

## BIOSYNTHÈSE DES RAMIFICATIONS EN C-24 DES PHYTOSTEROLS DE *PHYSARUM POLYCEPHALUM* ET D'*OCHROMONAS DANICA*

M. F. LECOMPTE\* et M. LENFANT†

Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif/Yvette 91190, France

(Revised received 14 October 1977)

**Key Word Index**—*Physarum polycephalum*; *Ochromonas danica*; myxomycete; chrysophyte; biosynthesis; side chain alkylation mechanism; stereochemistry; phytosterols.

**Abstract**—The side chain C-24 alkylation mechanism of phytosterols of *Physarum polycephalum* and *Ochromonas danica*, cultured in a nutrient medium containing methionine-CD<sub>3</sub>, has been studied. Depending on species, five or four deuterium atoms were incorporated respectively in C-24 ethyl phytosterols. No relation could be established between the stereochemistry of C-24 and the alkylation mechanism at this position.

### INTRODUCTION

La biosynthèse de la chaîne latérale des stérols présents dans les végétaux supérieurs et les algues a été étudiée par différents auteurs. Les ramifications méthyle ou éthyle présents en position C-24 dans ces composés ont pour origine la méthionine [1]. Il est apparu que selon les espèces, différents mécanismes interviennent au cours de ces étapes de méthylation conduisant à la conservation [2-5] ou à l'élimination [6, 7] d'une partie des hydrogènes portés par les groupes méthyle introduits, (pour revue, voir [8]). Nous rapportons les résultats de l'étude des mécanismes de méthylation des phytostérols C-24 éthyle et C-24 méthyle ramifiés de deux organismes, *Physarum polycephalum* et *Ochromonas danica*, qui diffèrent notamment par la configuration du carbone C-24 respectivement  $\alpha$  et  $\beta$  [9, 10].

### RESULTATS ET DISCUSSION

Le mécanisme de formation des ramifications C-24 méthyle et éthyle des stérols de *Physarum polycephalum* et *Ochromonas danica* a été étudié par spectrométrie de masse des composés deutériés, obtenus par culture de ces organismes en présence de méthionine-CD<sub>3</sub>.

#### Etude des stérols de *Physarum polycephalum*

La présence, dans *P. polycephalum*, de stigmastérol, sitostérol, campestérol, stigmastanol et campestanol, a été mise en évidence antérieurement [9]. L'incorporation de méthionine méthyle-CD<sub>3</sub> dans la souche axénique de *P. polycephalum* a été effectuée au cours d'une culture dans un milieu entièrement synthétique [11], pour lequel cet acide aminé est essentiel à la croissance des

cellules. Les stérols après acétylation et époxydation ont été séparés successivement par chromatographie sur couche mince puis chromatographie en phase vapeur; ceci a permis de séparer les différents constituants en fonction de leur degré d'insaturation et de la nature de la ramification en C-24. De cette façon, le diépoxyacétate de stigmastérol 1, les monoépoxy-acétates de sitostérol 2 et de campestérol 3, et les acétates de stigmastanol 4 et de campestanol 5, ont été isolés puis analysés par spectrométrie de masse et comparés à des échantillons authentiques non deutériés.

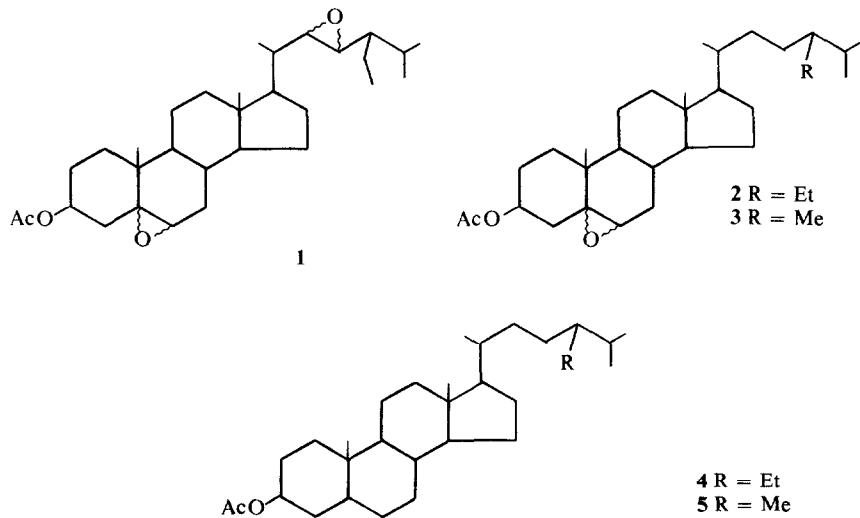
Le spectre de masse du diépoxy-acétate de stigmastérol témoin 1 présente un pic moléculaire à *m/e* 486 ainsi que des pics de fragmentation à *m/e* 468 ( $M^{+} - H_2O$ ), à *m/e* 443 ( $M^{+} - 43$ ) dû à la perte du groupe isopropyl, à *m/e* 457 dû à la perte du groupement éthyle porté par le carbone 24, à *m/e* 426 ( $M^{+} - 60$ ), pic de base du spectre dû à l'élimination de HOAc, à *m/e* 401 ( $M^{+} - 85$ ) dû à la fragmentation en  $\alpha$  de la double liaison C-22, C-23 de la chaîne latérale [5]. Dans le spectre de masse du diépoxy-acétate de stigmastérol deutérié, les pics à *m/e* 486, 468, 443, 426 sont accompagnés respectivement de pics à *m/e* 491 (486 + 5), 473 (468 + 5), 448 (443 + 5), 431 (426 + 5). Ces résultats indiquent donc, l'incorporation de *cinq* atomes de deutérium dans le stérol étudié. Le fait que les pics à *m/e* 457 et 401 ne soient pas accompagnés de pic isotopique à  $M + 5$  indique que les *cinq* atomes de deutérium sont incorporés dans la ramification éthyle en C-24 de ce composé.

L'examen des spectres de masse du monoépoxy-acétate de sitostérol 2 et de l'acétate de stigmastanol 4 conduit à des conclusions semblables. En effet, les spectres de ces deux produits deutériés présentent respectivement des pics moléculaires à *m/e* 472 et 458 accompagnés de pics isotopiques à *m/e* 477 (472 + 5) et 463 (458 + 5). Il en est de même de chaque fragment qui a conservé la ramification éthyle en C-24.

La détermination, pour chacun de ces composés, des proportions relatives en espèces mono, di, tri, tétra, pentadeutériées, montrent (Tableau 1) que les espèces mono et tétradeutériées sont négligeables. Les trois

\* Laboratoire de Chimie Macromoléculaire, Centre Scientifique et Polytechnique de l'Université Paris-Nord, Avenue Jean-Baptiste-Clément, 93430 Villetaneuse, France.

† Laboratoire d'hématologie, Centre Hospitalier et Universitaire de Poitiers, La Milétrie, 86021 Poitiers, France.



stérols à chaîne éthyle ramifiée de *Physarum polycephalum* sont donc biosynthétisés suivant un mécanisme qui exclut le passage par un intermédiaire C-24 éthylidène. Ce résultat est à rapprocher de ceux obtenus dans le cas des stérols de *Dictyostelium discoideum* [5].

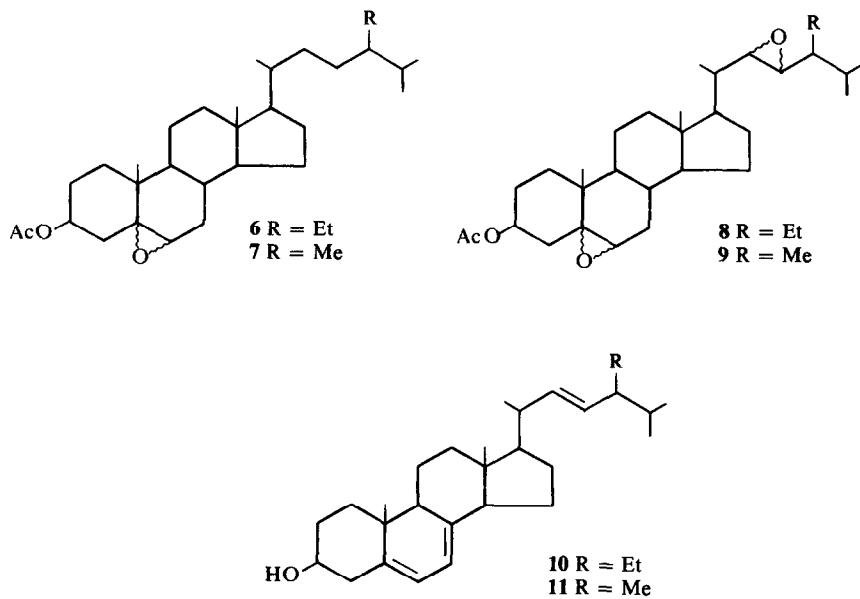
Le spectre de masse de l'acétate de campestanol deutérié présente un pic moléculaire à  $m/e$  444 ( $M^+$ ), accompagné de pics de fragmentation à  $m/e$  384 ( $M^+ - HOAc$ ) et 369 ( $M^+ - 60-15$ ). Ces pics sont accompagnés respectivement d'un pic isotopique majeur à  $m/e$  446 (444 + 2), 386 (384 + 2) et 371 (369 + 2), indiquant l'incorporation de deux atomes de deutérium dans le stérol (Tableau 1). Des conclusions semblables peuvent être tirées de l'analyse du spectre de masse du mono-époxyacétate de campestérol 3 deutérié.

La voie de biosynthèse des stérols à ramification C-24 méthyle s'accompagne de la perte d'un hydrogène du groupement  $\text{CH}_3$  introduit par la méthionine; elle met en oeuvre, très vraisemblablement, un mécanisme semblable à celui démontré pour l'ergostérol [12] et qui entraîne le passage par un intermédiaire C-24 méthylénique qui peut servir également de précurseur pour les stérols C-24 éthyle ramifiés. La présence, dans le spectre de masse de l'acétate de campestanol 5, de pics isotopiques de faible intensité à  $m/e$  447 (444 + 3), 387 (384 + 3), 372 (369 + 3), ainsi que dans le spectre de masse du composé 3 de pics à  $m/e$  461 (458 + 3) et 401 (398 + 3) indique l'existence, dans cet organisme, d'une voie biosynthèse parallèle mineure de la chaîne latérale des stérols, impliquant la conservation de trois atomes d'hydrogène.

Tableau 1. Détermination par spectrométrie de masse, des proportions (%) des différentes espèces deutériées, biosynthétisées par incorporation de méthionine-CD<sub>3</sub>

	<i>M</i>	<i>M + 1</i>	<i>M + 2</i>	<i>M + 3</i>	<i>M + 4</i>	<i>M + 5</i>
<i>Physarum polycephalum</i> , $\theta$ ramification éthyle ou méthyle						
Diépoxy-acétate de	<i>m/e</i> 426	427	428	429	430	431
stigmastérol 1	% 19.5	2.3	15.6	16.8	5.7	40
Monoépoxy-acétate de	<i>m/e</i> 412	413	414	415	416	417
sitostérol 2	% 32.2	3	20.8	19.8	3.7	20.5
Acétate de	<i>m/e</i> 398	399	400	401	402	403
stigmastanol 4	% 42.6	1.5	20.5	17.8	3.1	14.5
Monoépoxy-acétate	<i>m/e</i> 398	399	400	401		
de campestérol 3	% 40.6	8	8.8	2.6		
Acétate de	<i>m/e</i> 444	445	446	447		
campestanol 5	% 51.6	3.4	43	2		
<i>Ochromonas danica</i> , $\theta$ ramification éthyle						
7-Deshydroporiférastérol 10	<i>m/e</i> 410	411	412	413	414	415
	% 41	16.5	4	20.5	17	1
Diépoxy-acétate de	<i>m/e</i> 426	427	428	429	430	431
poriférastérol 8	% 42.8	19.8	3	19.6	13.9	1
Monoépoxy-acétate	<i>m/e</i> 412	413	414	415	416	417
de clionastérol 6	% 45.7	27.9	0	13.2	9.1	4.1

N.B. les calculs des proportions (%) ont été faits pour les composés 1, 2, 4, 3, 8, 6 et homologues deutériés, sur les pics à  $m/e$  426..., 412..., 398..., 398..., 426..., et 412..., (M-60) et confirmés sur les pics moléculaires à  $m/e$  486..., 472..., 458..., et 458..., 486... et 472...  $M^+$ ; pour les composés 5 et 10 ces calculs ont été faits sur les pics moléculaires à  $m/e$  444..., 410...  $M^+$ .



#### Etude des stérols d'*Ochromonas danica*

La présence, dans *Ochromonas danica*, de 7-deshydroporiférastérol, d'ergostérol, de clionastérol, de dihydrobrassicastérol, de poriférastérol et de brassicastérol a été mise en évidence antérieurement [10]. Les cellules obtenues par culture en présence de méthionine deutériée ont été saponifiées. La fraction stérolique isolée a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice imprégné de nitrate d'argent à 50%. Nous avons pu ainsi séparer le mélange de 7-deshydroporiférastérol 10 et d'ergostérol 11 d'une fraction moins polaire contenant des stérols mono et diinsaturés, qui furent purifiés par chromatographie sur couche mince d'acide silicique, après acétylation et époxydation. Le mélange de monoépoxy-acétates de clionastérol 6 et de dihydrobrassicastérol 7 et le mélange de diépoxy-acétates de poriférastérol 8 et de brassicastérol 9, ont ainsi été isolés. Les fractions séparées ont ensuite été analysées. Le spectre de masse du 7-deshydroporiférastérol 10 deutérié présente un pic moléculaire à *m/e* 410 accompagné d'un pic à *m/e* 414 (410 + 4). Un résultat identique est obtenu pour le diépoxyacétate de poriférastérol 8 deutérié dont le spectre de masse présente un pic moléculaire à *m/e* 486, accompagné d'un pic à *m/e* 490 (486 + 4). Ces résultats viennent confirmer des résultats signalés dans la littérature [8].

Le mécanisme de biosynthèse de ces 2 composés, qui conserve 4 atomes d'hydrogène originaires de la méthionine, est à rapprocher de celui qui a été démontré dans le cas du poriférastérol d'*Ochromonas malhamensis*, en faveur du passage par un intermédiaire C-24, C-28 éthylidène. La présence, dans le spectre de masse du monoépoxy-acétate de clionastérol 6, d'un pic moléculaire à *m/e* 472 accompagné non seulement d'un pic à *m/e* 476 (472 + 4), mais aussi d'un pic à *m/e* 477 (472 + 5), indique l'existence dans ce cas de voies de biosynthèse concurrentes.

Les résultats, que nous avons obtenus, confirment que

plusieurs mécanismes peuvent contribuer dans un même organisme à la formation de la ramification méthyle et/ou éthyle en C-24 des stérols. Dans la limite des exemples étudiés, il semble qu'un des mécanismes soit prépondérant pour chaque organisme, et que dans chaque espèce une stérochimie en C-24 liée au mécanisme soit préférentiellement rencontrée: respectivement C-24  $\beta$  pour les chlorophytes [2-4] avec conservation des atomes d'hydrogène originaires de la méthionine ainsi que pour les chrysophytes [6, 8] avec perte cette fois d'un atome d'hydrogène original de la méthionine [6], et C-24  $\alpha$  pour les myxomycètes [5, 9] avec conservation des atomes d'hydrogène considérés [5] ainsi que pour les graminées avec perte d'une atome d'hydrogène [7].

#### PARTIE EXPERIMENTALE

Les chromatographies en phase vapeur ont été effectuées sur un appareil Chromagas modèle C.G.1 sur colonne de 1.80 m de gas chrom Q (GD 2702) à 100-120 mesh, imprégné de OV-1 à 4%. Les acétates des stérols saturés de *Physarum polycephalum* ont été analysés à 245°, les époxy-acétates à 255°. Débit d'azote: 40 cm<sup>3</sup>/min. Les chromatographies sur couche mince d'acide silicique (Merck F 254) ont été effectuées tant à des fins analytiques que préparatives—par deux migrations dans un système de solvants: EtOAc-hexane (1:3) pour les stérols libres, EtOAc-pétrole (3:17) pour les époxy-acétates des stérols de *Physarum polycephalum* et (1:9) pour ceux d'*Ochromonas danica*—par une migration dans le système de solvants, EtOAc-hexane (1:3) pour les acétates des stérols.

*Cultures des cellules.* Une souche axénique de *Physarum polycephalum* M<sub>3</sub>C est conservée sur le milieu liquide naturel modifié de Brewer *et al.* [13] par repiquages successifs tous les deux ou trois jours. Les cellules sont ensuite cultivées dans le milieu entièrement synthétique de Daniel *et al.* [11] en présence méthionine méthyle-CD<sub>3</sub> (252 mg/ml). Les cultures effectuées dans des Erlenmeyers de 2 l, contenant chacun 200 ml de milieu ont été agitées (180 tours/min) à 26° et à l'obscurité pendant 4 jours. 2.4 l. de milieu fournissent alors 92 g de cellules humides. Les cellules d'*Ochromonas danica* sont cultivées en boîts de Roux, en présence de méthionine méthyle-CD<sub>3</sub>

(0.2 g/l.), dans le milieu synthétique d'Aaronson et Baker [14], à 24° sous illumination contue pendant 11 jours. La méthionine est ajoutée en deux fois, le premier et le troisième jour, à raison de 0.1 g/l. Les sioles ont été inoculées auparavant à partir de 100 ml de précultures âgées de 15 jours. A la fin de la période d'incubation, les cellules sont récoltées par centrifugation à 11 000 tours/s, pendant 20 min. 46 g cellules humides sont ainsi obtenus à partir de 5 l. de milieu de culture. Les manipulations suivantes sont effectuées, sous azote et à l'abri de la lumière, afin de prévenir l'oxydation des produits étudiés.

*Extractions et séparations des stérols.* Les cellules en suspension dans 1 ml du mélange EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1), pour 1 g de cellule, sont saponifiées par chauffage à reflux pendant 4 hr en présence de 1 g de KOH. La fraction neutre est extraite au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 × volume de EtOH-H<sub>2</sub>O). Le résidu (300 mg et 747 mg respectivement pour *Physarum polycephalum* et *Ochromonas danica*) est chromatographié sur 40 et 70 g d'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> respectivement. L'élution est effectuée par le mélange C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-Et<sub>2</sub>O en polarité croissante. On isole respectivement 85 et 207 mg de stérols. 207 mg de la fraction stérolique d'*Ochromonas danica* sont chromatographiés sur une colonne de 36 g de gel de silice-céelite (1:1) imprégnés de AgNO<sub>3</sub> à 50%. Par élution avec un mélange de solvants: pétrole-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> (1:1), on sépare deux fractions (20 mg et 75 mg, la plus retenue). Les acétates et époxy-acétates ont été obtenus selon les méthodes décrites antérieurement [9].

*Remerciements*—Nous remercions très vivement M. le Professeur E. Lederer pour l'intérêt qui il a porté à ce travail.

#### REFERENCES

1. Lederer, E. (1969) *Quart. Rev. Chem. Soc.* **23**, 453.
2. Tomita, Y., Uomori, A. et Minato, H. (1970) *Phytochemistry* **9**, 555.
3. Tomita, Y., Uomori, A. et Sakurai, E. (1971) *Phytochemistry* **10**, 573.
4. Goad, L. J., Knapp, F. F., Lenton, J. R. et Goodwin, T. W. (1972) *Biochem. J.* **129**, 219.
5. Lenfant, M., Ellouz, R., Das, B. C., Zissmann, E. et Lederer, E. (1969) *European J. Biochem.* **7**, 159.
6. Smith, A. R. H., Goad, L. J., Goodwin, T. W. et Lederer, E. (1967) *Biochem. J.* **104**, 56 C.
7. Lenton, J. R., Goad, L. J. et Goodwin, T. W. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1523.
8. Goad, L. J., Lenton, J. R., Knapp, F. F., et Goodwin, T. W. (1974) *Lipids* **9**, 582.
9. Lenfant, M., Lecompte, M. F. et Farrugia, G. (1970) *Phytochemistry* **9**, 2529.
10. Gershengorn, M. C., Smith, A. R. H., Goulston, G., Goad, L. J., Goodwin, T. W. et Haines, T. H. (1968) *Biochemistry* **7**, 1698.
11. Daniel, J. W., Babcock, K. L., Sievert, A. H. et Rusch, H. P. (1963) *J. Bacteriol.* **86**, 324.
12. Jaureguiberry, G., Law, J. H., McCloskey, V. A. et Lederer, E. (1965) *Biochemistry* **4**, 347.
13. Brewer, E. N., Kuraishi, S., Garver, J. C. et Strong, F. M. (1964) *Appl. Microbiol.* **12**, 161.
14. Aaronson, S. et Baker H. (1959) *J. Protozool.* **6**, 282