

LA BIOSYNTHESE DES STÉROLS DANS LES TISSUS DE TABAC CULTIVÉS *IN VITRO**—I.

ISOLEMENT DE STÉROLS ET DE TRITERPÈNES

P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON

Département des Applications Biologiques du Centre de Recherches Nucléaires,
Strasbourg-Cronembourg, France

(Reçu le 24 Juin 1965)

Résumé—Les stérols et triterpènes suivants sont identifiés dans les tissus de Tabac cultivés *in vitro*: campesterol, β -sitostérol, stigmasterol, cycloarténol, méthylène-24 cycloartanol, citrostadiénol et 28-nor citrostadiénol.

Abstract—The following sterols and triterpenes have been identified in tobacco tissues grown *in vitro*: campesterol, β -sitosterol, stigmasterol, cycloartenol, 24-methylenecycloartanol, citrostadienol and 28-nor citrostadienol.

INTRODUCTION

LES CULTURES de tissus de plantes, obtenues simultanément en 1939 par Gautheret¹ et White,² constituent un matériel précieux d'études en physiologie végétale.³ Cependant, sur le plan biochimique, le nombre de travaux effectués à ce jour sur les tissus de plantes cultivées *in vitro* est resté très restreint. Le métabolisme des glucides,⁴ celui des composés azotés et des acides nucléiques,⁵⁻⁷ ont toutefois été étudiés; il a d'autre part été démontré que certaines cultures de tissus étaient capables d'héberger des virus⁸.

Il ne semble cependant pas exister d'études effectuées à l'aide de tissus de plantes cultivés *in vitro*, sur le métabolisme de certains produits naturels tels que les alcaloïdes, les terpènes et les stérols. Pourtant, les cultures de tissus constituent un matériel très propice aux études biochimiques; peu ou pas différenciés³, ces tissus croissent le plus souvent sur un milieu synthétique, et toujours dans des conditions de stérilité rigoureuse. Ils forment un matériel reproductible, peu sensible aux influences saisonnières. En outre, les problèmes de pénétration de substances dont on voudrait étudier le métabolisme, et ceux de leur transport aux sites actifs, semblent devoir être plus simples que dans le cas des plantes.

Les travaux récents effectués sur des tissus de *Dioscorea composita* et d'*Agave tumeyana* cultivés *in vitro* ont montré que ces tissus ne contenaient pas les sapogénines à noyau stérolique (diosgénine ou hécogénine) rencontrés dans les plantes dont ils proviennent.⁹ Cette observation montre que les tissus cultivés *in vitro* représentent probablement un matériel original et

* 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".

¹ R. J. GAUTHERET, *Compt. Rend.* **208**, 118 (1939).

² R. WHITE, *Am. J. Bot.* **26**, 59 (1939).

³ R. J. GAUTHERET, *La culture des tissus végétaux*. Masson, Paris (1959).

⁴ A. GORIS, *Ann. Biol.* **30**, 297 (1954).

⁵ C. LIORET, *Compt. Rend.* **244**, 2171 (1957).

⁶ L. HIRTH, Thèse Dr. ès Sci., Paris (1958).

⁷ H. DURANTON, Thèse Dr. ès Sci., Paris (1959).

⁸ G. SEGRÉTAINE, *Compt. Rend.* **226**, 594 (1948).

⁹ L. H. WEINSTEIN, L. G. NICKELL, H. J. LAURENCOT, JR. et W. TULECKE, *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **20**, (3), 259 (1959).

simplifié par rapport à la plante d'origine. Mais il est permis d'espérer que ce matériel simplifié, inadéquat pour l'étude de certains problèmes, est au contraire très favorable pour celle de questions qu'il faudra naturellement choisir avec discernement. C'est ainsi que, dans le cas qui nous occupe, le choix de l'étude des stéroïdes présents dans les cultures de tissus de Tabac a été heureux. Il a permis de mettre en évidence des corps qui, comme nous l'avons constaté ultérieurement, auraient été beaucoup plus difficiles à étudier si nous avions utilisé seulement les divers organes de la plante entière.

Nous renvoyons à des mises au point récentes pour la discussion des étapes conduisant de l'acide acétique, par l'intermédiaire de l'acide mévalonique, du squalène et du lanostérol, au cholestérol.¹⁰⁻¹⁶ Ces étapes ont été mises en évidence grâce aux travaux effectués sur le foie de rat et la levure. On a extrapolé le schéma ainsi obtenu à tous les organismes capables de fabriquer des stérols, et notamment aux plantes. Cette dernière hypothèse est appuyée par certaines expériences. Ainsi, Battersby et Parry¹⁷ ont montré que la distribution de la radioactivité dans le β -sitostérol formé par *Rauwolfia serpentina* est compatible avec l'hypothèse de la voie acétate-mévalonate-squalène, quand on fournit à la plante de l'acétate et du mévalonate marqués. Nes et al.^{18,19} ont étudié l'incorporation d'acide mévalonique dans le β -sitostérol et la β -amyrine par les embryons de pois. Du squalène radioactif a pu être isolé au cours de ces expériences. Nicholas²⁰, étudiant l'incorporation d'acétate $1-^{14}\text{C}$ par les feuilles, tiges, fleurs de *Salvia officinalis*, a montré que ce sont les fleurs qui produisent le plus activement le β -sitostérol; cet auteur a mis également en évidence une formation, et selon lui un renouvellement des triterpènes pentacycliques dans les trois organes. Heftmann et Bennett²¹ ont étudié, avec les tissus de *Dioscorea spiculiflora*, l'incorporation d'acide mévalonique $2-^{14}\text{C}$ dans quatre sapogénines à noyau stérolique (diosgénine, yamogénine, gentrogénine et corrélogénine) et dans trois stérols (β -sitostérol, stigmastérol et cholestérol).

Goodwin et al.^{22,23} ont étudié la biosynthèse des stérols végétaux en liaison avec la biosynthèse des caroténoïdes, de la plastoquinone et de l'ubiquinone. Ils ont montré que les stérols et l'ubiquinone, contrairement à la plastoquinone et aux caroténoïdes, ne sont pas synthétisés dans les chloroplastes. Goodwin et Williams²⁴, d'autre part, rapportent dans une note préliminaire, l'isolement de stérols, de caroténoïdes et de xanthophylles dans les tissus de Rosier cultivés *in vitro*. Enfin, la biosynthèse de la digitoxigénine a été étudiée dans la Digitale.²⁵⁻²⁷

¹⁰ E. HEFTMANN, *Ann. Rev. Plant Phys.* **14**, 225 (1963).

¹¹ T. T. TCHEN, *Metabolic Pathways*, p. 389. Academic Press, N.Y. (1960).

¹² J. W. CORNFORTH et G. POPIAK, *Adv. Enzymol.* **22**, 281 (1960).

¹³ O. KARLSTROM, *Svensk Kemisk Tidskrift* **74**, 11 (1962).

¹⁴ P. CRABBI et G. OURISSON, *Biogénèse des terpènes et stérols*, *Ind. Chim. Belge* **22**, 1311 (1957).

¹⁵ J. W. CORNFORTH, R. H. CORNFORTH, M. G. HORNING, A. PELTIER et G. POPIAK, *Ciba Foundation Symp.*, p. 119. Churchill, London (1959).

¹⁶ D. ARIGONI, *Ciba Foundation Symp.*, p. 231. Churchill, London (1959).

¹⁷ A. R. BATTERSBY et G. V. PERRY, *Tetrahedron Let.* **14**, 787 (1964).

¹⁸ D. J. BAISTED, E. CAPSTAC K et W. NES, *Biochemistry* **1**, 537 (1962).

¹⁹ E. CAPSTAC K, D. J. BAISTED, W. W. NEWSCHWANDER, G. BLONDIN, N. L. ROSIN et W. R. NES, *Biochemistry* **1**, 1178 (1962).

²⁰ H. J. NICHOLAS, *J. Biol. Chem.* **237**, 1476 (1962).

²¹ R. D. BENNETT et E. HEFTMANN, *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 74 (1963).

²² E. I. MERCER, et T. W. GOODWIN, *Biochem. J.* **88**, 2, 46 p (1963).

²³ D. R. THRELFALL, W. T. GRIFFITH et T. W. GOODWIN, *Biochem. J.* **92**, 56 p (1964).

²⁴ T. W. GOODWIN et B. L. WILLIAMS, *Phytochem.* **4**, 81 (1965).

²⁵ H. GREGORY et E. LEETE, *Chem. and Ind.* **40**, 1242 (1960).

²⁶ J. W. EUW et T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta* **47**, 711 (1964).

²⁷ R. TSCHESCHE et G. LIENEFWISS, *Z. Naturforsch.* **19b**, 265 (1964).

L'ensemble de ces travaux a permis de montrer que les stérols ou les triterpènes des plantes deviennent radioactifs lorsque de l'acide acétique ou de l'acide mévalonique marqué sont administrés comme précurseurs. Les techniques utilisées, qui comportaient des marquages généralement longs, n'ont cependant pas permis de mettre en évidence les intermédiaires de la biosynthèse des phytostérols, sauf le squalène.*

Cependant, les stérols des végétaux présentent certaines particularités. D'une part, la présence d'un ou de deux carbones supplémentaires en C-24 est un phénomène très général. Ce groupement provient d'une réaction de transméthylation caractéristique des tissus de plante^{28,29}. D'autre part, l'isolement de toute une série de triterpènes tétracycliques différents du lanostérol dans les plantes (cf. ³⁰), ainsi que la mise en évidence de produits de déméthylation inattendus de ces derniers, tels que le cycloeucalénol³⁰, le pollinastanol³¹ ou la macdougaline³², pouvaient laisser prévoir l'existence, dans les plantes, de voies biosynthétiques différentes de celles existant chez les animaux.

L'étude des voies métaboliques conduisant aux phytostérols nécessitait l'utilisation de marquages courts, ainsi que celle d'un matériel végétal approprié à ce type de marquage, ce qui nous a conduits à étudier les perspectives offertes par la culture des tissus végétaux *in vitro*.

Dans un premier temps, nous nous proposons d'étudier les constituants stéroliques de quelques tissus végétaux cultivés *in vitro*. Dans un deuxième temps, nous avons recherché les relations métaboliques existant entre ces différents constituants. Le présent article rend compte des résultats concernant le premier point.

RÉSULTATS

Mise en Évidence et Identification des Stérols et des Triterpènes

La fraction insaponifiable de colonies de Tabac lyophilisées a donné, par chromatographie sur silice, quatre "produits" hétérogènes appelés A, B, C et D.

Le produit A ne donne pas de réaction au tétranitrométhane; les spectres i.r. et de RMN indiquent la présence d'un mélange d'hydrocarbures saturés.

Le produit D est homogène en chromatographie en couche mince. Après recristallisation dans le méthanol, on obtient des cristaux, $F = 140-141^\circ$, $[\alpha]_D = -37^\circ$. Ce produit apparaît, en RMN, en i.r. et par son spectre de masse, comme un mélange, que nous n'avons pas pu résoudre en ses constituants. Il a cependant été aisé d'identifier les trois constituants majeurs de ce mélange, en comparant les propriétés spectrales des acétates avant et après hydrogénation (Fig. 1) et grâce à la chromatographie en phase gazeuse. Le produit D est constitué d'environ 37% de campesterol (I), 37% de β -sitostérol (II) et 25% de stigmastérol (III)^{33,34} (Tableau 1), plus un constituant mineur, dont la masse moléculaire correspond à celle du cholestérol.

* Bennett et Heftmann viennent de démontrer l'incorporation de squalène dans le β -sitostérol, par les plantules de *Pharbitis nil* Chois.⁵⁰

²⁸ S. BADER et D. ARIGONI, *Proc. Chem. Soc.*, 16 (1964).

²⁹ V. R. VILLANUEVA, E. LEDERER et M. BARBIER, *Bull. Soc. Chim.*, 1423 (1964).

³⁰ G. OURISSON, P. CRABBÉ et O. R. RODIG, *Tetracyclic Triterpenes*. Hermann, Leeds (1964);

G. OURISSON, P. CRABBÉ, *Les triterpènes tétracycliques*. Hermann, Paris (1961).

³¹ M. BARBIER et M. F. HÜGEL, *Bull. Soc. Chim.*, 2012 (1964).

³² C. DJERASSI, J. C. KNIGHT et D. I. WILKINSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 835 (1963).

³³ P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, *Compt. Rend.*, 258, 5515 (1964).

³⁴ P. BENVENISTE, Thèse Dr. Ing., Strasbourg (1964).

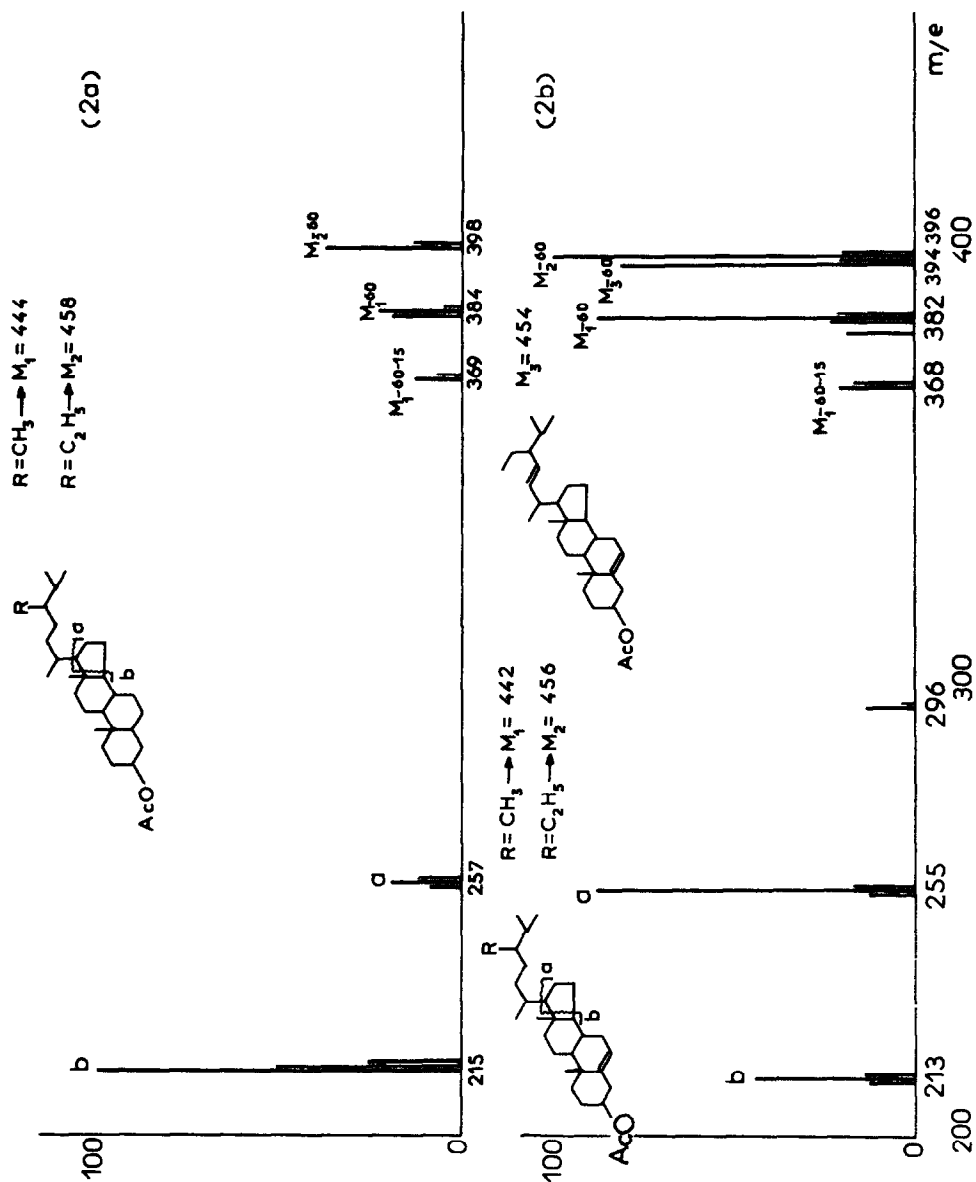
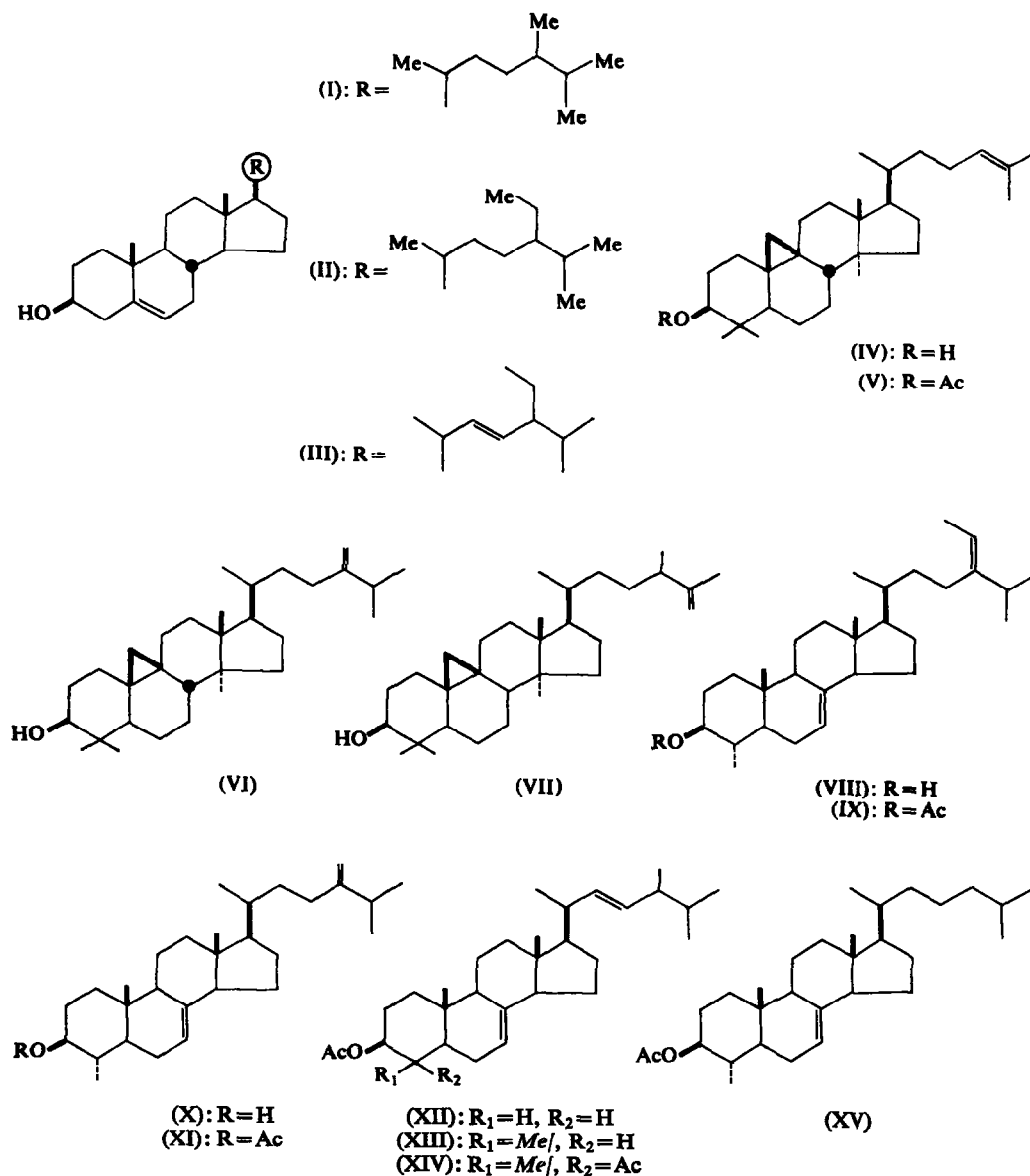


FIG. 1. (a) SPECTRES DE MASSE DES ACÉTATES DE PHYTOSTÉROLS HYDROGÉNÉS; (b) SPECTRES DE MASSE DES ACÉTATES DE PHYTOSTÉROLS AVANT HYDROGÉNATION.

TABLEAU 1



La substance B est chromatographiquement identique au lanostérol; son point de fusion, très bas, indique la présence d'un mélange, aussi avons-nous procédé à son acétylation. L'acétate obtenu a été chromatographié sur une colonne de silice imbibée de nitrate d'argent: deux acétates, que nous appellerons B1 et B2 ont pu être ainsi séparés.

L'acétate du produit *BI*, recristallisé dans le méthanol, fond à 127–129° et a même R_f en chromatographie en couche mince que l'acétate de lanostéryle. La masse moléculaire de cette substance, déterminée par spectrométrie de masse, est identique à celle de l'acétate de lanostéryle ($m/e = 468$) mais les fragmentations principales sont différentes (Tableau 2).

TABLEAU 2. PRINCIPALES FRAGMENTATIONS APPARAISSANT DANS LES SPECTRES DE MASSE DES ACÉTATES DES PRODUITS B1 ET B2 ET DE L'ACÉTATE DE LANOSTÉRYLE

Acétate du produit B1 (<i>m/e</i>)		Acétate du produit B2 (<i>m/e</i>)		Acétate de lanostéryle* (<i>m/e</i>)	
468	M' (pic moléculaire)	482	M'' (pic moléculaire)	468	M (pic moléculaire)
408	M'-60	422	M''-60	408	M-60
339	—	343	—	—	—
297	<i>a</i>	300	<i>h</i>	—	—
286	<i>b</i>	297	<i>a</i>	—	—
271	<i>h</i> -15	285	<i>h</i> -15	—	—

* Aucun pic correspondant aux fragmentations *a* et *b* n'apparaît dans le spectre de masse de l'acétate de lanostéryle.

Etant donné que nous ne disposions que de quelques mg de ce produit, nous avons utilisé la chromatographie en couche mince "fonctionnelle"³⁵, afin d'obtenir des renseignements supplémentaires. C'est ainsi que le comportement vis-à-vis de l'acide *p*-nitroperbenzoïque a été étudié. L'acétate de lanostéryle (exempt du dérivé dihydrogéné) donne d'abord un monoépoxyde, puis le diépoxyde³⁶.

L'acétate du produit B1 ne donne, dans les mêmes conditions, qu'un seul époxyde. Le *R'* de ce dernier en chromatographie en couche mince est identique à celui du monoépoxyde de l'acétate de lanostéryle; c'est donc certainement un monoépoxyde.

Le produit B1 a donc probablement une seule double liaison; comme il a même masse moléculaire que le lanostérol, il contient donc un cycle supplémentaire, comme le cycloarténol IV. L'acétate du produit B1 a donc été comparé avec un échantillon d'acétate de cycloartényle V fourni par le Professeur D. Arigoni; les spectres i.r. des deux produits sont superposables, ainsi que leurs spectres de RMN (effectués dans des microcellules).³⁷

Enfin, une étude effectuée par M. H. E. Audier,³⁸ sur une série de triterpènes tétracycliques possédant un cycle propanique en 9: 19, a mis en évidence quelques fragmentations caractéristiques de ces systèmes, permettant d'identifier le cycle A d'une part et également la chaîne latérale.

Le spectre de masse du produit B1 est identique à celui de l'acétate de cycloartényle. Le pic à *m/e* 297 correspond à la fragmentation *a*. Le pic à *m/e* 286 correspond à la fragmentation *b*. La substance B1 est donc le cycloarténol: l'identification a été réalisée avec 7 mg de produit en tout.

La substance qui accompagne le cycloarténol au cours de l'extraction se trouve en concentration encore plus faible. Les mêmes techniques que celles décrites ci-dessus ont été utilisées pour son identification. Ainsi, l'action de l'acide *p*-nitroperbenzoïque sur l'acétate du produit B2 ne met en évidence qu'une seule double liaison, et les spectres i.r. et de RMN indiquent que cette double liaison correspond à un groupe méthylène. Enfin, le spectre de masse (Tableau 2) indique une masse moléculaire correspondant à la formule C₃₁H₅₂O et présente les fragmentations caractéristiques d'un triterpène tétracyclique cyclopropanique dont la chaîne latérale posséderait le groupement méthylène ainsi qu'un atome de carbone

³⁵ C. MATHIS et G. OURISSON, *J. Chromatog.* **12**, 94 (1963).

³⁶ D. CASE et G. PONSINET, Résultats non publiés.

³⁷ P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, *Compt. Rend.* **259**, 2284 (1964).

³⁸ H. E. AUDIER, Résultats non publiés.

supplémentaire: le pic *a* correspondant à la rupture de la chaîne latérale se trouve à *m/e* 297, et le pic *b* correspondant au clivage des liaisons 9:19, 9:10 et 5:6, est déplacé à *m/e* 300.

On sait par ailleurs, que la ramification en C-24 de certains stéroïdes et triterpénoïdes des végétaux provient de la méthionine^{18,29,30}. Nous avons pu montrer que le *produit B2* incorpore la méthionine ¹⁴CH₃, alors qu'aucune activité n'apparaît au niveau du cycloarténol³⁹; ceci suggère que le carbone supplémentaire de la chaîne latérale du *produit B2* doit se trouver en C-24. La structure la plus probable pour le *produit B2* est donc celle du méthylène-24 cycloartanol (VI) (le cyclolaudénol, son isomère Δ^{25} (VII) étant éliminé du fait de l'absence dans le spectre de R.M.N. de signal d'un groupe méthyle sur double liaison)⁴⁰.

L'acétate du *produit B2* a donc été comparé avec un échantillon d'acétate-3 β de méthylène-24 cycloartanyle (*F* = 122°), que nous a fourni généreusement le Dr. G. Ohta. Le comportement de ces substances en chromatographie en couche mince fonctionnelle est identique vis-à-vis de réactifs tels que l'acide *p*-nitroperbenzoïque et le tétr oxyde de ruthénium. Enfin leurs spectres de masse sont identiques. Le *produit B2* est donc le méthylène-24 cycloartanol; l'identification a été réalisée avec 4 mg de produit.

Il faut noter que l'isolement de quantités suffisantes des *substances B1* et *B2* a nécessité de nombreuses extractions de tissus de Tabac cultivés *in vitro*; en aucun cas nous n'avons pu mettre en évidence la moindre trace de lanostérol.

La *substance C* est homogène en chromatographie en couche mince est son *R_f* est identique à celui du lophénol (XV, H au lieu de Ac)⁴¹, et en général à celui des méthyl-4 α stérols dont nous avons disposé; recristallisée dans le méthanol, elle fond à 160–164°. Le spectre de masse montre que l'on affaire en fait à un mélange de deux substances dont les formules brutes sont respectivement C₃₀H₅₀O et C₂₉H₄₈O. Pour des squelettes tétracycliques, ces formules correspondraient à la présence de deux doubles liaisons.

On a procédé à l'acétylation de ce mélange, et les acétates obtenus ont été chromatographiés sur une colonne de silice imbibée de nitrate d'argent. Deux *substances C1* et *C2* ont ainsi été isolées sous forme de leurs acétates. Ces derniers sont indiscernables en chromatographie en couche mince, même quand le gel de silice contient 5 % de nitrate d'argent.

Les *produits C1* et *C2* se comportent d'une manière identique vis-à-vis de l'acide *p*-nitrobenzoïque: après une heure de réaction, on observe la formation d'une substance dont le *R_f* correspond à celui d'un diépoxyde. Avec des temps de réaction plus courts, on observe la formation d'au moins deux produits, pouvant être des monoépoxydes d'après leur *R_f*.

Le spectre i.r. de l'acétate de *C1* comporte une band à 817 cm⁻¹, caractéristique d'une double liaison trisubstituée. Celui de l'acétate de *C2* comporte deux bandes à 883 et 1635 cm⁻¹, caractéristiques d'un groupement méthylène. Les spectres de masse abrégés des deux acétates sont rapportés dans la Fig. 2 et dans le Tableau 3.

On voit que: (a) Les fragmentations des *produits C1* et *C2* sont comparables en ce sens qu'à chaque pic de *C1* de *m/e* inférieur à 370 correspond un pic *identique* pour *C2*; les pics de *m/e* supérieurs à 370 sont par contre *décalés* de 14 unités (soit de CH₂). (b) L'allure du spectre de masse permet de postuler pour *C1* et *C2* les structures VIII et X.

En effet: 1.—La fragmentation *a* correspond à l'élimination de la chaîne latérale. Elle donne ici un pic à *m/e* 269, alors qu'il se trouve à *m/e* 255 dans le cas du cholestérol⁴². 2.—De

³⁹ P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, *Phytochem.* **5**, 45 (1966).

⁴⁰ G. BERTI, F. BOLTARI, B. MACCHIA, A. MASSILI, G. OURISSON et H. PIOTROWSKA, *Bull. Chem. Soc.* 2359 (1964).

⁴¹ C. DJERASSI, G. W. KRAKOWER, A. J. LEMIN, K. H. LIU, J. S. MILLS et R. VILLOTTI, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6284 (1958).

⁴² H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI et D. H. WILLIAMS, *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*, Vol. II. Holden Day, San Francisco (1964).

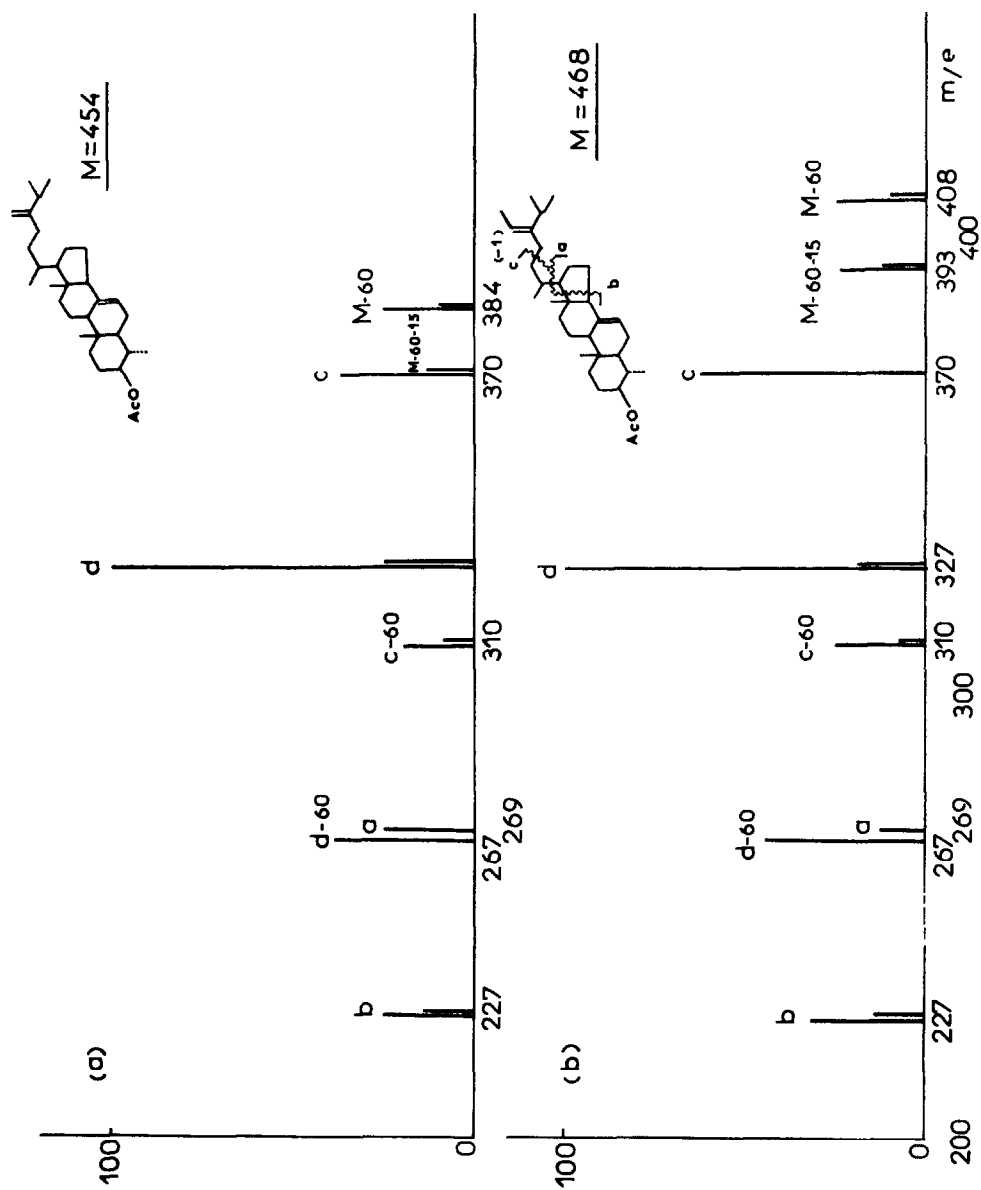


FIG. 2. (a) SPECTRE DE MASSE DE L'ACÉTATE DU PRODUIT C2; (b) SPECTRE DE MASSE DE L'ACÉTATE DU PRODUIT C1.

TABLEAU 3. PRINCIPALES FRAGMENTATIONS APPARAISSANT DANS LES SPECTRES DE MASSE DES ACÉTATES DES C1 ET C2

<i>m/e</i>	Acétate de C1	Acétate de C2
468	Pic moléculaire M'	
454		Pic moléculaire M''
408	M'-60	
394		M''-60
370	<i>c</i>	<i>c</i>
327	<i>d</i>	<i>d</i>
310	<i>c</i> -60	<i>c</i> -60
269	<i>a</i>	<i>a</i>
267	<i>d</i> -60	<i>d</i> -60
227	<i>b</i>	<i>b</i>

même, la fragmentation *b*, qui correspond au clivage du cycle D en 13 et en 14^{42, 43} donne ici un pic à *m/e* 227, alors qu'il se trouve à *m/e* 213 dans les cas du cholestérol.

3.—La fragmentation *c* est mise en évidence chez les stérols possédant un groupement éthylidène ou méthylène en C₂₄.³⁸ Elle donne ici un pic à *m/e* 310 alors qu'il se trouve à *m/e* 296 dans le cas du fucostérol, non méthylé en C-4 (Fig. 3). Nous montrerons dans un

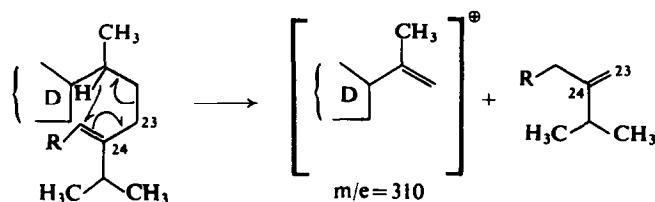


FIG. 3.

article ultérieur que ces produits sont biosynthétisés avec incorporation de méthionine. Ce résultat est pleinement en accord avec les groupements éthylidènes ou méthylènes mis en évidence en position C-24 par la fragmentation *c*.³⁹

4.—Le pic à *m/e* 327 (et son homologue *d*-60 à *m/e* 267) est de loin le pic de base. Ce pic semble être caractéristique des Δ^7 -stérols³⁸. Les spectres de masse de produits XII, XIII, XIV et XV* possèdent tous en effet des pics homologues du pic à *m/e* 327.

L'acétate du produit C1 a été comparé à un échantillon d'acétate-3 β de méthyl-4 β stigmastadiène-7,24 (28)-yle isolé par le Dr. K. Schreiber de *Solanum tuberosum*⁴⁴. D'une part, le comportement des deux substances en chromatographie en couche mince fonctionnelle est identique vis-à-vis de l'acide *p*-nitroperbenzoïque et de l'anhydride sélénieux en solution acétique³⁴. D'autre part, leurs spectres de masse sont identiques. Le produit C1 est donc le méthyl-4 α stigmastadiène-7,24 (28) ol-3 β .

Nous avons vu que le produit C2 est chimiquement et chromatographiquement indiscernable du produit C1: de plus, il donne en spectrométrie de masse les mêmes fragmentations

* Nous remercions le Dr. F. Lederer, le Dr. J. B. Thomson et le Professeur C. Djerassi pour le don de ces quatre produits.

⁴³ K. BIEMANN, *Mass Spectrometry*. McGraw-Hill, N.Y. (1962).

⁴⁴ K. SCHREIBER et G. OSSKE, *Tetrahedron* 20, 2575 (1964).

de *m/e* inférieur à 370 que le *produit C1*. La différence de masse moléculaire de 14 unités et la présence d'un groupement méthylène dans le spectre i.r. sont en faveur de la structure IX proposée ci-dessus. Le *produit C2* serait donc le méthyl-4 α ergostadiène-7,24 (28)ol-3 β . Quoique soupçonné dans le mélange stérolique de *Solanum tuberosum*⁴⁴, ce produit n'a jamais été isolé: il n'a, par conséquent, pas pu être comparé avec un échantillon authentique.

La structure de la substance isolée par Schreiber est identique à celle de citrostadiénol précédemment isolé par Sondheimer et Mazur de l'essence d'orange⁴⁵. Cependant, ces deux substances ont un pouvoir rotatoire nettement différent; on a donc avancé que la configuration du groupement éthylidène en C-24 ne serait pas identique dans les deux substances.⁴⁴

Etant donné que nous n'avons pas fait de mesures de pouvoir rotatoire sur le *produit C1* nous ne pouvons pas affirmer si ce dernier est identique au citrostadiénol ou à la substance isolée par Schreiber.

DISCUSSION

Le tableau 4 indique l'ensemble des substances isolées des tissus de Tabac cultivés *in vitro*.

TABLEAU 4. POINTS DE FUSION DES STÉROLS ET TRITERPÈNES ISOLÉS DES TISSUS DE TABAC CULTIVÉS *in vitro* ET POINTS DE FUSION DE LEURS ACÉTATES

	Poids*	F	F. de l'acétate
Phytostérols { Cholestérol Campestérol Stigmastérol β -sitostérol }	150 mg	140-141	136
Cycloarténol	10 mg	—	127-129
Méthylène-24 cycloartanol	4 mg	—	122
Méthyl-4 α -stigmastadiène-7,24-(28)-ol-3 β	6 mg	162-164	141-143°
Méthyl-4 α -ergostadiène-7,24-(28)-ol-3 β	4 mg	—	—

* Pour 100 g de tissus lyophilisés.

Les remarques suivantes doivent être faites:

(1) Le solanésol, polyterpénol isolé des feuilles de Tabac⁴⁶ où il se trouve en quantités importantes, n'a pas pu être mis en évidence lors de l'extraction décrite ci-dessus. Les tissus anergisés de Tabac sont en effet, nous l'avons dit, biochimiquement très différents de ceux de la plante. Par contre, les tissus de Tabac cultivés *in vitro* sont relativement riches en β -sitostérol, campestérol et stigmastérol, et représentent un matériel convenable pour l'étude de la biosynthèse des phytostérols. La présence de quantités beaucoup plus faibles de triterpènes tétracycliques cyclopropaniques, ainsi que de triterpènes tétracycliques partiellement déméthylés, peut suggérer une participation de ces dernières substances à la biosynthèse des phytostérols. Pour vérifier cette hypothèse, l'emploi des éléments marqués s'imposait. Les résultats des expériences de marquage que nous avons entreprises seront rapportées dans un prochain article.

(2) D'une façon générale, les tissus anergisés de Tabac ont montré des variations importantes dans la teneur de certaines substances par rapport à la plante d'origine. C'est ainsi qu'on ne peut déceler dans ces tissus ni chlorophylle, ni nicotine; par contre la scopolétine

⁴⁵ F. SONDEIMER et Y. MAZUR, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6293 (1958).

⁴⁶ R. L. ROWLAND, P. H. LATIMER et J. A. GILES, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4680 (1956).

y est très abondante⁴⁷ alors qu'elle n'existe chez *N. tabacum* que dans le racine.⁴⁸ Les tissus de Tabac représentent donc un matériel qui, dans les conditions de croissance utilisées, diffère métaboliquement de la plante d'origine. Son intérêt réside dans le fait qu'il est possible de contrôler strictement le milieu de culture sur lequel il pousse; on peut ainsi, en faisant varier la composition de ce milieu, modifier plus ou moins profondément le métabolisme des tissus cultivés *in vitro*. C'est ainsi que sur un milieu approprié, les tissus de Tabac forment de la chlorophylle.

Les tissus de Tabac peuvent donc représenter un matériel convenable pour l'étude de la variabilité des différents types de métabolisme dont la cellule végétale est le siège.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les Cultures de Tissus de Tabac

Des investigations préliminaires portant sur des tissus de Rosier, de Carotte, de Dioscorée, de Tabac, etc. nous ont convaincus que les tissus anergiés de Tabac étaient un matériel très favorable pour résoudre le genre de problèmes que nous nous étions posés.⁴⁹

Les tissus de Tabac utilisés ont été obtenus par l'un d'entre nous à partir de fragments de tige de *Nicotiana tabacum*, variété P-19. Cette souche, ainsi que les conditions de culture, ont été décrites par ailleurs.⁶ Rappelons cependant certains de ses caractères les plus remarquables. Il s'agit d'une souche anergiée insensible à l'auxine exogène et possédant des propriétés tumorales. Elle pousse sur un milieu synthétique et dépourvu d'acide β -indole-acétique (par litre: eau bi-distillée dans un appareil en quartz: 900 ml, solution minérale de Knop diluée 1/2 100 ml, saccharose: 35,5 g, aneurine: 10^{-3} g, gélose "Bacto Agar Difco": 12 g).

La grande simplicité du milieu de culture sur lequel poussent les tissus anergiés de Tabac nous a confirmés dans l'intention d'utiliser ce matériel. D'autres tissus contenant des stéroïdes exigent en effet pour croître, des milieux complexes dans lesquels figurent souvent du lait de coco contenant des substances organiques mal déterminées et pouvant être génératrices d'artefacts. Le caractère anergié des colonies utilisées, s'accompagne également de l'absence de toute organogénèse³.

Techniques d'Isolement et d'Identification des Stérols et des Triterpènes

Les tissus de Tabac sont prélevés et congelés puis lyophilisés. La suite des opérations conduisant à l'isolement des stérols comprend une extraction à l'éther de pétrole, une saponification, puis une ou plusieurs chromatographies sur colonne de la matière insaponifiable. L'absorbant est de la silice (Merck, Darmstadt, 0,05 à 0,020 mm) utilisée soit pure, soit imbibée de nitrate d'argent. L'éluant consiste en des proportions croissantes d'éther ou de benzène dans l'éther de pétrole.

La chromatographie en couche mince a été systématiquement utilisée tout au long du processus d'extraction; l'absorbant est de la silice Merck pour chromatographie en couche mince, utilisée soit pure soit imbibée de nitrate d'argent: l'éluant est généralement un mélange de cyclohexane et d'acétate d'éthyle en proportions variées. Les chromatoplaques ont été

⁴⁷ P. BENVENISTE, L. HIRTH, S. MUNAVALLI et G. OURISSON, *Compt. Rend.* **257**, 2704 (1963).

⁴⁸ L. J. DEWEY et W. STEPKA, *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 91 (1963).

⁴⁹ S. M. MUNAVALLI, Résultats non publiés.

⁵⁰ R. D. BENNETT et E. HEFTMANN, *Phytochem.* **4**, 475 (1965).

révélées, soit par l'acide sulfurique, soit par le réactif de Liebermann-Burchard (5 % H_2SO_4 dans l'anhydride acétique). Etant donné les très faibles quantités de produits dont nous disposons, la chromatographie en couche mince "fonctionnelle" a été largement utilisée³⁵. C'est ainsi que des acétylations, des époxydations, des oxydations chromiques ou par le tétr oxyde de ruthénium, etc... ont été effectuées dans des tubes capillaires scellés. Une fois la réaction terminée, le mélange réactionnel a été déposé sur une chromatoplaque en présence d'un témoin constitué par du produit n'ayant pas réagi. Par ailleurs, une technique de séparation très générale a été mise au point: elle consiste à acétyler d'abord les produits que l'on veut séparer, puis à traiter le mélange d'acétates obtenus par un excès d'acide p-nitroperbenzoïque. Dans ces conditions, on époxyde toutes les doubles liaisons et il se trouve que les époxydes obtenus sont plus facilement séparés par une chromatographie sur colonne ou en couche mince, tout au moins dans les séries triterpéniques et stéroïdes³⁶.

Par "traitement habituel", nous entendons une extraction des produits de réaction par l'éther de pétrole ou l'éther, des lavages acides ou alcalins suivant la nature de la réaction, un séchage sur sulfate de sodium et une évaporation sous vide. Les solvants utilisés tout au long de ce travail ont été distillés avant usage.

Les produits, isolés et purifiés par les techniques décrites, sont identifiés grâce à leurs constantes physiques, leurs caractéristiques spectrales et la formation de dérivés.

Les techniques physiques utilisées ont été la spectrographie infra-rouge (i.r.), la résonance magnétique nucléaire (RMN)* et surtout la spectrométrie de masse† particulièrement adaptée aux très faibles quantités de produits dont nous disposons. La chromatographie en phase gazeuse‡ nous a également permis d'analyser les mélanges de stérols.

Phytostérols

Extraction des phytostérols. Les cultures de tissus de Tabac lyophilisées (200 g de poids sec) sont extraites dans un soxhlet par l'éther de pétrole pendant 12 hr. Après évaporation du solvant, l'extrait brut (1,056 g) est saponifié par la potasse éthanolique (2 g de potasse dans 20 ml d'éthanol); la réaction est conduite pendant 4 hr sous azote et en présence de 50 mg 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. On obtient 386 mg d'insaponifiable.

L'insaponifiable est chromatographié sur une colonne de silice (25 g). L'élution est assurée par des proportions croissantes d'éther dans l'éther de pétrole. Des fractions de 25 ml sont collectées (Tableau 5).

Le produit D, recristallisé dans le méthanol donne des cristaux $F = 140-141$, $[\alpha]_D = -37^\circ$ (chloroforme).

Acétylation des phytostérols. Les phytostérols (produit D, 100 mg) sont acétylés par l'anhydride acétique (1 ml) dans la pyridine (5 ml) pendant une nuit. Après traitement habituel, on isole un acétate (100 mg) $F = 136$, $[\alpha]_D = -40^\circ$. Spectre i.r. .

$$(-\text{CH}=\text{CH}-) = 970 \text{ cm}^{-1}.$$

Spectre de RMN. 2 groupes méthyles à 0.91 et 1.00 ppm, protons vinyliques (1) à 5.38 ppm et (1/3) à 5.12 ppm. *Spectre de masse:* m/e 396, 396, 382 (pics moléculaires-60), m/e 255 (clivage de la chaîne latérale) et m/e 213 (clivage du cycle D).

* Les spectres de RMN ont été mesurés par M. F. Hemmert avec un appareil A-60, sur des solutions dans CDCl_3 , avec le TMS comme étalon interne.

† Les spectres de masse, mesurés sur spectromètre Atlas CH-4, sont dus à l'obligeance de M. H. E. Audier (I.C.S.N. Gif s/Yvette).

‡ Les chromatographies en phase gazeuse sont dues à l'obligeance du Dr. Highet (N.I.H., Bethesda, Md.).

TABLEAU 5

Ether de pétrole pur	Fractions 1-2	64 mg d'un produit A
1% d'éther dans l'éther de pétrole	Fractions 3-8	
2% d'éther dans l'éther de pétrole	Fractions 9-14	
5% d'éther dans l'éther de pétrole	Fractions 15-18	
10% d'éther dans l'éther de pétrole	Fractions 19-24	20 mg d'un produit B
15% d'éther dans l'éther de pétrole	Fractions 25-26	15 mg d'un produit C
30% d'éther dans l'éther de pétrole	Fractions 27-34	250 mg d'un produit D
Ether pur	Fractions 35-37	
10% de méthanol dans l'éther	Fractions 38-42	

Hydrogénation des acétates de phytostéryle: L'hydrogénation des acétates de phytostéryle (9,25 mg), effectuée dans l'acide acétique en présence d'oxyde de platine (32,9 mg), nécessite 0,65 ml d'hydrogène (1,2 équiv.). On obtient un mélange d'acétates (8 mg), test négatif au tétranitrométhane; après recristallisation dans le méthanol, $F = 131-133^\circ$. *Spectre de masse*: m/e 398 et 384 (pics moléculaires-60), m/e 257 (clivage de la chaîne latérale) et m/e 215 (clivage du cycle D).

Cycloarténol et Méthylène-24 cycloartanol

La substance B (15 mg) est acétylée; après traitement habituel, on obtient un acétate (15 mg). Cet acétate est chromatographié sur une colonne de silice (2 g) imbibée de 5% de nitrate d'argent. Des fractions de 10 ml sont collectées (Tableau 6).

TABLEAU 6

1-20% de benzène dans l'éther de pétrole	30 fractions	
30% de benzène dans l'éther de pétrole	10 fractions	6 mg d'un produit B1
40% de benzène dans l'éther de pétrole	5 fractions	4 mg d'un produit B2

Acétate de cycloartényle. L'acétate du produit B est recristallisé dans le méthanol: $F = 127-129^\circ$ (acétate de cycloartényle $F = 126-127^\circ$). *Spectre de masse*: pic moléculaire à m/e 468. *Spectre de RMN*: deux doublets de protons cyclopropaniques à 0,33 et 0,60 ppm, $J = 5$ Hz; groupes méthyles à 0,85, 0,90, 0,97, 1,60 et 1,68 ppm.

Acétate de méthylène-24 cycloartanyle. L'acétate du produit B2 est rechromatographié une deuxième fois. *Spectre de masse*: pic moléculaire à m/e 482. *Spectre infra-rouge*: ($>C=CH_2$) 890 cm^{-1} .

Méthyl-4 α -stigmastadiène-7,24-(28)-ol-3 β et Méthyl-4 α -ergostadiène-7,24-(28)-ol-3 β

La substance correspondant au pic C (15 mg) est recristallisée dans le méthanol ($F = 162-164^\circ$). *Spectre de masse*: m/e 426 et 412: pics moléculaires. La substance C est acétylée et l'acétate obtenu (10,8 mg) est chromatographié sur une colonne de silice (2 g) imbibée de nitrate d'argent. Des fractions de 10 ml sont collectées (Tableau 7).

Acétate de méthyl-4 α -stigmastadiène-7,24-(28)-yle-3 β . L'acétate du produit C est recristallisé dans le méthanol, $F = 141-143^\circ$ (échantillon du Dr. K. Schreiber $F = 142-144^\circ$). *Spectre de masse*: m/e 468 pic moléculaire, m/e 327 pic de base.

TABLEAU 7

5 et 10% de benzène dans l'éther de pétrole	10 fractions	
15% de benzène dans l'éther de pétrole	10 fractions	produit C1 (5,2 mg)
20% de benzène dans l'éther de pétrole	5 fractions	produit C2 (4 mg)

Acétate de méthyl-4 α -ergostadiène-7,24-(28)-yle-3 α . Spectre infra-rouge: ($>C=CH_2$) 890 cm^{-1} . Spectre de masse: m/e 454 pic moléculaire, m/e 327 pic de base.

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