

## SHORT COMMUNICATION

# SUR LA BIOSYNTHÈSE DES STÉROLS DU TABAC *NICOTIANA TABACUM* À PARTIR DU MÉTHYLÈNE-24 CHOLESTÉROL ET DU MÉTHYLÈNE-24 DIHYDROLANOSTÉROL

A. ALCAIDE,\* M. DEVYS, J. BOTTIN, M. FETIZON, M. BARBIER et E. LEDERER

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette, France

(Received 7 May 1968)

**Résumé**—Des précurseurs 24-méthyléniques ont été appliqués aux feuilles du tabac *Nicotiana tabacum* Wisconsin. Le méthylène-24 dihydrolanostérol  $22,23\text{-}^3\text{H}_3$  est incorporé dans les stérols en  $\text{C}_{29}$ , essentiellement dans le  $\beta$ -sitostérol. Par contre, le méthylène-24 cholestérol  $28\text{-}^{14}\text{C}$  ne subit pas de seconde méthylation, mais est hydrogéné en campesterol.

**Abstract**—Precursors with a 24-methylene group have been applied to the leaves of the tobacco *Nicotiana tabacum* Wisconsin. 24-methylene dihydrolanosterol- $22,23\text{-}^3\text{H}_3$  is incorporated into the  $\text{C}_{29}$  sterols, mainly  $\beta$ -sitosterol. A second methylation step has not been observed with 24-methylene cholesterol  $28\text{-}^{14}\text{C}$ , which is hydrogenated to campesterol.

## INTRODUCTION

Nous avons entrepris depuis quelque temps une série d'expériences *in vivo*, dans le but d'étudier les précurseurs éventuels des phytostérols en  $\text{C}_{28}$  et  $\text{C}_{29}$ . (On sait que les atomes de carbone 28 et 29 proviennent du méthyle de la méthionine<sup>1-6</sup>; pour des revues voir 7a et 7b.) Selon des résultats obtenus *in vitro* par Nes *et al.*,<sup>8</sup> les enzymes de méthylation seraient peu exigeants quant à la structure chimique du système tétracyclique, la présence d'une insaturation en position 24 paraissant seule indispensable. Dans une expérience précédente,<sup>9</sup> effectuée sur les feuilles de l'épinard *Spinacea oleracea*, nous avons observé une incorporation d'un méthylène-24 dihydrolanostérol  $23,25\text{-}^3\text{H}_3$  dans un stérol en  $\text{C}_{29}$ : l' $\alpha$ -spinastérol.

Ayant dernièrement synthétisé un méthylène-24 cholestérol  $28\text{-}^{14}\text{C}$ <sup>10</sup> (I) nous avons voulu voir si ce stérol pouvait aussi subir une seconde méthylation *in vivo*. Nous avons

\* Boursier de la Fondation March (Madrid).

<sup>1</sup> L. W. PARKS, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2023 (1958).

<sup>2</sup> A. J. BIRCH, dans *Chemical Plant Taxonomy* (édité par T. SWAIN), p. 162, Academic Press, N.Y. (1963).

<sup>3</sup> M. CASTLE, G. BLONDIN et W. R. NES, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3306 (1963).

<sup>4</sup> H. J. NICOLAS et S. MORIARTY, *Fed. Proc.* **22**, 199 (1963).

<sup>5</sup> S. BADER, L. GUGLIELMETTI et D. ARIGONI, *Proc. Chem. Soc.* **16** (1964).

<sup>6</sup> V. R. VILLANEUVA, M. BARBIER et E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1423 (1964); dans *Beiträge zur Biochemie und Physiologie von Naturstoffen*, K. Mothes Festschrift, VEB G. Fischer Verlag, Jena, 509 (1965).

<sup>7a</sup> E. LEDERER, *Biochem. J.* **93**, 449 (1964); *Israel J. Med. Sci.* **1**, 1129 (1965).

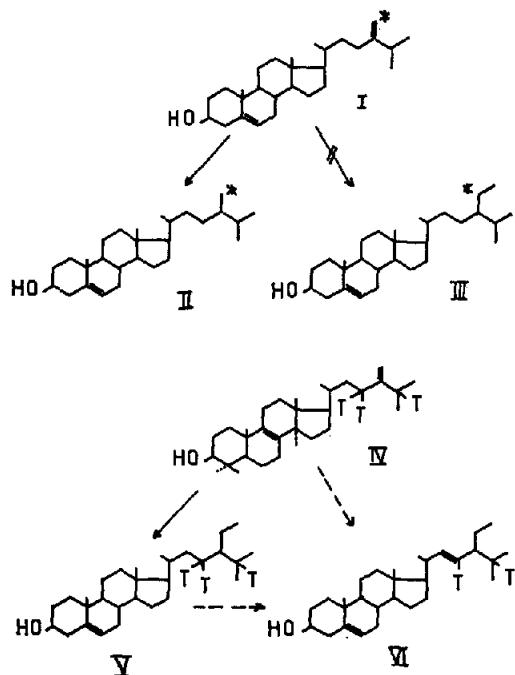
<sup>7b</sup> R. B. CLAYTON, *Quart. Rev.* **19**, 201 (1965).

<sup>8</sup> M. CASTLE, G. A. BLONDIN et W. R. NES, *J. Biol. Chem.* **242**, 5796 (1967). P. T. RUSSELL, R. T. VAN ALLER et W. R. NES, *idem*, 5802.

<sup>9</sup> M. DEVYS, A. ALCAIDE, M. BARBIER et E. LEDERER, *Phytochem.* **7**, 613 (1968).

<sup>10</sup> J. BOTTIN et M. FETIZON, résultats non publiés.

utilisé à cet effet le tabac *Nicotiana tabacum* Wisconsin.\* Nous avons constaté l'absence d'incorporation de ce précurseur dans les stérols en C<sub>29</sub> (III); cette substance est hydrogénée en campesterol (II) par cette plante.



A la suite de ce résultat, nous avons tenu à répéter sur le tabac l'expérience d'incorporation du méthylène-24 dihydrolanostérol 22,23-<sup>3</sup>H<sub>3</sub> (IV). De même que pour l'épinard, *Spinacea oleracea*, ce précurseur est incorporé dans les stérols en C<sub>29</sub> (dans ce cas, principalement dans le  $\beta$ -sitostérol V).

#### RESULTATS ET DISCUSSION

Les précurseurs radioactifs ont été, comme précédemment,<sup>9</sup> déposés en solution éthérée sur les feuilles de pieds de tabac *Nicotiana tabacum* Wisconsin. Après plusieurs jours d'incubation, les stérols ont été isolés par chromatographies sur colonne et sur couches minces.<sup>9,11</sup> Les résultats des incorporations sont reportés dans le Tableau 1. Dans l'expérience avec le méthylène-24 cholestérol 28-<sup>14</sup>C (I), on retrouve 0,3 pour cent de la radioactivité de départ dans le campesterol (II) (incorporation pratiquement nulle dans les stérols en C<sub>29</sub>). A partir du méthylène-24 dihydrolanostérol 23,25-<sup>3</sup>H<sub>3</sub> (IV), une incorporation d'environ 0,16 pour cent a été obtenue dans les stérols en C<sub>29</sub> (principalement le  $\beta$ -sitostérol (V)); l'incorporation dans les stérols en C<sub>28</sub>, très faible dans ce cas, n'a pu être détermi-

\* Nous remercions Monsieur J. P. Nitsch (Laboratoire du Phytotron, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette) qui nous a fourni ce matériel.

<sup>11</sup> M. Devys, A. Alcaide et M. Barbier, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1968, sous presse.

TABLEAU 1. RESULTATS DES INCORPORATIONS\*

	Précursors			
	Méthylène-24 cholestérol 28- <sup>14</sup> C 3,5. 10 <sup>6</sup> c/mn		Méthylène-24 dihydrolanostérol 22,23- <sup>3</sup> H <sub>3</sub> 6. 10 <sup>6</sup> c/mn	
	Poids	Radioactivités totales	Poids	Radioactivités totales
Extrait total (éthanol et éther)	3,6 g	3. 10 <sup>6</sup> c/mn		
Insaponifiable	0,4 g	3. 10 <sup>6</sup> c/mn	0,1 g	4,5. 10 <sup>6</sup> c/mn
Acides totaux	0,120 g	6. 10 <sup>2</sup> c/mn	0,016 g	7. 10 <sup>4</sup> c/mn
Stérols, après séparation du précurseur	0,008 g	2. 10 <sup>4</sup> c/mn	0,004 g	1. 10 <sup>4</sup> c/mn

\* Mesurées avec un appareil à Scintillation Nuclear Chicago, Mark I, de rendement 47 pour cent.

minée avec précision. L'incorporation de radioactivité est faible, mais non négligeable dans le stigmastérol (VI). Nous avons pu faire une remarque semblable au cours de l'étude de la conversion du stigmastène-7 ol-3 $\beta$  en  $\beta$ -sitostérol chez ce même végétal.<sup>11</sup> Ce phénomène ne peut se comprendre que si l'on admet une création "a posteriori" de la double liaison en 22; ceci serait en accord avec des constatations précédentes de Bennett et Heftmann;<sup>12</sup> (Waters et Johnson<sup>13</sup> n'ont cependant pas observé la transformation du  $\beta$ -sitostérol (V) en stigmastérol (VI), et vice versa, chez le soja *Soja hispida*).

Nous constatons donc, que dans les conditions utilisées, la seconde étape de C-méthylation conduisant aux phytostérols en C<sub>29</sub> s'effectue de préférence sur un alcool triterpénique. Le système étudié ici est donc plus spécifique que celui (*in vitro*) de Nes *et al.*<sup>8</sup> Nous ne pouvons préciser si ces méthylations ont effectivement lieu sur un alcool triterpénique du type lanostérol, ou cycloarténol, ou sur des homologues inférieurs partiellement démethylés; (rappelons que le lanostérol n'est habituellement pas présent en quantités décelables dans les végétaux supérieurs — exception faite du latex des euphorbes.<sup>14</sup>)

La réduction de la double liaison 24(28) du méthylène-24 cholestérol montre que les végétaux supérieurs ont bien, comme nous l'avions supposé,<sup>15</sup> la possibilité d'hydrogénérer la chaîne latérale au stade stérol. Une publication récente de Patterson et Karlander<sup>16</sup> indique d'ailleurs que l'algue *Chlorella ellipsoidea* peut réduire l'insaturation de la chaîne latérale du fucostérol.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### Analyse des Stérols des Feuilles du Tabac *Nicotiana tabacum Wisconsin*

Cette analyse, effectuée par spectrométrie de masse, par chromatographie sur couches minces et en phase gazeuse sur colonne de cérite imprégnée de silicone SE 30 1 pour cent, a fait l'objet d'une précédente note.<sup>11</sup> Selon les résultats de ces analyses on trouve: cholestérol 8,7 pour cent, campestérol 28 pour cent, stigmastérol 48,8 pour cent,  $\beta$ -sitostérol 14,4 pour cent (précision  $\pm 10$  pour cent).

<sup>12</sup> R. D. BENNETT et E. HEFTMANN, *Arch. Biochem. Biophys.* 103, 74 (1963).

<sup>13</sup> J. A. WATERS et D. F. JOHNSON, *Arch. Biochem. Biophys.* 112, 387 (1965).

<sup>14</sup> G. PONSINET et G. OURISSON, *Phytochem.* 6, 1235 (1967).

<sup>15</sup> M. F. HUGEL, W. VETTER, H. AUDIER, M. BARBIER et E. LEDERER, *Phytochem.* 3, 7 (1964).

<sup>16</sup> G. W. PATTERSON et E. P. KARLANDER, *Plant Physiol.* 42, 1651 (1967).

### Incorporation des Précurseurs Radioactifs

Ces précurseurs ont été déposés en solution éthérrée à la surface des feuilles comme précédemment indiqué.<sup>11</sup> Les incubations ont été poursuivies 15 jours dans le cas du méthylène-24 cholestérol 28-<sup>14</sup>C et 11 jours dans celui du méthylène-24 dihydrolanostérol tritié. Nous reportons dans le Tableau 1 les résultats des extractions et isolements des stérols, réalisés suivant des techniques déjà publiées.<sup>9,11</sup>

### Incorporation du Méthylène-24 Cholestérol 28-<sup>14</sup>C

Le précurseur a été séparé des autres stérols par chromatographie sur couche mince d'alumine imprégnée de AgNO<sub>3</sub>. On utilise un mélange de 30 g d'alumine (Fluka 2 microns), 10 g de CaSO<sub>4</sub> tamisé et 10 g de AgNO<sub>3</sub>. On développe par le système CHCl<sub>3</sub>-éther de pétrole-acétone 19:6:3 et on observe les plaques en u.v. après aspersion avec une solution acétonique de rhodamine. Dans ces conditions, le méthylène-24 cholestérol a un *R*<sub>f</sub> de 0,45 et les autres stérols 4-5 un *R*<sub>f</sub> de 0,70. Cette purification a été répétée deux fois (radioactivité inchangée).

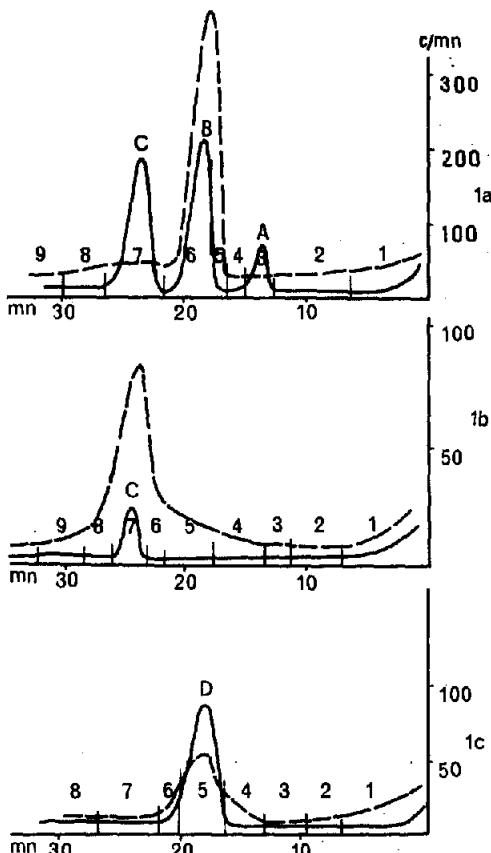


FIG. 1. ANALYSES DES PROPIONATES DE STÉROL PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.  
 1a. PROPIONATES DE STÉROL 4-5 MONO-INSATURÉS APRÈS INCORPORATION DE MÉTHYLÈNE-24 CHOLESTÉROL 28-<sup>14</sup>C.  
 1b. PROPIONATES DE STÉROL 4-5 MONO-INSATURÉS APRÈS INCORPORATION DE MÉTHYLÈNE-24 DIHYDROLANOSTÉROL 23,25-<sup>3</sup>H<sub>3</sub>.  
 1c. PROPIONATES DE STÉROL 4-5 DI-INSATURÉS APRÈS INCORPORATION DE MÉTHYLÈNE-24 DIHYDROLANOSTÉROL 23,25-<sup>3</sup>H<sub>3</sub>.

A—Propionate de cholestérol; B—Propionate de campestérol (II); C—Propionate de  $\beta$ -sitostérol (V);  
 D—Propionate de stigmastérol (VI).

— : Courbe enregistrée par le chromatographe.

— — — : Courbe de la radioactivité (les chiffres 1 à 10 indiquent les fractions recueillies à la sortie et dont la radioactivité a été mesurée).

Les stérols ainsi récupérés ont été séparés en deux groupes: mono-insaturés et di-insaturés par chromatographie préparative sur couche mince de leurs propionates;<sup>11, 17, 18</sup> cette séparation des propionates s'effectue sur plaques d'alumine imprégnées de  $\text{AgNO}_3$  en développant par le système hexane-benzène 10:1. Nous avons obtenu, à partir de 5 mg de propionates, 1,2 mg de stigmastérol ( $R_f$  0,40) de radioactivité nulle et 1,3 mg du mélange des stérols A-5 mono-insaturés (cholestérol, campestérol,  $\beta$ -sitostérol) ( $R_f$  0,50), radioactivité:  $6.10^3$  c/mn. Suivant une technique précédemment utilisée,<sup>11</sup> nous avons continué l'étude des stérols A-5 mono-insaturés par chromatographie en phase gazeuse (voir Fig. 1a). On constate que toute la radioactivité du mélange est située dans le campestérol.

*Incorporation du Méthylène-24 Dihydrolanosterol 23,25- $^3\text{H}_2$*

Cette expérience, dont les résultats figurent dans le Tableau 1, a été conduite de façon semblable à la précédente. On a terminé la purification par une chromatographie sur couche mince d'alumine imprégnée de  $\text{AgNO}_3$  (conditions de séparation des stérols A-5 et A-7);<sup>11</sup> notons cependant que nous n'avons pas observé la présence de quantités décelables de stérols A-7. Nous avons ainsi recueilli 2,8 mg de stérols de radioactivité totale  $6.10^3$  c/mn. Comme ci-dessus, nous avons ensuite fractionné ces stérols en deux groupes par chromatographie de leurs propionates sur couche mince d'alumine imprégnée de nitrate d'argent;<sup>11, 17, 18</sup> à cet effet, on a ajouté 1 mg de propionate de  $\beta$ -sitostérol pur et 1,5 mg de propionate de stigmastérol pur [échantillons préparés selon<sup>17</sup>]. On a récupéré 2 mg de la région de  $R_f$  0,40 (stigmastérol) et 1 mg de la région de  $R_f$  0,50 (mono-insaturés) (radioactivités respectives:  $5.10^2$  et  $1.10^3$  c/mn). Ces échantillons ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse comme ci-dessus, [voir aussi<sup>11</sup>]. Les dilutions effectuées avec des propionates de stérols authentiques non radioactifs ont eu pour effet d'effacer des analyses la présence des propionates de cholestérol et de campestérol (Fig. 1b). Nous avons, en conséquence, tenu à répéter cette analyse par chromatographie en phase gazeuse sur les stérols libres du mélange original, après addition de cholestérol authentique. Cette répétition permet de vérifier l'absence totale de radioactivité au niveau du cholestérol. La chromatographie en phase gazeuse du propionate de stérols di-insaturés (Fig. 1c) permet de vérifier la présence de radioactivité dans le stigmastérol.

<sup>17</sup> J. CLAUDE, *J. Chromatog.* 17, 596 (1965).

<sup>18</sup> J. P. ALLAIS et M. BARBIER, 2<sup>e</sup>me Symposium Intern. de Chimie Analytique sur la Chromatographie sur couche mince appliquée aux aliments, Paris (1967).