24 cholestérol n'est pas méthylé mais réduit en campesterol. L'impossibilité d'obtenir, dans les mêmes conditions, des stérols C₂₉ à partir du méthylène-24 cholestérol paraît intéressante et nous avons voulu voir s'il en était de même à partir du desmostérol.

2. Résultats

Nous avons aspergé des feuilles du tabac *Nicotiana tabacum* Wisconsin avec une solution de propionate de desmostérol-3-³H (1) et isolé les stérols (après saponification). Après séparation du précurseur radioactif, nous avons, par chromatographie sur couche mince, séparé les stérols Δ₅ en deux groupes: stérols mono-

insaturés (cholestérol (II), campesterol (III), β-sitostérol (IV)) et stérol di-insaturé (stigmastérol (V)) (pour l'analyse des stérols de ce végétal, voir [7]). Le stigmastérol isolé est totalement dépourvu de radioactivité. Le fractionnement des stérols mono-insaturés (II), (III) et (IV) a été poursuivi par chromatographie en phase gazeuse; le cholestérol (II) et le campesterol (III) sont radioactifs alors que le β-sitostérol (IV) ne l'est pas (voir fig. 1).

Ce résultat est en accord avec les observations précédentes; les méthylations biologiques conduisant aux stérols C₂₉ chez les végétaux supérieurs s'effectuent de préférence sur des dérivés des alcools triterpéniques, du moins dans les conditions de nos expériences.



* Dans les mêmes conditions, le cycloartanol est transformé en cholestérol [6].

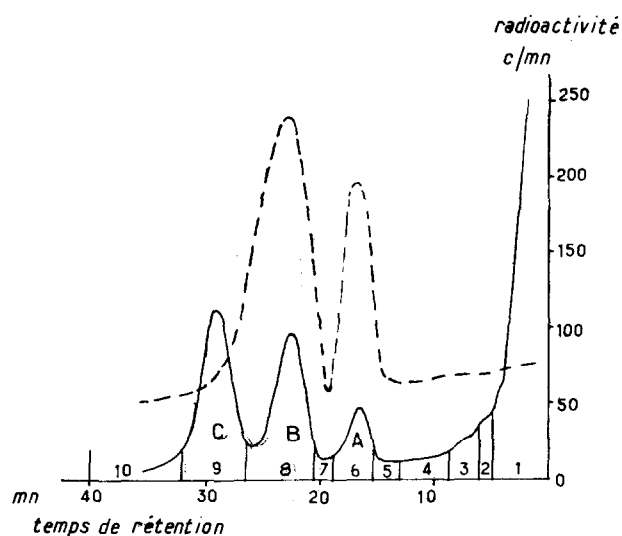


Fig. 1. Analyse des propionates de stérols Δ_5 mono-insaturés par chromatographie en phase gazeuse. (A) Propionate de cholestérol, (B) Propionate de campesterol, (C) Propionate de β -sitostérol.

— Courbe enregistrée par le chromatographe.
 - - - Courbe de la radioactivité. (Les chiffres de 1 à 10 indiquent les fractions recueillies à la sortie et dont la radioactivité a été mesurée séparément).

3. Détails expérimentaux

3.1. Préparation du précurseur radioactif

Nous avons obtenu un échantillon de desmostérol brut par extraction de l'algue rouge *Rhodomenia palmata* [8,9] et chromatographie des stérols sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt. Ce stérol a été d'abord purifié par deux chromatographies préparatives sur couche mince d'alumine neutre Merck type T imprégnée de nitrate d'argent [6,10]; système chloroforme-éther de pétrole-acétone 19:6:3 (R_f 0.36; R_f du cholestérol 0.56). Le desmostérol a été propionylé [7,10,11] et la purification continuée sur le même adsorbant (système hexane-acétate d'éthyle 100:6 R_f 0.45). La pureté du propionate de desmostérol a été vérifiée par spectrométrie de masse. On saponifie, puis oxyde par CrO_3 dans l'acétone aqueuse [12] à 0° (15 mn) de façon à obtenir la cétone-3 Δ -5. Nous avons contrôlé l'absence de cétone-3 Δ -4 par chromatographie sur couche mince d'acide silicique en développant par le système pentane-acétate d'éthyle 85:15 et en révélant par une

solution de dinitro-2,4 phénylhydrazine dans HCl 2N (sur des témoins latéraux; R_f de la cétone-3 Δ -5: 0.75; cétone-3 Δ -4: 0.57).

2 mg de cétone-3 Δ -5 sont réduits en présence de 1 mC de borohydrure de sodium tritié * [13]; le desmostérol-3- ^3H isolé après cette réaction est propionylé et purifié par chromatographie sur couche mince d'alumine / AgNO_3 comme ci-dessus; (cette opération est répétée une fois). On obtient 1 mg de propionate de desmostérol de radioactivité 8×10^6 c/mn **.

3.2. Incorporation

Les feuilles d'un pied de tabac *** ont été aspergées avec une solution éthérée du précurseur tritié ci-dessus, de radioactivité totale 8×10^6 c/mn. Après 6 jours, les stérols sont extraits [4,7]; l'extrait total (2.8 g) a une radioactivité de 7.5×10^6 c/mn; (par suite des colorations, les radioactivités des substances brutes n'ont qu'une valeur très approximative). La saponification donne 0.350 g de fraction insaponifiable, de radioactivité 7×10^6 c/mn. Les stérols totaux sont isolés par chromatographie sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt et le précurseur est séparé, après propionylation, par chromatographie préparative sur couche mince d'alumine/ AgNO_3 comme indiqué ci-dessus. Dans cette première séparation, le propionate de desmostérol est écarté; les autres stérols sont isolés ensemble. Nous avons récupéré 14 mg de propionates (sans précurseur) de radioactivité 4.2×10^4 c/mn. Cette radioactivité reste inchangée au cours de trois purifications dans les mêmes conditions. Les propionates des stérols Δ -5 mono-insaturés (cholestérol, campesterol et β -sitostérol) sont séparés du propionate de stigmastérol par une seconde chromatographie sur couche mince d'alumine/ AgNO_3 ; à partir de 3 mg de mélange, nous obtenons 1.5 mg du mélange des stérols mono-insaturés (radioactivité 9×10^3 c/mn) et 1.5 mg de propionate de stigmastérol (radioactivité nulle). La radioactivité des stérols mono-insaturés reste inchangée après une seconde chromatographie. Le rendement de

* Nous remercions le CEA, Saclay, pour une subvention ayant permis l'achat de ce réactif.

** Les radioactivités ont été mesurées sur un appareil à scintillation Nuclear Chicago Mark 1, de rendement 47%.

*** Nous remercions M.J.P. Nitsch, Phytotron, Gif-sur-Yvette, pour ce matériel.

l'incorporation est donc d'environ 0.52%. Les propionates des stérols mono-insaturés ont été fractionnés par chromatographie en phase gazeuse; (appareil Chromagas CG 1, colonne de SE-30 1% de 2 m de longueur, température d'introduction 220°). Les substances sont recueillies à la sortie de l'appareil et leur radioactivité mesurée séparément (fig. 1).

Remerciement

Nous remercions le Professeur E.Lederer pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Références

- [1] M.J.E.Hewlins, J.D.Ehrhardt, L.Hirth et G.Ourisson, *European J. Biochem.* 8 (1969) 184.
- [2] J. Hall, A.R.H.Smith, L.J.Goad et T.W.Goodwin, *Biochem. J.* 112 (1969) 129.
- [3] L.J.Goad et T.W.Goodwin, *Europ. J. Biochem.* 7 (1969) 502.
- [4] M.Devys, A.Alcaide et M.Barbier, *Phytochem.* 7 (1968) 613.
- [5] A.Alcaide, M.Devys, J.Bottin, M.Fétizon, M.Barbier et E.Lederer, *Phytochem.* 7 (1968) 1773.
- [6] M.Devys, A.Alcaide et M.Barbier, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 51 (1969) sous presse.
- [7] M.Devys, A.Alcaide et M.Barbier, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50 (1968) 1751.
- [8] G.F.Gibbons, L.J.Goad et T.W.Goodwin, *Phytochem.* 6 (1967) 677.
- [9] A.Alcaide, M.Devys et M.Barbier, *Phytochem.* 7 (1968) 329.
- [10] J.P.Allais et M.Barbier, *Qualitas. Plant. Mater. Veget.* 16 (1968) 215.
- [11] J.R.Claude, *J. Chromatog.* 17 (1965) 596.
- [12] R.G.Curtis, I.Heilbron, E.R.H.Jones et G.F.Woods, *J. Chem. Soc.* (1953) 457.
- [13] M.Devys, A.Alcaide et M.Barbier, *Phytochem.* (1969) sous presse.