

PREPARATION DU DIHYDRO LANOSTEROL ( $^3\text{H}$ )-24,25 (note de laboratoire)

Received March 25, 1977

Summary : 24, 25- $^3\text{H}$  dihydro lanosterol is obtained by catalytic reduction of lanosterol with tritium at atmospheric pressure. Its specific activity is 23 Ci/mMole. Natural lanosterol impurities do not disturb the synthesis.

INTRODUCTION :

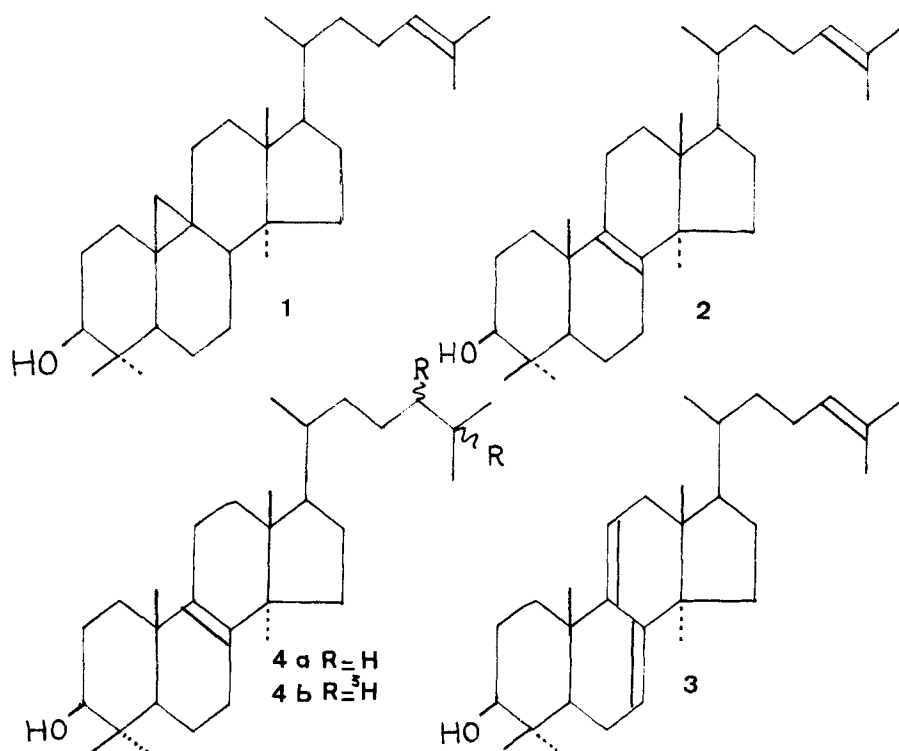
On sait que, à quelques rares exceptions près (1), l'oxydo-squalène est le précurseur de tous les triterpènes cycliques du règne végétal ou animal. Cette cyclisation résulte de la présence d'oxydo-squalène cyclases spécifiques. C'est ainsi qu'est formé le cyclo-arténol 1 chez les végétaux (2) et le lanostérol 2 chez les animaux (3).

L'étude de ces enzymes et notamment leur purification se heurte à deux difficultés majeures :

- 1°) Il s'agit, le plus souvent, d'enzymes membranaires (4,5) dont la "solubilisation" reste problématique.
- 2°) Leur activité ne peut être mesurée par une quelconque méthode cinétique directe : on utilise la méthode d'incubation qui implique l'isolement du triterpène formé à partir d'un précurseur radioactif, tel que l'oxydo-squalène [ $^{14}\text{C}$ -1] préparé préalablement à partir du squalène (6,7).

Cette méthode limite, par sa longueur et sa lourdeur, le développement de l'étude des cyclases. Une solution susceptible de lever cet obstacle consiste à développer une méthode radioimmunologique de dosage, seule capable, par sa haute sensibilité et sa spécificité, de pouvoir se substituer aux méthodes par "isolement".

C'est à cette fin que nous nous sommes proposés de mettre au point le dosage radioimmunologique (ou radioimmunoassay : RIA) du lanostérol dans le but précis d'étudier "l'oxydo-squalène lanostérol cyclase" présente en quantité remarquablement abondante dans le placenta humain (8,9). Ce RIA implique que l'on dispose de lanostérol radioactif de très haute activité spécifique. La synthèse du dihydro ( $^3\text{H}$ )-24,25 lanostérol 4b, répond à cet objectif. Ce composé est suffisamment proche du lanostérol pour être utilisé à sa place dans les RIA.



#### SYNTHÈSE DU DIHYDRO (<sup>3</sup>H)-24,25 LANOSTÉROL : 4b

Le produit de départ est le lanostérol commercial (Koch-Light). Il se présente sous forme d'un mélange contenant 60% de lanostérol 2, 30% de dihydro-24-25 lanostérol 4a et 5% d'autres triterpènes parmi lesquels prédomine l'agnostérol 3. (Identification effectuée par chromatographie en phase vapeur sur XE 60 1%,  $t^\circ = 190^\circ$ ). La titration directe sans purification est par conséquent impossible.

On réalise donc dans un premier temps une chromatographie préparative sur couche mince  $\text{SiO}_2$ . On élimine ainsi diverses impuretés, mais le mélange lanostérol, dihydrolanostérol et agnostérol (décelé par sa forte absorption en U.V.) n'est pas résolu. De multiples essais ont montré l'impossibilité de séparer le lanostérol du dihydrolanostérol (DHL) par chromatographie sur couche mince (CCM) ou sur colonne, quel que soit l'absorbant choisi ou l'imprégnation utilisée.

Au demeurant, cette séparation est inutile : le DHL "froid" contaminant le lanostérol ayant pour seul effet, après titration, de diminuer (de 30%) l'activité spécifique du DHL (<sup>3</sup>H)4b obtenu. Quant à l'agnostérol 3 il est certes possible, bien que très difficile (10), de le séparer du "bloc" lanostérol + DHL. Ici encore cette séparation peut être évitée car l'agnostérol disparaît lors de l'hydrogénation et aussi parce-que le lanostérol pur se deshydrogène lentement de manière spontanée, conduisant ainsi à l'agnostérol, ce qui provo-

que la présence constante de ce contaminant (10). On procède donc comme suit : le mélange lanostérol, DHL; et agnostérol en solution dans l'acétate d'éthyle est tritié sur rampe, avec Pd/C 10% pour catalyseur. Dans ces conditions, seule la double liaison en 24 est réduite. Cette réduction est complète en 10 min. On obtient ainsi un mélange de DHL (<sup>3</sup>H) et de dihydro (<sup>3</sup>H) 24,25 agnostérol dont l'activité spécifique calculée d'après l'intensité du pic de masse M+4 est de 51 Ci/mMole.

#### PARTIE EXPERIMENTALE :

Les chromatogrammes en phase vapeur ont été réalisés sur colonne (6 pieds) XE 60 1%, t = 190°C, détection par ionisation de flamme, matériel HEWLETT PACKARD FM 402. La radioactivité des produits séparés par chromatographie sur couche mince a été enregistrée sur "SCANNER PANAX". Les chromatographies en phase liquide à haute pression ont été réalisées sur un appareil "WATERS" muni d'un injecteur universel U6K, programmeur de gradient 660, avec détecteur à ionisation de flamme PYE UNICAM LMC2. Les spectres de masse ont été obtenus avec un appareil "VARIAN". Les mesures colorimétriques et spectroscopiques ont été réalisées au laboratoire de microanalyse du C.E.A. SACLAY, Service des Molécules Marquées.

#### SYNTHESE DU DIHYDRO (<sup>3</sup>H)-24,25 LANOSTEROL 4b.

32 mg de lanostérol commercial (KOCH-LIGHT) sont purifiés sur plaque SiO<sub>2</sub> MERCK (solvant d'élution hexane/acétate d'éthyle 75/25). On récupère 25 mg de produit, qu'on dissout dans 2 ml d'acétate d'éthyle, que l'on introduit dans le réacteur R (fig. 2). On ajoute ensuite 5 mg de Pd/C 10%. Après avoir purgé d'air tout le montage, le tritium pur est introduit à partir de la bombe A, (fig. 2) et la tritiation est réalisée à la pression atmosphérique (contrôlée par le dispositif Toepler) à 25°C, pendant 10 min. sous agitation magnétique. Le réacteur est isolé, le catalyseur éliminé par filtration et lavé à l'éthanol. Les solvants sont évaporés. Le précipité est repris trois fois à l'éthanol et évaporé : ceci pour éliminer le tritium "labile". Le résidu est purifié par une première chromatographie sur couche mince de silicagel H<sub>254</sub> MERCK, dans le système hexane/acétate d'éthyle 75/25. On isole ainsi une zone de R<sub>f</sub> contenant la totalité des triterpènes tritiés que l'on élue par le méthanol. L'activité de cette solution est de 2,6 Ci. Après évaporation des solvants, le résidu est soumis aux contrôles suivants :

#### 1°) Chromatographie sur couche mince : (CCM)

Dans deux systèmes (a) Hexane/acétate d'éthyle 75/25 et (b) Chloroforme/acétone 95/5, l'enregistrement sur SCANNER-PANAX des produits radioactifs ne

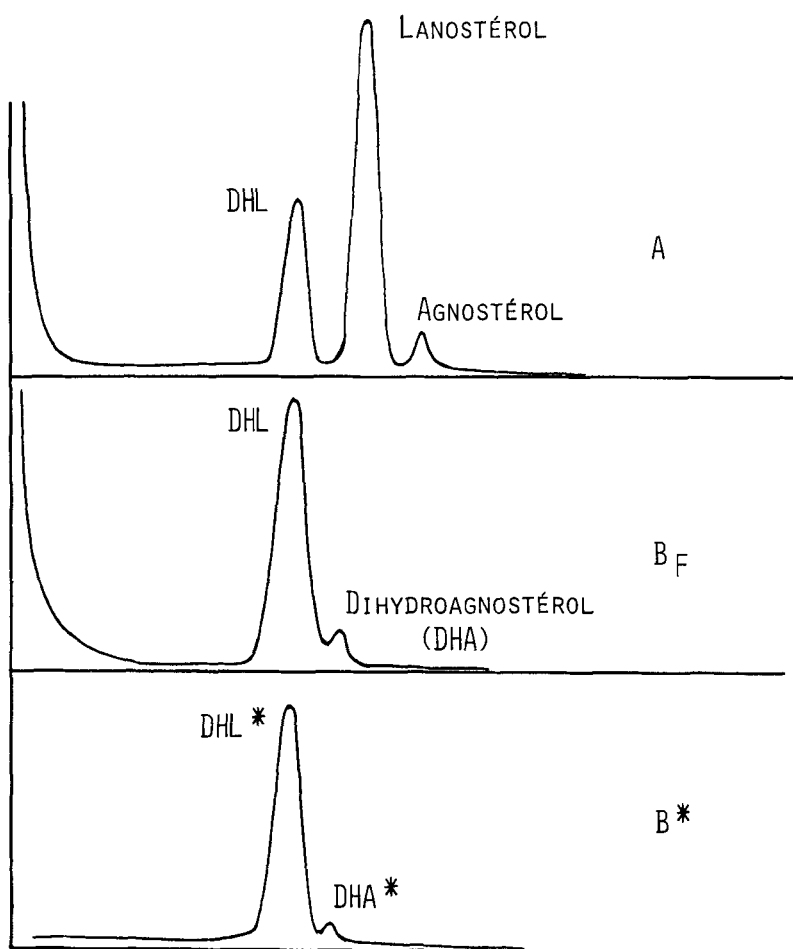


FIGURE 1 : CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE HAUTE PRESSION

- A : DU PRODUIT SOUMIS À LA TRITIATION  
(DÉTECTION PAR IONISATION DE FLAMME)
- B : DU PRODUIT OBTENU APRÈS TRITIATION AVEC DÉTECTION  
SIMULTANÉE :
- B<sub>F</sub> : PAR IONISATION DE FLAMME
- B\* : PAR COMPTEUR GEIGER

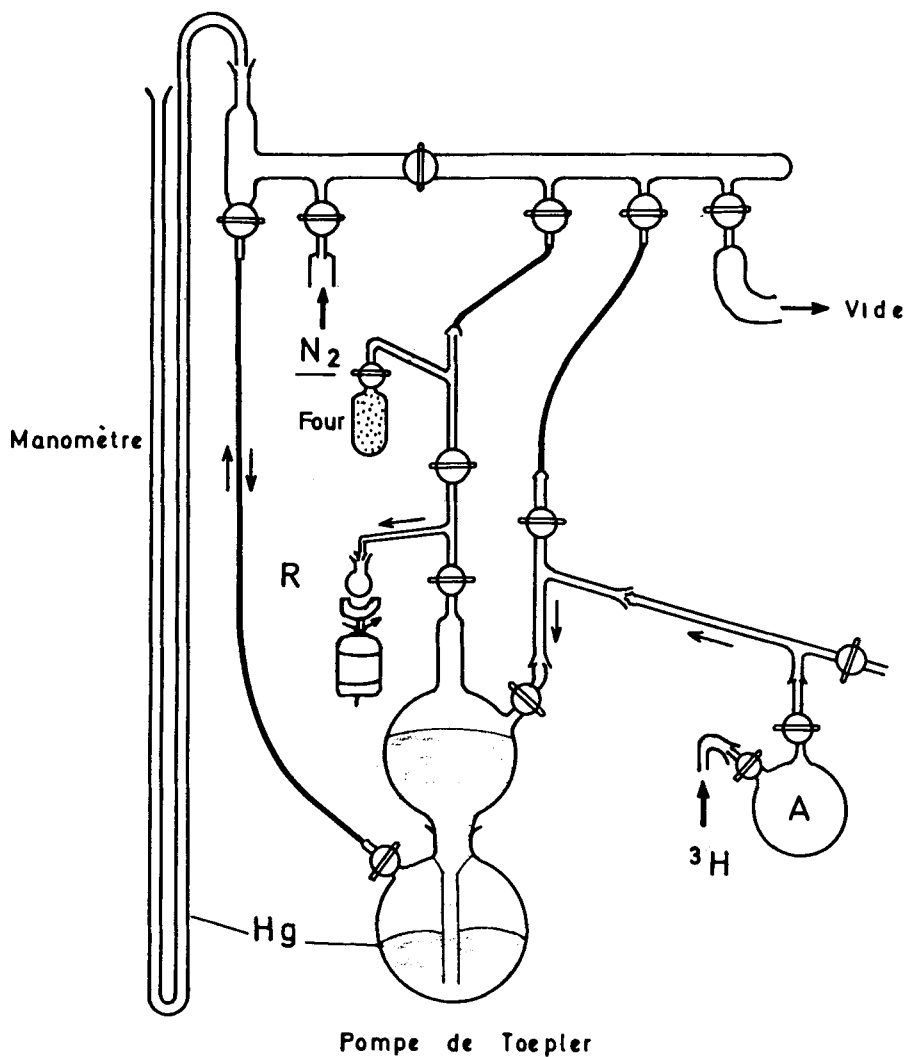


Fig 2 : Appareillage pour les réductions par le TRITIUM

montre qu'un seul pic ; l'autoradiographie confirme ce résultat en donnant un seul spot. Cette radioactivité est située au niveau du DHL, témoin "froid".

2°) Chromatographie liquide à haute pression :

Elle est effectuée sur colonne MERCK SiO<sub>2</sub>. (Solvant d'élution heptane/acétate d'éthyle 85/15 ; pression 1800 psi). On obtient un seul pic radioactif et un seul pic "blanc" de même temps de rétention relatif que le DHL. (fig. 1). Ceci permet d'affirmer que le produit obtenu est chimiquement et radiochimiquement pur à 95% avec moins de 5% de DHA-<sup>3</sup>H.

3°) Spectrographie de masse :

On obtient le pic de masse (M<sup>+</sup> 428 (C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O) et les mêmes fragments (m/e = 413, 395, 378, 300, 273) que ceux du spectre du DHL témoin. Le pic de masse M+4 donne une activité spécifique de 51 Ci/mMole.

BIBLIOGRAPHIE :

1. T.W. GOODWIN, Rodd's Chemistry of carbon compounds, Vol. II part E, p. 96
2. ibid - p. 104.
3. ibid - p. 94.
4. I. SHECHTER, F.W. SWEAT, and K. BLOCH, Biochim. Biophys. Acta, 1970, 220, 463-468.
5. M.G. ROWAN, P.D.G. DEAN and T.W. GOODWIN, FEBS Letters, 1971, 12, 229-232.
6. E.J. COREY, M. JAUTELAT et W. OPPOLZER, Tetrahedron Letters, 1967, n° 24, 2325.
7. J. BASCOUL, D. NIKOLAIDIS, A. CRASTES de PAULET et L. PICHAT, Bull. Soc. Chim. France, 1973, 7-8, 2318-2320.
8. M. ASTRUC, C. TABACIK, B. DESCOMPS, A. CRASTES de PAULET, FEBS Letters, 1974, 47, 66-71.
9. C. TABACIK, M. ASTRUC, B. DESCOMPS, A. CRASTES de PAULET, Biochem. Biophys. Acta, 1975, 398, 490-495.
10. U. WRYECIANO, Ch. F. MURPHY, G. OURISSON, S. CORSANO, J.O. EHRHARDT, M.F. LHOMME et G. TELLER, Bull. Soc. Chim. France, 1970, 1, 966-974.

REMERCIEMENTS :

Nous remercions vivement M. AUDINOT, Chef du Groupe Tritium, C.E.A. Service des Molécules Marquées à SACLAY de son précieux concours pour la réalisation de ce travail.

A. NICOLAS, J. BASCOUL, A. CRASTES de PAULET et L. PICHAT \*  
 I.N.S.E.R.M. U. 58, Avenue des Moulins - 34000 - MONTPELLIER  
 \*C.E.A. SACLAY, Service des Molécules Marquées, B.P. n° 2  
 91130 - GIF-sur-YVETTE.