

ÉTUDES SUR LES TRITERPÈNES PRÉCURSEURS DES PHYTOSTÉROLS. RECHERCHE DU CYCLOARTÉNOL ET DU LANOSTÉROL DANS DIVERSES ESPÈCES VÉGÉTALES*

J. D. EHRHARDT, L. HIRTH et G. OURISSON

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

(Reçu le 29 Décembre 1966)

Résumé—Le cycloarténol est décelé par son marquage après incorporation d'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$, dans les feuilles de Tabac, et dans les tissus cultivés *in vitro* d'*Agave toumeyana*, de *Dioscorea composita*, de ronce, d'endive et de carotte. Le lanostérol, la lanostadiénone, le lanostadiène ne peuvent être décelés dans ces conditions.

Abstract—Cycloartenol is labelled after incubating the following plant materials with $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetate: tobacco leaf-disks, and tissue cultures of *Agave toumeyana*, *Dioscorea composita*, bramble, endive and carrot. Lanosterol, lanostadienone and lanostadiene are not detectably labelled in these experiments.

INTRODUCTION

LE PROBLÈME de la biosynthèse des phytostérols comporte deux aspects différents : le premier concerne l'origine du squelette et de la chaîne latérale iso-octanique ; le second est relatif à l'origine de la ramifications habituellement présente en C-24.

Pour ce qui est de ce dernier aspect, grâce, entre autres, aux travaux des groupes de Nes,¹ de Lederer,² d'Arigoni,³ de Goodwin,⁴ on sait que le groupe alcoyle en C-24 provient du méthyle de la méthionine et le mécanisme intime de l'incorporation de ce fragment commence à être connu.

En ce qui concerne l'origine du système tétracyclique et de la chaîne latérale (non substituée en C-24), on a admis implicitement pour les végétaux supérieurs la validité de la séquence démontrée dans les tissus animaux ou dans les levures : formation de squalène, cyclisation en lanostérol, suivie de déméthylation en 4 et 14 (précédant ou suivant l'acoylation en C-24). Cette séquence n'a cependant pas été démontrée intégralement chez les végétaux supérieurs.

En utilisant du squalène radioactif comme précurseur, Bennett et Heftmann ont réussi à marquer le β -sitostérol des cotylédons de plantules de *Pharbitis nil* Chois.;⁵ avec de l'acide mévalonique $2\text{-}^{14}\text{C}$, ils marquent les stérols (β -sitostérol, stigmastérol, cholestérol) et les sapogénines stéroïques (diosgénine, yamogénine, corrélogénine, gentrogénine) de *Dioscorea spiculiflora* Hemsl.⁶ et, avec du cholestérol $4\text{-}^{14}\text{C}$, ils marquent les sapogénines de cette plante.⁷ Mais les intermédiaires entre squalène et stérols ne sont pas identifiés par ces expériences ; en particulier les triterpènes tétracycliques n'ont pas été étudiés.

* Travaux entrepris dans le cadre de la Recherche Coopérative sur programme No. 34 du C.N.R.S., intitulée : "L'utilisation des tissus végétaux cultivés *in vitro* pour l'étude des produits naturels."

¹ M. CASTLE, G. BLONDIN et W. R. NES, *J. Am. chem. Soc.* **85**, 3306 (1963).

² E. LEDERER, *Biochem. J.* **93**, 449 (1966) et références citées; V. R. VILLANUEVA, Thèse, Paris (1964).

³ S. BADER, L. GUGLIELMETTI et D. ARIGONI, *Proc. Chem. Soc.* 16 (1964).

⁴ L. J. GOAD, A. S. A. HAMMAM, A. DENNIS et T. W. GOODWIN, *Nature* **210**, 1322 (1966).

⁵ R. D. BENNETT et E. HEFTMANN, *Phytochem.* **4**, 475 (1965).

⁶ R. D. BENNETT, E. HEFTMANN, W. H. PRESTON et J. R. HAYN, *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 74 (1963).

⁷ R. D. BENNETT et E. HEFTMANN, *Phytochem.* **4**, 577 (1965).

Dans le cas des tissus de tabac cultivés *in vitro*, Benveniste et coll. ont montré⁸ que l'incorporation d'acétate radioactif est très rapide dans une fraction hydrocarbonée, identifiée au squalène; successivement se marquent les triterpènes, les méthyl-4 α -stérols et les phytostérols. La fraction triterpénique, dans laquelle était attendu le lanostérol (Ia), renferme son isomère, le cycloarténol (IIa), et le méthylène-24 cycloartanol (IIIa). La recherche du lanostérol dans ce matériel a été vaine, même avec des marquages intenses et de durée optimale. Bien sûr, l'absence de lanostérol en quantité décelable n'exclut pas qu'il puisse être un intermédiaire à renouvellement trop rapide pour être décelé. En outre, même si l'on admet l'absence totale de lanostérol, on peut supposer que son rôle est joué, soit par la lanostadiénone (Ib), soit par le lanostadiène (Ic). La cétone en 3 est cependant connue, dans les tissus animaux, comme n'étant *pas* un intermédiaire entre lanostérol et cholestérol.⁹ En ce qui concerne l'hydrocarbure, Barton et Moss¹⁰ ont réussi, en le prenant comme précurseur, à marquer le lanostérol de *Saccharomyces cerevisiae* de façon faible, mais décelable; ils suggèrent que la cyclisation du squalène pourrait se faire aussi sous l'action de " H^+ " et pas seulement de " OH^- " comme il est communément admis, et que l'hydroxylation en 3 pourrait suivre la cyclisation.* Cependant, ils n'ont pas réussi à détecter de lanostadiène marqué après incorporation d'acide mévalonique $2^{-14}C$.

Le travail que nous présentons ici tend à répondre aux questions suivantes:

1. l'absence de lanostérol en quantité décelable est-elle une particularité des tissus de tabac cultivés *in vitro*, ou bien vaut-elle pour la plante d'origine?
2. vaut-elle pour les tissus d'autres plantes, cultivés *in vitro*?
3. est-elle simplement due à la participation de lanostadiénone ou de lanostadiène à la biosynthèse des phytostérols, à la place du lanostérol?

Comme nous le verrons, nos résultats ne font que confirmer, sur divers matériaux, l'absence de quantités décelables de lanostérol et de ses équivalents oxydé ou réduit. Nous montrons d'une part que dans les feuilles de tabac, dans les tissus de *Dioscorea composita*, d'*Agave toumeyana*, de ronce, d'endive et de carotte cultivés *in vitro*, l'acétate est un précurseur du cycloarténol et du méthylène-24 cycloartanol, et d'autre part que la lanostadiénone et le lanostadiène ne sont pas marqués de façon décelables dans les tissus de tabac cultivés *in vitro*.

MÉTHODES

Tabac

On utilise des plants de *Nicotiana tabacum*, variété "Judy Pride", âgés de trois mois, cultivés en serre stérile.

Ces plants sont placés 12 hr à l'obscurité totale, puis exposés 6 hr à une lumière de 3000 lx; on prélève les feuilles et les découpe à l'emporte-pièces en disques d'environ 2 cm de diamètre. Ces disques sont alors posés à la surface d'une solution nutritive de Knop diluée de son volume d'eau, additionnée d'acétate $1^{-14}C$. On laisse incorporer pendant 6 hr.

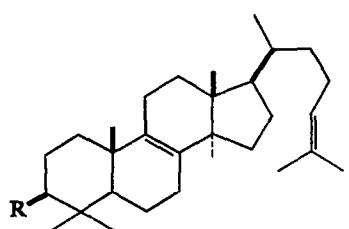
* Il a cependant été démontré par les groupes de Corey et de van Tamelen que l'époxyde de squalène était un intermédiaire normal dans le passage du squalène au lanostérol. Ceci n'exclut évidemment pas que d'autres voies soient utilisées concurremment.

E. J. COREY, W. E. RUSSEY, P. R. ORTIZ DE MONTELLANE, *J. Am. chem. Soc.* **88**, 4750 (1966); E. J. COREY et W. E. RUSSEY, *J. Am. chem. Soc.* **88**, 4751 (1966); E. E. VAN TAMELEN, J. D. WILLETT, R. B. CLAYTON et K. E. LORD, *J. Am. chem. Soc.* **88**, 4752 (1966).

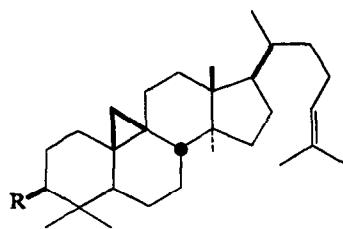
⁸ P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, *Phytochem.* **5**, 45 (1966).

⁹ K. BLOCH, *CIBA Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols*, p. 6 (1959).

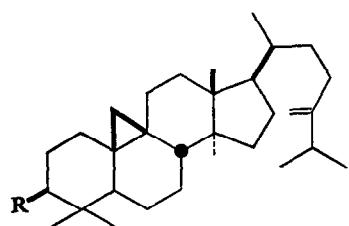
¹⁰ D. H. R. BARTON et G. P. MOSS, *Chem. Commun.* 261 (1966).



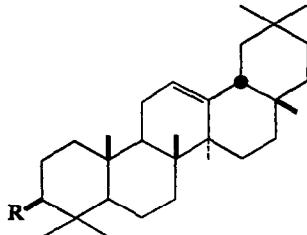
- (Ia) $R = \begin{smallmatrix} OH \\ | \\ H \end{smallmatrix}$
 (Ib) $R = \text{---O}$
 (Ic) $R = \begin{smallmatrix} H \\ | \\ H \end{smallmatrix}$
 (Id) $R = \begin{smallmatrix} OAc \\ | \\ H \end{smallmatrix}$



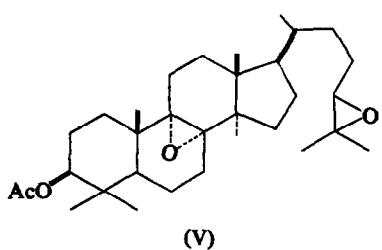
- (IIa) $R = \begin{smallmatrix} OH \\ | \\ H \end{smallmatrix}$
 (IIb) $R = \begin{smallmatrix} OAc \\ | \\ H \end{smallmatrix}$



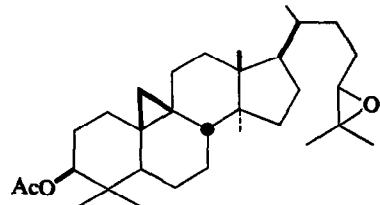
- (IIIa) $R = \begin{smallmatrix} OH \\ | \\ H \end{smallmatrix}$
 (IIIb) $R = \begin{smallmatrix} OAc \\ | \\ H \end{smallmatrix}$



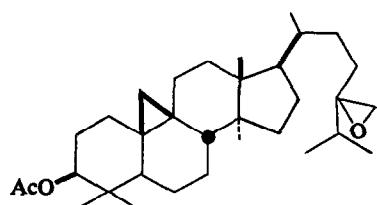
- (IVa) $R = \begin{smallmatrix} OH \\ | \\ H \end{smallmatrix}$
 (IVb) $R = \begin{smallmatrix} OAc \\ | \\ H \end{smallmatrix}$



(V)



(VI)



(VII)

Tissus Cultivés in vitro

Les tissus de tabac utilisés pour la recherche du lanostadiène et de la lanostadiénone sont cultivés selon Hirth;¹¹ ceux de *Dioscorea composita*, de ronce et de carotte, fournis par le Professeur Gautheret, sont cultivés sur milieu Heller,¹² ceux d'*Agave tourneyana* Trel., provenant du Dr. Tulecke, sur milieu White¹² et l'endive, dont la souche a été établie par M. Lutz, sur milieu Skoog.

Tous ces milieux sont additionnés de 1,2% de gélose pour les solidifier. Pour effectuer les incorporations, les tissus sont transférés aseptiquement sur milieu sans gélose, additionné d'acétate radioactif. Pendant toute la durée de l'incorporation, les cultures sont aérées par rotation mécanique dans des erlenmeyers placés sur un plateau (50 t/mn).

Isolement des Produits

Après incorporation, les feuilles ou les tissus sont prélevés, lavés, lyophilisés, extraits à l'éther de pétrole. Une chromatographie de l'extrait sur colonne de silice (feuilles de tabac) ou sur plaques préparatives permet de séparer, après addition d'entraîneurs, les fractions correspondant à la lanostadiénone, aux triterpènes, aux phytostérols.

Les triterpènes, rechromatographiés pour les débarrasser des méthyl-4 α -stérols, sont acétylés à froid par le mélange anhydride acétique-pyridine (1-1) et chromatographiés sur plaques de silice imprégnées de 10% de nitrate d'argent. Dans le cas de *Dioscorea composita*, cette technique permet de séparer les acétates de β -amyrine (IVb) et de méthylène-24 cycloartanol (IIb), et le mélange des acétates de cycloartényle et de lanostéryle (inséparables dans ces conditions) (Id et IIb).

Pour résoudre ce mélange, on en effectue l'époxydation par l'acide *p*-nitrobenzoïque dans l'éther,¹³ et on sépare les acétates-époxydes obtenus par chromatographie préparative sur couche de silice. Les acétates-époxydes obtenus (V, VI, VII) sont, soit rechromatographiés (feuilles de tabac), soit recristallisés dans le méthanol, et leur activité spécifique est mesurée.

Dans le cas des tissus de ronce, d'endive et de carotte, les triterpènes sont acétylés, purifiés par chromatographie sur silice (sans séparation), puis époxydés et chromatographiés. On sépare ainsi directement les triterpènes pentacycliques (non étudiés ici), le méthylène-24 cycloartanol, le cycloarténol et le lanostérol. Nous n'avons pas procédé, dans les cas de l'endive et de la carotte, à une recristallisation des acétates-époxydes de cycloarténol et de lanostérol; dans ces cas plus encore que dans les autres, seul le premier produit présente une activité notable (Tableau 1).

La fraction de *R*, correspondant à la lanostadiénone (étudiée sur des tissus de *N. tabacum*) est rechromatographiée, réduite au borohydrure de sodium, cochromatographiée avec du lanostérol entraîneur et recristallisée.

Recherche du Lanostadiène

Ce produit a même degré d'oxydation que le squalène qui s'accumule en anaérobiose;⁷ il était donc logique de penser que, dans ces conditions, on détecterait le plus facilement le lanostadiène ou éventuellement le cycloartène.

Les cultures de *Nicotiana tabacum* sont mises en milieu liquide; on fait barboter de l'azote stérilisé par des filtres "Millipore" pendant $\frac{1}{2}$ hr; puis on fait un vide partiel à la trompe à eau pendant quelques secondes, remet de l'azote et répète l'opération 5-6 fois. On rajoute l'acétate 1-¹⁴C (50 μ c) par une seringue munie d'un filtre "Millipore" pour stériliser la solution, à travers un diaphragme de caoutchouc. On laisse incuber 4 hr sous un faible courant d'azote. Pour éviter une aérobiose partielle par l'oxygène de l'air pendant le lavage des cultures, avant de prélever celles-ci on plonge le ballon fermé, pendant 20 mn, dans l'eau bouillante, de façon à tuer les cultures. Cette méthode a donné de très bons résultats (moins de 5% de produits actifs autres que les hydrocarbures par rapport à l'activité de l'extrait à l'éther de pétrole).

Après lyophilisation, extraction à l'éther de pétrole et addition de lanostadiène entraîneur,* on chromatographie dans le système cyclohexane-acétate d'éthyle (4-1); les hydrocarbures sont élusés et rechromatographiés avec du cyclohexane pur: on sépare ainsi nettement le lanosta-8,24-diène et le squalène.

RÉSULTATS

Recherche du Lanostérol

Nous avons rassemblé les résultats des différentes séries dans les deux tableaux suivants:

* Nous devons ce produit à l'obligeance du Dr. P. Pesnelle (Institut de Chimie, Strasbourg).

¹¹ L. HIRTH, Thèse, Paris (1958).

¹² R. J. GAUTHERET, *La Culture des Tissus Végétaux*, p. 12. Masson et Cie, Paris (1959).

¹³ G. PONSINET et G. OURISSON, *Phytochem.* 4, 799 (1965).

TABLEAU 1

	Feuille de Tabac [‡]	<i>D. composita</i>	<i>A. toumeyana</i>	Ronce	Endive	Carotte
Poids sec de matériel utilisé (g.)	—	2	0.45	0.85	0.60	0.70
Activité solution d'incorporation (μ c)	600	200	100	100	100	100
Activité extrait éther de pétrole (cpm)	4.1.10 ⁶	13.10 ⁶	3.8.10 ⁶	13.10 ⁶	15.10 ⁶	8.10 ⁶
Activité insaponifiable	1.8.10 ⁶	1.4.10 ⁶	0.3.10 ⁶	4.10 ⁶	6.10 ⁶	2.10 ⁶
Activité triterpènes purifiés	4.10 ⁴	1.7.10 ⁵	3.10*	4.10 ⁵	2.10 ⁴	4.5.10 ⁴
Activité phytostérols	2.10 ⁵	4.5.10 ⁵	5.4.10*	4.10 ⁵	3.5.10 ⁵	2.10 ⁵
Activité acétate de β -amyrine		1.4.10 ⁴		10 ^{5†}	3.7.10 ^{3†}	
Activité acétate de méthylène-24 cycloartanyl		8.10 ⁴		9.10 ^{4†}	3.10 ^{3†}	
Activité acétates de cycloartétyl et de lanostéryle	3.2.10 ⁴	3.4.10 ⁴	1.10 ⁴	* { 5.10 ^{4†}	* { 1.10 ^{4†}	* { 1.7.10 ^{4†}
				* { 2.10 ³	* { 6.10 ²	* { 5.10 ²

* { Acétate Epoxide de Cycloartényle.

† Acétate Epoxide de Lanostéryle.

† Produits isolés après époxidation.

Par marquage au méthylonate 2^{14}-C , on identifie dans les plants de tabac un grand nombre de substances, dont le cycloarténol, le méthylène-24 cycloartanol et la β -amyrine. Nous remercions le Dr. W. W. Reid (Sydney) de nous avoir communiquée cette information.

Dans le cas de *Dioscorea composita*, un spectre de masse nous avait indiqué la présence, en quantité importante, de β -amyrine (IVa) dans les triterpènes.* Il faut aussi remarquer la très forte activité du méthylène-24 cycloartanol par rapport à celle du cycloarténol, dans ce tissu. L'époxydation de la fraction "acétate de cycloartényle", suivie de chromatographie sur plaque, permet de séparer très facilement les acétates-époxydes de cycloartényle et de lanostéryle.

Le tableau 2 résume nos résultats.

TABLEAU 2

	Nombre de recristallisations	Feuille de tabac (cpm/mg)	<i>D. composita</i> (cpm/mg)	<i>A. tomentosa</i> (cpm/mg)	Ronce (cpm/mg)
Acétate-époxyde de cycloartényle	1	3 250	770	78	70
	2	3 600	710	85	69
	3		750	87	75
Acétate-époxyde de lanostéryle	1	250	33	10	20
	2	bruit de fond	bruit de fond	bruit de fond	5*

* Le sommet du pic de radioactivité, très faible, est ici légèrement décalé par rapport au pic de masse. Il doit s'agir d'une impureté faiblement marquée et de *R*, voisin de l'acétate-époxyde de lanostéryle.

Ces résultats sont nets et montrent que *par nos méthodes, nous ne détectons pas de lanostérol marqué*.

Recherche de la Lanostadiénone

La fraction contenant la lanostadiénone non active ayant été rechromatographiée successivement dans différents systèmes de solvants pour enlever les contaminants ne présente plus d'activité notable. Il en est de même du lanostérol obtenu comme indiqué ci-dessus (Méthodes). La lanostadiénone n'est donc pas décelable par nos méthodes. Notons d'ailleurs que la cycloarténone n'aurait pas été séparée de son isomère, et qu'elle n'est par conséquent pas non plus décelable.

Recherche du Lanostadiène

Alors que le squalène est très marqué ($5 \cdot 10^5$ c/mn), on détecte à peine 600 c/mn dans le lanostadiène brut isolé (activité spécifique 10 c/mn/mg par addition de 60 mg d'entraîneur); après recristallisation, cette activité spécifique tombe à environ 3 c/mn/mg; elle est trop faible pour avoir encore une signification.

CONCLUSION

Il semble donc que le lanostérol soit bien absent des tissus étudiés, ainsi que ses équivalents, l'hydrocarbure Ic ou la cétone Ib. Par contre, le cycloarténol et le méthylène-24 cycloartanol sont toujours détectés.

* Dans les autres cas, nous n'avons pas caractérisé les triterpènes pentacycliques, cochromatographiés avec la β -amyrine.

A première vue, ceci suggère que dans les plantes supérieures étudiées le cycloarténol pourrait remplacer le lanostérol dans la biosynthèse des phytostérols.*

Mais il se poserait alors le problème très important de l'ouverture du cyclopropane qui doit nécessairement mener à des produits insaturés que nous n'avons pas encore mis en évidence. Nous avons en route diverses expériences tendant à approfondir les problèmes métaboliques posés par la présence du cycloarténol et l'absence de lanostérol dans tous les systèmes que nous avons étudiés.

* Goad et Goodwin,¹⁴ se basant uniquement sur des expériences très voisines des nôtres, ont d'ailleurs postulé la chaîne: squalène, cycloarténol, méthylène-24 cycloartanol, cycloéucalénol, méthylène-24 lophénol, éthylidène-24 lophénol, β -sitostérol.

¹⁴ L. J. GOAD et T. W. GOODWIN, *Biochem. J.* **99**, 735 (1966).