

SHORT COMMUNICATION

LA BIOSYNTHÈSE DES STÉROLS DANS LES TISSUS DE TABAC
CULTIVÉS *IN VITRO**

MISE EN ÉVIDENCE DU CYCLOEUCALÉNOL ET DE L'OBTUSIFOLIOL

P. BENVENISTE

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

(Received 29 November 1967)

Résumé—Le cyclooeucalénol (I) et l'obtusifoliol (II) sont identifiés grâce à un marquage intense et bref à l'acide acétique $1\text{-}^{14}\text{C}$. Ces deux substances pourraient être des intermédiaires dans la biosynthèse des stérols dans les plantes supérieures.

Abstract—Cyclooeucalenol (I) and obtusifoliol (II) have been identified in tobacco tissues grown *in vitro*. It is suggested that these two products might be intermediates in the biosynthesis of sterols in higher plants.

Nous avons montré précédemment^{1,2} que la fraction triterpénique de nombreux végétaux, notamment de tissus divers cultivés *in vitro*, contenait le cycloarténol et le méthylène-24 cycloartanol. Aucun autre triterpène tétracyclique n'a pu être identifié dans cette fraction; en particulier, le lanostérol et le méthylène-24 lanostérol, que l'on pensait devoir être des intermédiaires dans la biosynthèse des phystostérols, n'ont pu être décelés malgré l'utilisation de méthodes analytiques sensibles, faisant appel à des marquages intenses.

Ces résultats suggèrent que le cycloarténol pourrait jouer dans les végétaux étudiés, ainsi que l'avaient déjà proposé Schreiber et Osske,³ un rôle parallèle à celui du lanostérol dans le foie de rat ou les champignons unicellulaires. Goad et Goodwin⁴ ont confirmé ces résultats dans de nombreuses autres plantes et les ont complétés en identifiant en outre le cyclooeucalénol (I). Ils ont ainsi été amenés à proposer un schéma biosynthétique précis, dans lequel le méthylène-24 cycloartanol serait d'abord démethylé en cyclooeucalénol (I); l'ouverture du cycle 9:10:19, apparemment indispensable pour permettre la perte du méthyle en C-14, pourrait alors s'effectuer pour donner notamment l'obtusifoliol (II), substance identifiée précédemment dans le latex d'*Euphorbia obtusifolia*.⁵ La déméthylation en C-14

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

² J. D. EHRHARDT, L. HIRTH et G. OURISSON, *Phytochem.* 6, 815 (1967).

³ H. VON ARDENNE, G. OSSKE, K. SCHREIBER, K. STEINFELDER et R. TUMMLER, *Kulturpflanze* 13, 101 (1965).

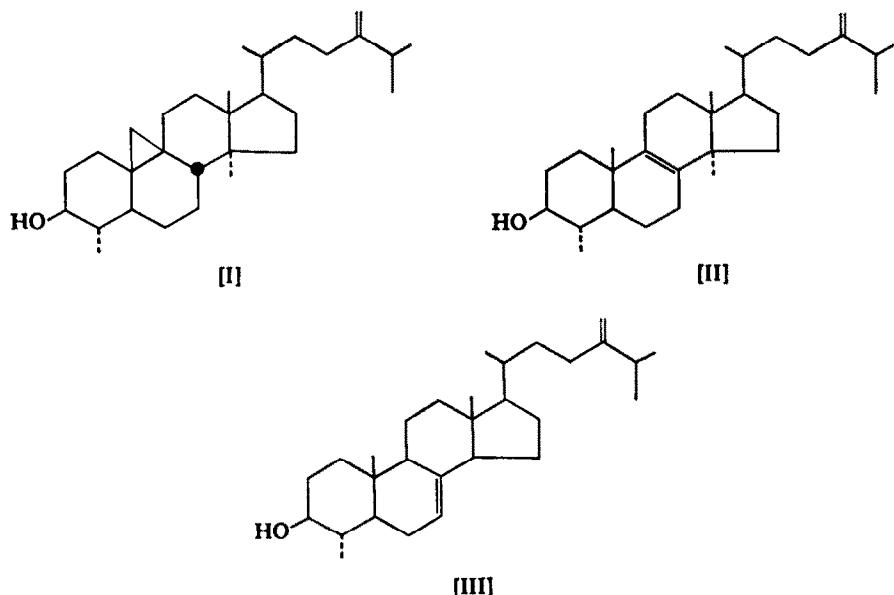
⁴ L. J. GOAD et T. W. GOODWIN, *European J. Biochem.* 1, 357 (1966).

⁵ J. BERMEJO BARRERA, J. L. BRETÓN, J. DELGADO MARTÍN et A. G. GONZALÉS, *An. Real Soc. Esp. Fis. Quim.* 63, 191 (1967).

* Ce travail a été entrepris dans le cadre d'une action conjointe, aidée par les sections de Biologie cellulaire et de Chimie organique du CNRS ultérieurement transformée en R.C.P. no. 34, intitulée: "L'utilisation des tissus végétaux cultivés *in vitro* pour l'étude des produits naturels".

donnerait ensuite le méthylène-24 lophéhol, que nous avions isolé dans les tissus de Tabac, et que Goad et Goodwin ont retrouvé dans leur matériel. L'identification récente de l'obtusifolol (II) par ces mêmes auteurs⁶ constituait alors un solide argument en faveur de ce schéma.

Il était important de vérifier si la fraction des "méthyl-4 stérols", dont nous avions précédemment isolé le méthylène-24 lophénol (III) et son homologue éthylidénique, contenait également le cycloecualénol (I) et l'obtusifoliol (II).



PARTIE EXPÉRIMENTALE ET RÉSULTATS

Les tissus de Tabac anergiés cultivés *in vitro* ont été décrits précédemment.⁷ Les techniques d'utilisation des éléments marqués, ainsi que les techniques d'extraction, de séparation et d'identification des terpénoides, ont été décrites dans des articles précédents.^{1,2} En ce qui concerne la mesure de la radioactivité des substances isolées, nous avons d'une part utilisé un lecteur de chromatogrammes Berthold, et d'autre part un spectromètre à scintillation liquide Packard.

On procéde pendant 60 mn à une incubation de 12 cultures de tissus de Tabac (20 g de poids frais) dans un milieu contenant 200 μ C (0,3 mg) d'acide acétique 1- 14 C (40 mC/mM). Après extraction à l'éther de pétrole des tissus lyophilisés, on ajoute à l'extrait brut 1 mg de cycloéucalénol et 1 mg d'obtusifolol non radioactifs. On saponifie le tout pendant 1 h. La matière insaponifiable est chromatographiée en couche mince dans des conditions permettant de séparer les "diméthyl-4,4 stérols" et les "méthyl-4 stérols" d'avec les stérols proprement dits. Comme les "diméthyl-4,4 stérols" sont beaucoup plus radioactifs que les "méthyl-4 stérols", on rechromatographie les "méthyl-4 stérols" avec des "diméthyl-4,4 stérols" non radioactifs afin d'éliminer toute contamination due à ces derniers. Les "méthyl-4 stérols" ainsi purifiés sont acétylés; les acétates obtenus sont purifiés par chromatographie puis époxydés dans des conditions déjà décrites.^{1,8} Le mélange des acétates-époxydes est chromatographié en couche mince. La répartition de la radioactivité sur les chromatogrammes est indiquée sur la Fig. 1. On voit 4 pics principaux. Le pic A est chromatographiquement identique à l'acétate-époxyde du cycloéucalénol. Le pic B correspond à une substance inconnue. Le pic C est chromatographiquement identique à l'acétate-diépoxyde de l'obtusifolol. Enfin le pic D correspond au mélange des acétates-diépoxydes du méthylène-24 lophénol et de l'éthyldène-24 lophénol.

⁶ L. J. GOAD, B. L. WILLIAMS et T. W. GOODWIN, *European J. Biochem.* 3, 232 (1967).

⁷ L. HIRTH, Thèse Dr. ès-Sci., Paris (1958).

⁸ G. PONSINET et G. OURISSON, *Phytochem.* **4**, 799 (1965).

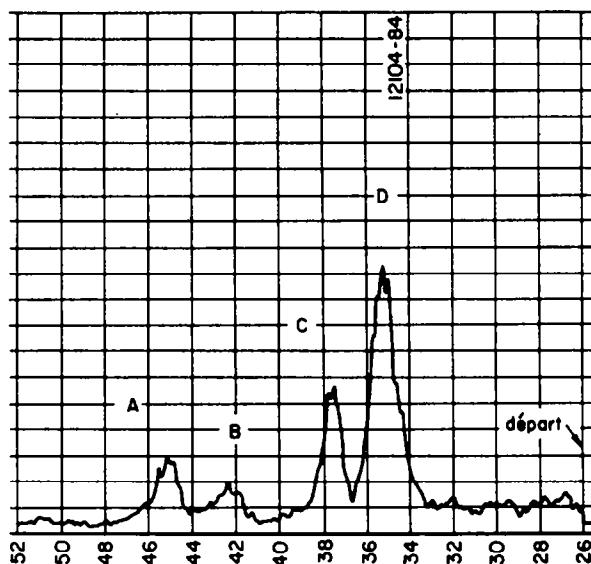


FIG. 1. SÉPARATION DES ACÉTATES-ÉPOXYDES DE "MÉTHYL-4 STÉROLIS".

Les acétates-époxydes du cycloéucalénol et de l'obtusifoliol, repérés par fluorescence après aspersion de berbérine, sont élus et rechromatographiés sur une plaque analytique Merck (2 migrations avec le solvant: acétate d'éthyle: 10; cyclohexane: 90). Les pics de radioactivité obtenus sont superposables aux bandes obtenues après révélation à la berbérine, ce qui prouve l'identité des substances radioactives avec, respectivement, les acétates-époxydes du cycloéucalénol et de l'obtusifoliol.

Enfin, on élue une 2ème fois ces substances et on leur ajoute respectivement 50 mg d'acétate-époxyde du cycloéucalénol froid et 40 mg d'acétate-diépoxyde de l'obtusifoliol. On recristallise jusqu'à activité spécifique constante (Tableau 1).

TABLEAU 1

Substance	Recristallisations (cpm/mg)					
	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}	5 ^{ème}	6 ^{ème}
Acétate-époxyde du cycloéucalénol	121 ± 5	128 ± 5	124 ± 5	104 ± 5	119 ± 5	116 ± 5
Acétate-diépoxyde de l'obtusifoliol	187 ± 8	174 ± 8	185 ± 8	198 ± 8		

CONCLUSION

Le cycloéucalénol et l'obtusifoliol sont donc présents dans notre matériel. Leur identification a été effectuée grâce à l'utilisation d'acide acétique à haute activité spécifique; la concentration stationnaire de ces nor-triterpènes semble très faible et leur activité spécifique est probablement élevée.

La suite complète des intermédiaires de la séquence biosynthétique de Goad et Goodwin⁶ est ainsi présente dans les tissus de Tabac cultivés *in vitro*. Ce résultat, à lui seul, ne constitue pas une preuve directe de l'intervention réelle de ce schéma, mais lui confère une vraisemblance encore plus grande.

Remerciements—Je remercie Messieurs T. J. King et A. G. Gonzales pour m'avoir aimablement fourni du cycloéucalénol et de l'obtusifoliol.