

# BIOSYNTHÈSE DE L' $\alpha$ -SPINASTÉROL À PARTIR DU MÉTHYLÈNE-24 DIHYDROLANOSTÉROL PAR L'ÉPINARD *SPINACEA OLERACEA*

MICHEL DEVYS, ANTONIO ALCAIDE, MICHEL BARBIER et EDGAR LEDERER

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

(Reçue 8 Novembre 1967)

**Résumé**—Après application de méthylène-24[23,25- $^3\text{H}_3$ ] dihydrolanostérol (I) à des feuilles d'épinard *Spinacea oleracea*, on isole un mélange de stérols radioactifs contenant environ 42 pour cent d' $\alpha$ -spinastérol (II). Cette expérience confirme qu'une substance ayant un méthylène en 24 peut être le substrat de la deuxième étape de la C-méthylation, conduisant à la chaîne latérale éthylidène, ou éthyle des phytostérols.

**Abstract**—After applying 24-methylene[23,25- $^3\text{H}_3$ ] dihydrolanosterol (I) to the leaves of spinach, *Spinacea oleracea*, a mixture of labelled sterols containing  $\alpha$ -spinasterol (II) (ca. 42 per cent) was isolated. This experiment confirms that a compound with a 24-methylene group can be the substrate for the second C-methylation step leading to the ethylidene or ethyl side-chains of phytosterols.

## INTRODUCTION

LES ATOMES de carbone 28 et 29 des phytostérols proviennent du méthyle de la S-adénosyl-méthionine;<sup>1-6</sup> pour des revues, voir.<sup>7a,b</sup> Cependant, dans le cas des végétaux supérieurs, il ne semble pas que l'on connaisse le précurseur sur lequel portent ces C-méthylation. Selon des expériences réalisées *in vitro* par Nes et ses collaborateurs,<sup>8</sup> l'enzyme de méthylation serait peu spécifique, seule la présence d'une insaturation en position 24 étant indispensable. Ainsi, des précurseurs en C<sub>27</sub> comme le desmostérol, en C<sub>30</sub> comme le lanostérol ou le cycloarténol (et leurs divers produits de déméthylation partielle) pourraient conduire à des dérivés 24-méthylène, -méthyle, -éthylidène ou -éthyle.

Il est admis que des composés 24-méthyléniques sont les intermédiaires sur lesquels porte la seconde C-méthylation<sup>3,5,6</sup>, mais aucune preuve expérimentale ne semble encore avoir été fournie.

Ayant à notre disposition un échantillon de méthylène-24[23,25- $^3\text{H}_3$ ] dihydrolanostérol (I),\* nous avons voulu voir si cette substance pouvait être transformée en stérols par des

\* Nous remercions très vivement le Dr. M. Akhtar (Université de Southampton) de nous avoir fourni ce précurseur.

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

<sup>2</sup> A. J. BIRCH, dans T. SWAIN éditeur, *Chemical Plant Taxonomy*, 162, Academic Press, New York (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. VILLANUEVA, 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).

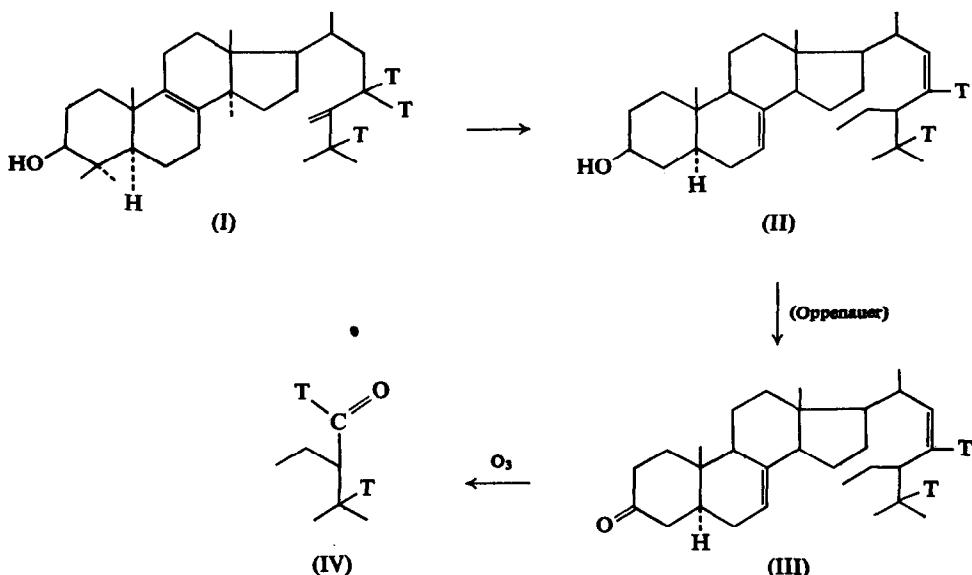
<sup>7a</sup> E. LEDERER, *Biochem. J.* **93**, 449 (1964); *Israel J. Med. Sci.* **1**, 1129 (1965).

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

<sup>8</sup> M. CASTLE, G. A. BLONDIN et W. R. NES, sous presse. P. T. RUSSELL, R. T. VAN ALLER et W. R. NES, sous presse.

feuilles d'épinard, *Spinacea oleracea*. L' $\alpha$ -spinastérol (II) a précédemment été isolé de ce végétal.<sup>9-11</sup> La présence d'une double liaison en 22 devait permettre des dégradations ultérieures de ce stérol.

### RÉSULTATS ET DISCUSSION



#### Analyse des Stérols d'Épinard

Dans une phase préliminaire de notre travail, nous avons analysé les stérols de la feuille de l'épinard, *Spinacea oleracea*. Ces stérols montrent une réaction de Moore et Baumann<sup>12</sup> fortement positive, caractéristique d'une insaturation en 7. Les analyses ont été effectuées par la spectrométrie de masse des acétates de stérols, d'une part; d'autre part, nous avons séparé en deux groupes, par chromatographie sur couche mince, les cétones-3  $\Delta$ 7 et cétones 3  $\Delta$ 4 (pourcentages approximatifs: 90 et 10 pour cent). Les cétones-3  $\Delta$ 7 analysées par spectrométrie de masse, contiennent environ 47 pour cent d'une substance dont la masse moléculaire et la chaîne latérale sont identiques à celles d'une 5 $\alpha$ -stigmastadiène-7,22 one-3 (III). 43 pour cent sont représentés par une substance ayant deux hydrogènes de plus dans la chaîne latérale (5 $\alpha$ -stigmastène-7 one-3).\*

Selon ces analyses le mélange de stérols isolé contient environ 42 pour cent d' $\alpha$ -spinastérol (II).

#### Incorporation du Précurseur Radioactif

Des feuilles d'épinard sur pied ont été aspergées avec une solution éthérée de méthylène-24[23,25-<sup>3</sup>H<sub>3</sub>] dihydrolanostérol. Après 15 jours, les stérols ont été isolés et cristallisés jusqu'à radioactivité constante. Nous reportons dans le Tableau 1 les résultats obtenus.

\* Il y a également 10 pour cent de cétones-3  $\Delta$ 7 en C<sub>27</sub> et C<sub>28</sub>.

<sup>9</sup> M. C. HART et F. W. HEYL, *J. Biol. Chem.* **95**, 311 (1932).

<sup>10</sup> D. H. R. BARTON et J. D. COX, *J. Chem. Soc.*, 1354 (1948).

<sup>11</sup> L. F. FIESER, M. FIESER et R. N. CHAKRAVARTI, *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 2226 (1949).

<sup>12</sup> P. R. MOORE et C. A. BAUMANN, *J. Biol. Chem.* **195**, 615 (1952).

TABLEAU 1. RÉSULTATS DE L'INCORPORATION DU MÉTHYLÈNE-24[23,25<sup>3</sup>H<sub>3</sub>] DIHYDROLANOSTÉROL DANS LES STÉROLS DE L'ÉPINARD *Spinacea oleracea*

	mg	F.	Radioactivité
Précureur: méthylène-24[23,25 <sup>3</sup> H <sub>3</sub> ] dihydrolanostérol	1		1,8 × 10 <sup>7</sup> c/min*
Extrait total	39.900		10 <sup>7</sup> c/min*†
Lipides solubles dans l'acétone	6.250		10 <sup>7</sup> c/min*†
Insaponifiable	1.160		8.10 <sup>6</sup> c/min*
Acides	1.000		5.10 <sup>5</sup> c/min*
Stérols bruts	150		390 c/min/mg
1ère cristallisation	100 F. 142-146°		400 c/min/mg
2ème cristallisation	80 F. 142-146°		410 c/min/mg
3ème cristallisation	55 F. 142-146°		400 c/min/mg

\* Radioactivité totale de la fraction en question.

† Ces mesures sont approximatives, la forte coloration de ces fractions ne permettant pas un comptage précis.

La réaction d'Oppenauer,<sup>13</sup> effectuée sur les stérols recristallisés, a conduit à un mélange de cétones Δ4 et Δ7, qui a été séparé par chromatographie sur couche mince. L'ozonisation des cétones (contenant III et le dérivé correspondant à chaîne latérale saturée) permet d'isoler la dinitro-2,4 phénylhydrazone de l'éthyle-2 méthyle-3 butyraldéhyde (IV). Ce dérivé a été isolé par chromatographie sur couche mince et cristallisé jusqu'à radioactivité constante; on le sépare ainsi de petites quantités de dinitro-2,4 phénylhydrazones, très faiblement radioactives, de l'acétone, de la formaldéhyde et de l'acétaldéhyde, correspondant à la présence de stérols possédant en 24 un isopropylidène, un méthylène, ou un éthylidène. Nous reportons, dans le Tableau 2, les radioactivités de la cétone (III) et de la dinitro-phénylhydrazone de (IV).

TABLEAU 2. RÉSULTATS DE LA DÉGRADATION DE LA CHAÎNE LATÉRALE DE L' $\alpha$ -SPINASTÉROL

	mg	Radioactivités	
		c/min/mg	c/min/mM × 10 <sup>-5</sup>
Stérols utilisés	23	400	~1,6
Cétones-3 Δ7 (Oppenauer)	15	400	~1,6
Éthyle-2 méthyle-3 butyraldéhyde (dinitro-2,4 phénylhydrazone)	7,5	390	~1,09
Id.—			
1ère recristallisation	4	400	~1,1
Id.—			
2ème recristallisation	2,5	400	~1,1

Environ 0,3 pour cent de l'activité de départ a été incorporée dans les stérols de l'épinard *Spinacea oleracea*. (Notons qu'un tritium en position 23 est perdu, par suite de la création

<sup>13</sup> C. MEYSTERE, H. FREY, R. NEHER, A. WETTSTEIN et K. MIESCHER, *Helv. Chim. Acta* **29**, 627 (1946).

d'une double liaison en 22-23.) La dégradation de la chaîne latérale permet de retrouver environ 70 pour cent de la radioactivité de l' $\alpha$ -spinastérol dans la dinitro-2,4 phénylhydrazone de l'éthyle-2 méthyle-3 butyraldéhyde (IV). Il n'y a donc aucun doute que l'épinard peut utiliser le méthylène-24 dihydro lanostérol (I) pour la biosynthèse des stérols en C<sub>29</sub>.

Etant donné que l'on sait que les réactions enzymatiques concernant la chaîne latérale des stérols (par exemple, la saturation de la double liaison en 24 au cours de la biosynthèse du cholestérol,<sup>14</sup> la C-méthylation de la chaîne latérale en C-24<sup>8</sup>) ne sont pas spécifiques, ces expériences ne prouvent pas que la voie naturelle de biosynthèse des phytostérols dans les épinards passe obligatoirement par le méthylène-24 dihydrolanostérol (I).

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### *Etude des Stérols de la Feuille d'Épinard Spinacea oleracea*

Cette étude a été effectuée sur un matériel non radioactif. Les feuilles broyées ont été successivement extraites par l'éthanol et l'éther. L'extrait total a été repris par l'acétone à chaud. Les lipides solubles dans l'acétone ont été saponifiés par la potasse 6 N. Les stérols bruts sont obtenus par chromatographie sur colonne d'acide silicique de la fraction insaponifiable, suivant la technique habituelle.<sup>15, 16</sup> Les fractions présentant une réaction de Liebermann positive sont cristallisées dans le méthanol. Les stérols obtenus fondent à 142-146°,\* ce point de fusion n'est pas modifié par les cristallisations successives. (L' $\alpha$ -spinastérol pur fond, selon les auteurs, entre 167 et 175°.<sup>9-11</sup>) La chromatographie sur couche mince d'acide silicique dans le système pentane-acétate d'éthyle 7:3 montre deux taches contiguës de  $R_f$  0,50 et 0,55, révélables par le chlorure d'antimoine, ou par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

La réaction de Moore et Baumann<sup>12</sup> caractéristique des stérols Δ7 est fortement positive. L'analyse par spectrométrie de masse a porté sur les acétates d'une part (préparés par action de l'anhydride acétique en présence de pyridine, 72 h. à 20°), et sur les cétones-3 d'autre part. Ces cétones-3 ont été préparées par oxydation selon Oppenauer<sup>13</sup> et séparées en cétones-3 Δ4 et Δ7 par chromatographie préparative sur couche mince d'acide silicique (système pentane-acétate d'éthyle 85:15  $R_f$ : Δ7 cétones-3:0,75 Δ4 cétones-3:0,57; révélation de témoins latéraux par une solution de chlorhydrate de dinitro-2,4 phénylhydrazine). Nous avons obtenu 90 pour cent de cétones-3 non conjugués et 10 pour cent de cétones-3 conjugués; (contrôle par la mesure des spectres u.v. en solution éthanolique.  $\lambda_{\text{max}}$  240 m $\mu$ ,  $\epsilon$ =17.000 pour les cétones-3 Δ4).

### *Résultats de la Spectrométrie de Masse des Acétates†*

On constate la présence de pics moléculaires à m/e 456 et à m/e 454 et de pics à m/e 396 et 394 d'intensités sensiblement égales dans chaque groupe. On observe aussi des pics de faible intensité à m/e 440 et 442, à 380 et 382. Le mélange contient donc principalement des stérols en C<sub>29</sub> dont les chaînes latérales sont comparables à celles du stigmastérol ( $M=454$  M-60=394) et du β-sitostérol ( $M=456$  M-60=396); cette constatation est vérifiée par les fragmentations ultérieures de ces ions. L'existence de pics de masse intenses est en faveur de l'absence de double liaison en 5 dans une partie de ces stérols; (les acétates de stérols Δ-5 fournissent quantitativement les ions à M-60). La comparaison des hauteurs des pics à m/e=454 et 456 indique que le mélange contient approximativement 50 pour cent d' $\alpha$ -spinastérol ( $M=454$ ); (voir ci-dessous la confirmation de cette évaluation).

### *Résultats de la Spectrométrie de Masse des Cétones-3 Δ7*

La spectrométrie de masse effectuée sur les cétones-3 Δ7 montre la présence d'environ 47 pour cent d'une substance donnant un pic de masse indentique à celui de la stigmastadiène-7, 22 one-3 (correspondant à l' $\alpha$ -spinastérol) à m/e=410. On observe la présence d'environ 43 pour cent d'une substance à m/e 412 possédant 2H de plus dans la chaîne latérale. De plus, environ 10 pour cent de cétones correspondant aux stérols en C<sub>27</sub> et C<sub>28</sub> mono-et diinsaturés sont présents. Ces résultats montrent donc la présence d'environ 42 pour cent d' $\alpha$ -spinastérol dans le mélange (47 pour cent des stérols Δ7, qui représentent 90 pour cent des stérols totaux Δ7 et Δ5).

\* Les points de fusion sont mesurés avec l'appareil Kofler, et sont corrigés.

† Mesures effectuées sur des appareils Atlas CH<sub>4</sub> et MS 9; température d'injection: 220°. Nous remercions le Dr. B. C. Das, ainsi que MM. Cosson et Varenne, pour la mesure de ces spectres.

<sup>14</sup> M. E. DEMPSEY, *J. Biol. Chem.* **240**, 4176 (1965).

<sup>15</sup> M. BARBIER, M. F. HÜGEL et E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**, 91 (1960).

<sup>16</sup> M. F. HÜGEL, Thèse de Dr. Ingénieur, Paris (1964).

*Incorporation*

1 mg de méthylène-24[23,25- $^3\text{H}_3$ ] dihydrolanostérol de radioactivité  $18 \cdot 10^6$  c/min a été déposé en solution dans 15 ml d'éther sur les feuilles de 20 pieds d'épinard *Spinacea oleracea*, variété Viroflay.\* Les asperisons ont été poursuivis pendant 5 jours et l'on a attendu ensuite 15 jours. Les résultats des extractions effectuées ci-dessus sont reportés dans le Tableau 1. On a recristallisé les stérols jusqu'à radioactivité constante.†

*Dégredations*

Ces dégradations ont été réalisées sur les cétones-3  $\Delta 7$  isolées comme ci-dessus. La réaction d'Oppenauer<sup>13</sup> sur 23 mg de stérols a conduit à 15 mg de cétones-3  $\Delta 7$  de radioactivité 400 c/min/mg.

L'ozonisation a été effectuée en solution dans l'acide acétique à 18°. Après réduction des ozonides en présence de poudre de zinc, on a entraîné les aldéhydes par la vapeur d'eau, (en recueillant dans une solution de chlorhydrate de dinitro-2,4 phénylhydrazine.<sup>6</sup> Les dinitro-2,4 phénylhydrazone‡ obtenues ont été chromatographiées sur couche mince dans le système pentane-éther 8:2; on observe 4 taches jaunes dont les  $R_f$  correspondent à ceux des dinitro-2,4 phénylhydrazone de la formaldéhyde, acétaldéhyde, acétone, éthyle-2 méthyle-3 butyraldéhyde. Ces dérivés ont été isolés par chromatographie préparative sur couche mince dans les mêmes conditions. On a ainsi obtenu 7,5 mg de dinitro-2,4 phénylhydrazone de l'éthyle-2 méthyle-3 butyraldéhyde IV (390 c/min/mg). On a cristallisé ce dérivé dans le méthanol et obtenu 4 mg de cristaux F. 210-212° (un échantillon authentique fond à 211-214°), radioactivité: 400 c/min/mg. Une seconde cristallisation fournit 2,5 mg de radioactivité 400 c/min/mg, F=210-212° (voir Tableau 2).

Au cours de la chromatographie préparative des dinitro-2,4 phénylhydrazone, on a isolé environ 2 mg de chacun des dérivés de la formaldéhyde, acétaldehyde et acétone (poids en produits bruts). La radioactivité de ces substances se situait vers 30 c/min/mg (valeur à la limite de la sensibilité de l'appareil); cette radioactivité s'est montrée invariable au cours de 4 chromatographies préparatives sur couche mince.

\* Nous remercions Mr. J. P. Nitsch, qui a bien voulu faire cultiver ce matériel au Phytotron du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette.

† Les radioactivités ont été mesurées sur un appareil à scintillation Nuclear Chicago, Mark I.

‡ La détermination des radioactivités des dinitro-2,4 phénylhydrazone a fait intervenir une correction suivant une courbe de rendement, établie sur des mélanges de dinitro-2,4 phénylhydrazone de l'éthyle-2 méthyle-3 butyraldéhyde authentique avec un échantillon de méthylène-24[23,25- $^3\text{H}_3$ ] dihydrolanostérol de radioactivité connue. Dans les conditions de nos mesures, les rendements de l'appareil se situent entre 20 et 35 pour cent.