

## LA BIOSYNTHÈSE DES STÉROLS DANS LES TISSUS DE TABAC CULTIVÉS *IN VITRO*\*—II. PARTICULARITÉS DE LA BIOSYNTHÈSE DES PHYTOSTÉROLS DES TISSUS DE TABAC CULTIVÉS *IN VITRO*

P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON

Département des Applications biologiques du Centre de Recherches Nucléaires,  
Strasbourg-Cronenbourg, France

(Received 24 June 1965)

**Résumé**—Les tissus de Tabac cultivés *in vitro* ont une activité métabolique intense, qui a été mise en évidence par marquage à l'acétate  $1-^{14}\text{C}$ , et à la méthionine- $^{14}\text{CH}_3$ . Les triterpènes et stérols précédemment identifiés incorporent activement la radioactivité. Des marquages très brefs ou bien effectués en anaérobiose ont permis de caractériser le squalène. Le lanostérol a été également recherché, mais semble totalement absent. L'hypothèse de l'intervention du cycloartenol comme intermédiaire de la biosynthèse des phytostérols dans les tissus de Tabac cultivés *in vitro* est suggérée.

**Abstract**—Tobacco tissues grown *in vitro* display a very active metabolism, as shown by labelling experiments with  $1-^{14}\text{C}$  acetate and  $^{14}\text{CH}_3$ -methionine. Triterpenes and steroids are efficiently labelled with these precursors. Very short exposure to labelled acetate (5 min), or incubation in the absence of oxygen, lead to labelled squalene. Lanosterol has been carefully looked for but could not be detected, whereas cycloartenol, which is highly labelled, apparently undergoes further changes. It is suggested that cycloartenol may replace lanosterol as an intermediate in the biosynthesis of phytosterols in tobacco tissue cultures.

### INTRODUCTION

DANS UN travail précédent, nous avons montré<sup>1</sup> que les tissus de Tabac cultivés *in vitro* renfermaient, d'une part des quantités notables de campestérol, stigmastérol et  $\beta$ -sitostérol, et d'autre part des triterpènes tétracycliques partiellement déméthylés (citrostadiénol et son compagnon en série ergostanique). Nous nous proposons, dans le présent article, d'étudier l'incorporation de précurseurs des terpènes et des stérols dans les produits cités ci-dessus, et de contribuer ainsi à l'élucidation des voies biosynthétiques conduisant aux stérols des végétaux. On pourra comparer ainsi ces voies avec celles existant chez la levure et chez les animaux.

Un grand nombre de chercheurs ont utilisé les éléments radioactifs dans le cas des plantes, mais pendant des temps d'incorporation longs, et, dans ces conditions, les intermédiaires à renouvellement rapide de la biosynthèse des stérols ne pouvaient être mis en évidence. Aussi avons nous cherché à effectuer des "impulsions" de très courte durée, d'autant plus que les tissus de Tabac cultivés *in vitro* semblaient *a priori* être un matériel favorable pour de tels marquages.

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### *Utilisation d'Acétate de Sodium $1-^{14}\text{C}$ comme Précurseur*

Les incorporations d'acétate  $1-^{14}\text{C}$  ont été faites avec des temps d'incubation variables. Dans chaque cas un diagramme d'élution a été tracé, comprenant d'une part une détermina-

\* Les recherches résumées ici ont été entreprises dans le cadre d'une action conjointe, aidée par les sections de Biologie cellulaire et de Chimie organique du C.N.R.S., ultérieurement transformée en Recherche coopérative sur Programme no. 34, intitulée: "L'utilisation des tissus végétaux cultivés *in vitro* pour l'étude des produits naturels".

<sup>1</sup> P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, *Phytochem.* 5, 31 (1966).

tion de la teneur en phytostérols par la méthode de Liebermann-Burchard. Plusieurs pics, baptisés, dans l'ordre d'élution:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , et  $\eta$  ont été ainsi observés. Le pic mineur  $\beta$  n'a été ni identifié ni même étudié, non plus que le pic  $\eta$ , sans doute constitué par des xanthophylles. Plusieurs autres produits, très faiblement marqués, sont en outre révélés par radiographie des chromatoplaques; ils n'ont pas été étudiés.

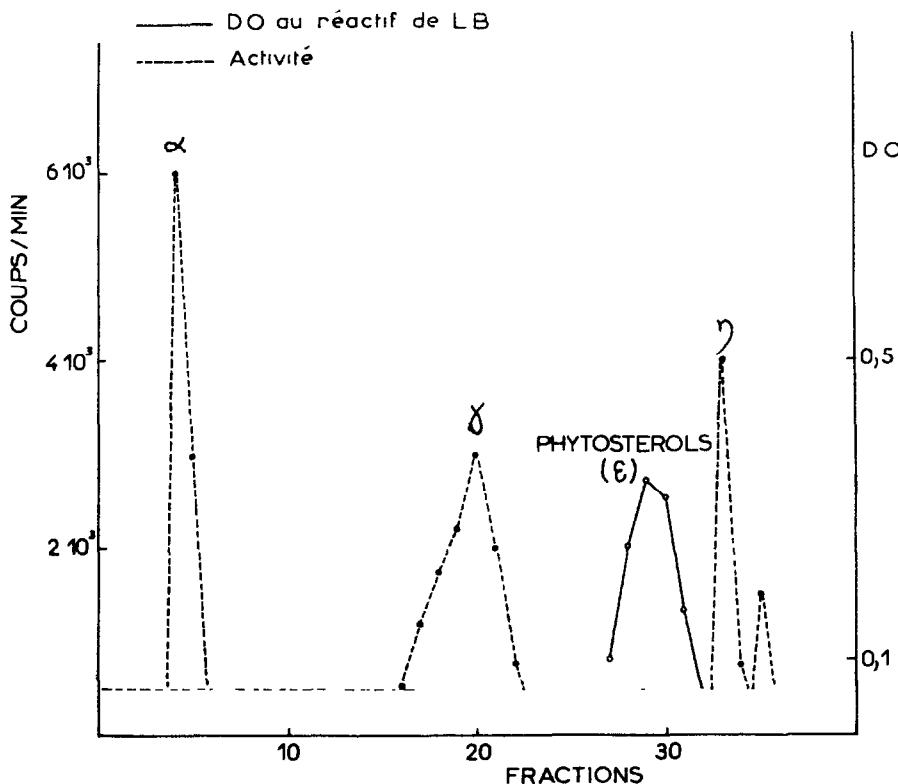


FIG. 1. DIAGRAMME D'ÉLUTION CORRESPONDANT À UNE INCUBATION DE 6 CULTURES DE TABAC, DANS UN MILIEU RENFERMANT  $50 \mu\text{C}$  (0,4 mg) D'ACÉTATE DE SODIUM  $1-^{14}\text{C}$ , PENDANT 5 min.

Les hydrocarbures saturés, élués dans la première fraction chromatographique,<sup>1</sup> ne présentent *aucune activité* décelable. Dans les conditions où nous opérons, ces produits, sans doute présents dans les cuticules, ne sont pas l'objet d'une activité de synthèse rapide.

Les figures 1, 2 et 3 montrent comment varie, en fonction du temps de marquage, l'activité des divers produits; le tableau 1 résume les données numériques correspondantes.

Le pic  $\epsilon$  est le seul qui renferme des quantités pondérales de substance, dans les expériences conduites avec six cultures. Ceci rend plus aisée son identification: les fractions correspondant à ce pic ne contiennent que les phytostérols décrits,<sup>1</sup> d'après leur comportement en chromatographie en couche mince, avec révélation par le réactif de Liebermann-Burchard ou par autoradiographie.

On voit que: (a) La radioactivité contenue dans le milieu est absorbée rapidement: après seulement 5 min d'incubation, près de 50 pour cent de l'acétate est absorbé par les tissus.

Cette absorption remarquablement rapide est en partie due au fait que les colonies peuvent être divisées en fragments très petits et sont mises à incuber dans un volume minimal de liquide.

(b) Le produit  $\alpha$  se marque très rapidement; son activité décroît aussi très vite, dès que la source d'acétate radioactif exogène est épuisée. Nous l'identifierons plus loin au squalène.

(c) Le pic  $\gamma$  se marque également après seulement 5 min d'incubation. Les fractions correspondant à ce pic contiennent un mélange de cycloarténol et de méthylène-24 cycloartanol d'après leur comportement en chromatographie en couche mince fonctionnelle,

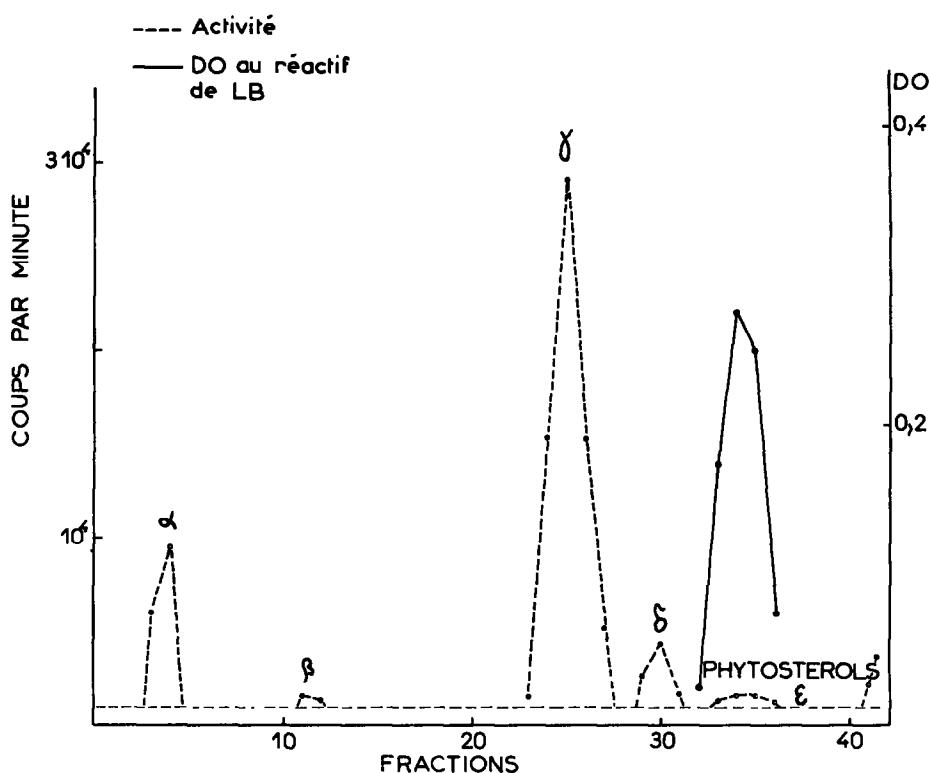


FIG. 2. DIAGRAMME D'ÉLUTION CORRESPONDANT À UNE INCUBATION DE 1 hr DE 6 COLONIES DE TISSUS DE TABAC EN PRÉSENCE DE 50  $\mu$ c (0,40 mg) D'ACÉTATE DE SODIUM  $1-^{14}\text{C}$ .

avec révélation par autoradiographie et comparaison avec des échantillons froids de ces substances. La concentration de ces substances étant très faible dans les tissus (moins de 0,05 %), leur activité spécifique doit donc être considérable.

(d) La substance  $\delta$  se marque plus lentement que les précédentes. Nous avons montré qu'elle s'identifiait par ses propriétés chromatographiques et chimiques aux méthyl-4 $\alpha$ -stérols précédemment identifiés,<sup>1</sup> (méthyl-4 $\alpha$ -stigmastadiène-7,24-(28)ol-3 $\beta$  et son compagnon ergostanique).

(e) Enfin, les phytostérols (pic  $\epsilon$ ) se marquent encore plus lentement.

Des incorporations en anaérobiose ont été d'autre part entreprises. Les techniques de marquage sont celles décrites dans la partie expérimentale. La figure 4 rapporte les résultats d'une incorporation de 12 hr en anaérobiose. Le tableau 2 consigne les activités du produit  $\alpha$ , du cycloarténol, des méthyl-4 $\alpha$ -stérols et des phytostérols.

On voit que: (a) La biosynthèse des méthyl-4 $\alpha$ -stérols et des phytostérols est très fortement inhibée (l'activité résiduelle de ces produits provenant sans doute de l'imperfection relative de nos conditions d'anaérobiose). Ces résultats sont en accord avec les observations effectuées sur les tissus animaux, suivant lesquelles plusieurs étapes de la formation du cholestérol mettent en jeu des processus oxydatifs.<sup>2</sup>

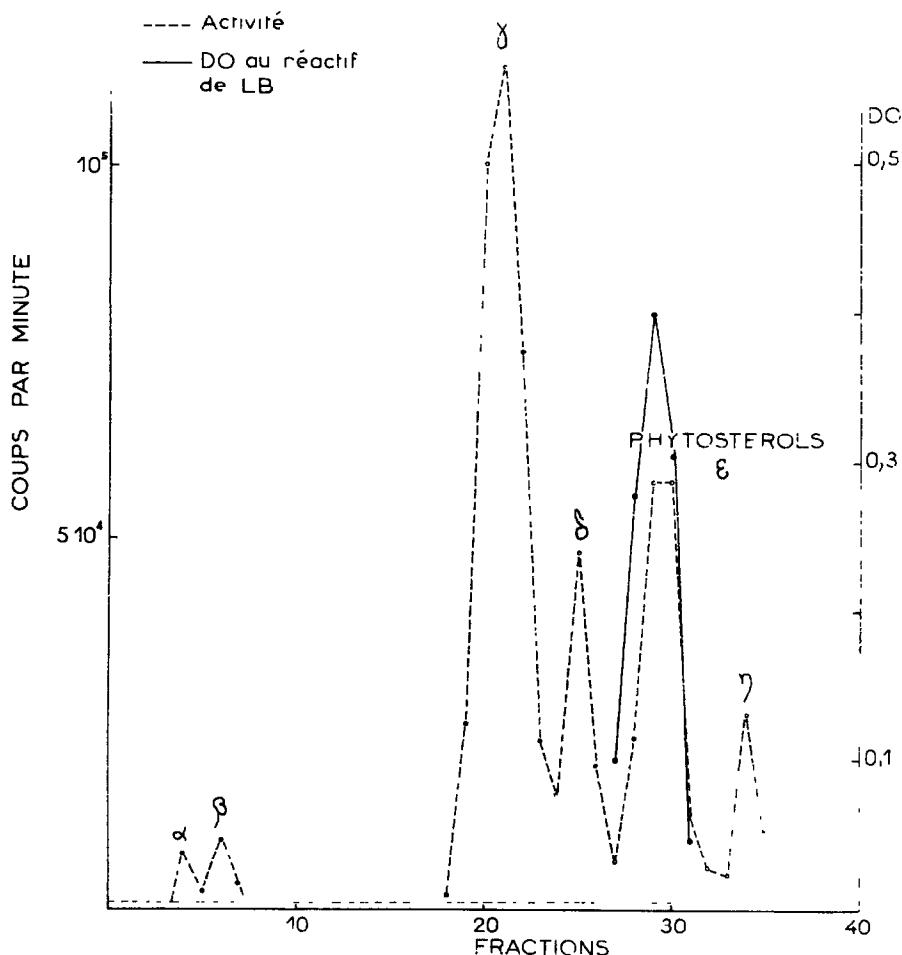


FIG. 3. DIAGRAMME D'ÉLUTION CORRESPONDANT À UNE INCUBATION DE 12 hr DE 6 COLONIES DE TISSUS DE TABAC EN PRÉSENCE DE 50  $\mu$ C (0,40 mg) D'ACÉTATE DE SODIUM  $1-^{14}\text{C}$ .

(b) Le produit  $\alpha$  est fortement marqué alors qu'au cours d'incorporations de 12 hr en aérobiose, son activité est très faible. Sa biogénèse est donc anaérobiose. Son activité ne subit pas de variation notable lorsque l'on augmente la durée du marquage. Le renouvellement de ce produit est donc très lent en anaérobiose. La substance  $\alpha$  est très probablement un précurseur des méthyl-4 $\alpha$ -stérols et des phytostérols.

<sup>2</sup> G. POPJAK, *Ciba Foundation Symp.*, p. 148. Churchill, London (1959).

*Identification du Produit  $\alpha$* 

Au cours de la biogénèse du cholestérol, les étapes conduisant de l'acide acétique au squalène sont anaérobies,<sup>3</sup> alors que la formation de lanostérol à partir de squalène, qui est une oxydation, comprend des étapes aérobies.<sup>4</sup> Le fait que l'activité du produit  $\alpha$  reste plus ou moins constante quelle que soit la durée du marquage, et que l'on obtienne une inhibition de la biogénèse des phytostérols quand on travaille en anaérobiose, suggère que la substance  $\alpha$  pourrait être le squalène.

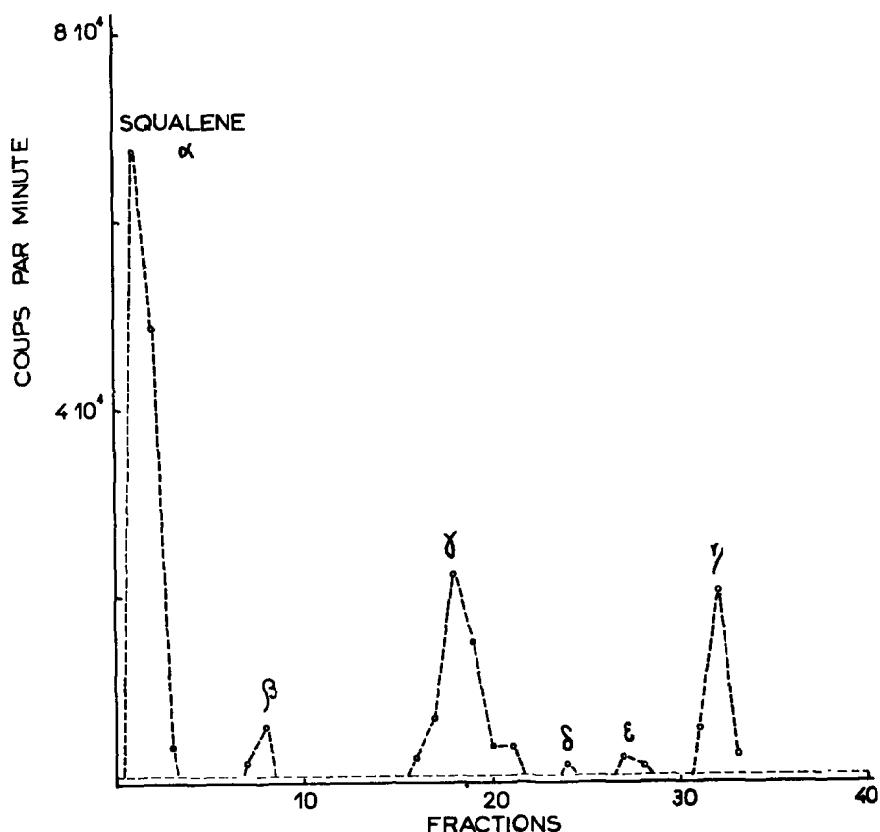


FIG. 4. CE DIAGRAMME D'ÉLUTION CORRESPONDANT À UNE INCUBATION DE 12 hr, EN ANAÉROBIOSE, DE COLONIES DE TISSUS DE TABAC (2,3 g DE POIDS SEC) EN PRÉSENCE DE 200  $\mu$ c (2 mg) D'ACÉTATE DE SODIUM  $1-^{14}\text{C}$ .

Pour le démontrer, du squalène, a été ajouté aux fractions radioactives correspondant au pic  $\alpha$  et une fraction aliquote a été chromatographiée en couche mince dans des conditions permettant la séparation du squalène d'avec les hydrocarbures saturés et les caroténoïdes.<sup>5</sup> Le chromatogramme a été révélé par la vapeur d'iode et par autoradiographie. La tache obtenue sur l'autoradiogramme est d'une part unique, d'autre part superposable à celle du squalène entraîneur sur le chromatogramme.

<sup>3</sup> N. L. R. BUCHER et K. McGARRAHAN, *J. Biol. Chem.* 222, 1 (1956).

<sup>4</sup> T. T. TCHEN et K. BLOCH, *J. Biol. Chem.* 226, 931 (1957).

<sup>5</sup> A. VASQUEZ-RONCERO et M. L. JENER, *Grasas y Aceites*, 13 (6), 243 (1962).

Enfin, un dérivé, l'hexachlorure de squalène, a été préparé ( $F = 114-120^\circ$ )<sup>6</sup> et caractérisé par son spectre de RMN. Celui-ci ne présente pas de signaux correspondant à des protons placés sur des atomes de carbone portant un atome de chlore, ce qui implique que l'addition

TABLEAU 1. RÉSULTATS NUMÉRIQUES CORRESPONDANT À DES INCUBATIONS DE COLONIES DE TISSUS DE TABAC (ENVIRON 0.8 À 1.0 g DE POIDS SEC) EN PRÉSENCE DE 50  $\mu\text{C}$  DE SODIUM  $\text{I}^{-14}\text{C}$

Temps de marquage	5 min	40 min	4 hr	12 hr	30 hr
Poids total de Phytostérols* (mg)	1,31	1,83	1,44	1,80	1,42
Substance	Activité†				
Produit $\alpha$	6300	13100	20000	3000	0
Produit $\gamma$	6000	18000	140000	165000	100000
Méthyl-4 $\alpha$ -stérols produit $\delta$	0	3000	21000	39000	15500
Phytostérols	0	0	26000	83000	86000
Milieu après incubation‡	54	40	8	0,4	0

\* Déterminé pour 6 cultures par la technique de Moore et Baumann utilisant le réactif de Liebermann-Burchard.

† En coups par mn et pour 1 mg de stérols isolés, dosés par colorimétrie (L.B.).

‡ L'activité du milieu après incubation a été évaluée en pour cent de l'activité initiale.

de gaz chlorhydrique s'effectue suivant la règle de Markownikoff. La structure postulée pour ce produit est en accord avec la présence dans le spectre de RMN de signaux dus à 8 groupes méthyles et à 16 groupes méthylènes. Après 5 recristallisations dans l'acétone, l'activité spécifique de l'hexachlorure reste constante (environ 300 coups/min/mg), mais le point de fusion est de 142-144°. (Tableau 3).

TABLEAU 2. RÉSULTATS NUMÉRIQUES EN COUPS PAR MINUTE CORRESPONDANT À DES INCUBATIONS EN ANAÉROBIOSE DE COLONIES DE TISSUS DE TABAC (2,3 g DE POIDS SEC) EN PRÉSENCE DE 200  $\mu\text{C}$  D'ACÉTATE DE SODIUM  $\text{I}^{-14}\text{C}$

Substance	Temps de Marquage	
	(4 hr)	(12 hr)
Activité*		
Produit $\alpha$	130000	116000
Cycloarténol et du méthylène-24 cycloartanol	63000	44500
Méthyl-4 $\alpha$ -stérols	< 1000	2000
Phytostérols	< 1000	< 1000

\* En coups par mn et pour 1 mg de stérols (voir Tableau 1).

Il faut noter que: (a) Le spectre de RMN des cristaux provenant de la 5 ème recristallisation est identique à celui décrit plus haut, lequel correspond à un produit recristallisé une fois seulement.

(b) Une fraction aliquote des eaux-mères provenant de chaque recristallisation est également chromatographiée sur couche mince et donne sur l'autoradiogramme une tache

<sup>6</sup> I. M. HEILBRON, E. D. KAMM et W. M. OWEN, *J. Chem. Soc.*, 1631 (1926).

TABLEAU 3. ACTIVITÉS NUMÉRIQUES (EN COUPS/MIN/MG)  
CORRESPONDANT À LA RECRYSTALLISATION JUSQU'À ACTIVITÉ  
SPÉCIFIQUE CONSTANTE D'HEXACHLORURE DE SQUALENE

ReCRYSTALLISATION	ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE*	F
1	300	120-122°
2	260	129-131°
3	315	132-134°
4	275	136-138°
5	300	142-144°

\* Activités déterminées dans un spectromètre à scintillation liquide, de type Packard.

unique superposable à celle obtenue sur le chromatogramme après révélation à l'aide des réactifs classiques.<sup>7</sup>

En l'absence de produit pondéralement isolable, les techniques utilisées permettent d'affirmer la présence, dans les fractions correspondant au pic de radioactivité  $\alpha$ , d'un métabolite chromatographiquement et chimiquement identique au squalène. Les expériences rapportées dans le tableau 2 impliquent que le squalène est un précurseur des phytostérols dans les tissus de Tabac cultivés *in vitro*. Cette observation, de même que celles de Nicholas<sup>8</sup> dans le cas d'*Ocimum basilicum*, suggèrent que la fonction du squalène est identique dans les tissus végétaux et les tissus animaux.

#### *Utilisation de la Méthionine comme Précurseur*

Les techniques de marquage utilisées sont les mêmes que celles décrites dans la partie expérimentale pour l'acide acétique  $1\text{-}^{14}\text{C}$ . La figure 5 montre un diagramme d'élution correspondant à une incorporation de  $50 \mu\text{c}$  de méthionine- $^{14}\text{CH}_3$  pendant 4 hr dans les conditions habituelles.

On voit que: (a) On a un marquage spécifique des triterpènes tétracycliques cyclopropaniques, des méthyl- $4\alpha$ -stérols et des phytostérols; ni le squalène, ni aucun autre produit ne sont marqués et ceci est confirmé par les autoradiogrammes.

(b) La présence de radioactivité dans les phytostérols et dans les méthyl- $4\alpha$ -stérols est en plein accord avec le fait que ces substances comportent une chaîne alcoyle en C-24.

(c) Le marquage des triterpènes tétracycliques cyclopropaniques est peu important. On a procédé à l'acétylation de ces substances, et le mélange d'acétates a été chromatographié sur une colonne de silice imbibée de nitrate d'argent dans des conditions décrites précédemment,<sup>1</sup> permettant de séparer l'acétate de cycloartényle de l'acétate de méthylène-24 cycloartanyl. On a pu ainsi démontrer<sup>9</sup> que seul l'acétate de méthylène-24 cycloartanyl est radioactif, résultat pleinement en accord avec la structure de cette substance.

#### *Essai de Mise en Évidence du Lanostérol*

Le cycloarténol ne peut être séparé du lanostérol par chromatographie en couche mince ou sur colonne; ainsi la radioactivité des fractions contenant du cycloarténol pourrait

<sup>7</sup> P. BENVENISTE, A. DURR, L. HIRTH et G. OURISSON, *Compt. Rend.* **259**, 2005 (1964).

<sup>8</sup> H. J. NICHOLAS, *J. Biol. Chem.* **237**, 1485 (1962).

<sup>9</sup> P. BENVENISTE, Thèse de Dr. Ing., Strasbourg (1964).

provenir de traces de lanostérol fortement marqué. Pour répondre à cette question, on procède à une incorporation d'acétate de sodium  $1-^{14}\text{C}$  de 1 hr (figure 2) et on utilise la technique d'époxydation décrite précédemment.<sup>1</sup> Les fractions chromatographiques contenant le cycloarténol et le méthylène-24 cycloartanol, et éventuellement le lanostérol (2x) sont réunies, du cycloarténol froid est ajouté et le tout est acétylé dans les conditions habituelles.

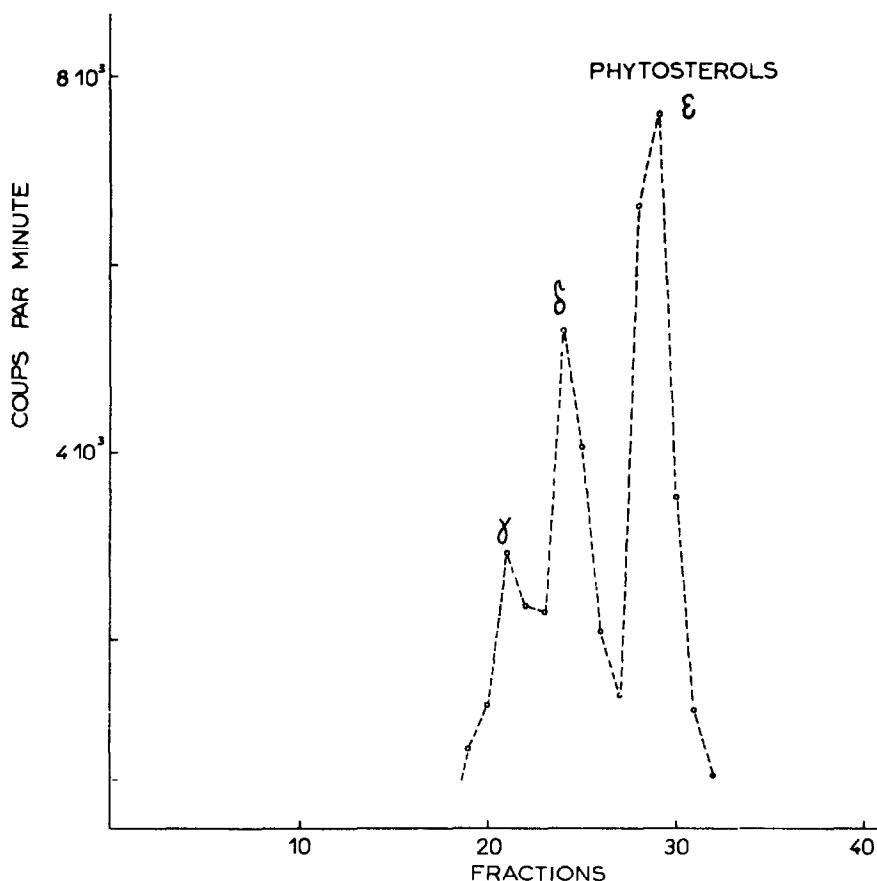


FIG. 5. DIAGRAMME D'ÉLUTION CORRESPONDANT À UNE INCUBATION DE 4 hr DE 6 COLONIES DE TISSUS DE TABAC EN PRÉSENCE DE 50  $\mu\text{C}$  DE MÉTHIONINE MÉTHYL  $^{14}\text{C}$ .

Le mélange des acétates est traité par un excès d'acide *p*-nitroperbenzoïque pendant 12 hr. Les époxydes obtenus sont ensuite chromatographiés sur une colonne de silice.

Un produit est d'abord élué ( $F = 141-142'$ ) et caractérisé comme étant l'acétate d'époxy-24:25 cycloartanyl par son spectre de RMN. Le second produit élué est l'acétate de diépoxy-8:9,24:25 lanostanyl ( $F = 192-194$ ).<sup>10</sup>

La radioactivité de l'ensemble des fractions chromatographiques est déterminée, ainsi que le poids de produit qu'elles renferment. On obtient ainsi le diagramme de la figure 6. Le pic de radioactivité obtenu correspond à l'acétate d'époxy-24:25 cycloartanyl. Enfin

<sup>10</sup> G. PONINET et G. OURISSON, *Phytochem.*, **4**, 799 (1965).

les fractions contenant l'acétate de diépoxy-8:9,24:25 lanostanyle ne présentent pas d'activité significative par rapport au bruit de fond.\*

L'ensemble de ces résultats a été contrôlé par chromatographie en couche mince, suivie de révélation par les réactifs habituels et par autoradiographie. Le lanostérol n'est donc pas décelable dans les constituants marqués du pic  $\gamma$ .

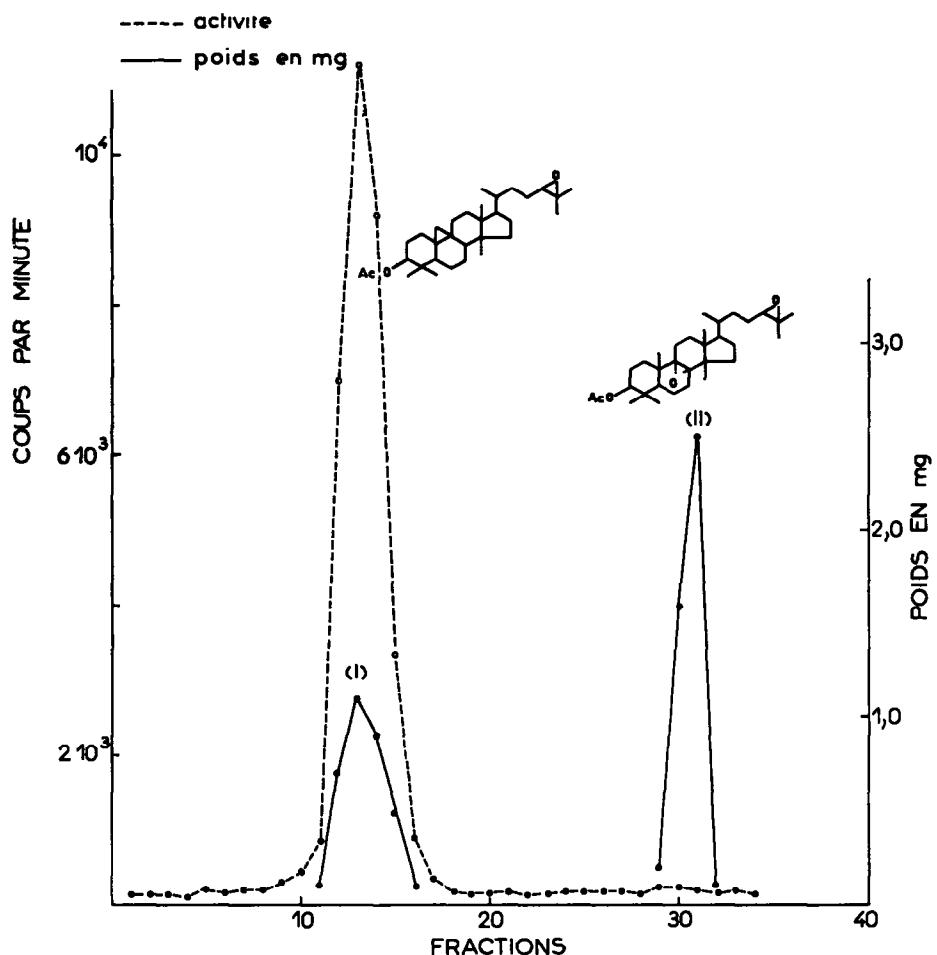


FIG. 6. DIAGRAMME D'ÉLUTION CORRESPONDANT À LA SÉPARATION DE L'ACÉTATE D'ÉPOXY-24:25 CYCLOARTANYLE (I) D'AVEC L'ACÉTATE DE DIÉPOXY-8:9,24:25 LANOSTANYLE (II).

#### *Essai de mise en évidence d'un renouvellement du cycloarténol*

On a procédé à une incorporation d'acétate de sodium  $1-^{14}\text{C}$  pendant 1 hr. Une partie des colonies a été prélevée (lot no. 1), et traitée de la manière habituelle; le reste des colonies a été lavé stérilement et transporté dans un milieu gélosé et contenant de l'acide acétique non radioactif (20 mg/l.). Au bout d'une semaine, la croissance étant décelable, des colonies

\* Dans cette expérience, l'acétate d'époxy-24:31 méthyl-24 cycloartanyle n'apparaît pas sur le diagramme d'éluion; il apparaît par contre nettement dans le diagramme provenant d'une incorporation de 4 hr, dans lequel le lanostérol est également absent.

sont alors prélevées et traitées de la manière habituelle (lot no. 2). Les diagrammes d'élution correspondant aux deux lots de colonies ont été obtenus et comparés, le tableau 4 rapporte les résultats numériques de cette expérience, ramenés à 1 mg de stérols isolés et dosés par la technique de Liebermann-Burchard.

TABLEAU 4. RÉSULTATS NUMÉRIQUES CORRESPONDANT À UNE INCUBATION DE 1 HR DE COLONIES DE TISSUS DE TABAC EN PRÉSENCE DE 50 D'ACÉTATE DE SODIUM  $1-^{14}\text{C}$  (LOT NO. 1) SUIVIE D'UN SÉJOUR D'UNE SEMAINE DANS UN MILIEU NON RADIOACTIF (LOT NO. 2)

Substance	Lot no. 1	Lot no. 2
Activité*		
Squalène	16600	< 2000
Cycloarténol et du méthylène-24 cycloartanol	60000	25500
Méthyl-4 $\alpha$ -stérols	7000	17400
Phytostérols	< 5000	245000

\* En coups par minute et pour 1 mg de stérols isolés, dosés par colorimétrie.

On voit que: (a) L'activité du squalène a considérablement diminué au cours du séjour sur milieu froid. (b) L'activité des triterpènes tétracycliques cyclopropaniques a nettement diminué. Les constituants de ce mélange ont été séparés de la manière décrite précédemment, et l'on a pu montrer que l'activité du méthylène-24 cycloartanol était restée sensiblement la même, alors que celle du cycloarténol avait fortement diminué. (c) Enfin, les phytostérols extraits du lot no. 1 sont peu actifs, alors que ceux extraits du lot no. 2 le sont fortement.

Ces résultats sont en faveur d'un renouvellement partiel du cycloarténol. Il faut noter cependant que si on effectue le bilan des activités de toutes les substances apparaissant dans les diagrammes d'élution, on voit que l'activité totale, ramenée à 1 mg de stérols, correspondant au lot no. 2, est nettement plus importante que celle correspondant au no. 1. Cette observation ne nous permet pas de tirer des conclusions définitives. Elle suggère en effet qu'une partie de l'acétate radioactif avait été *absorbé*, mais pas *incorporé*, dans les tissus du lot no. 1.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les tissus de Tabac cultivés *in vitro* ont été décrits précédemment, de même que les techniques d'extraction et de purification des stérols et des triterpènes.<sup>2</sup>

#### Utilisation des éléments marqués

L'acétate de sodium  $1-^{14}\text{C}$  et la méthionine  $^{14}\text{CH}_3$  sont des produits du C.E.A. (Saclay).

Quelques essais préliminaires ont été faits en ajoutant les précurseurs marqués au milieu de culture gélosé, mais dans toutes les expériences définitives on a effectué les incorporations dans un milieu liquide. Il a pu, en effet, être montré<sup>11</sup> que l'incorporation des précurseurs marqués était bien plus efficace dans un milieu liquide que dans un milieu gélosé, et que le métabolisme des tissus n'était pas modifié en ce qui concerne les stérols par un changement de milieu.

Les incorporations des précurseurs marqués sont donc effectuées en prélevant les colonies

<sup>11</sup> L. HIRTH, R. ENGLER et M. MILOT, *Ann. Nutrition Aliment.* 17B, 291 (1963).

du milieu gélosé (environ 6 colonies, représentant 0,8 à 1 g de poids sec), en les divisant en petits fragments dans une boîte de Pétri et en les maintenant pendant la durée choisie dans un erlenmeyer contentant 30 ml de milieu liquide additionné de 50  $\mu$ c de précurseur. Toutes les opérations sont effectuées stérilement. Le milieu liquide utilisé est, la gélose en moins, identique au milieu ordinaire. Les erlenmeyers sont disposés sur un appareil rotatif, de manière à assurer une oxygénation suffisante des cultures. La température d'incubation est de 25°. Des temps d'incubation variés sont utilisés, allant de 5 min à une semaine.

Une fois l'incubation terminée, les colonies sont prélevées par filtration, lavées rapidement, congelées dans un bain à -70° et lyophilisées. Le milieu de culture ainsi que les eaux de lavage sont introduits dans une fiole jaugée et une fraction aliquote est déposée sur des coupelles préalablement traitées au carbonate de sodium. On peut ainsi connaître l'activité du milieu après incubation.

Les incubations en anaérobiose ont été effectuées dans un dispositif analogue à celui décrit par Nickell et Tulecke.<sup>12</sup> Les colonies sont divisées en petits fragments et introduites aseptiquement dans un flacon à trois tubulures contenant le milieu liquide préalablement stérilisé. Le milieu est agité par un courant d'azote R, stérilisé par deux filtres "Millipore" (diamètre des pores 400  $\mu$ ) afin d'éviter toute contamination bactérienne. Le gaz carbonique radioactif produit par les tissus pendant l'incubation est capté dans un piège à soude.

Lorsque l'incubation est terminée, les colonies sont prélevées dans une chambre froide à -20° et traitées de la manière décrite plus haut.

#### *Traitement des tissus lyophilisés*

Les colonies lyophilisées (0,8 à 1 g de poids sec) sont extraites à l'éther de pétrole dans un petit soxhlet (60 ml). Après évaporation du solvant, l'extrait brut (10 mg) est saponifié par la potasse éthanolique (5 pastilles de potasse dans 5 ml d'éthanol), la réaction est conduite pendant 4 hr sous azote et en présence de traces d'hydroquinone. Le mélange réactionnel est dilué de son volume d'eau distillée et le tout est extrait à l'éther de pétrole de la manière habituelle.

#### *Chromatographie de l'insaponifiable*

La matière insaponifiable (4 mg) est chromatographiée sur une microcolonne (5 × 200 mm) contenant 1,5 g de silice. L'élation est assurée par des proportions croissantes d'éther dans l'éther de pétrole et des fractions de 5 ml sont collectées dans des tubes. L'activité de chaque fraction est déterminée grâce à un compteur "Nuclear Chicago". Pour cela, une partie aliquote (0,2 ml) de chaque fraction est déposée sur une coupelle de manière à former, après évaporation du solvant, une couche de produit très mince.

La concentration en stérols de chaque fraction a été déterminée grâce à la technique colorimétrique de Moore et Baumann<sup>13</sup> utilisant la réaction de Liebermann-Burchard. On a pu ainsi obtenir pour chaque expérience, un diagramme d'élation; ce diagramme comporte d'une part une courbe correspondant à l'activité de chacune des fractions, d'autre part une courbe correspondant à leur concentration en stérols.

La pureté radiochimique des substances contenues dans chacune des fractions éluées a été contrôlée au moyen de chromatographies en couche mince, réalisées en présence d'un témoin non radioactif, et révélées par les procédés conventionnels et par autoradiographie. Enfin, la

<sup>12</sup> L. G. NICKELL et W. TULECKE, *J. Bioch. Microb. Techn. Eng.* 2, 287 (1960).

<sup>13</sup> P. R. MOORE et C. A. BAUMANN, *J. Biol. Chem.* 195, 615 (1952).

technique d'autoradiographie, couplée à la chromatographie en couche mince fonctionnelle,<sup>14</sup> a permis de travailler sur des quantités non pondérales de produit. Pour cela, des films radiographiques "Kodirex" ont été appliqués contre les chromatogrammes et développés après un temps de pose d'environ deux semaines.

#### *Identification du Squalène*

Les fractions éluées à l'éther de pétrole lors de la chromatographie décrite au paragraphe précédent contiennent du squalène. Pour l'identification de ce dernier, deux systèmes de chromatographie en couche mince sont utilisées. Dans le premier, l'adsorbant est du gel de silice et l'éluant du cyclohexane pur. Dans le second on emploie du gel de silice imbibé de 5% de nitrate d'argent et un éluant comprenant 30% d'acétate d'éthyle dans le cyclohexane. La révélation des chromatogrammes est assurée d'une part par des vapeurs d'iode, d'autre part par autoradiographie.

#### *Préparation d'Hexachlorure de Squalène*

Du squalène (90 mg) est ajouté à du produit  $\alpha$  radioactif ( $\sim 100.000$  coups/min) en solution dans l'acétone anhydre; on fait barboter un courant de gaz chlorhydrique sec dans la solution refroidie à  $-5^\circ$ . Dans ces conditions, un dérivé est obtenu, et identifié comme étant l'hexachlorure de squalène:  $F=114-120^\circ$ ; spectre de RMN: signaux de 8 groupes méthyles à 1,51; 1,55 et 1,58 ppm., 16 groupes méthylènes à 1,71 ppm. On le recristallise (cf. Tableau 3).

#### *Séparation du Cycloarténol, du Méthylène-24 Cycloartanol et du Lanostérol*

On procède à une incorporation d'acétate de sodium  $1-^{14}\text{C}$  de 1 hr. Les fractions correspondant au pic  $\gamma$  du diagramme d'élution (Fig. 1) sont réunies (65.000 coups/min); du cycloarténol froid (11,7 mg) est ajouté et le tout est acétylé pendant 48 hr dans les conditions habituelles. On ajoute de l'acétate de lanostérol pur ( $F=132^\circ$ , 8,8 mg)\* et le milieu réactionnel est traité de la manière habituelle. Le mélange des acétates est chromatographié sur une colonne de silice (2 g). L'élution est assurée par 20% de benzène dans l'éther de pétrole.

Le mélange des acétates (45.000 coups/min) est traité par un excès (100 mg) d'acide *p*-nitroperbenzoïque pendant 12 hr. Le mélange réactionnel est traité de la manière habituelle, et le mélange des époxydes obtenus est chromatographié sur une colonne de silice (2 g). L'élution est assurée par un gradient d'éther dans l'éther de pétrole (Tableau 5).

TABLEAU 5

5% d'éther dans l'éther de pétrole	10 fractions	
10% d'éther dans l'éther de pétrole	10 fractions	produit I (30.000 coups min)
15% d'éther dans l'éther de pétrole	10 fractions	
20% d'éther dans l'éther de pétrole	10 fractions	produit II (100 coups min)*

\* Activité indistincte du bruit de fond.

#### *Acétate d'époxy-24:25 cycloartanyl*

Le produit I est recristallisé dans le méthanol,  $F=141-142^\circ$ . Spectre de RMN: 2 groupes méthyles sur époxyde à 1,25 et 1,31 ppm, un proton sur époxyde à 2,69 ppm.

\* Le lanostérol s'acétyle dans les mêmes conditions que le cycloarténol. Il ne peut donc pas y avoir un facteur sélectif à ce niveau.

<sup>14</sup> C. MATHIS et G. OURISSON. *J. Chromatog.* **12**, 94 (1963).

*Acétate de diépoxy-8:9,24 $\xi$ :25 lanostanyle*

Le produit II est recristallisé dans le méthanol,  $F = 192\text{--}194^\circ$ . Spectre de RMN: 2 groupes méthyles sur époxyde à 1,25 et 1,29 ppm 1 groupe méthyle déblindé (méthyle en 14) à 1,13 ppm, un proton sur époxyde à 2,63 ppm.

## CONCLUSIONS

En entreprenant ce travail sur les tissus de Tabac cultivés *in vitro*, nous nous proposions: (a) De voir si les voies biosynthétiques conduisant aux stérols des animaux étaient valables également, d'une manière générale, pour les tissus des plantes. (b) De voir si les différences morphologiques observées entre les tissus cultivés *in vitro* et les plantes dont ils dérivent pouvaient également se traduire par des différences biochimiques dans le métabolisme des stérols. Ceci impliquait l'établissement et la comparaison des chaînes biosynthétiques dans le Tabac et dans les tissus de Tabac cultivés *in vitro*. Le présent travail rapporte toutefois seulement les résultats d'une étude effectuée sur les tissus anergés de Tabac cultivés *in vitro*. Le second point fera l'objet d'études ultérieures. Des résultats récents obtenus avec les feuilles de Tabac ont montré que les observations faites avec les cultures de tissus semblent avoir un caractère général. Il n'y a pas de lanostérol décelable dans les feuilles de Tabac mais le cycloarténol y est présent.<sup>15,16</sup>

Nous avons pu identifier, en plus des phytostérols, le squalène, le cycloarténol, le méthylène-24 cycloartanol, le méthyl-4 $\alpha$ -stigmastadiène-7,24-(28)-ol-3 $\beta$ , ainsi que son compagnon en série ergostanique, et déterminer l'ordre dans lequel ces produits se marquent: squalène ..., > cycloarténol, > méthyl-4 $\alpha$ -stigmastadiène-7,24-(28)-ol-3 $\beta$  ..., > phytostérols.

*L'ordre de marquage* de ces substances est en accord avec le schéma biosynthétique classique établi dans le cas des stérols animaux. D'autre part, l'identification du méthyl-4 $\alpha$ -stigmastadiène-7,24-(28)-ol-3 $\beta$ , ainsi que de son compagnon en série ergostanique, confirme que la route conduisant aux phytostérols à partir d'un triterpène tétracyclique (qui pourrait être le cycloarténol) implique la perte successive d'un méthyle en 14 et d'un méthyle en 4.

Cependant si la voie biosynthétique conduisant aux stérols des tissus de Tabac cultivés *in vitro* présente des analogies profondes avec celles des tissus animaux, elle se caractérise par des différences appréciables; en effet, l'un des intermédiaires les plus importants de la chaîne biosynthétique animale, le lanostérol, n'existe pas dans les cultures, du moins pas à des concentrations décelables par nos méthodes les plus sensibles. On est donc conduit à envisager un intermédiaire métabolique nouveau; *cet intermédiaire pourrait être le cycloarténol*, qui se marque très vite et très intensément, et dont la concentration très faible dans les cultures implique l'existence d'un renouvellement. Les résultats d'expériences préliminaires rapportées sont en faveur de ce point de vue, de même que l'ensemble des études effectuées sur les produits naturels des végétaux, qui ont montré que le cycloarténol est un constituant de beaucoup d'espèces végétales alors que le lanostérol y est très rare.<sup>17</sup>

Il faut noter par ailleurs que, d'une part, la formation du cycle propanique en 9:19 correspond à un mécanisme de cyclisation du squalène légèrement modifié seulement par rapport à ce qu'il est dans le cas du lanostérol, mais tout aussi probable, et que d'autre part, l'ouverture du cycle propanique est réalisée très facilement *in vitro* par traitement acide.<sup>18</sup> On peut donc

<sup>15</sup> J. D. EHRHARDT, L. HIRTH et G. OURISSON, *Compt. Rend.*, sous presse.

<sup>16</sup> W. W. REID, Communication personnelle.

<sup>17</sup> G. OURISSON, P. CRABBÉ et O. RODIG, *Tetracyclic Triterpenes*. Hermann, Leeds (1964).

<sup>18</sup> H. R. BENTLEY, J. A. HENRY, D. S. IRVINE et F. S. SPRING, *J. Chem. Soc.* 3673 (1953).

imaginer l'existence, dans les tissus de Tabac, d'enzymes assurant l'ouverture du cycle propanique, avant ou après les déméthylations conduisant aux phytostérols. D'ailleurs l'existence, dans de nombreux végétaux répartis dans plusieurs familles, de dérivés du curbitane dont le plus simple est la bryogénine, correspondant à l'autre ouverture possible du cycle propanique et la structure du pollinastanol, déméthylé en 4 mais "encore" cyclisé en 9:19, deviendraient plus aisément compréhensibles.<sup>19,20</sup> Par ailleurs, le comportement du cycloarténol est différent de celui du lanostérol, dans le cas des tissus animaux. En effet, si la biosynthèse du cycloarténol dans les tissus anergiés de Tabac est très rapide, comme celle du lanostérol dans le foie de rat, son renouvellement semble beaucoup plus lent: il y a donc là un problème biochimique dont la solution définitive nécessitera des études approfondies.

Les tissus de Tabac cultivés *in vitro* se sont ainsi montrés un matériel favorable, tant sur le plan technique que sur le plan biochimique, pour l'étude des phytostérols. Il est permis d'espérer aborder ainsi le problème de la signification biochimique des phytostérols, qui est encore indéterminée, car si l'anabolisme de ces derniers est en passe d'être connu, leur catabolisme n'a fait pour le moment l'objet d'aucune recherche.

*Remerciements* --Nous tenons à remercier Mademoiselle A. Durr pour sa précieuse collaboration.

<sup>19</sup> G. BIGLINO, J. M. LEHN et G. OURISSON, *Tetrahedron Let.* 1681 (1963).

<sup>20</sup> M. BARBIER et M. F. HÜGEL, *Bull. Soc. Chim. France* 2012 (1964).